

Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos

José Francisco Morales Alvarez*
Laura Jaramillo Meza**
Zeferino Oropeza Vázquez*
Jorge L. Tórtora Pérez***
Francisco J. Trigo Tavera****
Guadalupe Espino Rojas*

Resumen

Se evaluó el efecto de la inoculación de corderos con bacterias vivas y citotoxina de *Pasteurella haemolytica* al desafío. Se utilizaron 40 corderos distribuidos al azar en 4 grupos. Al grupo 1 (lote testigo) se le inoculó, por vía subcutánea, sólo medio de cultivo; el grupo 2 fue inmunizado con un cultivo vivo de *P. haemolytica* serotipo A1 por vía subcutánea; el grupo 3 recibió el mismo inmunógeno por vía intradérmica y el grupo 4 con citotoxina de *P. haemolytica* por vía subcutánea más adyuvante completo de Freund. Los animales fueron expuestos al virus de PI3 y desafiados una semana después con una cepa de campo de *P. haemolytica* A1. Fueron sacrificados para la evaluación del daño pulmonar. Los animales del grupo testigo mostraron fiebre después del desafío bacteriano. Los títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina fueron más altos para los grupos inmunizados, comparados con el grupo testigo ($P < 0.05$). Las lesiones en pulmón fueron más severas para el grupo testigo ($P < 0.05$), sin diferencia significativa entre las diversas vías de inmunización. Según los resultados obtenidos, se puede considerar que la protección conferida por la inmunización con *P. haemolytica* así como con citotoxina, es eficiente para reducir en forma considerable las lesiones pulmonares ocasionadas por esta bacteria experimentalmente. Así-

mismo, se demostró la inocuidad de los inmunógenos por ausencia de reacciones posvacunales.

Introducción

El efecto de las neumonías en animales domésticos es de suma importancia, ya que afectan directamente al proceso productivo de las explotaciones comerciales.

Pasteurella haemolytica es un agente que comúnmente se asocia a problemas neumónicos de rumiantes.² Se han reconocido por hemoaglutinación indirecta, 15 serotipos de acuerdo a antígenos capsulares solubles.^{9,33} Esta bacteria produce en fase logarítmica de crecimiento una sustancia soluble que es tóxica para macrófagos y leucocitos de rumiantes.^{3, 14, 27, 30} Se menciona que factores predisponentes desempeñan una función determinante en el desarrollo de la enfermedad, por ejemplo: las condiciones ambientales adversas y la mala alimentación pueden favorecer la presentación del complejo respiratorio.¹

También se ha demostrado la participación de agentes primarios de tipo viral (adenovirus, virus respiratorio sincitial, parainfluenza 3, entre otros) capaces de iniciar el complejo neumónico; sin embargo, el mecanismo de cómo actúan aún no se define satisfactoriamente.^{18, 20}

El uso de bacterinas se va desechando día con día, pues no han tenido efecto en la prevención del problema. Evidencias clínicas muestran que animales bacterinizados han desarrollado una neumonía más severa al desafío, comparado con los animales no bacterinizados.⁶

En la actualidad se ha desarrollado una diversidad de inmunógenos para prevenir la neumonía por *P. haemolytica*, con resultados aparentemente satisfactorios en algunos casos.⁵

Los inmunógenos a base de bacterias vivas de cultivos de 6 horas son los que han dado resultados más satisfactorios. Se argumenta que este tipo de biológicos son

Recibido para su publicación el 29 de junio de 1992

* Proyecto Sistema de Referencia Diagnóstica. CENID-Microbiología, INIFAP-SARH. km 15.5 Carr. México-Toluca, 05110, México, D.F.

** Proyecto Enfermedades Bacterianas de Rumiantes. CENID-Microbiología, INIFAP-SARH. km 15.5 Carr. México-Toluca, 05110, México, D.F.

*** División de Ciencias Agropecuarias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 54840. Estado de México.

**** Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510, México, D.F.

eficaces porque los cultivos jóvenes producen más material inmunogénico (material capsular, citotoxina y otros carbohidratos no muy bien definidos). También la replicación del agente en el sitio de la inoculación favorece la estimulación de los mecanismos inmunológicos mediados por células.⁵

El objetivo de este trabajo fue evaluar, a nivel experimental, el efecto de la inoculación en corderos con bacterias vivas y sobrenadante de cultivo de *Pasteurella haemolytica* sobre la presentación de neumonías al desafío.

Material y métodos

Animales. Se utilizaron 40 corderos de aproximadamente dos meses de edad clínicamente sanos. A todos se les tomó muestra de sangre y suero para la determinación de títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina contra *P. haemolytica*.

Inmunógenos. Se utilizó un cultivo de 6 horas de *P. haemolytica* serotipo A1 aislado de pulmón neumónico de ovino, suspendida en solución salina amortiguada (SSA) a concentración de 1×10^9 UFC de paquete celular libre de citotoxina. También se preparó un inmunógeno a base de citotoxina de *P. haemolytica*, obtenida en fase de crecimiento logarítmico, concentrada 10X por liofilización y titulada por medio del ensayo visual simple.¹¹

Diseño experimental. Los animales se asignaron al azar en cuatro grupos de 10 animales cada uno. El grupo 1 (testigo) recibió como inóculo medio de cultivo estéril. Los animales de los grupos 2 y 3 fueron inmunizados, por vía subcutánea e intradérmica respectivamente, con 2 ml de *P. haemolytica* viva en cultivo de 6 horas. El grupo 4 fue inmunizado utilizando como

antígeno 2 ml de la citotoxina de *P. haemolytica*, suspendida en adyuvante completo de Freund (ACF) por vía subcutánea. Cada grupo se dividió en subgrupos de 5 animales; los subgrupos fueron sometidos a condiciones adversas de alojamiento, a la exposición viral y desafío bacteriano. Las condiciones adversas se referían a cúmulos de excretas y orina (humedad), así como hacinamiento de 1 animal por metro,² sin ventilación. El alojamiento de los otros subgrupos no presentaba el cúmulo de excretas; el grado de hacinamiento era de 2 m² por animal, con buena ventilación.

La exposición viral tuvo lugar el día 21 posinmunización y el desafío bacteriano el día 28. Los animales fueron sacrificados el día 35 para su evaluación *post mortem* (Cuadro 1).

El diseño estadístico que se usó para las variables anticuerpos anticápsula, anticitotoxina, contra el virus de PI3, temperatura y frecuencia respiratoria fue uno completamente al azar con arreglo factorial, anidado con rompimiento en tiempo con dos factores y diferentes niveles para cada factor. El modelo matemático quedó de la siguiente forma:

$$Y_{ijklm} = \mu + T_i + A_j + TA_{ij} + I_k (TA_{ij}) + D_l + TD_{il} + AD_{jl} + E_{ijklm}$$

donde: μ = Media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

A_j = Efecto del j-ésimo alojamiento

TA_{ij} = Efecto debido a la interacción trat. x aloj.

$I_k (TA_{ij})$ = Efecto debido al animal anidado en el trat. x aloj.

D_l = Efecto del l-ésimo día de muestreo

TD_{il} = Efecto de la interacción trat. x día de muestreo

AD_{jl} = Efecto de la interacción ambiente x día de muestreo

Cuadro 1
PROTOCOLO DE INMUNIZACION Y DESAFIO DE *Pasteurella haemolytica* EN CORDEROS

Día	Grupo 1 10 corderos	Grupo 2 10 corderos	Grupo 3 10 corderos	Grupo 4 10 corderos
0	Testigo inoculado con solución salina vía s/c	Inoculado con Ph A1 vía s/c	Inoculado Con Ph A1 vía i/d	Inoculado con citox más ACF vía s/c
21	Exposición con el virus PI3 aerolizado en todos los grupos y cambio a condiciones adversas solamente a los subgrupos*			
28	Desafío con <i>Pasteurella haemolytica</i> serotipo A1 a todos los grupos y cambio a condiciones adversas solamente a los subgrupos			
35	Sacrificio de animales para la evaluación del daño pulmonar			

s/c: Subcutánea

i/d: Intradérmica

Ph A1: *Pasteurella haemolytica* serotipo A-1

ACF: Adyuvante completo de Freund

* Cada grupo fue dividido a su vez en subgrupos de 5 animales para evaluar el efecto de someter a los corderos a condiciones adversas de alojamiento

Eijklm = Error aleatorio

El diseño para la evaluación del daño pulmonar fue similar pero sin la anidación y el rompimiento en tiempo, quedando el modelo de la siguiente manera:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + TA_{ij} + E_{ijk}$$

donde: μ = Media general

Y_{ijk} = Daño pulmonar en mg

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento

A_j = Efecto del j -ésimo alojamiento

TA_{ij} = Efecto de la interacción tratamiento x alojamiento

E_{ijk} = Error aleatorio

La exposición viral se realizó en una cámara de aerosoles y el desafío bacteriano por vía intratraqueal. Los cambios a condiciones de alojamiento adversas se llevaron a cabo en un lapso no mayor de tres horas. Por animal se utilizaron 6 ml de suspensión viral, la cual contenía una dosis de 1×10^7 TCID₅₀/ml. Por otra parte, la dosis bacteriana usada fue de 2.5 ml de una suspensión de *P. haemolytica* a concentración de 1×10^9 UFC por animal.

Examen clínico. Durante todo el periodo de evaluación, a todos los animales se les tomó la temperatura corporal por vía rectal diariamente por la mañana, así como su estado clínico general, evaluado mediante la frecuencia respiratoria y tipo de movimientos respiratorios.

Evaluación macroscópica. Para evaluar cuantitativamente el daño pulmonar en todos los grupos, se esquematizó en papel la extensión de las lesiones en pulmón para su evaluación por peso. El criterio tomado fue que las lesiones más extensas ocuparían más espacio en los diagramas de papel, por lo que al recortar las áreas dibujadas y pesarlas, el peso del papel sería mayor en las lesiones más severas.

Estudios serológicos. Antes y durante el periodo experimental o al momento de la muerte natural o sacrificio de los animales, se tomaron muestras séricas para determinar títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de *P. haemolytica*.

Examen bacteriológico. Se tomaron muestras en condiciones de esterilidad para intentar recuperar la cepa de desafío o de otros agentes involucrados en el complejo respiratorio. El aislamiento e identificación de los agentes aislados se realizó por métodos convencionales.³⁸

Examen histopatológico. Se tomaron muestras representativas de pulmón de los animales al momento de su muerte o sacrificio, las cuales fueron fijadas en formalina amortiguada al 10% y se incluyeron en parafina. Fue-

ron procesadas y teñidas con la técnica de hematoxilina-eosina para su evaluación microscópica.²¹

Ensayo simple visual para la determinación de anticuerpos anticitotoxina de *Pasteurella haemolytica*. La prueba consistió en hacer diluciones dobles de cada suero a probar. Realizada la dilución de suero, se agregó citotoxina de *P. haemolytica*²⁸ y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente; enseguida, se añadió una suspensión de leucocitos de sangre periférica de bovino obtenidos por choque hipotónico y se incubó una hora a 37 C.

Al finalizar este periodo, las placas se centrifugaron a 500 G por 5 minutos; a cada pozo se le adicionó formalina amortiguada al 10%, y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas fueron teñidas con una solución de cristal violeta al 1.0%.¹¹ Un fondo azul en los pozos indicaba la presencia de células teñidas; por lo tanto, un resultado positivo a la existencia de anticuerpos que fueron capaces de neutralizar la citotoxina de *P. haemolytica*.²⁸

Prueba de hemoaglutinación indirecta para la determinación de anticuerpos anticápsula de *Pasteurella haemolytica*. Se realizaron diluciones dobles con cada suero a probar con SSA. Se adicionaron los eritrocitos sensibilizados con *P. haemolytica* del serotipo a probar y se incubó por dos horas a 37 C. Al finalizar este periodo se realizó la lectura de las placas.⁹

Resultados

El factor alojamiento no mostró efecto en las variables estudiadas, excepto para la variable frecuencia respiratoria.

Temperatura. Al día siguiente de la aplicación de los inóculos, se observó en promedio un incremento ligero de temperatura en los grupos, salvo en el grupo testigo; dicho incremento bajó gradualmente hasta valores normales tres días. La temperatura promedio más alta registrada durante el experimento fue 40.02 ± 1.0 C, se presentó al día siguiente del desafío bacteriano y sólo ocurrió en el grupo testigo, mostrando diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a los demás grupos (Figura 1).

Títulos de anticuerpos anticápsula. En general, los títulos de anticuerpos fueron transformados a logaritmo base 2 (\log_2) para su mejor evaluación.

Se observó una diferencia significativa ($P < 0.025$) con respecto a tiempo y para la interacción tratamiento por tiempo. Esta diferencia para el tiempo se hizo notoria en la primera semana posinmunización de los diferentes inmunógenos, donde los grupos 2, 3 y 4 mostraron una seroconversión importante, comparados con el grupo testigo, existiendo una diferencia estadística significativa entre tratamientos (Figura 2).

Es importante señalar que hubo una seroconversión en el grupo testigo poco después del desafío experi-

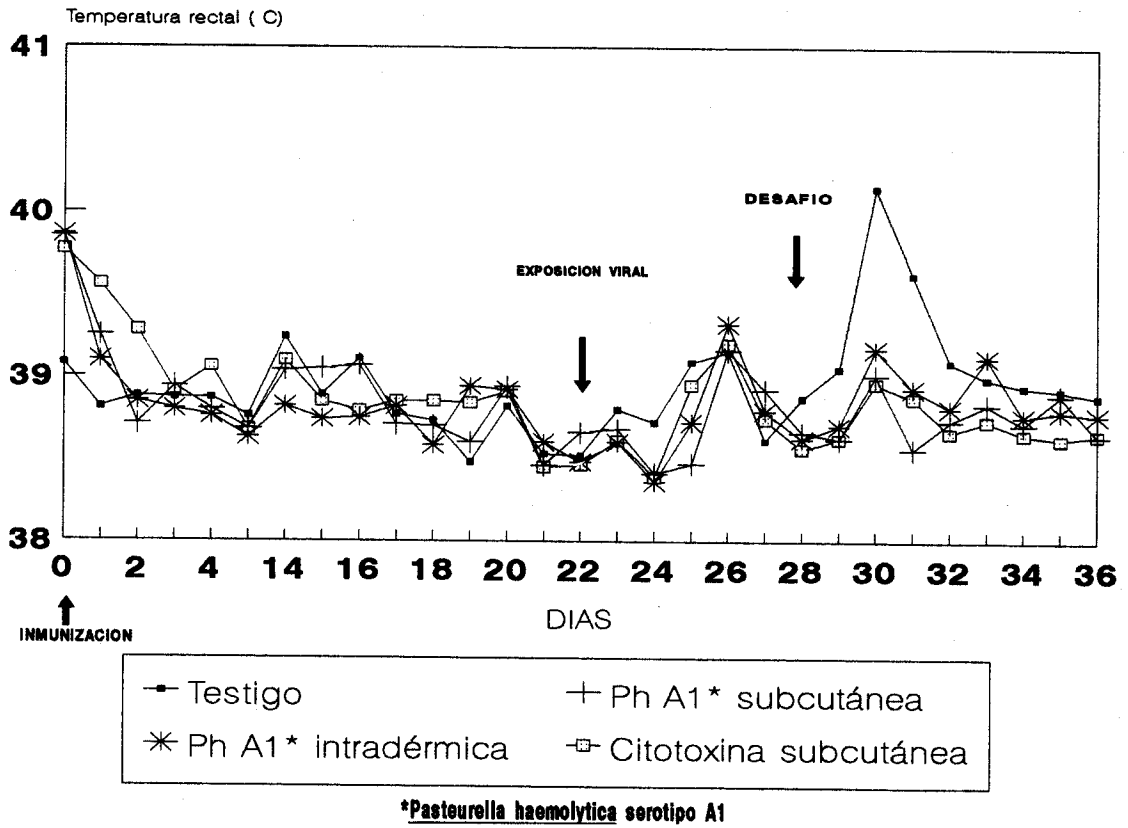


Figura 1. Temperatura corporal de corderos en la evaluación de un inmunígeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos

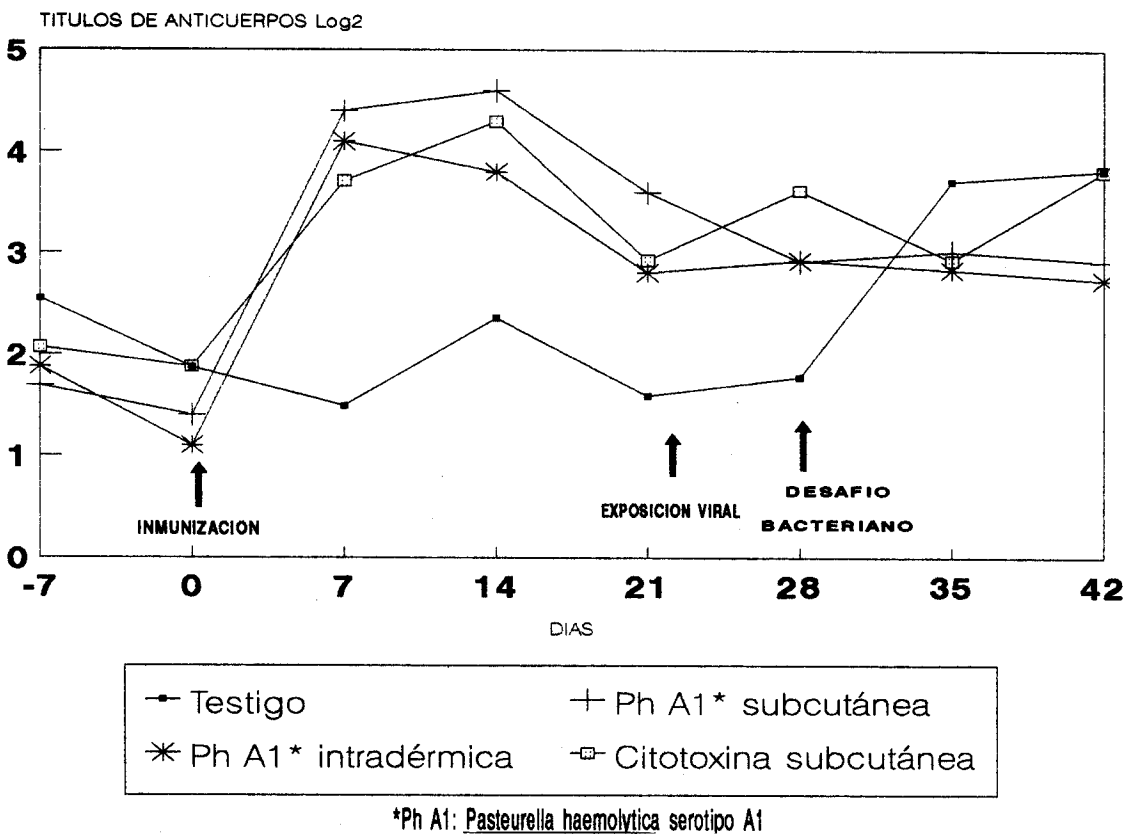
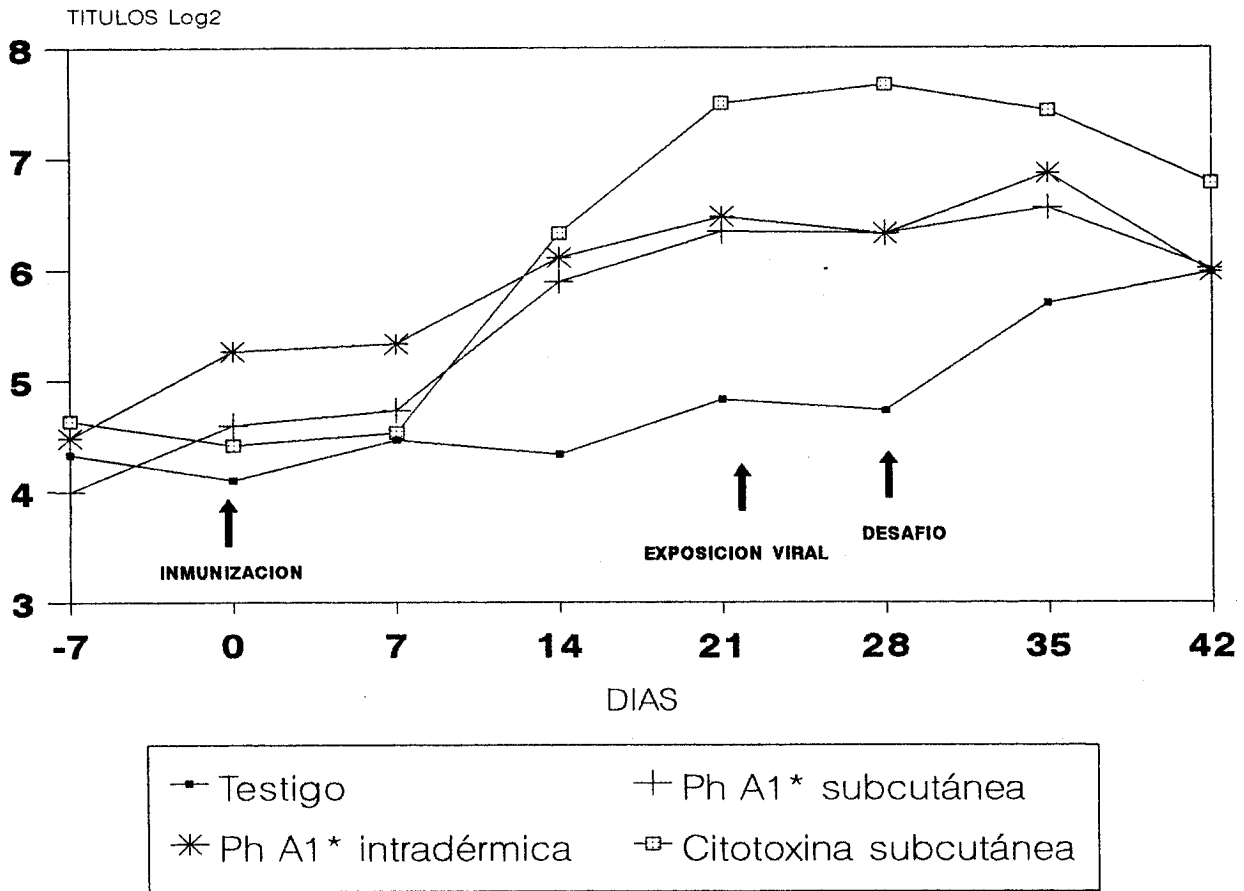


Figura 2. Títulos de anticuerpos anticápsula de *Pasteurella haemolytica* en la evaluación de un inmunígeno en corderos



****Pasteurella haemolytica* serotipo A1**

Figura 3. Títulos de anticuerpos anticitotoxina de *Pasteurella haemolytica* en la evaluación de un inmunógeno en corderos

mental con *P. haemolytica*, alcanzando un título promedio de 3.81 ± 1.053 . El valor de r^1 para esta variable fue de 66.6.

Títulos de anticuerpos anticitotoxina. Hubo diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) para el tiempo, entre tratamientos y para la interacción tratamiento por tiempo. En la Figura 3 se observa que el grupo 4, inoculado con la citotoxina de *P. haemolytica* más ACF, obtuvo la respuesta más alta. Los grupos inoculados con la bacteria por diferentes vías se comportaron de forma similar; el grupo testigo fue el que presentó los títulos más bajos con seroconversión importante después del desafío con *P. haemolytica*.

Frecuencia respiratoria. Hubo diferencia para alojamiento, tiempo y para tratamientos ($P < 0.05$), la cual se presentó al momento que los animales fueron sometidos a condiciones adversas de alojamiento. También se observó un incremento en la frecuencia respiratoria en el grupo testigo dos días posteriores al desafío bacteriano, con respecto a los grupos inmunizados (Figura 4). Los subgrupos sometidos a condiciones adversas de alojamiento tuvieron en promedio una frecuencia respiratoria mayor, comparada con los

subgrupos que estaban en condiciones favorables de alojamiento (Figura 4a).

Evaluación del daño pulmonar. En la Figura 5 se presentan en forma esquematizada las lesiones encontradas a nivel pulmonar en todos los grupos y en la Figura 6 los promedios del grado de lesión representado por el peso del papel expresado en miligramos para los mismos grupos. Las lesiones más severas se observaron en el grupo testigo. A pesar de la marcada desproporción, el grupo testigo fue diferente significativamente ($P < 0.05$) de los grupos 3 y 4, pero igual al grupo 2. Los grupos inmunizados fueron estadísticamente similares entre sí ($P > 0.05$). El valor de r^1 para esta variable fue de 23.7.

Examen histopatológico. En términos generales, las lesiones histopatológicas fueron de intensidad moderada a leve para los cuatro grupos. Las lesiones más evidentes se observaron en el grupo testigo. No se contaba con un método cuantitativo confiable para la evaluación de estas lesiones; por ende, sólo se mencionan las que se observaron con mayor frecuencia: Congestión, distensión de septos interlobulillares por infiltración de células inflamatorias entremezcladas con

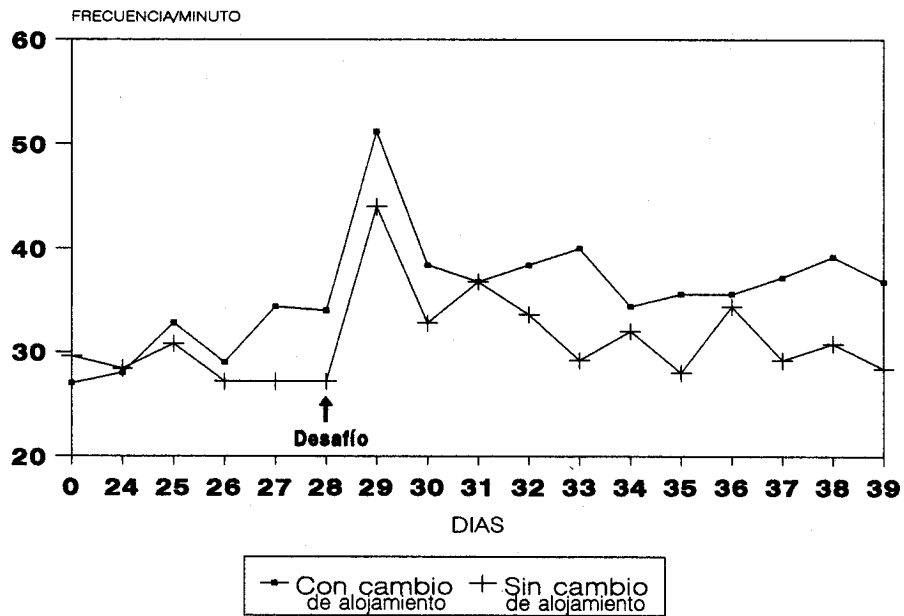
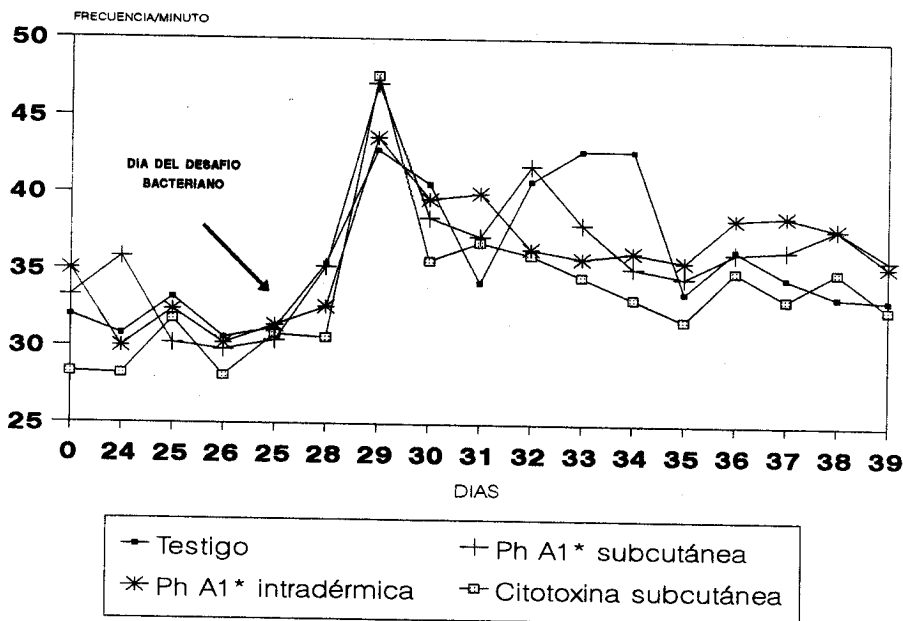


Figura 4. Frecuencia respiratoria de corderos mostrando el efecto del cambio a condiciones adversas de alojamiento



**Pasteurella haemolytica* serotipo A1

Figura 4a. Frecuencia respiratoria de corderos en la evaluación de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos

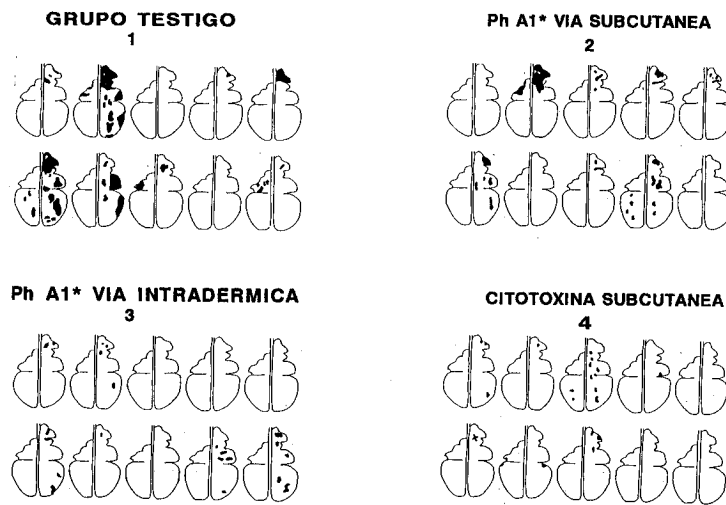
fibrina, pleuritis, infiltración mononuclear intersticial y células fusiformes con arreglo arremolinado. Otras lesiones observadas con menor frecuencia fueron: Edema, sincitios, hemorragias subpleurales y aumento relativo del tejido linfoide asociado a bronquios.

Examen bacteriológico. Sólo en un animal del grupo testigo se logró el aislamiento de *P. haemolytica* serotipo A1 a partir del pulmón. Conviene señalar que este

aislamiento se realizó 10 días después del desafío bacteriano.

Discusión

El aumento de temperatura posinmunización puede ser considerada como normal, ya que se ha demostrado que la aplicación de ciertos inmunógenos desencadena reacciones posvacunales que se caracterizan básicamente



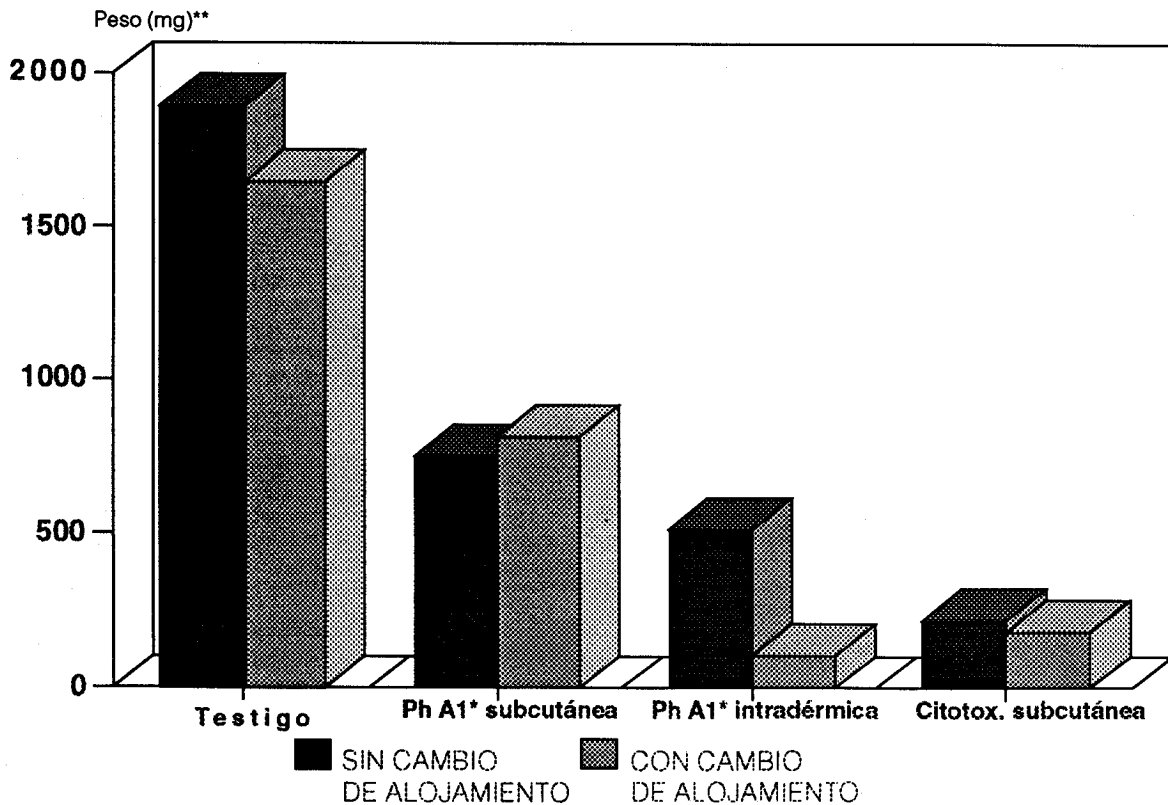
*Ph A1: *Pasteurella haemolytica* serotipo A1

Figura 5. Lesiones pulmonares en la evaluación de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos

te por aumento de temperatura.^{7,19,25} Se señala que este aumento no alcanzó valores considerados como febriles. Los inmunógenos usados en este trabajo redujeron en forma notoria la elevación de temperatura subsecuente al desafío con *P. haemolytica*, lo que puede

indicar cierto grado de protección al daño ocasionado por esta bacteria.

Las lesiones menos severas se observaron en el grupo inoculado con la citotoxina más ACF. En un trabajo realizado por Jericho *et al.*,¹⁷ se observó una protección



*Ph A1: *Pasteurella haemolytica* serotipo A1 **A mayor peso, la lesión es más severa

Figura 6. Evaluación del daño pulmonar por el peso de las impresiones en papel

aceptable al inocular un sobrenadante de cultivo preparado de forma similar al utilizado en el presente trabajo. Sin embargo, en el trabajo de Jericho *et al.*¹⁷ el sobrenadante fue inoculado en forma combinada con *P. haemolytica* inactivada con formalina, sin el uso de adyuvantes.

El efecto protector observado quizá no se debe a la citotoxina de *P. haemolytica* exclusivamente, ya que en el sobrenadante utilizado, por su proceso de elaboración, están contenidos otros antígenos solubles que podrían desempeñar una función importante en la protección conferida a los animales.^{26, 30, 32} En la actualidad, en la mayor parte de los trabajos de investigación se destaca la importancia de la citotoxina de *P. haemolytica*, ya que la presencia de anticuerpos contra este compuesto reduce de manera notoria el daño pulmonar al desafío.^{4, 12, 25, 31}

En la mayor parte de los estudios donde se evalúan las bacterinas, éstas confieren escasa protección y en algunos casos acentúan el daño pulmonar al desafío.^{8, 10, 37}

Los títulos de anticuerpos anticápsula altos no siempre han sido sinónimo de protección; en algunos trabajos^{10, 37} se ha observado este fenómeno. Es importante señalar que los mecanismos inmunes contra *P. haemolytica* son complejos e incluyen, entre otros: La inmunidad mediada por células, la presencia de IgA en secreciones, la opsonización por anticuerpos específicos conferida por IgG, IgM e IgE, los niveles de complemento presentes a nivel sérico y local. Por último, se considera importante la presencia de anticuerpos neutralizantes de la citotoxina en suero y secreciones bronquioalveolares.^{4, 13, 22, 29, 34, 35, 36} En este trabajo, se observó una relación directa con los títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de *P. haemolytica* con el grado de protección conferida por los diferentes inmunógenos. La vía intradérmica podría considerarse la mejor, a pesar de no existir diferencia significativa con respecto a la vía subcutánea; sin embargo, no fue posible evaluar otros mecanismos de inmunidad que pudiesen manifestar la inmunidad celular, que teóricamente es inducida por esta vía.

Las condiciones de alojamiento, con las que se trató de someter a los animales a estrés por hacinamiento e irritación por el cúmulo de excretas y orina, no tuvieron el efecto deseado ya que no hubo diferencias en las variables estudiadas, excepto para la de frecuencia respiratoria que invariablemente se mostró aumentada. Es probable que el efecto deseado no se alcanzara porque no fue suficiente el hacinamiento y la irritación causada para mantener en estrés constante a los animales; además, no se contaba con un método eficiente para medir el estrés en los animales.

El aislamiento de la cepa de desafío en un solo animal puede deberse a que los intentos de aislamiento se realizaron hasta el sacrificio de los animales. Ya habían transcurrido 10 días desde que se realizó el desafío bacteriano, tiempo suficiente para efectuarse la remoción y destrucción de las bacterias por parte de los mecanismos inmunológicos del animal. En México, a pesar de todos estos estudios, el uso de bacterinas se

realiza de manera rutinaria en explotaciones comerciales de ovinos y bovinos. Afortunadamente, en forma experimental ya se han realizado los primeros esfuerzos por evaluar otro tipo de inmunógenos, donde destacan el uso de bacterias vivas y de sobrenadantes de cultivo para conferir protección a los animales con resultados aparentemente satisfactorios.^{15, 16, 24}

En conclusión, los inmunógenos utilizados fueron inocuos para los animales, con base en la ausencia de reacciones posvacunales de consideración. Se observó una relación directa entre títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina con el grado de protección al desafío experimental con *P. haemolytica*.

La inmunización disminuyó el daño pulmonar al desafío experimental con *P. haemolytica*, así como las manifestaciones clínicas en los animales.

La citotoxina de *P. haemolytica* podría participar de manera determinante en la patogénesis de la enfermedad, pues fue el inmunógeno que redujo en forma más notoria la presentación del daño pulmonar al desafío.

Abstract

This study was conducted to evaluate the protective effect of live *Pasteurella haemolytica* and its leucotoxin on lambs upon challenge. Forty lambs were used and randomly distributed in four groups. Group one was the control group, receiving subcutaneously only growth media. Group two was subcutaneously immunized with a live culture of *P. haemolytica* A1. Group three was intradermally immunized with a live culture of *P. haemolytica*. Group four received *P. haemolytica* leucotoxin, which was subcutaneously administered with complete Freund's adjuvant. All animals were exposed with PI-3 virus and then challenged with a field strain of *P. haemolytica* A1, and subsequently slaughtered to evaluate pulmonary lesions. Control lambs presented fever after the bacterial challenge. Anticapsule and antileukotoxin antibody titrers were higher in all immunized groups compared with the control group ($P < 0.05$). Pulmonary lesions were more severe in the control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference among the immunized groups. These results show that the protection conferred with live *P. haemolytica* vaccine or its leucotoxin is satisfactory to protect lambs against pulmonary lesions produced experimentally by the *P. haemolytica* challenge. Furthermore, innocuity of the immunogens used in the present study due to the absence of postvaccinal reactions, was demonstrated.

Literatura citada

1. Aguilar, T.C. y Tórtora, P.J.: Mortalidad de corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa Alta, D.F. Memorias del III Congreso Nacional de Producción Ovina. Tlaxcala, Tlaxcala, México. 1989. 146-149. *Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinos*. México, D.F. (1989).
2. Aley, M.R. and Clarke, J.L.: The influence of microorganisms on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. *N. Z. vet. J.*, 25: 200-205 (1977).

3. Berggren, K.A., Baluyut, C.S., Simonson, R.R., Bemrick, W.J. and Maheswaran, S.K.: Cytotoxic effect of *Pasteurella haemolytica* on ovine neutrophils. *Am. J. vet. Res.*, 42: 1383-1388 (1981).
4. Cho, H.J., Bohac, J.C., Yates, W.D.G. and Ohman, H.B.: Anticytotoxin activity of bovine sera and body fluids against *Pasteurella haemolytica* A1 cytotoxin. *Can. J. comp. Med.*, 48: 151-155 (1984).
5. Conner, A.W., Panciera, R.A., Corsvet, R.E., Rummage, J.A. and Fulton, R.W.: Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of culture age of *Pasteurella haemolytica* used as a live vaccine. *Am. J. vet. Res.*, 45: 2543-2545 (1984).
6. Confer, A.W., Panciera, R.J., Fulton, R.W., Gentry, M.J. and Rummage, J.A.: Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. vet. Res.*, 46: 342-347 (1985).
7. Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J. and Fulton, R.W.: Immunologic response and resistance to experimentally induced pneumonic pasteurellosis in cattle vaccinated with various dosages of lyophilized *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. vet. Res.*, 47: 1853-1857 (1986).
8. Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J. and Fulton, R.W.: Immunologic response to *Pasteurella haemolytica* and resistance against experimental bovine pneumonic pasteurellosis induced by bacterins in oil adjuvants. *Am. J. vet. Res.*, 48: 163-168 (1987).
9. Frank, G.H. and Wessman, G.E.: Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. *J. Clin. Microbiol.*, 7: 142-145 (1978).
10. Friend, S.C.E., Wilkie, B.N., Thomson, R.G. and Barnum, D.A.: Bovine pneumonic pasteurellosis: Experimental induction in vaccinated and nonvaccinated calves. *Can. J. comp. Med.*, 41: 77-83 (1977).
11. Gentry, M.L., Confer, A.W. and Kreps, J.A.: Simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing antibody titres in cattle sera. *J. Clin. Microbiol.*, 22: 968-972 (1985).
12. Gentry, M.L., Confer, A.W. and Panciera, R.J.: Serum neutralization of cytotoxin from *Pasteurella haemolytica* serotype 1 and resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 9: 239-250 (1985).
13. Gershwin, L.J. and Friebergs, H.K.: Demonstration of *Pasteurella haemolytica* specific immunoglobulin E in bovine serum. *Am. J. vet. Res.*, 48: 169-175 (1987).
14. Himmel, M.E., Yates, M.D., Laverman, L.R. and Squire, P.G.: Purification and partial characterization of a macrophage cytotoxin from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. vet. Res.*, 43: 764-767 (1982).
15. Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Vázquez, N.J., Trigo, T.F. y Suárez, G.F.: Evaluación de la inmunidad pasiva contra *Pasteurella haemolytica* A-1 en corderos provenientes de borregas inoculadas con diferentes antígenos bacterianos. Memorias del XVI Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, Veracruz, México. 1991. 351-353. *Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos*. México, D.F. (1991).
16. Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Trigo, T.F., Suárez, G.F. y Vázquez, N.J.: Desafío experimental de ovinos inmunizados con vacuna y sobrenadante de cultivo (leucotoxina) de *Pasteurella haemolytica*. Memorias del XVI Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, Veracruz, México. 1991. 354-357. *Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos*. México, D.F. (1991).
17. Jericho, K.W.F., Cho, H.J. and Kozub, G.C.: Protective effect of inactivated *Pasteurella haemolytica* bacterin challenged in bovine herpesvirus-1 experimentally infected calves. *Vaccine*, 8: 315-320 (1990).
18. Lea-Master, B.R., Evermann, J.F. and Lehmkuhl, H.D.: Identification of ovine adenovirus types five and six in an epizootic of respiratory tract disease in recently weaned lambs. *J. Am. vet. med. Ass.*, 190: 1545-1547 (1987).
19. Lehmkuhl, H.D., Contreras, J.A., Cutlip, R.C. and Brogden, K.A.: Clinical and microbiologic findings in lambs inoculated with *Pasteurella haemolytica* after infection with ovine adenovirus type 6. *Am. J. vet. Res.*, 50: 671-675 (1989).
20. Lopez, A., Maxie, M.G., Savan, M., Ruhinke, H.L., Thomson, R.G., Barnum, D.A. and Geissinger, H.D.: The pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* in calves infected with bovine virus diarrhoea or *Mycoplasma bovis*. *Can. J. comp. Med.*, 46: 302-306 (1982).
21. Luna, L.G.: Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. *McGraw-Hill*, New York, 1968.
22. Markham, R.J.F. and Wilkie, B.N.: Influence of bronchoalveolar washing supernatant and stimulated lymphocyte supernatants on uptake of *Pasteurella haemolytica* by cultured bovine alveolar macrophages. *Am. J. vet. Res.*, 41: 443-447 (1980).
23. Moore, R.N., Walker, R.D., Shaw, G.A., Hopkins, F.M. and Shull, E.P.: Antileukotoxin antibody produced in the bovine lung after aerosol exposure to viable *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. vet. Res.*, 46: 1949-1952 (1985).
24. Pulido, F.M.: Efecto potencial de diferentes adyuvantes en la respuesta inmune inducida por la administración de leucotoxina de *Pasteurella haemolytica* A-1 en conejos. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 1991.
25. Purdy, Ch. W., Straus, D.C., Livingston, Ch.W. and Foster, G.S.: Immune response to pulmonary injection of *Pasteurella haemolytica* impregnated agar beads followed by transthoracic challenge exposure in goats. *Am. J. vet. Res.*, 51: 1629-1634 (1990).
26. Rimsay, R.L., Coyle-Dennis, J.E. and Lauerman, L.H.: Purification and biological characterization of endotoxin fractions from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. vet. Res.*, 42: 2134-2138 (1981).
27. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: Cytotoxin of *Pasteurella haemolytica* acting on bovine leukocytes. *Infect. Immun.*, 35: 91-94 (1982).
28. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by type specific rabbit antisera. *Am. J. vet. Res.*, 44: 715-719 (1983).
29. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing activity in sera from Ontario beef cattle. *Can. J. comp. Med.*, 47: 497-498 (1983).
30. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of growing bacteria. *Am. J. vet. Res.*, 46: 1212-1214 (1985).
31. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: Vaccination of calves with leucotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. vet. Res.*, 52: 30-36 (1988).
32. Squire, P.G., Smiley, D.W. and Croskell, R.B.: Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infect. Immun.*, 45: 667-673 (1984).
33. Sutherland, A.D. and Donachie, W.: Cytotoxic effect of serotypes of *Pasteurella haemolytica* on sheep bronchoalveolar macrophages. *Vet. Microbiol.*, 11: 331-336 (1986).
34. Walker, R.D., Corsvet, R.E., Lessley, B.A. and Panciera, R.J.: Study of bovine pulmonary response to *Pasteurella haemolytica*: Specificity of immunoglobulins isolated from the bovine lung. *Am. J. vet. Res.*, 41: 1015-1023 (1980).
35. Wilkie, B.N.: Respiratory tract immune response to microbial pathogens. *J. Am. vet. med. Ass.*, 181: 1074-1079 (1982).
36. Wilkie, B.N. and Markham, R.J.F.: Sequential titration of bovine lung and serum antibodies after parenteral of pulmonary inoculation with *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. vet. Res.*, 40: 1690-1693 (1979).
37. Wilkie, B.N., Markham, R.J.F. and Shewen, P.E.: Response of calves to lung challenge exposure with *Pasteurella haemolytica* after parenteral or pulmonary immunization. *Am. J. vet. Res.*, 41: 1773-1778 (1980).
38. Williams, W.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 9th ed. *Williams and Wilkie*, Baltimore, Maryland, 1986.