116
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"

DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS CAPSULARES Y CITOTOXICOS DE *Pasteurella haemolytica* EN SUERO DE CAPRINOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

GILBERTO VAZQUEZ CHAME

ASESOR: M. V. Z. PhD. FRANCISCO TRIGO TAVERA
ASESOR: M. V. Z. FRANCISCO MORALES ALVAREZ
ASESOR M. V. Z. HECTOR M. SANCHEZ MEJORADA P.

CUAUTITLAN IZCALLI, MEX. 1987

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LISTA DE CONTENIDO: Pág.

RESUMEN 1

INTRODUCCION 2

OBJETIVO 7

MATERIAL Y METODOS 8

Recolección de muestras 8

Preparación de la citotoxina 8

Suspensión de leucocitos de sangre periférica de bovino 9

Ensayo simple visual para la determinación de anticuerpos anticitotoxina de Pasteurella haemolytica 9

Preparación de eritrocitos sensibilizados para la prueba de hemoaglutinación indirecta 10

Prueba de hemoaglutinación indirecta para la determinación de anticuerpos anticápsula de Pasteurella haemolytica 10

Análisis de datos 11

RESULTADOS 16

DISCUSION 23

CONCLUSIONES 24

LITERATURA CITADA 26

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS Pág.

FIGURA 1. Diagrama de flujo para obtención de la citotoxina de *Pasteurella haemolytica* y preparación de las células blanco para le ensayo simple visual 11

FIGURA 2. Diagrama de flujo del ensayo simple visual para la determinación de anticuerpos anticitotoxina de *P. haemolytica* 12

FIGURA 3. Diagrama de flujo para la preparación de eritrocitos sensibilizados con *Pasteurella haemolytica* para la prueba de hemoaglutinación indirecta 13

FIGURA 4. Diagrama de flujo de la prueba de hemoaglutinación indirecta para la determinación de anticuerpos anticápsula de *P. haemolytica* 14

CUADRO 1. Reacción cruzada de los antisueros de conejo contra los serotipos homólogos y heterólogos de *P. haemolytica* por hemoaglutinación indirecta 17

CUADRO 2. Determinación de anticuerpos anticitotoxina y anticápsula de *P. haemolytica* en suero de cabras por estados 18

CUADRO 3. Determinación de anticuerpos anticitotoxina y-

anticápsula de P. haemolytica en suero de cabras importadas y criollas 19

CUADRO 4. Títulos promedio ($\bar{X}$) de anticuerpos anticápsula de P. haemolytica en suero de cabras 20

CUADRO 5. Títulos de anticuerpos anticitotoxina de P. haemolytica en sueros de cabras por estados.... 21

DETERMINACION DE ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS CAPSULARES Y CITOTOXICOS DE *Pasteurella haemolytica* EN SUERO DE CAPRINOS.

R E S U M E N

El presente trabajo fue realizado para determinar la prevalencia de los diversos serotipos de *Pasteurella haemolytica* y la presencia de anticuerpos anticitotoxina en suero de caprinos. Se evaluaron 977 sueros de caprinos de varios estados de la República Mexicana, de diferente raza y función zootécnica. Los títulos de anticuerpos anticitotoxina se determinaron mediante un ensayo simple visual en microplaca. Los anticuerpos anticápsula contra los serotipos de *P. haemolytica* se determinaron mediante la prueba de hemoaglutinación indirecta utilizando como antígenos una bateria con los 12 serotipos de referencia de *P. haemolytica*. Los resultados mostraron la existencia de una variedad amplia de serotipos de *P. haemolytica* donde destacan el A2, A6, A11, A1 y A5. Además se demostró la importancia de la inmunogenicidad de la citotoxina ya que se encontró un porcentaje alto de animales con títulos de anticuerpos específicos contra la citotoxina de *P. haemolytica*. El haber determinado los serotipos mas comunes de *P. haemolytica* en caprinos y la antigenicidad de la citotoxina puede ser importante para realizar una profilaxis adecuada contra la enfermedad causada por esta bacteria.

I N T R O D U C C I O N

Los problemas neumónicos en los animales domésticos son considerados de suma importancia a nivel mundial, debido a las pérdidas económicas que ocasionan por el retraso en el crecimiento de los animales, la pérdida de peso y el tratamiento específico contra la enfermedad (1, 20).

Estudios realizados en México destacan la importancia de las neumonías en becerros, ya que clínicamente la incidencia y prevalencia alcanza hasta un 24% en la etapa de lactancia (3). Por otro lado, el 39% de los corderos que fueron sometidos a necropsia en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM durante 1983, presentaron lesiones neumónicas de intensidad moderada y severa (36). Un estudio realizado en el rastro de Ferrería de la ciudad de México, donde se obtuvieron muestras de pulmones de becerros demostró que el 8.7% mostraban lesiones neumónicas, siendo las neumonías exudativas las mas importantes, además existió una relación estadística significativa entre el aislamiento de bacterias del género Pasteurella con la presencia de neumonía exudativa (35).

Pasteurella haemolytica es el agente mas comunmente asociado a problemas neumónicos de rumiantes (1). La primera información de esta bacteria se hizo en 1921, donde se aisló el germen de rumiantes, y en 1932 se propuso el nombre de P. haemolytica

(5, 22). Es una bacteria gram (-), de forma cocobacilar, inmóvil, capsulada, oxidasa (+), indol (-), aeróbica y anaeróbica facultativa; crece en agar Mc Conkey y en medios enriquecidos como agar sangre y agar chocolate. Produce hemólisis beta, el crecimiento en caldo es difuso y no sobrevive mucho tiempo (5, 22). Se han reconocido 12 serotipos por hemoaglutinación indirecta, de acuerdo a antígenos solubles capsulares. Estos antígenos son principalmente polisacáridos o lipopolisacáridos con alta capacidad antigénica y juegan un papel importante en la virulencia de la bacteria,ya que pueden darle características antifagocíticas. Asimismo, se han designado los biotipos A y T de acuerdo a características morfológicas y bioquímicas de la bacteria. El biotipo T fermenta la trealosa y el biotipo A la arabinosa (5). Los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12 corresponden al biotipo A que produce neumonía y septicemia en corderos y neumonía en borregos adultos. Los serotipos 3, 4 y 10 al biotipo T,causante de septicemia en adultos (8, 34). Recientemente se han descubierto otros tres serotipos, el A13, A14 y T15 pero son considerados de poca importancia debido a su baja patogenicidad (32). Tambien se ha demostrado que P. haemolytica produce una sustancia soluble en fase logarítmica de crecimiento, que es tóxica para leucocitos, considerándose como un factor de virulencia y patogenicidad (4, 16, 28, 29, 37), sin embargo no hay variaciones significativas en cuanto a su producción entre serotipos ni biotipos (32). La citotoxina

de P. haemolytica es soluble en agua, consta principalmente de dos fracciones; una proteica y un carbohidrato, es sensible a la tripsina debido al componente proteico esencial, su actividad citotóxica óptima es a 37°C y se inhibe a 4°C, es estable a pH de 2 a 12, resiste el calor hasta 60°C. (34)

Pasteurella haemolytica forma parte de la flora normal de las vias respiratorias altas (2, 14, 15, 25, 26), se desconoce el mecanismo por el cual se desencadena la enfermedad respiratoria. Se menciona que los factores predisponentes desempeñan un papel importante, por ejemplo las condiciones ambientales adversas como la temperatura baja, humedad alta, ventilación deficiente y contaminación atmosférica, aunados a mala alimentación, higiene deficiente y transportaciones prolongadas pueden favorecer la enfermedad. Estos factores inhiben de una u otra forma los mecanismos de defensa del pulmón (17). La asociación con otros agentes como adenovirus o Mycoplasma ovipneumoniae, pueden inducir la proliferación de la bacteria y por lo tanto el desarrollo de la enfermedad, ya que estos agentes actuan primariamente lesionando y disminuyendo los mecanismos de defensa del aparato respiratorio permitiendo el establecimiento de estas bacterias en el tejido pulmonar (10, 18, 21). Además, la citotoxina de P. haemolytica puede jugar un papel importante, ya que ejerce un efecto negativo sobre los principales mecanismos de defensa del pulmón, especialmente sobre los

macrófagos alveolares y neutrófilos, ocasionando inhibición de su capacidad fagocítica, de la respuesta inmune subsecuente y de la inducción de la inflamación como consecuencia de la lisis de estas células (4, 11, 16, 19, 28, 29, 30, 33, 37).

La neumonía causada por P. haemolytica, por lo general se caracteriza por ser una pleurobronconeumonía fibrinosa de curso agudo o sobreagudo que puede manifestarse como septicemia (7).En México no existe información acerca de la prevalencia de los agentes involucrados en la neumonía de caprinos, especialmente de P. haemolytica y sus serotipos, los estudios que existen son exclusivamente de bovinos y ovinos donde los serotipos mas comunmente encontrados fueron el A5, A6 y A1 en bovinos y el A6, A7 y A8 en ovinos (23, 27). Al revisar la literatura de estudios realizados en otros países se encontró un informe donde se menciona que el serotipo predominante en cabras fue el A11 (24).

El conocimiento de los serotipos predominantes de P. haemolytica en México y el determinar la importancia inmunológica de la citotoxina, puede ser importante para la profilaxis adecuada de la enfermedad respiratoria en cabras causada por esta bacteria.

En la actualidad la práctica de la bacterinización contra P. haemolytica en los caprinos de México, se lleva a cabo en un

número reducido de explotaciones, utilizándose una bacterina común para ovinos y caprinos, sin saber a ciencia cierta que serotipos estan contenidos en las bacterinas comerciales.

O B J E T I V O

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos anticitotoxina y anticápsula de los diversos serotipos de P. haemolytica en suero de caprinos en México.

MATERIAL Y METODOS

RECOLECCION DE MUESTRAS. Se evaluaron un total de 977 muestras de un banco de sueros de caprinos; de los cuales 857 eran animales importados y 120 criollos, los animales estaban clínicamente sanos provenientes de varias explotaciones de nueve estados de la República Mexicana con considerable población caprina, distribuídas de la siguiente forma: Chihuahua 239 sueros; Coahuila 193; - Guanajuato 86; Guerrero 19; México 223; Michoacán 51; Nuevo León 59; Querétaro 22 y Sonora 85 sueros. Entre estos se encontraban animales de diferente raza y función zootecnica.

PREPARACION DE LA CITOTOXINA (Figura 1). La citotoxina se obtuvo de Pasteurella haemolytica serotipo 1 biotipo A aislada de un pulmón neumónico de becerro holstein, sacrificado en el rastro de - Tlalnepantla, estado de México. La citotoxina se obtuvo durante la fase logarítmica de crecimiento, para lo cual se incubó P. haemolytica durante 18 horas a 37 C en agar sangre y posteriormente en caldo de infusión cerebro-corazón+ durante 4.5 horas en movimiento constante. Al finalizar este período que correspondía al inicio de la fase logarítmica, se centrifugó a 3000 G por 20 minutos en una centrifuga con unidad refrigerante, el sobrenadante se decantó y el paquete de bacterias fue resuspendido en medio - RPMI-1640++ suplementado con 7% de suero fetal bovino. Se incubó por una hora a 37 C en movimiento constante. El cultivo se centrifugó a 3500 G durante 15 minutos y el sobrenadante se esteri-

+Bioxon de México, S.A., México.

++Laboratorios NUNC, México.

lizó por filtración en membrana de 0.22 μm y fue envasado en viales para posteriormente ser titulado y liofilizado. El título alcanzado por la citotoxina fue determinado mediante una modificación al ensayo simple visual (13).

SUSPENSION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE BOVINO (Figura 1). Se utilizó un bovino adulto clínicamente sano, el cual fue sangrado por punción en la vena yugular con equipo vacutainer heparinizado+. Los eritrocitos fueron lisados por choque hipotónico con agua destilada, la lisis se detuvo después de 15 segundos adicionando solución salina fosfatada (SSF) concentrada 2X en una cantidad similar a la de agua destilada agregada. La suspensión se centrifugó a 1500 G por 10 minutos, el sobrenadante se decantó y al paquete celular se le repitió la lisis hipotónica. Las células fueron lavadas una vez por centrifugación con SSF a 1500 G y la concentración de células por ml se determinó mediante conteo directo en cámara cuentaglóbulos de Newbauer, ajustándose la concentración de células en RPMI-1640 a 1×10^6 células por ml (13).

ENSAYO SIMPLE VISUAL PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE Pasteurella haemolytica (Figura 2). Esta prueba se fundamenta en la capacidad que tiene el suero (título de anticuerpos) para neutralizar la citotoxina de P. haemolytica utilizando como células blanco leucocitos de sangre periférica de bovino. La prueba consistió en hacer diluciones dobles de cada uno de los sueros a probar con SSF en una placa de microtitulación

---

+Becton-Dickinson, S.A., México.

de 96 pozos. Realizada la dilución del suero se agregó la citotoxina de P. haemolytica y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, en seguida se añadió la suspensión de leucocitos y se incubó una hora a 37 C; al finalizar este período, las placas se centrifugaron a 500 G por 5 minutos, a cada pozo se le adicionó formalina amortiguada al 10%, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron las placas con cristal violeta al 1% durante 5 minutos, lavándose finalmente las placas con agua de la llave. La observación de un fondo azul en los pozos indicaba la presencia de células teñidas y por lo tanto, un resultado positivo a la existencia de anticuerpos que fueron capaces de neutralizar la citotoxina de P. haemolytica. Un fondo claro indicaba ausencia de anticuerpos, por lo que la citotoxina quedaba libre y ejercía su efecto sobre las células "blanco". Para cada ensayo se utilizaban sueros controles positivos y negativos (13).

PREPARACION DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS PARA LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA (Figura 3). Fueron utilizados 12 serotipos (cepas) de referencia de P. haemolytica. Cada serotipo a probar fue crecido en caldo infusión cerebro-corazón por 18 horas a 37 C en agitación constante, después de este período se realizó una tinción de Gram para verificar la presencia de cápsula y la de posibles contaminantes. El cultivo fue calentado a 56 C durante 30 minutos. Se adicionaron eritrocitos de bovino lavados previamente tres veces con SSF, de tal forma que quedara una suspensión de eritrocitos al 2%. Se incubó durante una hora en Baño María a 37 C para facilitar la adsorción de la bacteria a los eritrocitos y al finalizar este período la mezcla fue lavada ---

tres veces por centrifugación con SSF y finalmente el sobrenadante se eliminó y el paquete de eritrocitos sensibilizados se resuspendió al 0.5% con solución salina fosfatada formalinizada al -- 0.3% (6).

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE Pasteurella haemolytica (Figura 4). Se realizaron diluciones dobles con cada uno de los sueros a probar con SSF en placas de microtitulación de fondo en "U" de 96 pozos, se agregaron los eritrocitos sensibilizados con P. haemolytica - del serotipo a probar y se incubó por dos horas a 37 C. Al finalizar este período se realizó una primera lectura y se incubaron las placas durante toda la noche a temperatura ambiente para realizar posteriormente la segunda lectura de las placas (12). Se -- realizó la prueba de hemoaglutinación indirecta con antisueros -- homólogos y heter-ologos de P. haemolytica obtenidos por inoculación en conejos para observar posibles reacciones cruzadas entre serotipos y así poder eliminar falsos positivos.

ANALISIS DE DATOS. Se obtuvieron las medias aritmética y geométrica de los títulos de anticuerpos de los 12 serotipos de P. haemolytica. Se realizó un estudio de correlación entre los títulos - de anticuerpos anticápsula de los 12 serotipos de P. haemolytica y los títulos de anticuerpos anticitotoxina, siendo los títulos anticápsula la variable independiente y los anticitotoxina la variable dependiente.

FIGURA 1. DIAGRAMA DE FLUJO PARA OBTENCION DE LA CITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* Y PREPARACION DE LAS CELULAS BLANCO PARA EL ENSAYO SIMPLE VISUAL.

Crecimiento de *Pasteurella haemolytica* en agar sangre 18 horas a 37 C

↓

Cultivo en BHI 4.5 hrs a 37 C, movimiento constante

↓

Centrifugación a 3000 G 20 min

↓

Resuspensión en RPMI-1640, 7% de suero fetal bovino

↓

Incubación 1 hora a 37 C movimiento constante

↓

Centrifugación a 3000 G 20 min

↓

Esterilización del sobrenadante (citotoxina) por filtración en membrana 0.22 μm

↓

Titulación mediante ensayo simple visual

↓

Envasado y liofilizado

Obtención de sangre heparinizada de bovino

↓

Hemólisis hipótonica con agua destilada

↓

Detener lisis con SSF 2X

↓

Centrifugar a 300 G 10 min

↓

Repetir lisis hipótonica

↓

Lavar una vez por centrifugación a 300 G 10 min

↓

Ajustar la concentración de células a 1 X 10^6 en medio RPMI-1640

↓

ENSAYO SIMPLE VISUAL

FIGURA 2. DIAGRAMA DE FLUJO DEL ENSAYO SIMPLE VISUAL PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE P. haemolytica

Hacer diluciones dobles del suero en microplaca

↓

Agregar la citotoxina de P. haemolytica obtenida en fase logarítmica 100 µl

↓

Incubar 10 min a temperatura ambiente

↓

Agregar la suspensión de células blanco 100 µl

↓

Incubar 1 hr a 37°C

↓

Centrifugar a 500 G por 10 min

↓

Decantar por inversión rápida de la placa

↓

Adicionar 100 µl de formalina amortiguada al 10%

↓

Incubar 30 min a temperatura ambiente

↓

Teñir con cristal violeta al 1% 5 minutos

↓

Lavar con agua de la llave

↓

Lectura

↙ ↘

Fondo azul presencia de anticuerpos (+)

Fondo claro ausencia de anticuerpos (-)

FIGURA 3. DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA PREPARACION DE ERITROCITOS SENSIBILIZADOS CON *Pasteurella haemolytica* PARA LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA.

Crecimiento de los 12 serotipos de *P.haemolytica* en caldo infusión cerebro-corazón 18 hrs 37°C en movimiento constante.

Tinción de Gram para verificar cápsula y contaminantes

Incubar 30 min a 56°C en baño maría

Obtención de sangre con Alsever's de bovino

Lavar eritrocitos con SSF tres veces por centrifugación a 200 G por 10 min.

Agregar 1 ml de eritrocitos al cultivo

Incubar 1 hr a 37°C en baño maría

Lavar la mezcla tres veces con SSF por centrifugación a 200 G,10 min

Eliminar el sobrenadante

Eritrocitos sensibilizados resuspendidos al 0.5% con solución salina fosfatada formalinizada al 0.3% (antígeno soluble)

PRUEBA HEMOAGLUTINACION INDIRECTA

FIGURA 4. DIAGRAMA DE FLUJO DE LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE *Pasteurella haemolytica*.

Hacer diluciones dobles del suero en microplaca

↓

Agregar los eritrocitos sensibilizados con *P. haemolytica* del serotipo a probar

↓

Incubar dos horas a 37 C

↓

Realizar primera lectura

↓

Incubar 24 hrs a temperatura ambiente

↓

Segunda lectura (definitiva)

↙ ↘

Roseta	Botón
(+)	(-)

R E S U L T A D O S

En el Cuadro 1 se observan los resultados obtenidos en las pruebas de antigenicidad cruzada de los antisueros contra los serotipos homólogos y heterólogos de Pasteurella haemolytica. Se puede observar que los serotipos T4 y T10 tienen antígenos comunes con casi todos los serotipos de P. haemolytica, encontrándose títulos hasta de 1:128 para el caso de T4 y T3. Debido a que la mayoría de los títulos de reacción cruzada son inferiores a 1:16, en la prueba de hemoaglutinación indirecta se tomaron como sueros positivos aquellos que tuvieron títulos iguales o superiores a 1:16.

Los serotipos predominantes de P. haemolytica determinados por presencia de anticuerpos en suero, en los estados evaluados fueron el A6 con 49.1± 27.4 de promedio porcentual; el A2 con 47.1± 17.9%; el A5 con 28.7± 13.3%; el A11 con 28± 10.9% y el A1 con 26.1± 25% de seropositividad. El comportamiento de la seroprevalencia fue similar en la mayoría de los estados teniendo variaciones poco significativas en la presentación de los serotipos mas frecuentemente observados. El estado de Guerrero fue el que presentó menor prevalencia y menor variedad de serotipos de Pasteurella haemolytica ya que solo estuvieron presentes cuatro serotipos donde el A11 fue el mas común. Los serotipos A12, T4 y T10 fueron los menos comunes en todos los estados. La seropositividad específica para la citotoxina de P. haemolytica fue alta en todos

los estados alcanzando un promedio de 91.1 ± 11.4% de animales seropositivos (Cuadro 2)

Al hacer la diferenciación por animales criollos e importados se observó un comportamiento similar en seropositividad contra los serotipos A2, A6, A11, A1 y A5 para los dos grupos en comparación con lo observado en los animales en general. Los anticuerpos anticitotoxina tambien fueron encontrados en un porcentaje alto en los dos grupos de animales (Cuadro 3).

En el Cuadro 4 se muestran las medias geométrica/aritmética de los títulos de anticuerpos anticápsula de los distintos serotipos de Pasteurella haemolytica observándose que los serotipos A1, A6, A2 y A11 presentan los títulos mas elevados con 1:30/38, 1:29/35, 1:27/31 y 1:23/28 respectivamente. En tanto los títulos de anticuerpos anticitotoxina en la mayoría de los animales se encontraron comprendidos entre 1:4 y 1:32 con una media aritmética y geometrica de 1:23/27 respectivamente (Cuadro 5).

El análisis estadístico demostró que existe correlación de los títulos de anticuerpos anticitotoxina con los títulos de anticuerpos anticápsula del serotipo A6 ($p>0.5$).

CUADRO 1. REACCION CRUZADA DE LOS ANTISUEROS DE CONEJO CONTRA LOS SEROTIPOS HOMOLOGOS Y HETEROLOGOS DE *Pasteurella haemolytica* POR HEMOAGLUTINACION INDIRECTA.

	PhA1	PhA2	PhT3	PhT4	PhA5	PhA6	PhA7	PhA8	PhA9	PhT10	PhA11	PhA12
PhA1	++++	____	____	____	1:2	1:2	____	____	____	____	____	____
PhA2	____	++++	____	____	____	____	____	____	____	____	____	____
PhT3	1:8	____	++++	1:4	____	____	____	____	____	1:8	____	____
PhT4	1:32	1:16	1:128	++++	1:4	1:8	1:16	____	1:4	1:8	1:2	1:4
PhA5	1:4	____	____	____	++++	____	____	1:2	____	____	____	____
PhA6	1:2	____	____	____	____	++++	____	1:4	____	____	____	____
PhA7	____	____	____	____	____	____	++++	1:8	____	____	____	____
PhA8	____	____	____	____	____	____	____	++++	____	____	____	____
PhA9	____	____	____	____	____	____	____	____	++++	____	____	____
PhT10	1:4	1:4	1:32	1:4	1:4	1:4	1:8	____	1:4	+++++	1:4	1:2
PhA11	____	____	____	____	____	____	____	____	____	____	+++++	____
PhA12	____	____	____	____	____	____	____	____	____	____	____	+++++

CUADRO 2. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA Y ANTICAPSULA DE *Pasteurella haemolytica* en suero de cabras por estados

Estados	No. total de sueros	Citotoxina	Serotipos de Pasteurella haemolytica											
			PhA1	PhA2	PhT3	PhT4	PhA5	PhA6	PhA7	PhA8	PhA9	PhT10	PhA11	PhA12
CHIHUAHUA	239	189 (79)	122 (51)	149 (62)	73 (31)	15 (6)	65 (27)	197 (82)	55 (23)	29 (12)	18 (8)	23 (9)	96 (40)	9 (4)
COAHUILA	193	177 (92)	157 (81)	133 (69)	49 (25)	10 (5)	64 (33)	107 (55)	36 (19)	14 (7)	31 (16)	2 (4)	31 (16)	1 (0.5)
GUANAJUATO	86	85 (99)	18 (20)	49 (57)	7 (8)	2 (2)	20 (23)	33 (38)	15 (17)	29 (33)	6 (7)	5 (6)	22 (26)	6 (7)
GUERRERO	19	18 (94)	1 (5)	0	0	0	3 (16)	0	1 (5)	0	0	0	6 (32)	0
MEXICO	223	208 (93)	54 (24)	77 (35)	30 (13)	10 (4)	59 (26)	49 (22)	29 (13)	30 (13)	20 (9)	1 (0.4)	37 (17)	0
MICHOACAN	51	50 (98)	4 (8)	18 (35)	15 (29)	6 (12)	27 (53)	40 (78)	7 (14)	3 (6)	13 (25)	8 (16)	17 (33)	0
NUEVO LEON	59	39 (66)	4 (7)	8 (14)	8 (14)	3 (5)	7 (12)	5 (8)	7 (12)	4 (7)	2 (3)	2 (3)	11 (19)	0
QUERETARO	22	22 (100)	6 (27)	11 (50)	4 (18)	0	5 (23)	8 (36)	2 (9)	5 (23)	1 (4)	0	5 (23)	0
SONORA	85	84 (99)	10 (12)	47 (55)	30 (35)	2 (2)	39 (46)	63 (74)	13 (15)	3 (3)	4 (4)	22 (26)	41 (48)	2 (2)
$\bar{X}$ PORCENTUAL		91.1	26.1	47.1	19	4	28.7	49.1	14	11	8	6	28	

No. de sueros positivos
(porcentaje de sueros reactores positivos)

CUADRO 3. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA Y ANTICAPSULA DE *Pasteurella haemolytica* EN SUERO DE CABRAS IMPORTADAS Y CRIOLLAS

Animales	No. total de sueros	Citotoxina	Serotipos de *Pasteurella haemolytica*											
			PhA1	PhA2	PhT3	PhT4	PhA5	PhA6	PhA7	PhA8	PhA9	PhT10	PhA11	PhA12
IMPORTADOS	857	754 (88)	365 (43)	431 (50)	185 (22)	46 (5)	245 (29)	434 (51)	149 (17)	107 (12)	89 (10)	40 (5)	219 (26)	16 (2)
CRIOLLOS	120	118 (98)	11 (9)	61 (51)	31 (26)	2 (2)	44 (37)	68 (57)	16 (13)	10 (8)	6 (5)	23 (19)	47 (39)	2 (2)

No. de sueros positivos
(porcentaje de sueros reactores positivos)

CUADRO 4. TITULOS PROMEDIO ($\bar{X}$) DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE *Pasteurella haemolytica* EN SUERO DE CABRAS

	PhA1	PhA2	PhT3	PhT4	PhA5	PhA6	PhA7	PhA8	PhA9	PhT10	PhA11	PhA12
MEDIA ARITMETICA $\bar{X}a$	30	27	19	17	20	29	19	19	20	19	23	18
MEDIA GEOMETRICA $\bar{X}g$	38	31	21	18	22	35	28	20	22	21	28	18

CUADRO 5. TITULOS DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* EN SUERO DE CABRAS POR ESTADOS

Estados	No. total de sueros	(-)	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
CHIHUAHUA	239	50 (21)	1 (0.4)	7 (3)	25 (10)	68 (28)	49 (21)	28 (12)	10 (4)	1 (0.4)
COAHUILA	193	16 (8)	2 (1)	16 (8)	53 (27)	58 (30)	27 (14)	16 (8)	5 (3)	0
GUANAJUATO	86	1 (1)	3 (3)	14 (16)	37 (43)	15 (17)	11 (13)	4 (5)	1 (1)	0
GUERRERO	19	1 (5)	0	3 (16)	6 (32)	6 (32)	3 (16)	0	0	0
MEXICO	223	15 (6)	9 (4)	34 (15)	47 (21)	58 (26)	34 (15)	23 (10)	3 (1)	0
MICHOACAN	51	1 (2)	0	0	8 (16)	17 (33)	19 (37)	6 (12)	0	0
NUEVO LEON	59	20 (34)	0	1 (2)	9 (15)	23 (39)	6 (10)	0	0	0
QUERETARO	22	0	1 (5)	7 (32)	5 (23)	5 (23)	2 (9)	2 (9)	0	0
SONORA	85	1 (1)	0	4 (5)	12 (14)	27 (32)	19 (22)	16 (19)	5 (6)	1 (1)

No. de sueros positivos
(porcentaje de sueros reactores positivos)

D I S C U S I O N

Las pruebas de antigenicidad cruzada han sido realizadas por otros autores con técnicas mas específicas como la de ELISA y utilizando otros animales de laboratorio diferentes al conejo para la elaboración de los antisueros específicos (9, 12). La baja antigenicidad cruzada encontrada en el presente trabajo es similar a la descrita por estos investigadores, quienes dan una muestra como positiva cuando tiene títulos iguales o superiores a 1:8.

En México es escasa la información acerca de los agentes involucrados en problemas neumónicos de los rumiantes, especialmente de P. haemolytica y sus serotipos. Se considera que este trabajo es el primer estudio realizado en México para determinar los serotipos de P. haemolytica involucrados en problemas respiratorios de caprinos. A nivel mundial,también es escasa esta información. En un estudio realizado en caprinos de Kenia por Mwangota et al (1977) se observó que el serotipo mas común de P. haemolytica fue el A11. En el presente estudio se destaca la importancia de otros serotipos como el A6, A2, A1 y A5. El haber observado el mismo comportamiento de presentación en animales criollos e importados puede ser indicativo que,tanto en México como en Estados Unidos de Norteamérica presentan las mismas serovariedades de P. haemolytica, ya que la recolección de las muestras se realizó poco tiempo despues de la importación de los animales. Como pudo observarse, el estado de Guerrero fue el único con comportamiento

distinto de presentación. Esto puede indicar que en algunos estados de la República Mexicana los serotipos predominantes sean diferentes. Sin embargo, habría que tomar en cuenta que el número de sueros evaluados en este estado fue muy reducido y también que es un estado con número bajo de caprinos. Al comparar la prevalencia de los serotipos con otras especies de animales como bovinos y ovinos en México, se observó que sí existe diferencia ya que en bovinos los serotipos mas comunes son el A5, A6 y A1 y en ovinos el A6, A7 y A8 (23, 27). Es importante mencionar, que en general un porcentaje elevado de los animales presentaron anticuerpos específicos para la citotoxina de P. haemolytica considerada como factor de virulencia y patogenicidad (4, 16, 28, 29, 37).

La baja seropositividad observada para los serotipos A12, T4 y T10 en todos los estados, sugiere que es poca la importancia de estos serotipos como causantes de problemas en caprinos. En este trabajo los títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina encontrados en los animales se consideran como adecuados para proteger a los animales debido a que estudios realizados en Estados Unidos demuestran que animales con títulos similares resisten al desafío con cepas virulentas de P. haemolytica, los títulos de anticuerpos de los animales en los trabajos mencionados han sido inducidos naturalmente y por vacunación a nivel experimental (3, 31).

La correlación encontrada entre el serotipo mas comunmente determinado con los títulos de anticuerpos anticitotoxina era de

esperarse,debido a que los títulos de anticuerpos de los serotipos en cuestión son considerados como una variable independiente que van a inducir una respuesta directamente proporcional en los títulos de anticuerpos anticitotoxina, debido a que la proliferación de la bacteria da como consecuencia la producción de citotoxina con la subsecuente respuesta del hospedero a este antígeno.

C O N C L U S I O N E S

Actualmente se desconoce que serotipos estan contenidos en las bacterinas comerciales y si son los adecuados para proteger a los animales,considerando los serotipos predominantes según la especie y la región. Por lo que es de suma importancia determinar los serotipos mas comunes de P. haemolytica por regiones, como ya se realizó parcialmente en el presente trabajo y tener la seguridad que las bacterinas comerciales contengan estos serotipos y la citotoxina como antígeno adicional ya que tambien se demostró su importancia antigénica, para llevar a cabo una profilaxis adecuada contra la enfermedad causada por esta bacteria.

L I T E R A T U R A C I T A D A

1. Alley, MR. and Clarke, J.L., 1977. The influence of microorganism on the severity of lesions in chronic ovine neumonia. N. Z. Vet. J. 25:200.

2. Argueta, G.J., 1986. Frecuencia de Pasteurella haemolytica en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

3. Ayala, M.A 1977. Incidencia y prevalencia de neumonías en becerros Holstein Friesian en etapa de lactancia y destete durante un año en un centro de recría. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

4. Berggren, K.A., Baluyut, C.S., Simonson, R.R., Bemrick, W.J. and Maheswaran, S.K. 1981. Cytotoxic effects of Pasteurella haemolytica on ovine neutrophils. Am. J. Vet. Res. 42:1383.

5. Biberstein, E.L. 1978. Biotyping and serotyping of Pasteurella haemolytica. in Bergan, T. and Norris, J. (ed). Methods in Microbiology. New York. Academic Press Inc. Vol 10. pp. 253.

6. Biberstein, E.L., Gills, H. and Knight, P. 1960. Serological types of Pasteurella haemolytica. Cornell Vet. 50:283.

7. Blood, D.C., Henderson, J.A. and Rodostits, O.M. 1981. Veterinary Medicine. 5th ed. Bailliere, Tindall and Cassell, London. pp. 360.

8. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, U.S.A. pp 372.

9. Burrels, C., Evans, M.B. and Dawson, M.McL. 1983. Antigenic relationships between the serotypes of Pasteurella haemolytica demostrable by enzymelinked inmunosorbent assay (ELISA) Vet. Mic. 8:187.

10. Davies, D.H., Dungworth, D.L., Humpreys, S. and Johnson, A.J. 1977. Concurrent infection of lambs with parainfluenza virus type 3 and Pasteurella haemolytica. N.Z. Vet. J. 25:263.

11. Davies, D.H. and Penwarden Rosemary, A. 1981. The phagocytic cell responses of the ovine lung to Pasteurella haemolytica. Vet. Mic. 6:183.

12. Frank, G.H. and Wessman, G.E. 1978. Rapid plate agglutination procedure for serotyping Pasteurella haemolytica. J. Clin. Mic. 7:142.

13. Gentry, M.L., Confer, A.W. and Kreps. J.A. 1985. Simple visual assay for determination of Pasteurella haemolytica cytotoxin neutralizing antibody titers in cattle sera. J. Clin. Microbiol. 22:968.

14. Gilmour, N.J.L., Thompson, D.A. and Fraser, J. 1974. The recovery of Pasteurella haemolytica from the tonsils of adult sheep. Res. Vet. Sci. 17:41.

15.Hamdy, A.H. and Trapp, A.L. 1967. Investigation of nasal micro flora of feedlot calves before and after weaning. Am. J. Vet. Res. 28:1019.

16.Himmel, M.E., Yates, M.D., Laverman, L.R. and Squire, P.G. 1982. Purification and partial characterization of a macrophage citotoxin from Pasteurella haemolytica. Am. J. Vet. Res. 43:764.

17.Lillie, L.E. 1974. The bovine respiratory disease complex. Can. Vet. J. 15:233.

18.Lopez, A., Thomson, R.G. and Savan, M. 1976. The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica in calves infected with bovine parainfluenza 3 virus. Can. J. Comp. Med. 40:385.

19.Markham, R.J.F. and Wilkie, B.N. 1980. Interaction between Pasteurella haemolytica and bovine alveolar macrophages. Cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. Am. J. Vet. Res. 41:18.

20.Martin, S.W., Meek, A.H., Davis, D.G., Thomson, R.G., Johnson, J.A., Lopez, A., Stephen, L., Curtis, R.A., Prescott, 1980. Factors associated with mortality in feedlot cattle the Bruce county beef project. Can. J. Comp. Med. 44:1.

21.Mattson, D.E. 1973. Adenovirus infection in cattle. J. Am. Vet. Med. Ass. 163:894.

22.MERCHANT, I.A., PACKER, R.A. 1975. Bacteriología y Virología Veterinarias. Ed. Acribia. España. pp. 348.

23. Morales, A.J.F., Espino, R.G., Zepeda, M.O.O., Sanchez-Mejorada, P.H. y Trigo, T.F. 1986. Seroprevalencia de anticuerpos anticitotoxina en suero de ovinos. Memorias reunión de Investigación Pecuaria en México, 1986. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. SARH. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D.F.

24. Mwangota, A.V., Muhamed, S.I. and Thomson, R.G. 1977. Serological types of Pasteurella haemolytica in Kenya. Cornell Vet. 68:84.

25. Pass, D.A. and Thomson, R.G. 1971. Wide distribution of Pasteurella haemolytica type 1 over the nasal mucosa of cattle. Can. J. Comp. Med. 35:181.

26. Prince, D.V. 1985. Serotypes of Pasteurella haemolytica from the respiraory tract of sheep in New Zeland. N. Z. Vet. J. 33:76.

27. Sanchez-Mejorada, P.H., Zepeda, M.O.O., Espino, R.G., Morales, A.J.F., Trigo, T.F. y Loeza, C.M.E. 1986. Presencia de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de Pasteurella haemolytica en suero de bovinos. Memorias Reunión de Investigación Pecuaria en México. 1986. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. SARH. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM. México, D.F.

28. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N. 1982. Cytotoxin of Pasteurella haemolytica acting on bovine leucocytes. Infect. Inmun. 35:91.

29. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N. 1985. Evidence for the Pasteurella haemolytica cytotoxin as a product of growing bacteria. Am. Vet. Res. 46:1212.

30. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N. Pasteurella haemolytica cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by typespecific rabbit antisera. Am. J. Vet. Res. 44:715. 1983.

31. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N. 1983. Pasteurella haemolytica cytotoxin neutralizing activity in sera from Ontario beef cattle. Can. J. Comp. Med. 47:497.

32. Sutherland, A.D. and Donachie, W. 1986. Cytotoxic effect of serotypes of Pasteurella haemolytica on sheep bronchoalveolar macrophages. Vet Mic. 11:331.

33. Sutherland, A.D., Gray, E. and Wells, P.W. 1983. Cytotoxic effect of Pateurella haemolytica on ovine bronchoalveolar macrophages in vitro. Vet. Mic. 8:3.

34. Sutherland, A.D. and Redmond, J. 1986. Cytotoxin from on ovine strain of Pasteurella haemolytica: Characterization studies and partial purification. Vet. Mic. 11:337.

35. Trigo, T.E., Trigo, T.F., Hernández, G.H., Ramírez, C.C. y Berruecos, V.M. 1982. Patología y bacteriología de pulmones neumónicos de becerros. Vet. Mex. 13:131.

36. Trigo, T.J.F. 1984. Diagnóstico, patogénesis y control de las neumonías en ovinos (línea de investigación). Memoria de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. 1984. México, D.F.

37. Walker, R.D. Schults, T.W., Hopkins, F.M. and bryant,M.J. 1984. Growth phase-dependent phagocytosis of Pasteurella haemolytica by pulmonary macrophages. Am. J. Vet. Res. 45: 1230.