



Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de antígenos de *Pasteurella multocida*, obtenidos de aislados de casos clínicos

Immunogenic evaluation and protection of *Pasteurella multocida* antigens isolated from clinical cases

Germán Guadarrama Cruz* Lemuel León Lara* María Uxúa Alonso Fresán*
Roberto Montes de Oca Jiménez* Pomposo Fernández Rosas*

Abstract

The immunogenic protection response to four *P. multocida* isolations obtained from clinical cases and a reference strain was studied. Isolations were proven as three different immunogens: complete antigen (Ag), washed Ag and culture supernatant. They were subcutaneously administered in SPF light White Leghorn hens. Immune response was evaluated using ELISA test and challenge test evaluated protection response. The ANOVA and Tukey test did not show statistical differences between groups. All isolations using different vaccines induced high protection levels ranging from 87 to 100%. This study indicates that immunization using these three immunogens induce an effective response against *P. multocida* challenge with the best protection when culture supernatant is used.

Key words: EVALUATION, *P. MULTOCIDA*, ISOLATIONS, IMMUNOGENIC, PROTECTION.

Resumen

Se investigaron los niveles de anticuerpos y la capacidad protectora de cuatro diferentes aislados de *P. multocida*, obtenidos de casos clínicos y de una cepa de referencia. Los aislados se evaluaron como tres inmunógenos diferentes: antígeno completo (Ag), Ag lavado y el sobrenadante del cultivo. Se administraron en aves ligeras de la raza White Leghorn (SPF) por vía subcutánea. Los niveles de anticuerpos se determinaron mediante el ensayo de ELISA y la protección, desafiando las aves con los respectivos aislados utilizados para vacunación. ANDEVA y la prueba de Tukey no mostraron diferencias estadísticas entre grupos. Todos los aislados en los diferentes tipos de preparación de la vacuna indujeron altos niveles de protección, entre el 87% y 100%. Este estudio indica la efectividad de los diferentes aislados clínicos en la protección de las aves desafiadas.

Palabras clave: EVALUACIÓN, *P. MULTOCIDA*, AISLADOS, INMUNÓGENOS, PROTECCIÓN.

Recibido el 22 de abril de 2009 y aceptado el 5 de noviembre de 2009.

*Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Km. 15.5, Carretera Toluca-Atlacomulco, 50200, Toluca, México.

Trabajo de tesis de maestría en ciencias agropecuarias y recursos naturales del primer autor.

Autor responsable de correspondencia: Pomposo Fernández Rosas. Correo electrónico: pfr@uaemex.mx, hap_5@yahoo.com.mx Tel/Fax.01722 2965555, 01722 2968980

Introduction

Pasteurella multocida is a non motile, aerobic and gram-negative bacterium, causal agent of avian cholera in domestic birds and avian pasteurellosis in other species. It produces hemorrhagic septicemia in bovines and rhinitis in pigs.¹ The disease generally occurs in two forms, as an acute septicemic disease with high morbidity and mortality or as a localized chronic infection in articulations and infraorbital sinuses.² *P. multocida* is classified in five capsular serogroups named A, B, D, E, F and serovars 1-16, based on lipopolysaccharide antigens or somatic antigens.^{2,3} Based on DNA homology studies, the species has been divided in three subspecies denominated *multocida*, *septica* and *gallicida*, the subspecies can be differentiated by their physiological characteristics.⁴ The three subspecies have been isolated from avian cholera outbreaks.⁵ The subspecies *multocida* is the most commonly isolated from broilers and turkeys and subspecies *septica* in smaller percentage;⁶ subspecies *multocida* is predominant in raptor birds;⁷ subspecies *gallicida* is mainly related to web-footed birds.⁸

Virulence of *P. multocida* is complex and variable depending on the strain, host species and contact conditions between both. The ability of *P. multocida* to invade and reproduce in the host is increased by the presence of a capsule, since it allows the evasion from the immune system due to its antiphagocytic activity.⁹ The decrease of a virulent strain ability to produce a capsule results in a virulence decrease.¹⁰ Several isolations of avian cholera cases have large capsules, but are low in virulence;¹¹ therefore, virulence is apparently related with some chemical substances associated with the capsule, rather than with their physical presence.

Capsules are highly hydrated polysaccharides externally localized and adhered to the cellular wall.¹² The localization of the extracellular polysaccharides in the outer surface of the cell is important because they are the first portal of entry and the last barrier for substance excretion in and outside of the cell.¹³ Several hypothesis have been postulated about its bacterium cell function, including: protection against environmental desiccation,¹⁴ phagocytosis¹⁵ and bactericide activity of the serum complement.⁸

Endotoxins are produced by *P. multocida* virulent or avirulent strains, they can contribute with virulence, invasion and multiplication of the bacteria. Endotoxins are lipopolysaccharides (LPS) that coat the external membrane of the gram-negative bacteria cellular wall and are considered the main responsible component for septic shock induction that are frequently part of serious infections caused by this bacterium.⁹ Clinical signs of avian cholera have been induced with small quantities of endotoxin.¹⁶

Introducción

Pasteurella multocida (*P. multocida*) es una bacteria gramnegativa, aerobia y no móvil, agente causal del cólera aviar en aves domésticas y pasteurellosis aviar en otras especies. Produce septicemia hemorrágica en bovinos y rinitis en los cerdos.¹ La enfermedad ocurre generalmente en dos formas, como una enfermedad septicémica aguda con alta morbilidad y mortalidad o como una infección crónica localizada en articulaciones y senos infraorbitarios.² *P. multocida* está clasificada en cinco serogrupos capsulares denominados A, B, D, E, F y serovares 1-16, basados en antígenos de lipopolisacáridos o antígenos somáticos.^{2,3} Con fundamento en estudios de homología de ADN, la especie ha sido dividida en tres subspecies denominadas *multocida*, *septica* y *gallicida*, las subspecies pueden ser diferenciadas por sus características fisiológicas.⁴ Las tres subspecies han sido aisladas de brotes de cólera aviar.⁵ La subespecie *multocida* es la más comúnmente aislada de pollos y pavos y en menor porcentaje la subespecie *septica*;⁶ la subespecie *multocida* es predominante en aves raptoras;⁷ la subespecie *gallicida* está relacionada principalmente con aves palmípedas.⁸

La virulencia de *P. multocida* es compleja y variable dependiendo de la cepa, especies hospederas y condiciones de contacto entre ambas. La habilidad de *P. multocida* para invadir y reproducirse en el hospedero se incrementa por la presencia de una cápsula, ya que le permite evadir al sistema inmune debido a su actividad antifagocítica.⁹ La disminución de la habilidad de una cepa virulenta para producir una cápsula da como resultado la disminución de su virulencia.¹⁰ Muchos aislamientos de casos de cólera aviar tienen cápsulas grandes, pero son de baja virulencia;¹¹ por tanto, la virulencia está aparentemente relacionada con algunas sustancias químicas asociadas con la cápsula, más que con su presencia física.

Las cápsulas son polisacáridos altamente hidratados localizados externamente y adheridos a la pared celular.¹² La localización de los polisacáridos extracelulares en la superficie más externa de la célula es importante porque ellos son el primer portal de entrada y la última barrera para la excreción de sustancias dentro y fuera de la célula.¹³ Varias hipótesis han sido postuladas acerca de la función de la célula bacteriana: incluyen protección contra la desecación en el ambiente,¹⁴ fagocitosis¹⁵ y la actividad bactericida del complemento del suero.⁸

Las endotoxinas son producidas por cepas de *P. multocida* virulentas o avirulentas, pueden contribuir con la virulencia, la invasión y la multiplicación de la bacteria. Las endotoxinas son lipopolisacáridos (LPS) que recubren la membrana externa de la pared celular

It is clear that *P. multocida* LPS stimulate humoral immunity and are considered as protector antigens. *P. multocida* strains are defined according to Heddleston serotypes, that, in turn, are based on the response of antibodies induced against *P. multocida* vaccines primarily directed against LPS and protect the host against strains of the same type.¹⁷

Vaccination plays an important role in the prevention of this disease. For immunization against *P. multocida* prepared bacterines with aluminum hydroxide or mineral oil as adjuvant from selected serotypes are used. The administration of at least two subcutaneously or intramuscularly doses are required with intervals of two weeks between each immunization for protection against this disease.¹⁸

Material and methods

Antigen preparation

Four isolates designated as SD, UC, JO and MO of *Pasteurella multocida* obtained from clinical cases of different avian farms from Mexico were used, and ATCC 1662 (A: 4) reference strain. The four isolates and *P. multocida* reference strain, were separately inoculated in brain heart infusion broth,* with 5% yeast extract.** The medium pH was previously adjusted at 7.2, and incubated for 24 h at 37°C; afterwards, quality control tests were carried out, such as: viability, purity and colony forming units (CFU). Culture bacteria concentration was adjusted approximately at 5×10^9 CFU/mL,¹⁹ and was inactivated with formaldehyde at 0.25% (v/v) to prepare three different types of antigens: a) *P. multocida* complete culture antigen, where the strain complete culture was used after being incubated and inactivated; b) washed *P. multocida* complete culture antigen. After cultivating and inactivating the bacterium, it was centrifuged at 3776 g for 7 min and three bacteria concentrate (pellet) washes were carried out with PBS, pH 7.2; and c) antigen obtained from culture supernatant. Once the bacterium was inactivated, it was centrifuged at 3776 g for 7 min and the supernatant was used.

Immunization

Two hundred and seventy White Leghorn birds,* six weeks old, free of specific pathogens (ALPES) and clinically healthy were used. All birds were individually identified, kept in adaptation for seven days and housed in laboratory conditions, with water and food *ad libitum*. Three groups of 90 birds each were formed according to the immunogen employed (washed, complete or supernatant). Each group was conformed by five treatments according to the isolate origin (SD,

de las bacterias gramnegativas y son consideradas el principal componente responsable para la inducción del choque séptico que frecuentemente acompaña a las infecciones graves que ocasiona esta bacteria.⁹ Los signos clínicos de cólera aviar han sido inducidos con inyección de cantidades pequeñas de endotoxina.¹⁶

Es claro que los LPS de *P. multocida* estimulan la inmunidad humoral y están considerados como antígenos protectores. Las cepas de *P. multocida* están definidas de acuerdo con los serotipos de Heddleston, que, a su vez, están basados en la respuesta de anticuerpos inducidos contra vacunas de *P. multocida* dirigidos primariamente contra los LPS y protegen al hospedero contra las cepas del mismo serotipo.¹⁷

La vacunación juega un papel importante en la prevención de esta enfermedad. Para la inmunización contra *P. multocida* se emplean bacterinas preparadas con hidróxido de aluminio o aceite mineral como adyuvante, preparadas de serotipos selectos. Por lo menos se requieren dos dosis administradas vía subcutánea o intramuscular con intervalo de dos semanas entre cada inmunización para la protección contra esta enfermedad.¹⁸

Material y métodos

Preparación del antígeno

Se utilizaron cuatro aislamientos denominados SD, UC, JO y MO de *Pasteurella multocida* obtenidos de casos clínicos de diferentes granjas avícolas de México y una cepa de referencia ATCC 1662 (A: 4). Los cuatro aislamientos y la cepa de referencia de *P. multocida*, se inocularon por separado en caldo infusión cerebro corazón,* adicionado con 5% de extracto de levadura.** El pH del medio se ajustó previamente a 7.2, y se incubaron a 37°C durante 24 h; posteriormente se realizaron pruebas de control de calidad, como: viabilidad, pureza y título de unidades formadoras de colonia (UFC). Se ajustó la concentración bacteriana de los cultivos a 5×10^9 UFC/mL, aproximadamente,¹⁹ y se inactivaron con formaldehído a 0.25% (v/v) para preparar tres diferentes tipos de antígeno: a) Antígeno de cultivo completo de *P. multocida*, en el que se utilizó el cultivo completo de la cepa después de ser incubado e inactivado; b) antígeno de cultivo completo de *P. multocida* lavado. Después de cultivar e inactivar la bacteria, se centrifugó a 3 776 g por 7 min y se realizaron tres lavados del concentrado bacteriano (pellet) con PBS pH 7.2; c) antígeno obtenido del sobrenadante del cultivo. Una vez inactivada la bacteria, se centrifugó a 3 776 g por 7 min y se tomó el sobrenadante.

*Difco, Cod. 211200. Difco Laboratories Detroit Michigan, Estados Unidos de América.

**Difco, Cod. 230900. Difco Laboratories Detroit Michigan, Estados Unidos de América.

UC, JO, MO or A4). Fifteen birds were kept as control in each group. All birds were immunized at seven and nine weeks old with 0.5 mL of prepared immunogen by subcutaneous via (except controls), where 25% of aluminum hydroxide** (v/v) was used as adjuvant.

Challenge

All birds were challenged by nasal instillation with 0.2 mL of live *P. multocida* culture (5×10^5 CFU/mL, approximately)²⁰ two weeks later after the last vaccination. They were observed for one week and mortality was recorded among bird groups.

Protection determination

Indirect ELISA test was used to determine IgG antibody levels in experimental groups.

Antigen preparation to sensitize ELISA test plate

Cellular pack for raw LPS extraction was prepared in brain heart infusion*** inoculated with ATCC16662 (A:4) reference strain. Culture was centrifuged at 8 496 g for 12 min and washed three times with PBS pH 7.2; afterwards, the pellet was resuspended in 160 mL of NaCl† at 0.85% and kept in agitation for 30 h at 4°C. Carbohydrate concentration was determined by Dubois *et al.*,²¹ method and glucose‡ was used as standard.

ELISA test (modified by Alonso²²)

The 96 well polystyrene microplates were sensitized with 100 µL of *P. multocida* antigen (40 µg/mL)¹⁹ in a carbonate fixing solution (sodium carbonate, 1.59 g; sodium bicarbonate, 2.93 g; distilled water, 1000 mL; pH, 9.6). Microplates were incubated all night at 4°C. The supernatant of each microplate was eliminated and plates were washed three times manually with PBS pH 7.2 with 0.05% of Tween 20* (v/v). When the plates were dry they were blocked with bovine serum albumin** at 10% and incubated at 4°C all night, then they were washed and after drying, they were covered with 100 µL of diluted test sera, from immunized birds, 1:100 in PBS pH 7.2, and positive and negative sera were included as controls in each plate. Plates with antiserum were incubated all night at 4°C.

Microplates were washed with PBS-Tween (0.05%) and dried. Later, 100 µL (1:1 000) of chicken anti sheep IgG*** conjugate were added, marked with peroxidase; microplates were incubated at 37°C from 30 to 90 minutes.

Subsequently, 100 µL of ABTS† (2,2'-azino-bis,3-

Inmunización

Se emplearon 270 aves de la raza White Leghorn,* de seis semanas de edad, libres de patógenos específicos (ALPES), clínicamente sanas. Todas las aves se identificaron en forma individual, se mantuvieron en adaptación durante siete días y se alojaron bajo condiciones de laboratorio, con agua y alimento *ad libitum*. Se formaron tres grupos de 90 aves cada uno de acuerdo con el inmunógeno empleado (sobrenadante, completo o lavado). Cada grupo quedó conformado por cinco tratamientos de acuerdo con la procedencia del aislado (SD, UC, JO, MO o A4). Quince aves se mantuvieron como testigos en cada uno de los grupos. Todas las aves se inmunizaron en la séptima y novena semanas de edad con 0.5 mL del inmunógeno preparado por vía subcutánea (excepto los testigos), en donde se utilizó 25% de hidróxido de aluminio** (v/v) como adyuvante.

Desafío

Todas las aves se desafiaron por instilación nasal con 0.2 mL de un cultivo vivo de *P. multocida* (5×10^5 UFC/mL, aproximadamente)²⁰ dos semanas después de la última vacunación. Se observaron durante una semana y se registró la mortalidad dentro de los grupos de aves.

Determinación de protección

Se empleó la prueba de ELISA indirecta para determinar el nivel de anticuerpos IgG en los grupos experimentales.

Preparación del antígeno para sensibilizar la placa de la prueba de ELISA

El paquete celular para la extracción de LPS crudo se preparó en medio de infusión cerebro corazón*** inoculado con la cepa de referencia ATCC1662 (A:4). El cultivo se centrifugó a 8 496 g por 12 min y se lavó tres veces con PBS pH 7.2, posteriormente se resuspendió el pellet en 160 mL de NaCl† a 0.85% y se conservó en agitación durante 30 h a 4°C. La concentración de carbohidratos se determinó por el método de Dubois *et al.*,²¹ y se utilizó glucosa‡ como estándar.

*Alpes, S.A. de C.V., México.

**Sigma Cat. núm. A0327, Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América.

*** Difco, Cod. 211200. Difco Laboratories, Estados Unidos de América.

† Sigma Cat. núm. S3014, Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América.

‡ Sigma Cat. núm. A3803, Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América.

ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) were added as substrate for peroxidase, they were incubated for 15 to 30 minutes at room temperature and 100 μ L of SDS† (sodium dodecyl sulfate) at 10% were added to stop reaction. Afterwards, microplates were read with an ELISA° reader at 490 nm. To find working dilution, negative sera titration was carried out.²³ Results were expressed as absorbance (optical density, OD) in worked dilution at 490 nm.

ELISA result analysis

Absorbency readings (optical density, OD) obtained by ELISA test were compared using a completely random block design and ANOVA to evaluate the treatment effect. In order to evaluate the mean differences of DO between groups, Tukey test was used ($P < 0.05$).²⁴

Results

Positive sera that expressed large optical density were the ones where washed antigen as immunogen was used; although, while performing the statistical analysis, there were no significant differences ($P > 0.05$) between the optical densities of the immunized bird sera (Table 1).

The ATCC 1662 (A: 4) reference strain was the one who gave higher response (DO) to the culture supernatant (0.276 ± 0.178), followed by the response given by washed antigen UC isolation (0.221 ± 0.038) (Table 1). It is important to mention that antibody levels obtained were compatible with a low antibody response against the antigen.

Birds challenged with *P. multocida* (homologous challenge) showed protection percentages of 86% to 100% in the three types of antigen, along with the four isolates and the reference strain in regard to the control group (Table 2).

Discussion

The present study researched the antibody levels and the induced protection by immunization using *P. multocida* isolates of avian origin, by immunogens prepared from complete antigen, washed antigen and culture supernatant administered by parenteral route in SPF light White Leghorn hens. The antibody levels were evaluated by ELISA test and the protection by homologous challenge.

The present study proved that the free cell immunogen (supernatant) of different isolations and *P. multocida* reference strain administered in these birds, of 11 weeks old, is capable to induce an effective immune response in presence of the challenge with a *P. multocida* live culture, probably because of the

Prueba de ELISA (modificada por Alonso²²)

Las microplacas con 96 pozos de poliestireno fueron sensibilizadas con 100 μ L de antígeno *P. multocida* (40 μ g/mL)¹⁹ en una solución fijadora de carbonatos (carbonato de sodio, 1.59 g; bicarbonato de sodio, 2.93 g; agua destilada, 1 000 mL; pH, 9.6). Las microplacas se incubaron toda la noche a 4°C. El sobrenadante de cada microplaca se eliminó y las placas se lavaron tres veces de forma manual con PBS pH 7.2 con 0.05% de Tween 20* (v/v). Cuando las placas se secaron, se bloquearon con albúmina sérica bovina** a 10% y se incubaron a 4°C toda la noche, posteriormente se lavaron y después de secarse se cubrieron con 100 μ L de los sueros diluidos a probar de las aves inmunizadas 1:100 en PBS pH 7.2, y se incluyeron sueros positivos y negativos como testigos de placa. Las placas con el antisuero se incubaron toda la noche a 4°C.

Las microplacas se lavaron con PBS-Tween (0.05%) y se secaron. Posteriormente se adicionaron 100 μ L (1:1 000) de conjugado anti IgG*** de gallina elaborado en ovino, marcadas con peroxidasa; las microplacas se incubaron a 37°C de 30 a 90 minutos.

Posteriormente se adicionaron 100 μ L de ABTS† (2,2'-Azino-bis,3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) como sustrato para la peroxidasa, se incubaron durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente y se detuvo la reacción mediante la adición de 100 μ L de SDS‡ (dodecil sulfato de sodio) a 10%. Después, las microplacas se leyeron con lector de ELISA° a 490 nm. Para encontrar la dilución de trabajo se llevó a cabo una titulación de los sueros negativos.²³ Los resultados se expresaron como absorbancia (densidad óptica, DO) en la dilución trabajada a 490 nm.

Análisis de resultados de ELISA

Las lecturas en absorbancia (densidad óptica, DO) obtenidas mediante la prueba de ELISA se compararon con un diseño de bloques completamente al azar y un ANDEVA para evaluar el efecto del tratamiento. Para evaluar la diferencia de medias de las DO entre los grupos, se empleó la prueba de Tukey ($P < 0.05$).²⁴

Resultados

Los sueros positivos que expresaron una densidad

*Sigma Cat. núm. P9416, Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América.

**Sigma Cat. núm. A3803, Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América.

***Kirkegaard y Perry Lab. Cod 652406, Estados Unidos de América.

†Sigma Cat. núm. A3219, Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América.

‡Sigma Cat. núm. S263622, Sigma-Aldrich, Estados Unidos de América.

°Bio -Tek (ELx800). Winooski Estados Unidos de América.

presence of high molecular weight proteins and external membrane proteins. In a study carried out by Boyce *et al.*,²⁵ on *P. multocida*, it was identified that the bacterium has the capacity to produce high molecular weight external membrane proteins in hosts during *in vivo*, as well as *in vitro* growth, and that can stimulate immune response and confer protection. Based on the results of the present study, it is thought that there are immunogenic elements in the supernatant.

The results of this study are also similar to Uchida *et al.*,²⁶ who reported that a *P. multocida* cell free antigen (supernatant) administered in mice, is enough to induce an immune response and protection in presence of the challenge.

One of the most important aspects of *P. multocida* constitutes its capacity to produce toxigenic and nontoxigenic proteins; infections caused by *P. multocida* type A are responsible of causing avian cholera in birds.²⁷

Mena-Rojas *et al.*,²⁸ showed that *Avibacterium paragallinarum* secretes high molecular weight RTX proteins during growth in brain heart infusion broth, some of these proteins are recognized by chicken sera, and are important immunogens in the control of avian infectious coryza; therefore, it is concluded that *P. multocida* secretes these type of proteins during its growth in broth. In the present study, where the supernatant of *P. multocida* culture was used as antigen, proteins secreted during this bacterium growth could possibly be found, that stimulates avian immune system enough to protect them from the challenge.

Mukkur²⁹ carried out a study in mice where a complete culture of *P. multocida* inactivated with

óptica mayor fueron aquellos en donde se utilizó como inmunógeno el antígeno lavado, aunque al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las densidades ópticas de los sueros de las aves inmunizadas (Cuadro 1).

La cepa de referencia ATCC 1662 (A: 4) fue la que produjo mayor respuesta (DO) con el sobrenadante del cultivo (0.276 ± 0.178), seguida de la respuesta producida por el aislamiento UC del antígeno lavado (0.221 ± 0.038) (Cuadro 1). Es importante mencionar que los niveles de anticuerpos obtenidos fueron compatibles con una baja respuesta de anticuerpos frente al antígeno.

Las aves desafiadas con *P. multocida* (desafío homólogo) presentaron protección del 86% al 100% en los tres tipos de antígeno, con los cuatro aislados y la cepa de referencia con respecto al grupo testigo (Cuadro 2).

Discusión

En el presente trabajo se investigaron los niveles de anticuerpos y la protección inducida por la inmunización utilizando aislados de *P. multocida* de origen aviar, mediante inmunógenos preparados de antígeno completo, antígeno lavado y sobrenadante de cultivo administrados en forma parenteral en aves ligeras de la raza White Leghorn (SPF). Los niveles de anticuerpos fueron evaluados mediante la prueba de ELISA y la protección ante el desafío homólogo.

En el presente estudio se comprobó que el inmunógeno libre de células (sobrenadante) de diferentes aislados y cepa de referencia de *P. multocida*

Cuadro1
ABSORBANCIA PROMEDIO EN SUERO DE AVES DE GRUPOS EXPERIMENTALES AL
UTILIZAR DIFERENTES INMUNÓGENOS DE *Pasteurella multocida*
AVERAGE ABSORBENCE IN SERA FROM EXPERIMENTAL GROUP BIRDS WHEN
USING DIFFERENT *Pasteurella multocida* IMMUNOGENS

Isolate/Strain	Antigen type		
	Washed	Supernatant	Complete
SD	0.189 ± 0.037^a	0.189 ± 0.037^a	0.199 ± 0.054^a
JO	0.186 ± 0.045^a	0.189 ± 0.037^a	0.180 ± 0.040^a
UC	0.221 ± 0.038^a	0.197 ± 0.031^a	0.206 ± 0.061^a
MO	0.201 ± 0.058^a	0.215 ± 0.063^a	0.187 ± 0.062^a
1662 (A: 4)	0.190 ± 0.021^a	0.276 ± 0.178^a	0.209 ± 0.038^a
Control	0.07 ± 0.006^b	0.07 ± 0.006^b	0.07 ± 0.006^b

The SD, UC, JO, MO designation are abbreviations arbitrarily designated and correspond to isolates used in this work. A: 4 corresponds to *P. multocida* 1662 reference strain.

Averages are shown $\pm$ standard deviation.

Results were expressed in absorbance (optic density). Same letters per column do not have statistical differences ($P > 0.05$).

Cuadro 2			
PORCENTAJE DE PROTECCIÓN DE AVES DESAFIADAS CON <i>Pasteurella multocida</i>			
PROTECTION PERCENTAGE OF CHALLENGED BIRDS WITH <i>Pasteurella multocida</i>			
Isolate/ Strain	Antigen type		
	Washed	Supernatant	Complete
SD	0/15 ^y	0/15	2/15
	100 ^z	100	86.68
JO	0/15	1/15	0/15
	100	93.34	100
UC	0/15	0/15	1/15
	100	100	93.34
MO	1/15	0/15	0/15
	93.34	100	100
1662 (A:4)	1/15	0/15	0/150
	93.34	100	100
Control	15/15	15/15	15/15
	0	0	0

The SD, UC, JO, MO designation are abbreviations arbitrarily designated and correspond to isolates used in this work. A: 4 corresponds to *P. multocida* 1662 reference strain.

^yMortality.

^zPercentage of protection.

Animals were challenged with the same strain used for vaccination.

formaldehyde and adjuvated with aluminum hydroxide was administered, besides two immunizations and during the challenge he obtained 80% of protection. In the present study, two applications of complete antigen inactivated with formaldehyde and adjuvated with aluminum hydroxide were used, in the challenge a protection of 96% was obtained. In both studies a high percentage of protection was observed.

In the present study, the immunogen produced with washed antigen protected an average of 97.33%. Brown *et al.*³⁰ tested the efficacy of several *P. multocida* washed cellular fractions (P-1 059) used as immunogens and demonstrated that the culture filtrate, cell wall and *P. multocida* cytoplasm individually utilized and prepared with different vehicles for its administration in chicken are capable to confer protection up to 77% in regard to a commercial bacterin (66%). In the present study, it is shown that *P. multocida* washed antigen is capable to induce 97.33% of protection in immunized birds. Marshall *et al.*³¹ carried out a study where they evaluated the efficacy of *P. multocida* immunogen, strain 1 059, administered to turkeys, which protected 83% of the latter, in both studies aluminum hydroxide as adjuvant was used; nevertheless, the difference in protection percentage in this study might be due to the antigenic power of the strains, as well as the age of immunization.

Jarvinen *et al.*²⁷ studied the immune response induced by a wash extract of *P. multocida* applied

administrado en dichas aves, de 11 semanas de edad, es capaz de inducir una respuesta inmune efectiva ante el desafío con un cultivo vivo de *P. multocida*, posiblemente por la presencia de proteínas de alto peso molecular y de proteínas de membrana externa. En un estudio realizado por Boyce *et al.*,²⁵ con *P. multocida*, se identificó que la bacteria tiene la capacidad de producir proteínas de membrana externa de alto peso molecular durante su crecimiento *in vivo* en hospederos, así como *in vitro*, y que puede estimular la respuesta inmune y conferir protección. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, se piensa que en el sobrenadante existen elementos inmunogénicos.

Los resultados de este estudio también son similares a los de Uchida *et al.*,²⁶ quienes informaron que un antígeno libre de células (sobrenadante) de *P. multocida* administrado en ratones, es suficiente para inducir una respuesta inmune y de protección ante el desafío.

Uno de los aspectos más importantes de *P. multocida* constituye su capacidad para producir proteínas toxigénicas y no toxigénicas; las infecciones causadas por el tipo A de *P. multocida* son responsables de producir el cólera aviar en las aves.²⁷

Mena-Rojas *et al.*²⁸ demostraron que *Avibacterium paragallinarum* secreta proteínas RTX de alto peso molecular durante el crecimiento en caldo infusión-cerebro-corazón, algunas de estas proteínas son

subcutaneously in rabbits, and conclude that the wash extract conferred partial protection; that is, only 50%. It is probable that in this immunogen, surface antigens or immunogenic fractions might have been lost during its preparation: thus, protection was partial. In the present study, it was found that by administering *P. multocida* washed antigen by subcutaneous via in birds, it induced 97.33% protection against challenge.

Avakian *et al.*³² evaluated induced immunity of several vaccines against avian cholera and concluded that inactivated vaccines confer 86% protection in 42 weeks old birds; nevertheless, in this study, it is shown that the immunogen produced from *P. multocida* inactivated complete culture is able to protect up to 96% of 11 week old chicks.

Ganfield *et al.*³³ studied the immunogenic properties of purified lipopolysaccharide-protein complex and demonstrated that when administered as immunogen to turkeys and mice, protected turkeys in 70% and mice in 83% after challenge. In the present study, a complete immunogen was administered protecting 96% in presence of the challenge. In this way, it is possible that components contained immunogens form lipopolysaccharide-protein complexes with immunogenic properties.

The three immunogens used in this study provide levels of protection not significantly different. When considering the aforementioned, it is understood that the three types of immunogens produced might contain high molecular capsular proteins, capable of inducing antibody production and protection in 11 week old birds, and that the supernatant from complete culture conferred greater protection according to the observed mortality.

Acknowledgements

Authors thank the Universidad Autonoma del Estado de Mexico (UAEM) for the financing of the research project "Use of *Pasteurella multocida* immunogen administered by nasal and parenteral via in commercial laying hens" with code UAEM-1848/2004, as well as Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (Conacyt), of Mexico, for the granted scholarship, also to the Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnologia (Comecyt) for granting scholarship-thesis support to German Guadarrama Cruz, and finally to Centro de Investigacion en Salud Animal (Ciesa) and Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the Universidad Autonoma del Estado de Mexico (FMVZ-UAEM), for providing the necessary facilities for achieving the present work.

reconocidas por el suero de pollos, y son importantes inmunógenos en el control de la coriza infecciosa aviar; por tanto, se infiere que *P. multocida* secreta este tipo de proteínas durante su crecimiento en caldo. En el presente trabajo, en el que se utilizó el sobrenadante de cultivo de *P. multocida* como antígeno, posiblemente se encuentran proteínas secretadas durante el crecimiento de esta bacteria, que estimulan al sistema inmune de las aves lo suficiente como para protegerlas ante el desafío.

Mukkur²⁹ realizó un estudio en ratones en donde administró un cultivo completo de *P. multocida* inactivado con formol y adyuvado con hidróxido de aluminio, además de dos inmunizaciones y durante el desafío obtuvo 80% de protección. En el presente estudio se utilizaron dos aplicaciones del antígeno completo inactivado con formaldehído y adyuvado con hidróxido de aluminio, en el desafío se obtuvo 96% de protección. En ambos estudios se observó un porcentaje de protección alto.

En el presente estudio el inmunógeno elaborado con antígeno lavado protegió en promedio 97.33%. Brown *et al.*³⁰ prueban la efectividad de varias fracciones celulares lavadas de *P. multocida* (P-1 059) utilizadas como inmunógenos y demuestran que el filtrado de un cultivo, la pared celular y el citoplasma de *P. multocida* utilizados de manera individual y preparados con diferentes vehículos para su administración en pollos son capaces de conferir protección hasta de 77% con respecto a una bacterina comercial (66%). En el presente estudio se demuestra que el antígeno lavado de *P. multocida* es capaz de inducir 97.33% de protección en aves inmunizadas. Marshall *et al.*³¹ realizaron un estudio en donde evalúan la eficiencia de un inmunógeno de *P. multocida*, cepa 1 059, administrado en pavos, que protegió en 83% a estos últimos, en ambos estudios se utilizó hidróxido de aluminio como adyuvante; sin embargo, la diferencia en el porcentaje de protección en el presente trabajo puede deberse al poder antigénico de las cepas, así como a la edad de la inmunización.

Jarvinen *et al.*²⁷ estudiaron la respuesta inmune inducida por un extracto lavado de *P. multocida* aplicado de forma subcutánea en conejos, y concluyen que el extracto lavado confirió una protección parcial; es decir, solamente 50%. Es probable que en dicho inmunógeno se hayan perdido antígenos de superficie o fracciones inmunogénicas durante su preparación; por ende, la protección fue parcial. En el presente estudio se encontró que al administrarse el Ag lavado de *P. multocida* vía subcutánea en aves, indujo 97.33% de protección ante el desafío.

Avakian *et al.*³² evaluaron la inmunidad inducida por varias vacunas contra el cólera aviar y concluyen que las vacunas inactivadas confieren 86% de protección

Referencias

1. BOYCE JD, ADLER B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). Infect Immun 2000; 68:3463-3468.
2. RHOADES KP, RIMLER RB. Pasteurellosis. In: Calnek BW, Barnes HJ, Bread CW, Reid WR, Yode HW, editors. Diseases of Poultry. 9th ed. Iowa: Iowa State University Press, 1991: 171-204.
3. CHUNG JY, WILKIE I, BOYCE JD, TOWNSEND KM, FROST AJ, GHODDUSI M *et al.* Role of capsule in pathogenesis of fowl cholera caused by *P. multocida* serogroup A. Infect Immun 2001; 69: 2487-2492.
4. MUTTERS R, IHM P, FREDERIKSEN S, POHL SW, MANNHEIM W. Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis* and *Pasteurella langaa*. Int J Syst Bacteriol 1985; 35: 1004-1010.
5. FEGAN N, BLACKALL PJ, PAHOFF JL. Phenotypic characterization of *Pasteurella multocida* isolates from Australia poultry. Vet Microbiol 1995; 47: 281-286.
6. SNIPES KP, HIRD TE, MCCAPES RH. Homogeneity of characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from turkeys and wildlife in California 1985-1988. Avian Dis 1990; 34: 315-320.
7. MORISHITA TY, LOWENSTINE LJ, HIRSH DC, BROOKS DL. *Pasteurella multocida* in raptors: prevalence and characterization. Avian Dis 1996 40: 908-918.
8. DWIGHT CH, YUAN CZ.. Veterinary Microbiology, 2nd ed. Massachusetts USA: Blackwell Publishing 2004.
9. WILSON J, SCHURR M, LEBLANC C, RAMAMURTHY R, BUCHANAN K, NICKERSON C. Mechanisms of Bacterial Pathogenicity. J Postgrad Med 2002; 78: 216-224.
10. HARPER M, COX DA, MICHAEL ST. F, WILKIE WI, BOYCE DJ, ADLER B. A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. Infect Immun 2004; 72: 3436-3443.
11. HEDDLESTONE KL, WATKO LP, REBERS PA. Dissociation of a fowl cholera strain of *Pasteurella multocida*. Avian Dis 1964; 8: 649-657.
12. SUTHERLAND IW. Surface carbohydrates of the prokaryotic cell. New York: Academic Press Inc 1977.
13. CHENG KJ, COSTERTON JW. Ultrastructure of cell envelopes of bacteria of the bovine rumen. Appl Microbiol 1975; 28: 841-849.
14. OPHIR T, GUTNICK DL. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from dessication. Appl Environ Microbiol 1994; 60: 740-745.
15. SMITH HE, DAMMAN M, VAN DER VELDE J, WAGENAAR F, WISSELINK HJ, STOCKHOFF-ZURWIEDEN N *et al.* Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. Infect Immun 1999; 67: 1750-1756.
16. GLISSON JR, HOFACRE CP, CHRISTENSEN J. *Pasteurella* and other related bacterial infections. In: SAIF M, editor. Diseases of poultry. 11th ed. Iowa: Iowa State University Press, 2003: 657-676.
- en aves de 42 semanas de edad; sin embargo, en el presente trabajo se demuestra que el inmunógeno elaborado a partir de un cultivo completo inactivado de *P. multocida* es capaz de proteger a pollas de 11 semanas de edad hasta en 96%.
- Ganfield *et al.*³³ estudiaron las propiedades inmunogénicas de un complejo purificado de lipopolisacáridos-proteína de *P. multocida*, la estudiaron y demostraron que un inmunógeno elaborado con un complejo purificado de lipopolisacáridos-proteína, administrado en ratones y pavos, protegió, en 70% a pavos y en 83% a ratones, después de realizar el desafío. En el presente estudio se administró un inmunógeno completo que protegió en 96% ante el desafío. De esta manera, es posible que los componentes contenidos en los inmunógenos formen complejos de lipopolisacáridos-proteína con propiedades inmunogénicas.
- Los tres inmunógenos utilizados en este estudio proporcionan protección en niveles no significativamente diferentes. Al considerar lo anterior, se infiere que los tres tipos de inmunógenos elaborados probablemente contengan proteínas capsulares de alto peso molecular, capaces de inducir la producción de anticuerpos y la protección en aves de 11 semanas de edad, y que el sobrenadante de cultivo completo confirió mayor protección de acuerdo con la mortalidad observada.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) el financiamiento del proyecto de investigación "Utilización de inmunógenos de *Pasteurella multocida* administrado por vía nasal y parenteral en gallinas de postura comercial" con clave UAEM-1848/2004, así como al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), de México, por la beca otorgada, también al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (Comecyt) por otorgar el apoyo de becas para estudios de posgrado a Germán Guadarrama Cruz, y finalmente al Centro de Investigación en Salud Animal (Ciesa) y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (FMVZ-UAEM), por facilitar las instalaciones necesarias para la realización del presente trabajo.

17. BROGDEN KA, REBERS PA. Serologic examination of the Westphal-type lipopolysaccharides of *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res 1978; 39: 1680-1682.
18. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres. [Serie en línea] 1989 [Citado] 2008 Julio 5] Disponible en: URL: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/e_summry.htm 2004
19. BLACKALL PJ, REID GG. Further efficacy studies of inactivated aluminium hydroxide adsorbed vaccines against infectious coryza. Avian Dis 1987; 31:527-532.

20. WILKIE I, GRIMES S, O'BOYLE D, FROST A. The virulence and protective efficacy for chickens of *Pasteurella multocida* administered by different routes. *Vet Microbiol* 2000; 72: 57-68.
21. DUBOIS M, GILLES AK, HALMILTON KJ, REBERS AP, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956; 28: 350-356.
22. ALONSO FMU. Niveles de inmunoglobulinas de la clase IgG totales y específicas contra el Antígeno F5+ de *Escherichia coli* en suero y calostro de ovejas al parto y suero de corderos durante el periodo perinatal (tesis de maestría). Toluca, Estado de México: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México, 1997.
23. BRIGGS DJ, SKEELES JK. An enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to *Pasteurella multocida* in chickens. *Avian Dis* 1983; 28: 208-215.
24. STEEL DG, TORRIE JH. Bioestadística, principios y procedimientos. 2ª ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1995.
25. BOYCE JD, CULLEN PA, NGUYEN V, WILKIE I, ADLER B. Analysis of the *P. multocida* outer membrane subproteome and its response to the *in vivo* environment of the natural host. *Proteomics* 2006; 6: 870-880.
26. UCHIDA C, KIMURA Y, KUBOTA S, SASAKI O. Protective effect of *Pasteurella multocida* cell-free antigen and toxoid against challenge with toxigenic strains of *P. multocida* in mice. *J Vet Med Sci* 2003; 65: 737-740.
27. JÄRVINEN L, HÖGENESCH H, SUCKOW AM, OWERSOCK TL. Induction of protective immunity in rabbits by coadministration of inactivated *Pasteurella multocida* toxin and potassium thiocyanate extract. *Infect Immun* 1998; 66: 3788-3795.
28. MENA-ROJAS E, VAZQUEZ CRUZ C, VACA PACHECO S, GARCIA GONZÁLEZ O, PEREZ-MARQUEZ VM, PEREZ-MENDEZ A *et al*. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum* a 110-kDa putative RTX protein. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 232: 83-87.
29. MUKKUR T. Demonstration of cross-protection between *P. multocida* type A and *P. haemolytic* serotype 1. *Infect Immun* 1997; 18: 583-585.
30. BROWN JL, DAWE DB, DAVIS RW, FOSTER J, SRIVASTAVA K. Fowl cholera immunization in Turkeys. I. Efficacy of various cell fractions of *P. multocida* as vaccines. *Appl Microbiol* 1970; 19: 837-841.
31. MARSHALL SM, ROBINSON AR, JENSEN MM. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure antibody response in turkeys against *P. multocida*. *Avian Dis* 1981; 25: 964-971.
32. AVAKIAN A, DICK WT, HENRY CW. Comparison of various antigens and their ability to detect protective antibodies against *Pasteurella multocida* using enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis* 1986; 30: 527-535.
33. GANFIELD JD, REBERS AP, HEDDLESTON LK. Immunogenic and toxic properties of a purified lipopolysaccharide-protein complex from *Pasteurella multocida*. *Infect Immun* 1976; 14: 990-999.