

Evaluación de la protección contra la pasteurelisis neumónica, en corderos vacunados con diferentes antígenos de *Pasteurella haemolytica* A1

Francisco Aguilar Romero*^{***}
Laura Jaramillo Meza*
J. Francisco Morales Alvarez*
Francisco J. Trigo Tavera**
Francisco Suárez Güemes^{***}

Abstract

An evaluation in two stages to measure the protection of pneumonic pasteurellosis provided by different immunogens of *Pasteurella haemolytica* A1 was conducted. It was first conducted under experimental conditions and afterwards on field trials. In the first stage, 42 lambs were randomly distributed in six groups. On day 0 of the experiment, Group A received subcutaneously, as an immunogen, a live culture in the logarithmic phase of *P. haemolytica* with a 1×10^9 CFU/ml; Group B was the control group; Group C received a commercial bacterin; Group D was treated with a leukotoxin culture supernatant; Group E was inoculated with a soluble capsule extract (SCE) with leukotoxin and Group F was treated with SCE with leukotoxin plus the adjuvant. All animals were exposed on day 35 to the Parainfluenza virus type 3 (PI₃) intratracheally and intranasally and seven days later challenged with a field strain of *P. haemolytica* transthoracically. The surviving sheep were euthanized on day 49 of the experiment to assess pulmonary lesions and to perform the bacteriological study of some organs. Rectal temperature was measured daily, and serum samples were taken on days 0, 7, 14, 21, 28, 35, 41 and 49 of the experiment to determine the anticapsule and antileukotoxin antibody levels using indirect haemmoagglutination and the simple visual assay. The field evaluation was carried out on 12 farms in Coajomulco, Morelos, Mexico, were 320 lambs were divided into 4 groups of 80 animals each. Using the same method as mentioned above the dosage and the administration techniques were as follows: Group 1 received leukotoxin; Group 2 was treated with a commercial bacterin; Group 3 was used as the control and group 4 received a live bacteria. In this phase the challenge was natural and anticapsule and antileukotoxin antibody titers were evaluated, determining morbidity and mortality too. In the experimental phase the measurements of the levels of the anticapsule- and antileukotoxin antibodies were statistically higher ($P < 0.05$) in the groups treated with the live bacteria, leukotoxin and commercial bacterin as compared to the rest of the groups. Furthermore, lesions found were more severe in groups B, E and F. In the field trial, Group 1 presented 3 (3.75%) animals which developed clinical pneumonia, while Group 2 presented 5 (6.25%) and Group 4 presented 4 (5%) ones. Control Group 3 included 23 lambs (28.75%) with clinical pneumonia. Group 1 presented fewer deaths and higher anticapsule and antileukotoxin antibody titers than control Group 3 ($P < 0.05$). Results obtained in both phases suggest that the leukotoxin and the live bacteria are an important option in the prevention of pneumonia, and that research must continue regarding the different immunogens used, as well as searching for new options.

Key words: LAMBS, PNEUMONIC, *PASTEURELLA HAEMOLYTICA*, IMMUNOGENS, PROTECTION.

Recibido el 26 de noviembre de 1996 y aceptado el 29 de enero de 1997.

* Proyecto Complejo Neumónico en Rumiantes, CENID-Microbiología, INIFAP-SAGAR, km 15.5 Carretera México-Toluca, Cuajimalpa, 05110, D.F.

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

^{***} Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

Resumen

Con la finalidad de medir la protección contra pasteurelosis pulmonar que otorgan diferentes inmunógenos de *Pasteurella haemolytica* A1, éstos se evaluaron en 2 etapas: en condiciones de desafío experimental, y de desafío natural. En la primera, 42 corderos fueron distribuidos en 6 grupos: el grupo A recibió cultivo vivo, el B sirvió como testigo, al C se le trató con una bacterina comercial, el D con leucotoxina (sobrenadante de cultivo), al E se le administró extracto soluble capsular (ESC) con leucotoxina y el F fue tratado con ESC con leucotoxina más adyuvante. En el día 35 los ovinos fueron expuestos al virus de PI₃ y 7 días después fueron desafiados con *P. haemolytica* por vía transtorácica. Los corderos sobrevivientes fueron sacrificados al día 49, para el registro de lesiones y estudio bacteriológico. Se les tomó diariamente la temperatura rectal y muestras de suero cada 7 días, con el fin de medir anticuerpos anticápsula y antileucotoxina. En la evaluación de campo se trabajó con 4 grupos de 80 animales cada uno. Se midieron niveles de anticuerpos y se registraron parámetros de morbilidad y mortalidad. En la primera fase los títulos de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina fueron estadísticamente significativos ($P < 0.05$) en los grupos tratados con bacteria viva, leucotoxina y bacterina comercial en comparación con el resto de los grupos; las lesiones fueron más severas en los grupos B, E y F. En la fase de campo en los grupos 1, 2 y 4 se enfermaron de neumonía clínica 3 (3.75%), 5 (6.25%) y 4 (5%) animales, respectivamente, y en el grupo 3 (testigo) fueron 23 (28.75%). Con respecto a la mortalidad y los niveles de anticuerpos se encontró diferencia ($P < 0.05$) entre los grupos 1 y 3. Los resultados obtenidos en ambas fases sugieren que la leucotoxina (sobrenadante de cultivo) y la bacteria viva pueden ser una opción importante en la prevención de las neumonías en ovinos.

Palabras clave: NEUMONIA, CORDEROS, *PASTEURELLA HAEMOLYTICA*, INMUNOGENOS, PROTECCION.

Introducción

Las neumonías son consideradas como los padecimientos de mayor importancia en los animales domésticos; por su parte, los microorganismos del género *Pasteurella* constituyen las bacterias más frecuentemente aisladas en estos procesos patológicos.³² *Pasteurella haemolytica* se considera como un importante oportunista del tracto respiratorio de los bovinos, ovinos y cabras, ya que usualmente coloniza la parte alta de éste, y bajo ciertas condiciones de inmunosupresión en el huésped —tales como infección primaria por virus o micoplasmas, cambios de temperatura, humedad y ventilación deficiente— afecta los mecanismos de defensa, esto último permite el establecimiento del microorganismo y daño al tejido pulmonar.^{1,15,18,23,25,44} Se ha observado que corderos clínicamente sanos bajo condiciones de estrés presentan niveles elevados de cortisol;³⁹ al administrar experimentalmente hidrocortisona, se encontró que los animales presentaron linfopenia, por lo que se supone que bajo estas condiciones existe una supresión en la respuesta inmune, lo anterior contribuye a una mayor presentación de la enfermedad.⁸

Informes sobre la frecuencia de neumonías en ovinos producidas por *P. haemolytica*, en los ámbitos nacional e internacional, la han evidenciado como una de las principales causas de mortalidad perinatal con índices que varían de acuerdo con la procedencia, tipo de explotación, época del año, con cifras que fluctúan del 10% al 40%.^{18,20,24,43}

P. haemolytica presenta diversos factores asociados con su virulencia, tales como la presencia de glicocálix, fimbria²⁸ y endotoxina,¹⁹ además de la producción de una exotoxina que ha demostrado ser tóxica para los neutrófilos,

macrófagos alveolares y linfocitos de rumiantes². Con la muerte de estas células también se liberan enzimas proteolíticas, histamina y otros mediadores químicos del proceso inflamatorio que contribuyen al daño pulmonar; por lo tanto, se ha considerado a la leucotoxina producida por cada uno de los 17 serotipos⁴⁵ como el principal factor de virulencia de la bacteria;^{2,25,36} estas exotoxinas están estrechamente relacionadas desde el punto de vista inmunológico, funcional y genético.⁷

Las bacterinas contra la pasteurelosis en ovinos han sido usadas durante décadas, pero su eficacia sigue siendo cuestionada. Actualmente se han desarrollado diversos inmunógenos para prevenir las neumonías por *Pasteurella haemolytica* en rumiantes con resultados aparentemente satisfactorios, en algunos casos, utilizando como antígenos: bacteria viva, bacteria muerta, material capsular, extractos bacterianos y leucotoxina cruda,^{9,11,12,13,14,22,34,37,38,40} además de probar rutas de administración como la oral⁴ y usar adyuvantes sintéticos.⁵ También existe información que indica que hay una correlación directa entre títulos de anticuerpos neutralizantes de la leucotoxina con la resistencia a la enfermedad.^{21,29}

Los objetivos de este trabajo fueron producir 4 biológicos experimentales y evaluar su protección en los animales vacunados al exponerlos al desafío experimental y de campo, además de determinar si existe una relación directa entre títulos de anticuerpos y protección.

Material y métodos

La evaluación se realizó por medio de un estudio experimental longitudinal prospectivo^{31,42} y se llevó a cabo en dos

fases, la primera en condiciones experimentales y la segunda en campo.

Fase experimental

Animales

Se utilizaron 42 ovinos de 2 a 4 meses de edad, clínicamente sanos, que fueron distribuidos en forma aleatoria en 6 grupos de 7 animales cada uno y fueron confinados en los corrales del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Veterinaria, INIFAP-SAGAR.

Cepas bacterianas y virales

Se usaron dos cepas de *P. haemolytica* A1, una de ellas de referencia,* para producir los antígenos y la otra como cepa de desafío, que se aisló de un caso clínico de pasteurelisis pulmonar ovina. La cepa de virus de parainfluenza 3 (PI₃) fue aislada en México a partir de un pulmón de ovino, replicada en cultivos celulares y mantenida en congelación hasta su utilización en concentración de 1×10^6 dosis infectante 50 de cultivo de tejido por mililitro (DICT₅₀/ml).

Inmunógenos

Se prepararon los siguientes biológicos: leucotoxina cruda (proteína en sobrenadante de cultivo), extracto soluble capsular, cultivo en fase de crecimiento logarítmico (suspensión de células vivas incubadas durante 6 horas) y se adquirió una bacterina comercial (suspensión de células completas inactivadas). La producción de leucotoxina se realizó de acuerdo con el método recomendado por Gentry *et al.*¹⁷ La obtención del extracto soluble capsular se realizó siguiendo la técnica descrita por Durham *et al.*¹⁴ El cultivo fresco de *P. haemolytica* a una concentración de 1×10^9 UFC/ml se obtuvo siguiendo la metodología de Confer *et al.*¹⁰

Diseño experimental

Los antígenos se aplicaron en el día 0 del experimento de acuerdo con el siguiente esquema:

Grupo A: Suspensión de cultivo fresco de *P. haemolytica* a una concentración de 1×10^9 UFC/ml, 2 ml por vía subcutánea.

Grupo B: Testigo (recibió 2 ml de solución salina fisiológica).

Grupo C: Bacterina comercial.

Grupo D: Leucotoxina cruda a una concentración proteínica de 10 mg/ml, 2 ml vía subcutánea.

Grupo E: Extracto soluble 2.5 mg/ml (1 ml)+ leucotoxina cruda (1 ml), vía subcutánea.

Grupo F: Leucotoxina (1 ml)+ extracto soluble (1 ml)+ adyuvante Al(OH)₃ (1 ml), vía subcutánea.

El día 35 posvacunación los corderos fueron expuestos al virus de PI₃ por vía intratraqueal e intranasal con un volumen total de 2 ml de suspensión viral titulada a 1×10^6 DICT₅₀/ml, la cual se define como la cantidad de virus contenido en 50 ml que causa 50% de efecto citopático en cultivo de tejidos.

En el día 42 del experimento se efectuó el desafío con 2 ml de suspensión de *P. haemolytica*, a una concentración de 1×10^9 UFC/ml por vía transtorácica. Los animales que sobrevivieron fueron sacrificados el día 49 y se les practicó la necropsia para registrar lesiones pulmonares macroscópicas y coleccionar muestras de tejido de diferentes órganos para el estudio bacteriológico.

Serología

Los animales fueron sangrados los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 del experimento. Se utilizó la técnica de hemoaglutinación indirecta (HI) para la determinación de los anticuerpos anticápsula y la del ensayo visual simple (EVS) para los anticuerpos neutralizantes de la leucotoxina, descritas por Biberstein³ y Gentry *et al.*¹⁷

Examen clínico

Se registró la temperatura rectal de los corderos diariamente, así como su estado clínico general.

Estudios postmortem. Se recolectaron muestras de pulmón, hígado, riñón y bazo, para estudio bacteriológico, además de preparar laminillas de tejido pulmonar teñidas con hematoxilina-eosina para estudios de histopatología.

Las lesiones pulmonares macroscópicas fueron registradas en esquemas, para realizar una comparación de la magnitud de las mismas entre los diferentes grupos.

Análisis estadístico

Se analizaron las variables: niveles de anticuerpos anticápsula, antileucotoxina y temperatura con un análisis de varianza con un diseño en arreglo factorial anidado con rompimiento en tiempo. Los títulos serológicos se expresan logarítmicamente en base 2 para facilitar la interpretación de los datos y análisis.⁴² Finalmente se realizó la comparación de las medias con la prueba de significancia de Tukey.³³

Fase de campo

Antígenos

De acuerdo con los resultados de la fase experimental, se eligieron 3 antígenos para ser probados en campo: bacteria viva, leucotoxina y la bacterina comercial.

* Donada por el Dr. G. Frank, del Animal Disease Center, Ames, Iowa, USA.

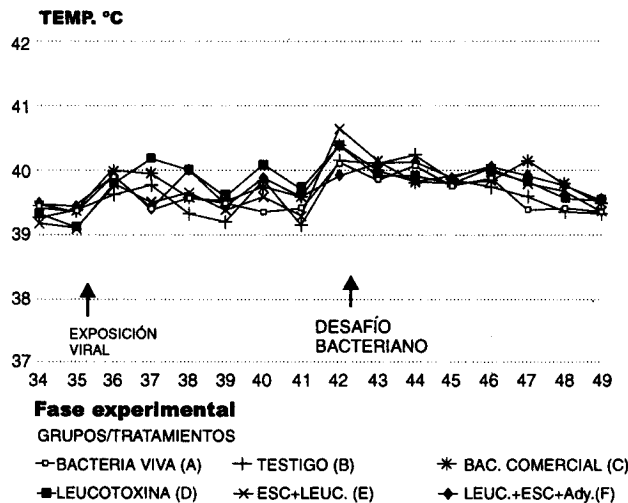


Figura 1. Temperatura rectal de corderos inmunizados con antígenos de *Pasteurella haemolytica*.

Animales

Se utilizaron 320 corderos de 2 a 4 meses de edad, en 12 explotaciones ovinas de Coajomulco, Morelos. El tamaño de la muestra se calculó con la fórmula para detectar diferencias entre promedios:^{31,35}

$$n = [(Z_a + Z_b) \times DE / d]^2$$

Diseño experimental

Se formaron aleatoriamente 4 grupos, de 80 corderos cada uno, a los cuales se les aplicó de igual forma que en la fase experimental, con respecto a dosis y vía, el siguiente tratamiento:

Grupo 1: Leucotoxina.

Grupo 2: Bacterina comercial.

Grupo 3: Testigo.

Grupo 4: Bacteria viva.

Los animales fueron sangrados en el día 0 y posteriormente en 2 ocasiones con un intervalo promedio de un mes; se registraron parámetros de morbilidad y mortalidad de padecimientos relacionados con el aparato respiratorio. Todos los animales continuaron con las prácticas rutinarias de manejo y alimentación durante los 2 meses que duró el estudio.

Estudios serológicos

Se midieron anticuerpos anticápsula y antileucotoxina con las pruebas de hemoaglutinación indirecta y ensayo visual simple, respectivamente.^{3,17}

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se sometieron al análisis de varianza y prueba de significancia de Tukey.³⁵

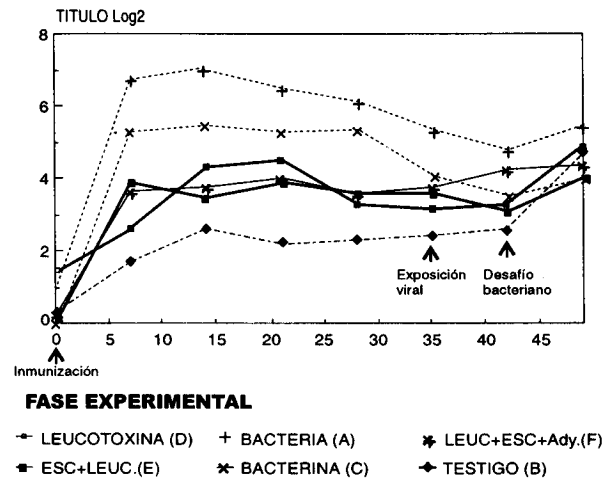


Figura 2. Anticuerpos anticápsula en corderos con la prueba de hemoaglutinación indirecta.

Resultados de la fase experimental

Temperatura

La temperatura rectal en los días posteriores a la inoculación de los antígenos no mostró diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre los grupos, registrándose el valor promedio más alto de $39.4 \pm 0.5^\circ\text{C}$. En los 4 días posteriores a la exposición viral se observaron incrementos en los grupos D y F, tratados con leucotoxina y ESC + leucotoxina + adyuvante, respectivamente, en donde se registraron temperaturas promedio de 40.2°C , presentándose diferencia estadística significativa con respecto a los demás grupos. El mayor incremento que se registró (40.6°C promedio) fue posterior al desafío bacteriano, se presentó la más alta en el grupo E tratado con leucotoxina + ESC (Figura 1).

Anticuerpos anticápsula

Se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) de los grupos tratados con respecto al grupo testigo (grupo B), no habiendo diferencia estadística entre sí, de los grupos D, E y F. Los títulos se elevaron de manera uniforme (Figura 2) en todos los grupos durante la primera semana posinmunización, hasta alcanzar los niveles más altos el día 14, después disminuyeron paulatinamente hasta el día 42 en donde fueron desafiados con *P. haemolytica*. A partir de ese día se observó un incremento homogéneo en todos los grupos. La mayor seroconversión se apreció en los animales tratados con bacteria viva, dando títulos promedio de 7.0 ± 1.15 , la más baja se presentó en el grupo testigo (2.57 ± 0.53); aunque este último tuvo un incremento similar a los demás grupos en los días posteriores al desafío experimental.

Anticuerpos antileucotoxina

Los grupos inoculados con leucotoxina y bacteria viva, mostraron diferencia estadística significativa

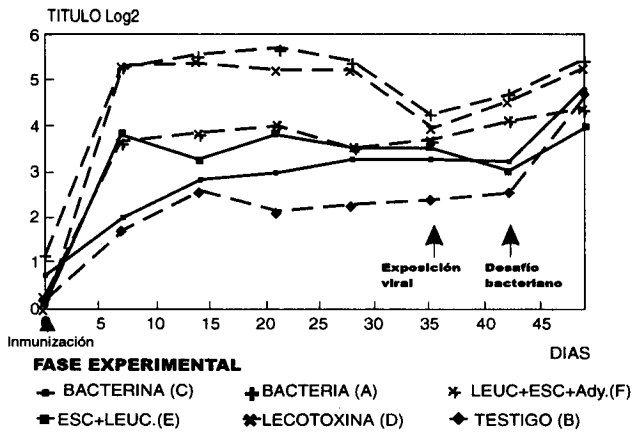


Figura 3. Anticuerpos contra leucotoxina en corderos con la prueba de ensayo visual simple.

($P < 0.05$) con respecto a los demás, incluyendo el grupo testigo, se lograron los títulos promedio más altos en los días 14 y 21 de 5.42 ± 0.53 y 5.71 ± 0.48 , respectivamente. La Figura 3 muestra el comportamiento similar en los grupos A y D, para posteriormente disminuir hasta el día 35, cuando fueron expuestos al virus de PI₃, observándose un incremento constante hasta la finalización del experimento en el día 49. Situación similar se dio en los grupos C, E y F, aunque con niveles más bajos, encontrándose diferencia con

respecto al grupo testigo (B), que fue el que menos seroconvirtió (2.14 ± 0.37), pero al ser desafiados con *P. haemolytica* en el día 42, sus valores se incrementaron rápidamente hasta alcanzar en el día 49 el título promedio de 4.71 ± 0.48 .

Evaluación del daño pulmonar

En la necropsia se registró la extensión de lesiones en esquemas (Figura 4), registrándose las áreas de consolidación más grandes y severas en el grupo testigo (grupo B), seguido por los grupos inoculados con ESC + leucotoxina (grupo E) y ESC + leucotoxina + adyuvante (grupo F). Las lesiones menores fueron encontradas en los grupos inoculados con bacteria viva (grupo A), leucotoxina (grupo D) y bacterina comercial (grupo C).

Estudio bacteriológico

De los 42 corderos, 5 murieron 48 horas posdesafío; el resto fueron sacrificados el día 49. De los 5 que murieron, 1 pertenecía al grupo tratado con bacterina comercial (C), 2 al grupo E, tratado con ESC combinado con leucotoxina, y 2 al grupo inoculado con leucotoxina, ESC y adyuvante (F), en todos se aisló *Pasteurella haemolytica* A1, a partir de pulmón, riñón, bazo e hígado. En los animales restantes se logró el aislamiento a partir del pulmón.

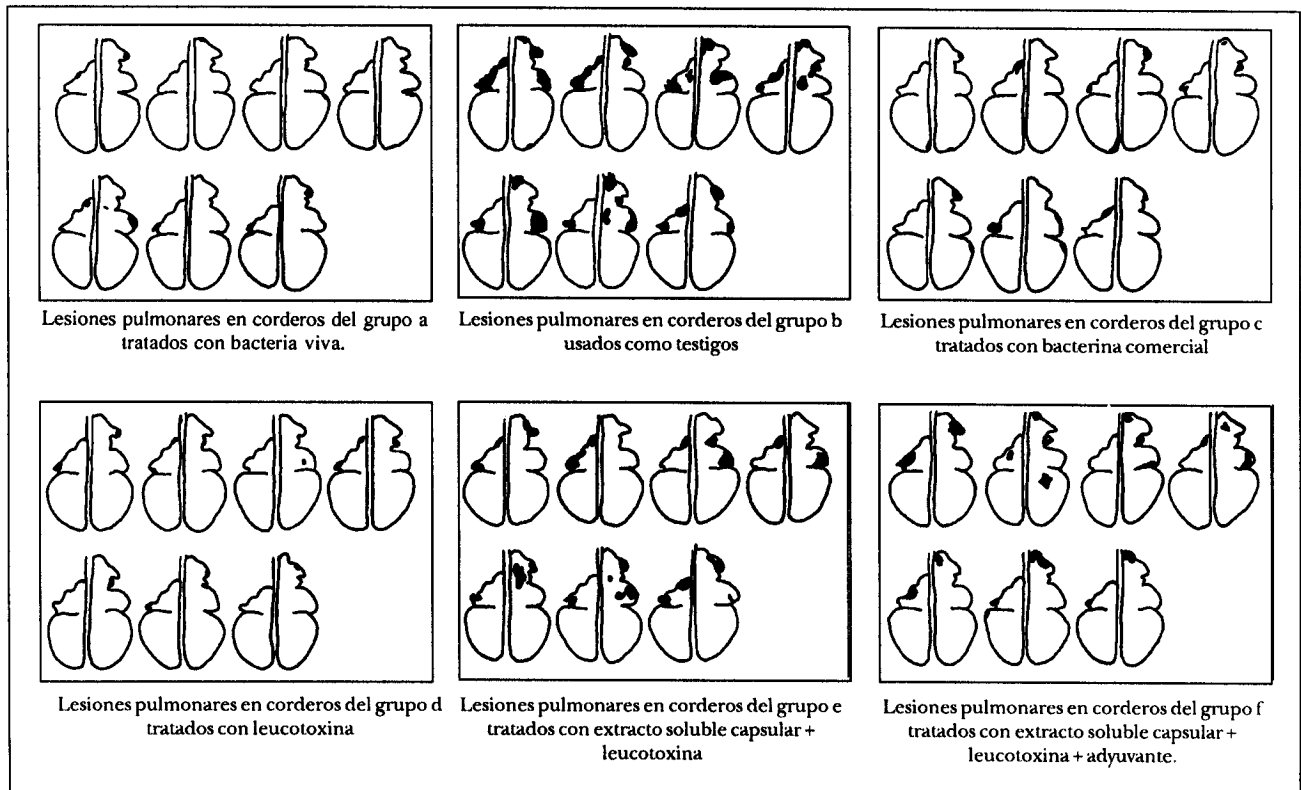


Figura 4. Lesiones pulmonares en los 6 grupos formados en la base experimental.

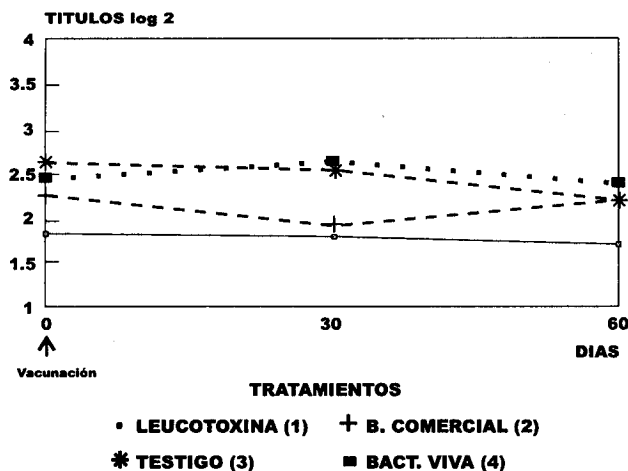


Figura 5. Anticuerpos anticápsula en corderos vacunados con antígenos de *P. haemolytica*.

Estudio histopatológico

Las lesiones más frecuentes que se observaron en los pulmones fueron: pleuritis fibrinosa de moderada a severa, congestión, engrosamiento de septos interlobulillares por la presencia de fibrina e infiltración de células inflamatorias del tipo neutrófilos. También fue frecuente la presencia de edema y hemorragias subpleurales.

Resultados de la fase de campo

Anticuerpos anticápsula

La Figura 5 muestra los títulos de anticuerpos anticápsula, de tres muestreos, espaciados entre sí por periodos de aproximadamente 30 días. La seroconversión de los cuatro grupos fue mala, ya que el título más alto fue de 2.65 +/- 0.59 en el día 30, del grupo inoculado con bacteria viva y donde prácticamente todos los grupos conservaron un mismo nivel de anticuerpos durante el experimento. Al realizar la prueba de significancia de Tukey se encontró diferencia estadística significativa ($P < 0.05$) entre el grupo tratado con leucotoxina (grupo 1) y al que se le administró bacterina comercial (grupo 2), con respecto a los grupos 3 (testigo) y 4 (inoculado con bacteria viva), aunque estos últimos no mostraron diferencia estadística entre sí. Cabe mencionar que el grupo testigo inició el experimento con el título promedio más alto (2.62 +/- 0.64) de los grupos y durante toda la evaluación fue superior a los grupos 1 y 2.

Anticuerpos antileucotoxina

Los niveles de anticuerpos antileucotoxina de todos los grupos tuvieron un comportamiento similar desde el inicio del estudio y conservaron ese mismo nivel hasta el tercer muestreo (Figura 6). Al realizar el análisis estadístico y someter los datos a la prueba de significancia ($P < 0.05$) se encontró diferencia en el día 60 entre los grupos

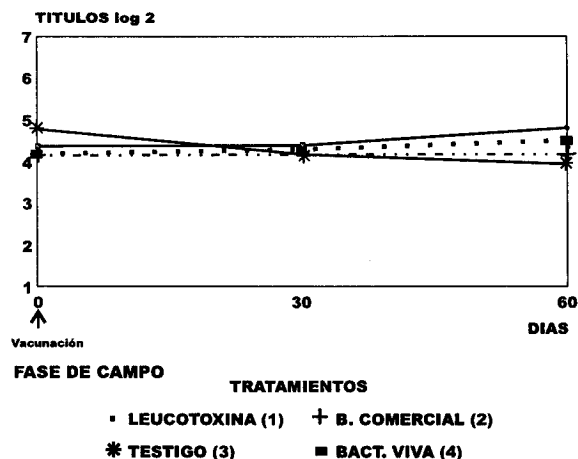


Figura 6. Anticuerpos antileucotoxina en corderos vacunados con *P. haemolytica*.

tratados con leucotoxina y bacterina comercial; asimismo, entre el grupo testigo y el tratado con leucotoxina.

Evaluación clínica

Durante el estudio se registraron los datos de morbilidad y mortalidad (Figura 7), encontrándose que la cifra más alta de enfermos de cuadro respiratorio se registró en el grupo 3 (testigo) con 23, que representa 28.75%, seguido de los tratados con bacterina comercial (grupo 2), bacteria viva (grupo 4) y leucotoxina (grupo 1) con 5 (6.25%), 4 (5%) y 3 (3.75%), respectivamente. Los casos fueron tratados con quimioterapéuticos y aunque algunos se recuperaron, se registró la muerte de 12 corderos, los cuales estaban distribuidos de la siguiente forma: 5 (6.25%) pertenecían al grupo testigo, 3 (3.75%) al tratado con la bacterina comercial y 2 (2.5%) en cada uno de los grupos inoculados con leucotoxina y bacteria viva, respectivamente.

Discusión

Se sabe que una de las reacciones posvacunales características es la elevación de la temperatura, aunque en el presente trabajo los incrementos más evidentes fueron posteriores a la exposición al virus de PI₃ y al desafío bacteriano por vía transtorácica. Resultados similares informaron Morales *et al.*²⁷ al llevar a cabo exposición viral (PI₃) y desafío bacteriano experimental. Por otro lado, Lehmkuhl *et al.*²⁸ encontraron incrementos en la temperatura de los ovinos que inocularon con *P. haemolytica* después de infectarlos con adenovirus ovino tipo 6. Es importante destacar que existen trabajos^{9,10} en los que no se encontró una relación directa entre temperatura y protección al daño pulmonar; en este sentido no se puede tomar dicho parámetro como un dato esencial para valorar un biológico.

Respecto de los títulos de anticuerpos antileucotoxina, los grupos que mostraron valores más altos y que presentaron diferencia estadística significativa con el resto, fueron los inoculados con bacteria viva y leucotoxina, coincidiendo que éstos presentaron las lesiones menos extensas

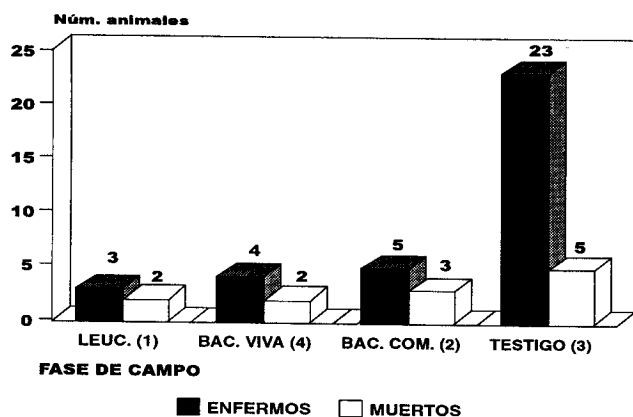


Figura 7. Corderos que presentaron problemas respiratorios.

y severas, a diferencia de los grupos B, E y F; por lo que en el presente trabajo se encontró una relación directa entre títulos de anticuerpos antileucotoxina y protección. Es importante que se encuentren presentes anticuerpos neutralizantes contra la leucotoxina con la finalidad de que no haya destrucción de leucocitos, ya que representan la primera barrera de defensa pulmonar y como consecuencia se ve reflejado en una mayor resistencia al daño pulmonar. Cabe señalar que las lesiones pulmonares producidas son las que usualmente se observan en casos de pasteurelisis pulmonar en condiciones naturales.⁴¹

El grupo tratado con sobrenadante de cultivo (leucotoxina sola) fue el que presentó mayor resistencia al daño pulmonar, ningún animal murió al desafío bacteriano, lo que dio 100% de protección. Esto último concuerda en parte con lo descrito por Sutherland *et al.*⁴⁰ al utilizar leucotoxina cruda como vacuna en corderos libres de patógenos específicos (SPF), donde obtuvo una protección del 86% al desafío homólogo. Ahora bien con la leucotoxina combinada con un extracto de la bacteria, obtenido con salicilato de sodio, encontró una protección del 98%; esta cifra es superior a la registrada en el presente experimento (grupo E), que al utilizar un antígeno igual fue de 71.5%, ya que de los 7 animales del grupo, murieron 2.

Es importante mencionar que cuando se ha utilizado la leucotoxina purificada los resultados son poco efectivos, no así cuando se emplea el sobrenadante de cultivo en donde se encuentra la leucotoxina, pero también podrían existir componentes de la bacteria como el polisacárido capsular, el lipopolisacárido (LPS) y proteínas de membrana externa, además de otros productos de su metabolismo, por lo que éstos podrían estar participando de manera importante en la protección que otorgan a los animales vacunados.^{5,6,26}

En diversos trabajos las vacunas constituidas por bacterias vivas también han demostrado su efectividad al proteger a los animales contra el desafío experimental,^{9,10,30,38} coincidiendo con los resultados del presente trabajo. Un aspecto que se debe mencionar es el riesgo que puede

existir al manejar microorganismos vivos que pudieran constituir un riesgo para la salud de los animales que se pretende proteger; sin embargo, la ventaja que se logra al administrar este tipo de biológico, es que el microorganismo se difunde lentamente desde el sitio de aplicación y permite que se formen anticuerpos contra sus antígenos de superficie que se encuentran en la cápsula, así como contra productos de su metabolismo como la leucotoxina, lo que explica que se tengan niveles similares de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina cuando se da un tratamiento de este tipo.^{9,10} Con respecto al uso de las bacterinas, se ha discutido mucho acerca de la protección que brindan, debido a que en la mayoría de las veces se concluye que confieren escasa protección e incluso se menciona que pueden incrementar el daño pulmonar, debido a que cuando los títulos de anticuerpos anticápsula son altos se favorece el mecanismo de opsonización por anticuerpos específicos, facilitando que se lleve a cabo la fagocitosis por los macrófagos alveolares y los neutrófilos, dándose una respuesta de manera exacerbada que se traduce en daño tisular del pulmón.¹⁰

En la evaluación de los inmunógenos en condiciones de campo se presentó la siguiente situación que pudo haber influido, aunque no de forma determinante, en la presentación de los resultados obtenidos; debido a que no se cumplió exactamente con el programa original de sangrados, por lo que al analizar las gráficas de los títulos anticápsula y antileucotoxina de todos los grupos, no se observa la curva característica de la respuesta a un inmunógeno; sin embargo, los datos obtenidos en los otros parámetros evaluados permite llegar a conclusiones importantes respecto de los biológicos evaluados.

En relación con los parámetros de morbilidad y mortalidad por afecciones respiratorias, el mayor número de animales enfermos (23) se registró en el grupo testigo, de éstos murieron 5; en comparación con el grupo tratado con leucotoxina en el que enfermaron 3, de los cuales murieron 2. El dato anterior es el resultado más importante de esta fase ya que muestra claramente la diferencia que existe, con respecto a resistencia a la infección del aparato respiratorio, entre los animales que fueron tratados con la leucotoxina y los del grupo testigo, coincidiendo con lo ocurrido en la parte experimental. Los resultados encontrados en esta etapa permiten pensar que los inmunógenos a base de leucotoxina sola (sobrenadante de cultivo) y bacteria viva, son útiles en la prevención de los problemas respiratorios, pero es necesario evaluarlos en mayor número de veces y bajo distintas condiciones. Es importante que se identifiquen los componentes inmunogénicos de estos biológicos con la finalidad de tener un mayor control en su producción.

También es necesario que en la investigación sobre pasteurelisis neumónica en rumiantes se enfoque hacia aspectos que permitan conocer con más exactitud la patogénesis del complejo respiratorio ya que existen múltiples interacciones huésped-parásito que permiten la colonización, invasión y evasión a las defensas del huésped.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por la International Foundation for Science (IFS), de Estocolmo, Suecia, Grant No. B/16626-1 y por el Programa de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecemos al M. en C. Marcelino E. Rosas García por su asesoría en el análisis estadístico y al personal del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Ovina (CEIEPO) Departamento de Rumiantes, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por su apoyo en la fase de campo.

Literatura citada

1. Babiuk, L.A., Morse, M., Campos, M. and Harland, R.: Viral-bacterial synergy. International Conference of *Haemophilus*, *Actinobacillus* and *Pasteurella*. Edinburgh, Scotland, UK. 1994. 21. Edinburgh, Scotland, U.K. (1994).
2. Balayut, C.S., Simonson, R.R., Demrick, N.J. and Maheswaran, S.K.: Interaction of *Pasteurella haemolytica* with bovine neutrophils: Identification and partial characterization of a cytotoxin. *Am. J. vet. Res.*, 42: 1920-1926 (1981).
3. Biberstein, E.L.: Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. In: Methods in Microbiology. Edited by: Bergeys, T., Norris, J.R., 253-269. Academic Press, New York, 1978.
4. Bowersock, T.L., Shalaby, W.S., Levy, M., Samuels, M.L., Lallone, R., White, R.M., Borie, D.L., Lehmeier, J. and Park, K.: Evaluation of an orally administered vaccine using hydrogels containing bacterial exotoxins of *Pasteurella haemolytica* in cattle. *Am. J. vet. Res.*, 55: 502-509 (1994).
5. Brogden, A.K., DeBey, B., Audibert, F., Lehmkuhl, H. and Chedid, L.: Protection of ruminants by *Pasteurella haemolytica* A1 capsular polysaccharide vaccines containing muramyl dipeptide analogs. *Vaccine*, 13: 1667-1684 (1995).
6. Brogden, A.K., DeBey, B. and Cutlip, R.: Lesions induced *in vivo* by cell-associated products of *Pasteurella haemolytica* and their role in the pathogenesis of bovine respiratory disease. Memorias del Seminario Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, N.L., México. 1995. 23-29. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L., México (1995).
7. Burrows, L.L., Olah-Winfield, E. and Lo, R.Y.C.: Molecular analysis of leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect. Immun.*, 61: 5001-5007 (1993).
8. Collins, M.T., Suárez-Güemes, F., Pierson, R.E. and Whiteman, C.E.: Effect of hydrocortisone on circulating lymphocyte numbers and their mitogen-induced blastogenesis in lambs. *Am. J. vet. Res.*, 46: 1-5 (1985).
9. Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J., Fulton, R.W. and Rummage, J.A.: Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica* on resistance to experimental bovine pneumonic pasteurellosis. *Am. J. vet. Res.*, 46: 342-347 (1985).
10. 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).
11. Chae, C.H., Gentry, M.J., Confer, A.W. and Anderson, G.A.: Resistance to host immune defense mechanisms afforded by capsular material of *Pasteurella haemolytica*, serotype 1. *Vet. Microbiol.*, 25: 241-251 (1990).
12. Derek, A.M., Simons, K.R., Confer, A.W., Panciera, R.J. and Clinkenbeard, K.D.: *Pasteurella haemolytica* antigens associated with resistance to pneumonic pasteurellosis. *Infect. Immun.*, 57: 711-716 (1989).
13. Donachie, W.: Vaccine development against *Pasteurella haemolytica* infections in sheep. International Conference of *Haemophilus*, *Actinobacillus* and *Pasteurella*. Edinburgh, Scotland, U.K. 1994. 18-19. Edinburgh, Scotland, U.K. (1994).
14. Durkham, J.A., Confer, A.W., Mosier, D.A. and Lessiey, B.A.: Comparison of the antigens associated with saline solution, potassium thiocyanate and sodium salicylate extract of *Pasteurella haemolytica* serotype 1. *Am. J. vet. Res.*, 47: 1946-1951 (1986).
15. Fillion, L.A., McGuire, R.L. and Babiuk, L.A.: Non specific suppressive effect of bovine herpes virus type 1 on bovine leucocyte function. *Infect. Immun.*, 42: 106-112 (1983).
16. Fillion, L.A., Wilson, P.J. and Bielefeldt-Ohmann, H.: The possible role of stress on the induction of pneumonic pasteurellosis. *Can. J. comp. Med.*, 48: 268-274 (1984).
17. Gentry, M.J., Confer, A.W. and Kops, J.A.: Simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxic neutralization antibody titers in cattle sera. *J. Clin. Microbiol.*, 22: 763-772 (1985).
18. Hernández, Z.J., Tórtora, P.J., Martínez, H.A. y Pijoan, A.P.: Determinación de las principales causas de mortalidad en Corderos en explotaciones del Estado de México. Memorias de la Reunión Anual de Investigación Pecuaría. México, D.F., 1985. 110. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. México, D.F. (1985).
19. Jean, Y.H. and Bak, U.B.: Pathological studies on the calf pneumonia experimentally induced by endotoxin and leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* A1. *J. agric. Sci. Vet.*, 35: 643-658 (1993).
20. Jensen, R.R., Pierson, P.E., Weitel, J.C., Tucker, J.O. and Swift, B.L.: Middle ear infection in feedlot lambs. *J. Am. vet. med. Ass.*, 181: 805-807 (1982).
21. Jones, G.E., Donachie, W., Sutherland, A.D., Knox, D.P. and Gilmour, J.S.: Protection of lambs against experimental pneumonic pasteurellosis by transfer of immune serum. *Vet. Microbiol.*, 19: 175-181 (1989).
22. Kiorpes, A.L., Collins, M.T., Goerke, T.P., Traul, D.L., Confer, A.W., Gentry, M.J. and Baumann, L.E.: Immune response of neonatal lambs to a modified live *Pasteurella haemolytica* vaccine. *Small Rumin. Res.*, 4: 73-84 (1991).
23. Lehmkuhl, H.D., Contreras, J.A., Cutlip, R.C. and Brogden, A.K.: 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).
24. Malore, F.C., MacCullough, G.J., MacLoughlin, M.T., Rall, H.J., Ohagan, J. and Neill, S.D.: Infectious agents in respiratory disease of housed fattening lambs of Northern Ireland. *Vet. Rec.*, 122: 203-207 (1988).
25. Markham, R.J. and Wilkie, B.N.: Interaction between *Pasteurella haemolytica* and bovine alveolar macrophages. Cytotoxic effect on macrophage and impaired phagocytosis. *Am. J. vet. Res.*, 41: 10-22 (1980).
26. Moiser, D.A., Confer, A.W. and Panciera, R.J.: The evolution of vaccines of bovine pneumonic pasteurellosis. *Res. vet. Sci.*, 47: 1-10 (1989).
27. Morales, A.J.F., Jaramillo, M.L., Oropeza, V.Z., Tórtora, P.J.L., Trigo, T.J.F. y Espino, R.G.: Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos. *Vet. Méx.*, 24: 97-105 (1993).
28. Morck, D.W., Olson, M.E., Acres, S.D., Daoust, P.Y. and Costerton, J.W.: Presence of bacterial glycocalyx and fimbriae on *Pasteurella haemolytica* in feedlot cattle with pneumonic pasteurellosis. *Can. J. vet. Res.*, 53: 167-171 (1989).

29. Moore, R.N., Walker, R.D., Shaw, G.A., Hopkins, F.M. and Shull, E.P.: Antileukotoxin antibody produced in the bovine lung after aeroexposure to viable *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. vet. Res.*, 46: 1949-1952 (1985).
30. Panciera, R.J., Corstvet, R.E., Confer, A.W. and Gresham, C.N.: Bovine pasteurellosis: Effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *Am. J. vet. Res.*, 45: 2538-2542 (1984).
31. Pérez, G.E.: Curso de Epidemiología Básica. Mérida, Yucatán, México. 1994. 45. *Agencia Internacional de Energía Atómica*. Austria, Viena (1994).
32. Ramírez, R.R. y Brodgen, A.K.: Patogénesis del daño pulmonar provocado por *Pasteurella haemolytica*. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 37: 353-365 (1995).
33. SAS Institute Inc.: SAS User's Guide Basics. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 1982.
34. Schimmel, D., Erler, W. and Feist, H.: Experimental immunization of calves with various *Pasteurella* antigens. *Deutsche-Tierärztl. Wechschrft.*, 99: 204-206 (1992).
35. Segura, J. y Honhold, N.: Manual de Muestreo para la Salud y Producción Animal. *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, 1993.
36. 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).
37. Shewen, P.E. and Wilkie, B.N.: Vaccination of calves with leucotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can. vet. Res.*, 52: 30-36 (1988).
38. Srinand, S., Ames, T.R., Maheswaran, S.K. and King, V.L.: Efficacy of various vaccines against pneumonic pasteurellosis in cattle: A meta-analysis. *Prev. vet. Med.*, 25: 7-17 (1995).
39. Suarez-Guemes, F., Collins, M.T., Whiteman, W.E. and Pierson, R.E.: Serum cortisol levels in clinical normal feedlot lambs and clinicopathological features of septicemic pasteurellosis. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, 28: 253-257 (1986).
40. Sutherland, A.D., Donachie, W., Jones, G.E. and Quirie, M.: A crude cytotoxin vaccine protects sheep against experimental *Pasteurella haemolytica* serotype A-2 infection. *Vet. Microbiol.*, 19: 175-181 (1989).
41. Thompson, R.G.: Special Veterinary Pathology. *B.C. Decker*, Philadelphia, 1994.
42. Thrusfield, M.: Epidemiología Veterinaria. *Acribia*, Zaragoza, España, 1990.
43. Trigo, J.F. y Romero, J.: La relevancia de las neumonías como causa de mortalidad en corderos. *Vet. Méx.*, 17: 116-119 (1986).
44. Trigo, T.J.F.: El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos. Memorias del Seminario Pasteurellosis Neumónica del Ganado Bovino. Monterrey, N.L., México. 1995. 18-22. *Universidad Autónoma de Nuevo León*. Monterrey, N.L., México (1995).
45. Younan, M. and Fodor, L.: Characterization of a new *Pasteurella haemolytica* serotype (A17). *Res. vet. Sci.*, 58: 98 (1995).