

1990 - A

087015416

Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL A
INMUNOGENOS DE Pasteurella multocida
EN RATONES ADULTOS**

T E S I S P R O F E S I O N A L

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA**

PRESENTA

ARMANDO ROMERO BARAJAS

GUADALAJARA, JALISCO

NOVIEMBRE DE 1994



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias Biológicas

Expediente.....
 Número.....
 Sección.....

C. ARMANDO ROMERO BARAJAS
 P R E S E N T E.-

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis " ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL A INMUNOGENOS DE Pasteurella multocida EN RATONES ADULTOS " para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el Dr. Hugo Castañeda Vázquez.

A T E N T A M E N T E
 "PIENSA Y TRABAJA"
 Las Agujas, Zapopan, Jal. 4 de Marzo de 1994

EL DIRECTOR

DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE



FACULTAD DE
 CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

BIOL. GUILLERMO BARBA CALVILLO

c.c.p.- Dr. Hugo Castañeda Vázquez, Director de Tesis.-pte.
 c.c.p.- El expediente del alumno

FAB/GBC/mahs.

Al contestar este oficio citese fecha y número

C. Dr. Fernando Alfaro Bustamante

Director de la Facultad de Ciencias Biológicas
de la Universidad de Guadalajara

P R E S E N T E.

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó el (la) pasante Armando Romero Barajas código número 087015416 con el título ESTUDIO DE LA RESPUESTA HUMORAL A INMUNOGENOS DE Pasteurella multocida EN RATONES ADULTOS.

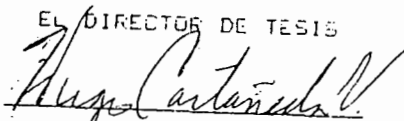
Consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines que haya lugar.

A T E N T A M E N T E


Guadalajara, Jal. a 8 de Noviembre 1994


EL DIRECTOR DE TESIS


Dr. Hugo Castañeda Vasquez

SINODALES

1. M.C. Margarita Bonilla Moreno
2. Dr. Sergio Aquilar Benavides
3. Dra. Galina Zaitzeva Petrovna


Firma


Firma

DEDICATORIAS

A mis padres Angel y Ma. Eugenia
por su apoyo, confianza, y a quienes
debo lo que soy.

A mis hermanos Angel,
Blanca Etel, y Viridiana
por su cariño y
paciencia.

A Mayra Molinar, René Zaragoza y
José Barajas quienes me enseñaron
el valor de la amistad y de la
vida.

AGRADECIMIENTOS.

A mi director de tesis Dr. Hugo Castañeda Vázquez por su asesoría y apoyo mediante los cuales fue posible la realización de esta tesis.

A la M.C. Maricela Mendoza Meneses por su asesoría en la técnica de aglutinación y aportaciones a este trabajo.

Al M.C. Salvador Velázquez Magaña por su valiosa asesoría en el análisis estadístico de este trabajo.

Al Biol. Roberto Vazquez Cabrales por su amistad, apoyo y ayuda en el proceso experimental de esta tesis.

A la Biol. Gloria Gómez Gómez por su amistad y ayuda en la realización de este proyecto.

A la M.C. Margarita Bonilla Moreno por su apoyo y motivación.

A mis sinodales Dr. Sergio Aguilar Benavides, Dra. Galina Zaitzeva Petrovna, M.C. Margarita Bonilla Moreno, por el tiempo y consejos dedicados con lo cual fue posible la realización de esta tesis.

A las Biólogas Lucila Méndez Moran y Celia Robles Murguía por su amistad y enseñanzas.

Al Biol. Gerardo Hernández Vera por su amistad y valiosa colaboración en este proyecto.

Al Biol. Ricardo Solis Zamora por su amistad y ayuda.

Al Biol. Fco. José Cuevas Preciado por su amistad y consejos.

A los Biólogos Leticia, Griselda, Mayra, Veronica T., Veronica Ch., Monica, Silvia, Lourdes y Mauricio por su ayuda y motivación.

INDICE

I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA	
II.1. Descripción General de <u>Pasteurella multocida</u> ..	3
II.1.1 Taxonomía, Morfología e Identificación Bioquímica	3
II.2. Inmunogenicidad	6
II.3. Adyuvantes	6
II.4. Respuesta Humoral	7
II.5. Tipificación Antigenica	10
II.6. Inmunógenos de <u>Pasteurella multocida</u>	10
II.6.1. Inmunógenos Para Aves de Corral	14
II.6.2. Inmunogenós Para Ganado Vacuno	15
II.6.3. Inmunógenos Para Cerdos	16
III. OBJETIVOS	19
IV. HIPOTESIS	19
V. JUSTIFICACION	19
VI. METODOLOGIA	20
VI.1. Producción de Bacterinas	20
VI.1.1. Bacterina Sin Adyuvante	22
VI.1.2. Bacterina Suplementada Con Adyuvante Completo de Freund	22
VI.1.3. Bacterina Suplementada con Hidróxido de Aluminio	23
VI.2. Selección de Ratones.....	23
VI.3. Condiciones de Bioterio	24
VI.4. Esquema de Inmunización	24
VI.5. Prueba de Reto	25
VI.6. Numero de Bacteria Para la Aglutinación	25
VI.7. Prueba de Aglutinación	26

VI.8. Lectura de la Prueba de Aglutinación	27
VI.9. Análisis estadístico	28
VII. RESULTADOS	29
VIII. DISCUSION	32
IX. CONCLUSIONES	36
X. BIBLIOGRAFIA	44

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA 1. IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE <u>Pasteurella multocida</u> .	5
TABLA 2. ESTANDARIZACION DE SUSPENSION BACTERIANA	26
TABLA 3. RESULTADO DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS (TITULO DE ANTICUERPOS EN LAS CUATRO BACTERINAS Y SUS RESPECTIVAS DOSIS	37
TABLA 4. ANALISIS ESTADISTICO DE LAS BACTERINAS CON SUS RESPECTIVAS DOSIS MEDIANTE LA PRUEBA U DE MAN WITNEY CON UN ALFA DE 0.05	38
TABLA 5. ANALISIS ESTADISTICO COMPARANDO TODAS LAS BACTERINAS MEDIANTE LA PRUEBA KRUS KAL WALLIS CON UN ALFA DE 0.05 .	39
FIGURA 1. PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN LOS RATONES CON LAS DIFERENTES BACTERINAS DOSIS 0.25 ML	40
FIGURA 2. PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN LOS RATONES CON LAS DIFERENTES BACTERINAS DOSIS 0.5 ML	41
FIGURA 3. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LA POBLACION DE RATONES DOSIS 0.5 ML	42
FIGURA 4. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LA POBLACION DE RATONES DOSIS 0.25 ML	43

I. INTRODUCCION.

La familia Pasteurellacea contiene bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos y fermentativos del género Pasteurella.

Aproximadamente 20 diferentes biotipos del género Pasteurella han sido identificados con la ayuda de análisis fenotípicos y genéticos. Las especies Pasteurella multocida y Pasteurella haemolytica, son los más prominentes patógenos en animales domésticos de este género de bacterias causando severas enfermedades y las mayores pérdidas económicas en ganado vacuno, porcino y aviar (García, 1988).

P. multocida está dividida en base a sus antígenos capsulares en 5 serogrupos (A,B,D,E, y F) según Carter. Los serogrupos A y D son los principales causantes de enfermedades en Norteamérica en ganado vacuno y porcino (García, 1988). Entre las principales enfermedades causadas por P. multocida se encuentra el cólera aviar en pollos y pavos, que es causado principalmente por el serogrupo A. Este serotipo en el ganado vacuno está asociado principalmente con bronconeumonía, sin embargo esta bacteria es aislada ocasionalmente de pleuroneumonía fibrinosa y septicemia hemorrágica. En el ganado porcino el serotipo A y D de P. multocida está asociado principalmente con rinitis atrófica.

Mucho se habla de los factores predisponentes de las enfermedades causadas por Pasteurella, los cuales pueden reducir las defensas del animal tales como: malos manejos de animales durante el transporte, mala alimentación, infestación de parásitos, destete de becerros, entre otros. Tal parece que la prevención de la pasteurelisis es el mejor camino para combatir

este microorganismo, ya que la terapia de animales clínicamente enfermos es mediante antibióticos se ha observado un incremento en la resistencia contra antibióticos de uso común por esta bacteria (Acosta, 1989).

Las especies de Pasteurella han estado asociadas con enfermedades y con intentos de desarrollar eficientes biológicos para este grupo de bacterias que antedatan el tiempo de Pasteur, sin embargo el desarrollo de tales vacunas ha sido una formidable tarea se ha experimentado con vacunas virales, vacunas combinadas virus-bacterias, bacterinas, bacterinas con adyuvantes etc.

En algunas ocasiones se observa que los agentes secundarios son parte de la microbiota normal de las vías aéreas y que llegan a tener un papel patógeno cuando disminuyen la defensas del animal (Castañeda, 1989).

Las infecciones por Pasteurella pueden estar asociadas con agentes virales; se han encontrado diferentes virus, sobretodo mixovirus parainfluenza-3 y herpes virus bovino-1.

Se piensa que la interacción del virus y Pasteurella se presenta cuando la lesión primaria de la mucosa es causada por agentes virales a lo cual sigue una colonización de esta bacteria.

II. REVISION DE LITERATURA.

II.1. DESCRIPCION GENERAL DE Pasteurella multocida.

II.1.1. Taxonomía, morfología, estructura e identificación Bioquímica.

Han sido muchos los intentos por nombrar y combatir las especies de Pasteurella así tenemos que Louis Pasteur, (1880) intentó atenuar cultivos de bacterias aisladas de aves para crear una vacuna viva contra el cólera aviar. Trevisan (1887), dió el nombre al agente causal de las neumonías en bovinos y venados en honor de Pasteur. Posteriormente las Pasteurellas fueron mencionadas dependiendo del animal al que atacaban, así el agente causal del cólera aviar era Pasteurella aviceptica, el agente causal de neumonía en bovinos era Pasteurella boviséptica. Kitt (1893), propuso el nombre de Bacterium bipolare multocidum por las características morfológicas que presenta la Pasteurella al teñirla con azul de metileno. Topley y Willson (1929), le dieron el nombre de Pasteurella septica. El nombre actual de Pasteurella multocida fue utilizado por primera vez en 1939 por Rosenbuch y Merchant. (Citado por Acosta 1989).

Como fue descrito en el Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology (Carter, 1984), el género Pasteurella puede ser dividido en 6 especies, basadas en su beta hemólisis, crecimiento en agar MacConkey, producción de indol, producción de gas a partir de carbohidratos y producción de ácido a partir de lactosa o manitol. Estas especies son P. multocida, P. haemolitica, P. pneumotropica, P. ureae, P. aerogenes, y P. gallinarum.

Las propiedades fenotípicas únicamente son importantes en la expresión del 10-20% del genoma, las técnicas moleculares

ofrecen un análisis más crítico de la relación entre las especies por lo tanto la Pasteurella ha sido examinada usando técnicas como DNA/DNA hibridización (Mutters et al., 1986), electroforesis de proteínas bidimensional (Olsen et al, 1989) y análisis de ARNr (Dewhirst et al., 1992); tales análisis han resultado en diversas reclasificaciones de las especies de Pasteurella hacia 11 especies en el género.

Uno de los organismos más afectados en esta clasificación es P. multocida la cual no es largamente clasificada como una especie de bacteria simplemente aislada de una amplia variedad de enfermedades en distintas especies animales.

Subespecies de P. multocida son ahora reconocidas y estas podrían ser especies específicas de algunos animales.

Las cepas de P. multocida pueden diferir mucho en cuanto a la virulencia y aparentemente, en la especificidad del huésped. Uno de los principales factores de virulencia encontrados en P. multocida, es la formación de neuraminidasa (Castañeda, 1987).

Estas bacterias pueden crecer en agar nutritivo convencional o en medios sintéticos relativamente sencillos. No producen hemólisis, aunque las colonias se oscurecen en los medios que contienen sangre. Forman distintos tipos de colonias : lisas mucoides y rugosas. La mayor parte de las cepas forman cápsulas de polisacáridos.

P. multocida son bacilos pequeños de 0.4 micrómetros de ancho por 1.4 micrómetros de largo aproximadamente, son Gram-negativas, muestran la propiedad de tinción bipolar al teñirlos con Giemsa o azul de metileno, no forman esporas y son inmóviles (Acosta, 1989).

TABLA NO. 1

IDENTIFICACION BIOQUIMICA DE P. multocida

Substrato	Pohl (1984)
Indol.	+
Nitrato	+
Citocromooxidasa	+
Catalasa	+
H ₂ S	+
Movilidad	-
Urea	-
Sacarosa	+
Sorbitol	+
Glucosa	+
Manitol	+
Xilosa	(+)
Lactosa	-
Arabinosa	v
Salicina	(-)
Ramnosa	-
Manosa	+
Dulcitol	-
Maltosa	+
Citrato	-

+ Positivo

- Negativo

(+) o (-) La mayoría de los casos positivo o negativo

v Variable

II.2. INMUNOGENICIDAD.

La definición tradicional de antígeno es aquella que le adjudica a una sustancia exógena la capacidad de inducir una respuesta inmune cuando se introduce en un animal (Ortiz, 1988). Recientemente se ha propuesto el término de inmunogenicidad para indicar esta capacidad. Por lo tanto hay una tendencia a designar como inmunógeno aquellos agentes que producen una respuesta inmune restringiendo el término antígeno.

Existen distintos factores que determinan la inmunogenicidad como: la composición, la vía de administración, dosis del antígeno, uso de adyuvantes y el estado físico del antígeno entre otras(Ortiz, 1988).

En general las sustancias con mayor capacidad inmunógena son las proteínas macromoleculares. Sin embargo los polisacaridos también constituyen un grupo de sustancias que inducen una buena respuesta inmunitaria. Por otra parte, los ácidos nucleicos puros y los lípidos no son inmunógenos. Resulta evidente que la naturaleza química del antígeno es importante ya que mediante una modificación química de una molécula es posible volver inmunógena una sustancia que originalmente no lo era o lo era en forma limitada. Otra característica muy importante en la inmunogenicidad es que varía de una especie a otra (Carpenter, 1982).

II.3. ADYUVANTES.

Gran número de sustancias inyectadas junto con el antígeno aumentan la formación y persistencia de anticuerpos; estas sustancias capaces de potenciar la respuesta inmune (adyuvantes),

modifican la inmunogenicidad del antígeno (Riott, 1992).

Se han descrito varias sustancias que aumentan la inmunogenicidad de los antígenos, cómo las emulsiones oleosas, el caolín, las sales de magnesio, el hidróxido de aluminio.

Freund descubrió la técnica de incorporar antígenos en aceite de parafina en forma de emulsión de agua en aceite, comprobando que una o dos inyecciones promovían la formación intensa y persistente de anticuerpos. El poder antigénico de tales emulsiones a veces aumentaba más todavía por la adición de un segundo coadyuvante, micobacterias muertas.

El aceite de parafina y las micobacterias pueden estimular la formación de anticuerpos, promoviendo inflamación local, pero el aceite también retrasa la absorción, destrucción y eliminación del antígeno y permite la estimulación antigénica continuada por largo tiempo (Carpenter, 1982).

II.4. RESPUESTA HUMORAL.

Un anticuerpo es una globulina de la sangre modificada (inmunoglobulina) que por lo general se forma en respuesta a un estímulo antigénico, y que es capaz de combinarse específicamente con el antígeno correspondiente (Carpenter, 1982).

Las inmunoglobulinas comprenden la familia de proteínas que consisten de cadenas ligeras y cadenas pesadas unidas por enlaces disulfuro; todos los anticuerpos hasta ahora descritos son inmunoglobulinas pero no se sabe si todas las inmunoglobulinas funcionan como anticuerpos.

Una característica fundamental de los organismos es su capacidad para reconocer moléculas extrañas y responder contra

ellas (respuesta inmune). Tradicionalmente la respuesta inmune ha sido dividida en dos diferentes tipos de reacción humoral y celular (Ortiz, 1988). Sin embargo para ambos tipos de respuestas, las células inmunocompetentes de mayor importancia son los linfocitos.

El término respuesta humoral deriva del hecho de que los anticuerpos están distribuidos en los fluidos corporales (humor) tales como sangre, lágrimas, sudor, saliva, etc. (Roit, 1992). Estos anticuerpos característica de la respuesta humoral, son secretados por un tipo de linfocitos llamados células B. El otro tipo de linfocitos llamados células T contribuye a la repuesta humoral y son principalmente responsables de la inmunidad celular. Un antígeno por ejemplo una bacteria o toxina, pueden estimular la diferenciación de células B en células plasmáticas, existen dos caminos por los cuales las células B pueden ser activadas a la diferenciación en células plasmáticas (Roit, 1992):

1. Respuesta T independiente. En este caso las células B serán activadas directamente en ausencia de células T. Los antígenos timo dependientes son normalmente polisacáridos bacterianos y las proteínas polimerizadas, que tienen como característica común presentar determinantes antigénicos (epítopes) repetidos.
2. Respuesta T dependiente. En este caso la respuesta depende de los dos tipos de células tanto células B como células T, reconociendo el antígeno. En esta respuesta la diferenciación de las células B depende de la interacción con células T. En una respuesta inmune la cual es independiente de células T los anticuerpos producidos son principalmente del tipo IgM. Sin

embargo en la respuesta T dependiente las células B desarrollan primeramente anticuerpos IgM y después la célula B sintetizará otros tipos de inmunoglobulinas como IgG, IgA, o IgE. Un proceso el cual es dependiente de factores secretados por células T. El mecanismo de cómo es dirigido el cambio no está totalmente comprendido, de algún modo la naturaleza del antígeno y el cómo es presentado, influencia la clase de anticuerpo producido.

Al ponerse un antígeno por primera vez en contacto con el sistema inmune de un individuo, se observa un período latente de varios días (tres a cuatro) durante el cual no se detectan anticuerpos. Después los anticuerpos del tipo IgM hacen su aparición en el suero y aumentan exponencialmente hasta alcanzar un máximo, para luego disminuir en forma gradual; a esto se le llama respuesta primaria. Ahora bien si a este individuo se le deja que tales niveles de anticuerpo desaparezcan y después se le aplica una segunda dosis del mismo antígeno la respuesta que se obtiene es diferente y se le llama respuesta secundaria. Se caracteriza por ser más rápida en su desarrollo y cuantitativamente, ya que su período latente es de menor duración además después de llegar al máximo, su descenso es mucho más lento y la clase de anticuerpos producidos es solo IgM (Riot, 1992).

Algunas de las mayores funciones de la respuesta humoral son:

1. Neutralización de virus y toxinas.
2. Aglutinación de bacterias y otros patógenos seguida por fagocitosis.
3. Activación del sistema de complemento vía complejo Antígeno-anticuerpo.

4. Protección del organismo para prevenir ataque a células epiteliales.

II.5. TIPIFICACION ANTIGENICA.

P. multocida se clasifica por sus antígenos capsulares o sus antígenos somáticos (Rhoades, 1989). Los antígenos capsulares están divididos en cinco serogrupos (A,B,D,E, y F) basados en pruebas de hemaglutinación pasiva de eritrocitos revestidos con extractos celulares conteniendo los antígenos específicos de la cápsula los cuales incluyen lipopolisacáridos y los no lipopolisacáridos (Carter, 1984).

La serotipificación somática de P. multocida es más comúnmente hecha por la prueba de difusión en agar (Henddleston et al., 1972); este sistema reconoce 16 serotipos con antisueros de pollo hechos contra bacterinas de Pasteurella multocida reaccionando contra antígenos de bacteria formalinizada y suspendida en solución salina. Antisero somático específico puede ser obtenido de pollos inmunizados con lipopolisacárido purificado (Rimmler, 1984).

II.6. INMUNOGENOS DE P. multocida.

La cápsula purificada de P. multocida funciona como un hapteno cuando es inyectada en muchos animales y no ha sido investigada como un inmunógeno contra enfermedades del ganado en Norteamérica.

Los lipopolisacáridos de P. multocida tienen similitudes químicas y biológicas con otros lipopolisacáridos de otras bacterias Gram-negativas (Lugtenberg et al., 1984). El

lipopolisacárido purificado de P. multocida es antigénico; sin embargo, los anticuerpos encontrados después de la inmunización dependen de la especie de animal inoculado, lipopolisacáridos usados, ruta y método de inoculación (Rimler and Philips, 1986). La protección proporcionada por inmunización con lipopolisacáridos es algo dependiente de la especie de animal.

En general, parece que los lipopolisacáridos de P. multocida muestran ser mayormente inmunógenos en aves (Rhoades y Rimler, 1989), sin embargo, Tsuji y Matsumoto (1988) sugieren que un complejo lipopolisacárido-proteína es esencial para la inducción de inmunidad contra P. multocida en infecciones en pavos. El papel de los lipopolisacáridos cómo un inmunógeno en mamíferos permanece controversial. Ratones, ganado vacuno y conejos no han sido realmente protegidos contra infección de P. multocida seguida de una inmunización de lipopolisacáridos (Rimler y Rhoades 1989).

Wijewardana et al. (1990) encontraron que un anticuerpo monoclonal bactericida contra lipopolisacáridos protegía completamente contra la exposición homóloga con P. multocida viva. Sin embargo anticuerpos monoclonales de lipopolisacáridos que fueron opsonizados pero no bactericidas únicamente protegieron parcialmente a ratones contra exposición de P. multocida (Ramdani y Adler, 1991).

Las proteínas externas de membrana de P. multocida han sido estudiadas como inmunógenos potenciales. El papel inmunogénico de esas proteínas a sido sospechoso por años sin embargo la contaminación con lipopolisacáridos y cápsula de las proteínas externas de membrana han limitado la interpretación de su

potencial inmunogénico.

Lughtenberg et al. (1984) demostraron tres perfiles sobre proteínas de P. multocida aisladas. El perfil difiere principalmente en la migración de una proteína de la superficie (proteína H) con su masa molecular de aproximadamente de 36-38 kDa de los varios serogrupos de P. multocida y demostraron que su patrón electroforetico fue marcadamente diferente de aquellos de P. haemolytica.

El papel inmunogénico de las proteínas de membrana externa de P. multocida ha sido mejor caracterizado. Lu et al. (1988) demostraron que hubo un mayor aumento de anticuerpos contra 5 proteínas de membrana externa de P. multocida (27, 37.5, 49.5, 58.7 y 64.4 kDa). Ellos demostraron que la vacunación con membrana externa de P. multocida protegía ratones contra el desafío de una bacteria homóloga (Lu et al 1991a).

Truscott y Hirsh (1988) demostraron que una proteína de membrana externa 50 kDa fue antifagocítica. Pavos dieron anticuerpos específicos para esa proteína de membrana externa y protegieron contra el desafío de bacterias homólogas. Sin embargo Abdullahi et al. (1990) fallaron en el desafío en ratón de P. multocida y en alguna correlación entre protección y la respuesta humoral de proteínas de membrana externa, aisladas de bovino.

Los serogrupos A y D de P. multocida producen proteínas tóxicas similares (aproximadamente 145 kDa) que son tóxicas para pulmones bovinos y células Vero in vitro, son letales para roedores y pájaros, en cerdos inducen osteolisis, producen hemorragia y necrosis cuando son inyectados en gallina de Guinea (Rimler y Brogden, 1986; Rimler y Rhodes, 1989). debido al efecto

posterior la toxina fue llamada toxina dermonecrotica, sin embargo el término toxina de P. multocida está en uso corriente.

Aunque la toxina de P. multocida tiene muchas características de una exotoxina ésta no es secretada por P. multocida viviente intacta (Dali et al., 1991), pero podría ser extraída de la bacteria mediante la sonicación.

La toxina de P. multocida fue demostrada por aislamientos de varios animales, es sin embargo un factor de virulencia principalmente en rinitis atrófica de cerdos.

Como un inmunógeno, la toxina de P. multocida inactivada (Toxoide) induce protección contra el efecto letal de la toxina en ratas y ratones (Thurston et al., 1991) y contra rinitis atrófica experimental en cerdos (Foged et al., 1989). Anticuerpos monoclonales contra la toxina de P. multocida puede neutralizar su efecto letal en ratón (Foged, 1988).

El gen para la toxina ha sido clonado, expresado y caracterizado en Escherichia coli (Petersen y Foged, 1989). Una delección mutante de la toxina de P. multocida, la cual es deficiente en 121 aminoácidos en la parte amino-terminal de la toxina, tuvo una marcada reducción de la toxicidad para células cultivadas, ratones, y gallinas de Guinea; sin embargo retuvo su inmunogenicidad para ratones (Nielsen et al., 1991). En estos estudios los ratones vacunados fueron protegidos contra los efectos letales de la toxina de P. multocida y los cerdos vacunados al nacer, tuvieron realzada la resistencia experimental contra la rinitis atrófica.

II.6.1. Inmunógenos para aves de corral.

Varios serotipos y serogrupos de P. multocida especialmente el serogrupo A, y los serotipos 1,3 y 4 son reconocidos como la principal causa de cólera aviar en pollos y pavos (Rhoades y Rimler, 1989). La enfermedad puede manifestarse como una septicemia aguda caracterizada por una coagulación intravascular diseminada, necrosis esplénica y neumonía fibrinosa.

El cólera aviar ocurre como un exudado fibrino-purulento y necrosis en una variedad de localizaciones incluyendo sacos aéreos, pulmones, barba, huesos y articulaciones.

Los factores de P. multocida que pueden ser importantes para la virulencia son los lipopolisacáridos (Rimler et al., 1984), la cápsula (Tsuji y Matsumoto, 1989) los plásmidos y resistencia a complemento (Lee et al., 1991).

Los biológicos para la inmunización contra aves de corral son comúnmente de dos tipos: Bacterinas y vacunas atenuadas. Las bacterinas inducen inmunidad específica somática mientras las vacunas confieren algún grado de inmunidad cruzada. Las bacterinas son probadas en pollos o pavos con vacunaciones previas y desafiadas con un serotipo virulento en no menos de 14 días después de la última vacunación.

El principal inmunógeno de P. multocida en aves parece ser los lipopolisacáridos esto basado en la capacidad de inmunizar aves contra la enfermedad usando extractos de lipopolisacáridos (Rhoades y Rimbler, 1989). Sin embargo el papel de los antígenos no-lipopolisacáridos en la estimulación inmunogénica en aves no es bien conocida.

Se han hecho varios intentos para correlacionar el título

de anticuerpos contra P. multocida con la resistencia al desafío. Avakian et al. (1986,1989) mostraron correlación positiva entre la respuesta de anticuerpos a la cápsula y la resistencia de los pollos al desafío, pero no mostraron correlación entre protección y título de anticuerpos a la bacteria sonicada.

Schlink y Olson (1989) demostraron correlación entre altos títulos de anticuerpos en la prueba de microaglutinación y la sobrevivencia de pavos vacunados una o más veces. El desafío se hizo con una cepa virulenta en el agua de bebida.

Se han ensayado diferentes esquemas de inmunización vacunando a gallinas de 12 y 21 semanas de edad con la cepa Clemson, dos bacterinas comerciales y dos bacterinas experimentales ambas en emulsión oleosa. Todas las aves que recibieron la cepa Clemson sobrevivieron. Las aves inmunizadas con bacterinas fueron protegidas contra el desafío en un 86%.

Todos los controles no vacunados murieron dentro de las 72 horas posteriores al desafío. Los niveles de anticuerpos fueron más elevados en las aves que recibieron bacterinas pero la protección fue mayor con la vacuna viva (Avakian et al., 1989).

II.6.2. Inmunógenos para ganado vacuno.

Los serogrupos B y E de P. multocida están asociados con septicemia hemorrágica (Carter y De Alwis, 1989), mientras que las enfermedades respiratorias están asociadas principalmente con el serogrupo A (Frank, 1989). El serogrupo A de P. multocida está más comúnmente asociado con bronconeumonía fibrinosa que es menos fulminante que pleuroneumonía fibrinosa asociada con infección de P. haemolytica (Dungworth, 1985).

P. multocida puede ser aislada en bronconeumonía de ganado vacuno en lotes o de neumonía enzoótica en bovinos menores de 6 meses de edad.

Los biológicos disponibles para P. multocida en ganado vacuno son bacterinas y vacunas usualmente en combinación con P. haemolytica.

La prueba de potencia de las bacterinas para animales diferentes de las aves se realizan en ratón.

Una aceptable potencia para ratón es 1/20 de la menor dosis recomendada para otros animales. Cada bacterina es probada en los ratones por 2 inyecciones intraperitoneales con 14 días por separado.

Poco ha sido publicado acerca de los inmunógenos de P. multocida de importancia para la protección contra enfermedades respiratorias bovinas. Limitada información está disponible en inmunógenos de P. multocida aislados de septicemia hemorrágica (Carter y De Alwis, 1989; Dawkins et al., 1991).

Antígenos capsulares (Nagy y Penn, 1976), lipopolisacáridos, complejo proteína-lipopolisacárido, y varias proteínas (Dawkins et al., 1991) han sido sugeridos como inmunógenos importantes para P. multocida serogrupos B y E, debido a la dificultad en la protección de ratón con lipopolisacáridos de P. multocida y la similitud entre la enfermedad respiratoria inducida en ganado vacuno y lo que se ha visto en el conejo.

II.6.3. Inmunógenos para cerdos.

Los serogrupos A y D están asociados con bronconeumonía fibrinosa y rinitis atrófica en el puerco (Dunworth, 1985).

La enfermedad de mayor importancia económica es la rinitis atrófica que es una enfermedad de porcinos jóvenes caracterizada por la inducción de atrofia de los cornetes nasales (Chanter y Rutter, 1989). Cuando las lesiones son severas, se observan distorsiones faciales. La rinitis atrófica severa ocurre cuando la cavidad nasal es colonizada por un gran número de P. multocida toxigénica, particularmente del serogrupo D. La colonización es realizada por una infección nasal con citotoxina producida por Bordetella bronchiseptica (Chanter, 1990). La toxina de P. multocida induce degeneración y necrosis de osteoblastos con la subsecuente osteoporosis de los cornetes nasales a través de un proceso de osteólisis de osteoclastos (Dunworth, 1985) e, hiperplasia epitelial. La toxina de P. multocida no fue tóxica en los macrófagos alveolares de cerdo in vitro (Pifoan, 1986), y el papel de esta toxina en la neumonía porcina es desconocida.

Los biológicos comúnmente disponibles para P. multocida en cerdos son bacterinas con o sin toxina de P. multocida, frecuentemente empacadas en conjunción con otras bacterinas tales como Bordetella bronchiseptica, Erysipelothrix rhusiopathiae, y Actinobacillus pleuropneumoniae. La eficacia de bacterinas de P. multocida sin toxina en el control de neumonía porcina o rinitis atrófica es cuestionable (Chanter y Rutter, 1989), sin embargo la inmunidad a rinitis atrófica parece que es inducida pasivamente con antisuero específico contra toxina de P. multocida (Chanter y Rutter, 1989) y activamente con biológicos que contienen toxoides de P. multocida (Foged et al., 1989) o con mutantes con deleciones de P. multocida toxina recombinante (Nielsen et al., 1991). Normalmente no hay una prueba de potencia

estandarizada aprobada para vacunas con toxoide de P. multocida.

La toxina de P. multocida está establecida como el mejor inmunógeno de P. multocida en rinitis atrófica. Efectivamente esto requeriría agregar un modelo estandarizado para rinitis atrófica, estandarización de un método de medida de la masa antigénica de la toxina de P. multocida en una preparación biológica y la determinación de la dosis requerida de antígeno para proteger contra el desafío.

III. OBJETIVOS:

General: Evaluar la respuesta humoral de 3 inmunógenos de Pasteurella multocida en ratones cepa Balb/c.

Particulares:

1. Comparar el título de anticuerpos inducidos por una bacterina comercial, contra 2 bacterinas con adyuvante
2. Comparar la protección brindada por las bacterinas.

IV. JUSTIFICACION.

La incidencia de enfermedades producidas por Pasteurella multocida es muy alta. La producción de vacunas para combatir la morbilidad provocada por estos microorganismos hasta ahora no ofrecen una protección adecuada.

Se requieren investigaciones encaminadas al mejoramiento de los inmunógenos.

V. HIPOTESIS.

Al adicionar adyuvantes a bacterinas de Pasteurella multocida la respuesta humoral será mayor que con la vacuna comercial.

VI. METODOLOGIA.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología del departamento de Biología Celular y molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales de la Universidad de Guadalajara.

La cepa de P. multocida A 11220 fue donada por el Laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

VI.1. PRODUCCION DE BACTERINAS.

A partir de un cultivo de P. multocida serogrupo A se tomó una colonia y se sembró en el medio de enriquecimiento infusión cerebro-corazón, se incubó a 37 °C durante 24 horas en baño maría con agitación.

Posteriormente el cultivo se centrifugó 20 minutos a 5000 rpm., se decantó el sobrenadante y se agregó solución salina fisiológica estéril y se volvió a centrifugar 20 minutos a 5000 rpm, ésto con el fin de eliminar residuos del medio de cultivo y dejar únicamente las bacterias en solución salina fisiológica estéril. Inmediatamente después se decantó el sobrenadante y se agregó nuevamente solución salina fisiológica estéril y agitando el tubo con el fin de homogenizar las bacterias en la solución, para la determinación del número de unidades formadoras de colonia (U.F.C./ml.) y su conteo en placa. Técnica que se describe a continuación.

1. Se tomó una muestra de un ml. de la solución de bacterias homogenizadas.

2. Esta se diluyó en 99 ml. de solución estéril, se agitó se tomó 1 ml., enseguida se diluyo en 99 ml del diluyente estéril, y asi sucesivamente hasta llegar a la dilución $1:1 \times 10^8$.
3. De cada dilución se tomó una muestra de 1 ml. y se introdujo en una caja de Petri previamente esterilizada.
4. Se adicionó a cada caja de Petri de 20 a 30 ml. de agar fundido, el cual mediante agitación circular de la caja se mezcló al inculo.
5. Una vez gelificadas las placas se colocaron en posición invertida en la incubadora 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
6. Posteriormente se seleccionó una placa que contenía de 30 a 300 colonias.
7. El número de colonias que se encuentran en la placa se multiplica por la inversa de la dilución de la muestra que es igual al número de U.F.C. por ml.

La técnica de conteo en placa se basa en el principio de que cada organismo viable dará origen a una colonia y además se supone que la suspensión bacteriana es homogénea, obviamente las únicas bacterias que se encuentran son aquéllas que pueden crecer en el medio utilizado y en condiciones de incubación.

De la solución matriz se hacen 2 diluciones con el objetivo de que el contenido de éstas sea de 12×10^6 UFC por ml. en una dilución y en la otra 24×10^6 UFC por ml. y así poder preparar las bacterinas. A las soluciones que contienen 12×10^6 UFC y 24×10^6 UFC se les agregó 0.3% de formaldehído y se expusieron 12 hrs. a temperatura ambiente con la finalidad de lisar a las bacterias. Después se hizo una prueba para saber si realmente había tenido

efecto letal el formaldehído. Se tomó una muestra de cada una de las soluciones que contenían las bacterias con formaldehído y se sembró en agar sangre y su posterior incubación 24 hrs. a 37 °C. Si después de éste período no se observaba crecimiento alguno en el agar sangre, ésto indicaba que la solución carecía de bacterias capaces de multiplicarse. Estando listas estas soluciones se procedió a la preparación de las bacterinas respectivas.

VI.1.1. Bacterina sin adyuvante.

Esta bacterina como no era suplementada con algún adyuvante no requirió agregarle nada dado que ya habían sido lisadas las bacterinas con el formaldehído utilizando la bacterina con la concentración de 12×10^6 .

VI.1.2. Bacterina suplementada con adyuvante completo de Freund.

El adyuvante completo de Freund contiene 8.5 volúmenes de vaselina líquida (aceite mineral) más 1.5 volúmenes de lanolina y 1 ml. de BCG, los cuales están mezclados. Esta tipo de bacterina se preparó mezclando volúmenes iguales de adyuvante completo de Freund y bacterina que en este caso fue la que contenía 24×10^6 UFC.

Utilizando una jeringa con una aguja número 18 para aspirar y expulsar la muestra repetidamente en la forma más vigorosa posible, se comprueba la emulsión dejando caer una gota sobre la superficie de agua. Si la gota permanece perfectamente formada y no se extiende sobre la superficie la emulsión se encontraba lista para usarse.

VI.1.3. Bacterina suplementada con Hidróxido de Aluminio.

Para la preparación de ésta se utilizó la bacterina que contenía 12×10^6 UFC, se le añadió una solución de hidróxido de aluminio al 10% en proporción de 2.30 ml. por cada 50 ml. de bacterina y posteriormente se agitó.

VI.2. SELECCION DE RATONES.

El ratón es un animal manso, dócil, fácil de mantener, de bajo costo, relativamente saludable y que satisface un amplio rango de procedimientos en las investigaciones; sus características de tamaño, necesidades nutritivas convencionales, corto período de gestación y fácil manejo hacen del ratón, un sujeto ideal para la investigación.

La selección de ratones se llevo a cabo mediante los siguientes criterios de inclusión que se enlistan a continuación:

1. Ratones Cepa Balb/c.
2. Ratones "sanos".
3. Ratones adultos.
4. De los 2 sexos.
5. Sin previo tratamiento.

En base a estos criterios fueron seleccionados 56 ratones para cada uno de los experimentos, los cuales se separaron en 8 lotes de 7 ratones en sus respectivas jaulas. El experimento se repitió 2 veces más tomando en cuenta la misma cantidad de ratones, la mismas bacterinas e iguales condiciones de bioterio.

VI.3. CONDICIONES DE BIOTERIO.

Sabemos, que el medio ambiente influye notablemente en la salud de los animales por ser un conjunto de factores físicos químicos y biológicos que rodean al organismo, por lo que es importante en los animales de laboratorio un adecuado control de éste para así evitar que el animal enferme y ésto ocasione a su vez variantes en la investigación.

Las condiciones del ambiente en el bioterio para el desarrollo óptimo en los animales son:

1. Humedad 45-55%.
2. Temperatura 21-25 °C.
3. Iluminación 100-125 lux (intensidad luminosa) con 12 hrs. de requerimiento de luz al día.
4. Ventilación 6-10 recambios totales por hora.

VI.4. ESQUEMA DE INMUNIZACION.

La inmunización se hizo una vez obtenidas las bacterinas. Se formaron 8 lotes de 7 ratones cada uno. A cada lote se le inoculó la misma dosis y una bacterina: la bacterina suplementada con hidróxido de aluminio, la bacterina suplementada con adyuvante completo de Freund, la bacterina sin adyuvante y la bacterina comercial. Todas fueron inoculadas en sus respectivos ratones en 2 dosis 0.25ml. y 0.5ml. y en dos concentraciones 3×10^6 UFC y 6×10^6 UFC, respectivamente.

A los 14 días fueron revacunados con su respectiva dosis y bacterina.

La fase de inmunización fue repetida 2 veces más con la utilización de la misma cantidad de ratones y las mismas

Bacterinas.

VI.5. PRUEBA DE RETO.

Después de 21 días postinmunización se tomaron 4 ratones de cada lote y se inocularon con bacterias vivas de una cepa homóloga de P. multocida con una concentración de 1600 UFC aproximadamente. Después de la inoculación los animales que murieron en las 72 hrs posteriores se les tomó una muestra de sangre, pulmones y líquido peritoneal, se hizo una siembra de estas muestras para comprobar la infección de P. multocida. Los animales que sobrevivieron se consideraron protegidos.

VI.6. NUMERO DE BACTERIA PARA LA AGLUTINACION.

La técnica de Macfarland provee un método simple para la estandarización de la concentración de bacterias en suspensión.

La turbidez de una suspensión determinada de bacterias es comparada con la turbidez respectiva de una serie de 10 tubos estandarizados conteniendo una solución de sulfato de bario. Preparada por la mezcla de varias cantidades de Cloruro de Bario al 1% y Acido Sulfúrico al 1%, la turbidez de estos tubos corresponde a la variación de la concentración de bacterias en el rango de estafilococos, estreptococos y bacilos.

A una serie de 10 tubos se les adicionó el Cloruro de Bario y el Acido Sulfúrico en la proporción enlistada en la tabla.

TABLA No. 2

Estandarización de suspensión bacteriana

Escala de McFarland	1%BaCl ₂ (ml)	1%H ₂ SO ₄ (ml)	Número de bacteria representada x10 ⁶
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

VI.7. PRUEBA DE AGLUTINACION.

Se hace crecer un cultivo de P. multocida en el medio de enriquecimiento infusión cerebro-corazón, después de incubar se centrifugó 20 min/5000 rpm, se decanto el sobrenadante y se agregó solución fisiológica estéril volviéndose a centrifugar 20 min/5000 rpm. Una vez obtenido el botón de bacterias se ajustaron a una concentración que corresponde al número 3 en la escala de McFarland, ya que ésta nos servirá como antígeno para la prueba de aglutinación.

Después se procedió a la extracción de sangre de los ratones

por punción cardiaca, que fue aproximadamente de 1 ml. por cada ratón. La sangre fue centrifugada a 2500 rpm/10 min, después se separo con una pipeta Pasteur el suero, el cual fue congelado a menos 20 °C para su posterior titulación.

Se dispuso en una gradilla 12 tubos de ensayo para que excedieran al título supuesto de anticuerpos, se puso con una pipeta serológica 0.5 ml de solución salina fisiológica a todos los tubos. Con la pipeta serológica se agregaron 0.5 ml del antisuero en el primer tubo, después se mezcló el contenido con un vortex; este tubo que contenía la dilución 1:2 se transfirió 0.5 ml al segundo tubo, se mezcló como anteriormente se dijo y se siguió la transferencia en forma análoga hasta el último tubo, en el cual se desechó 0.5 ml del contenido.

Cada tubo contenía la mitad de la concentración del antisuero que el tubo precedente (la serie de tubos es como sigue 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64.... 1:2048), se puso en cada tubo 0.5 ml de la solución que contenía el antígeno con una concentración de 3 en la escala de McFarland, posteriormente fueron agitados los tubos y fueron incubados 12 hrs a 37 °C en baño maría con agitación lenta.

Este procedimiento se realizo para cada suero obtenido de los ratones con su respectiva dosis de bacterina administrada.

VI.8. LECTURA DE LA PRUEBA DE AGLUTINACION.

Los tubos se examinaron en 3 modalidades: sin agitarlos, agitándolos y mediante un golpe rápido para suspender el sedimento. La reacción positiva es aquella, en la cual las células se hallan aglutinadas en el fondo del tubo y suelen

resuspenderse como gránulos separados o masas flocculentas en un líquido por demás claro.

En la reacción negativa no hay acumulación, sólo sedimentación normal de células, de manera que la agitación del tubo causa poco o ningún cambio de la turbiedad.

Se considera el título de anticuerpos la dilución mayor que presenta aglutinación.

VI.9. ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos obtenidos se analizaron con estadística no paramétrica empleando las pruebas Kruskal Wallis y U de Man Whitney.

VII. RESULTADOS.

Los resultados de las pruebas de reto (desafío) revelaron que la bacterina que brindó menor protección fue la bacterina sin adyuvante con una mortalidad de 50 % para la dosis de 0.25ml y una mortalidad de 41.66% para la dosis de 0.5ml.

En la bacterina suplementada con adyuvante completo de Freund se encontró una mortalidad de 41.66% para la dosis 0.25ml y una mortalidad de 33.33% para la dosis de 0.5ml.

En la bacterina comercial se encontró una mortalidad de un 33.33% para ambas dosis.

Respecto a la bacterina suplementada con hidróxido de aluminio fue la que mayor protección dio a los ratones con una mortalidad de 25% para la dosis de 0.25ml y una mortalidad de 16.66% para la dosis de 0.5ml.

En los resultados de las pruebas de aglutinación hubo títulos de anticuerpos en las cuatro bacterinas y se encontró que la bacterina que mayor título de anticuerpos produjo fue la bacterina suplementada con adyuvante completo de Freund.

Las bacterinas suplementadas con hidróxido de aluminio y la bacterina comercial presentaron títulos muy similares intermedios entre las otras dos bacterinas.

La bacterina sin adyuvante presentó los títulos más bajos comparada con las cuatro bacterinas.

Los resultados de la prueba de aglutinación se presentan en la tabla No. 3.

La comparación del título de anticuerpos entre las dosis 0.25ml y 0.5ml de bacterina suplementada con hidróxido de

aluminio, presentaron una diferencia significativa al hacer la comparación estadística, mediante la prueba U de Man Witney con un alfa de 0.05, presentando la dosis de 0.5ml el título mas elevado.

En el caso de la bacterina suplementada con el adyuvante completo de Freund se observó el mayor título de anticuerpos para las cuatro vacunas de prueba al llevar a cabo el análisis estadístico de las dosis 0.25ml y 0.5ml mediante la prueba U de Man Witney se encontró que presentaban diferencias significativas con un alfa de 0.05.

En el caso de la bacterina comercial al llevar acabo la comparación estadística entre las dosis 0.25ml y 0.5 ml mediante la prueba U de Man witney con un alfa de 0.05 se encontró que no había diferencias significativas.

Los resultados de este análisis estadístico se muestran en la tabla No. 4.

La evaluación de la variación de los títulos de anticuerpos en cada una de las bacterinas se hizo mediante la prueba estadística Kruskal Wallis con un alfa de 0.05 la cual indicó que la bacterina suplementada con hidróxido de aluminio presentó diferencias significativas con el inmunógeno suplementado con el adyuvante completo de Freund. De igual manera la bacterina suplementada con hidróxido de aluminio presentó diferencias significativa con la bacterina sin adyuvante. No se encontraron diferencias significativas entre la bacterina suplementada con hidróxido de aluminio y la vacuna comercial.

La bacterina suplementada con el adyuvante completo de Freund presentó diferencias significativas con la vacuna suplementada

con hidróxido de aluminio, así como con la vacuna comercial y con el inmunógeno sin adyuvante.

En la bacterina sin adyuvante se encontraron diferencias significativas con el inmunógeno suplementado con hidróxido de aluminio, con la bacterina suplementada con el adyuvante completo de Freund y la vacuna comercial.

En lo que respecta a la bacterina comercial, presentó diferencias significativas con el inmunógeno suplementado con adyuvante completo de Freund y con la bacterina sin adyuvante, pero no presentó diferencias significativas con la vacuna suplementada con hidróxido de aluminio.

Esta información es sintetizada en la tabla número 5.

VIII. DISCUSION.

El ratón es el animal mas utilizado en las investigaciones científicas por la facilidad de mantener, bajo costo, corto período de gestación entre otras de sus características y se puede observar que en la mayoría de los trabajos de vacunas contra Pasteurella que estén destinadas a la protección de ganado vacuno y porcino (Confer, 1993) se utiliza el ratón como modelo experimental. En trabajos similares de vacunas de las aves se tienen como modelo experimental pavos o pollos. Actualmente en el mercado se puede encontrar a las bacterinas como el principal biológico disponible para prevenir enfermedades causadas por P. multocida, las vacunas con organismos vivos atenuados se utilizan principalmente en algunos trabajos de investigación.

Los resultados obtenidos en la comparación del título de anticuerpos entre la dosis 0.25ml y 0.5ml de la bacterina suplementada con hidróxido de aluminio, revelaron que la dosis 0.5ml presento una diferencia significativa con la dosis 0.25ml. Este mismo resultado se presento entre las dosis 0.25ml y 0.5ml de la bacterina suplementada con adyuvante completo de Freund. Por lo cual se determino que es una diferencia real y poco probable que se deba al azar. Sin embargo, estos resultados eran de esperarse, dado que el empleo de adyuvantes y la diferencia en la concentración del antígeno da por consecuencia títulos de anticuerpos diferentes (Ortiz, 1988;Carpenter, 1982;Bach, 1984).

En el caso de la bacterina comercial y la bacterina sin adyuvante en las dosis de 0.25ml y 0.5ml no se presentaron diferencias estadísticamente significativas, este resultado en el caso de la bacterina sin adyuvante concuerda con los reportes

bibliográficos que dicen que concentraciones poco diferentes de antígenos no ocasionan grandes diferencias en el título de anticuerpos.

Con respecto a el inmunógeno comercial no presento diferencias significativas en ambas dosis, esto se pudo haber debido a la poca diferencia en la concentración de las 2 dosis o a la pobre actividad de adyuvante de su formula la cual contiene una sustancia llamada retigen.

La bacterina suplementada con adyuvante completo de Freund presento el mayor título de anticuerpos y diferencias estadísticamente significativas con respecto a las otras bacterinas. Esto concuerda con la literatura, en la cual se menciona que este adyuvante provoca una respuesta humoral alta (Bach, 1984). Este resultado probablemente se debe a que el adyuvante completo de Freund es muy activo sobre las respuestas timo dependientes, incrementa la dispersión del antígeno, así como un retraso en la destrucción local por los macrófagos.

En trabajos con bacterinas suplementadas con adyuvante completo de Freund se observaron títulos de anticuerpos de 1:4056 en becerros (citado por Acorca, 1989), título elevado para dos aplicaciones ya que en nuestro trabajo se alcanzaron títulos de 1:64 utilizando ratón como modelo experimental; la diferencia puede ser debido a la metodología, sensibilidad de la técnica, o concentración del antígeno utilizado.

En contraparte tenemos que en un trabajo realizado en pollos con vacunas experimentales, la detección de anticuerpos fue mediante la técnica de microaglutinación, donde se detectaron títulos de 1:16 antes del desafío (schlink et al., 1989).

La bacterina suplementada con hidróxido de aluminio no tuvo diferencias significativas con la bacterina comercial en el título de anticuerpos, pero si una gran diferencia en la sobrevivencia ya que alcanzo un porcentaje de un 83.3 el mas alto entre las demás bacterinas, porcentaje muy cercano al reportado por otros trabajos de un 86% de sobrevivencia con vacunas experimentales (Avakian, 1985; Schlink, 1989).

El hidróxido de aluminio aparte de elevar el título de anticuerpos, desarrolla un granuloma local que contiene básicamente macrófagos, el antígeno se libera lentamente a partir de este deposito y una vez pasado el período de sensibilización da una verdadera reacción secundaria (Bach, 1984; Kellner, 1992). Es probable que el hidróxido de aluminio estimule otro tipo de respuesta inmune, como la respuesta celular esto se podría corroborar con trabajos posteriores.

En el título de anticuerpos de la bacterina comercial no hubo diferencia significativa con la bacterina suplementada con hidróxido de aluminio sin embargo se encontró diferencia en la protección brindada que para esta bacterina es de un 66%, inferior a la protección de 83% de la bacterina suplementada con hidróxido de aluminio e igual protección que la bacterina suplementada con adyuvante completo de Freund.

El intento por correlacionar el título de anticuerpos con la protección al desafío se ha puesto de manifiesto en varios trabajos. Se ha ensayado diferentes esquemas de inmunización vacunando a gallinas de 12 y 21 semanas de edad, con bacterinas comerciales y experimentales, después se realizan los desafíos a las 42 y 72 semanas con una cepa patógena de P.multocida. Las

aves inmunizadas mostraron correlación positiva, entre altos títulos de anticuerpos y sobrevivencia (Avakian et al., 1989).

Recientemente se ha popularizado el uso de proteínas de membrana como agentes inmunizantes y no se encontró correlación entre la protección inducida en ratones y títulos de anticuerpos (Abdullahi, et al., 1990). Resultados similares se presentaron en este trabajo en el que la bacterina que mayor título de anticuerpos Presentó (bacterina suplementada con adyuvante completo de Freund) no fue la que mayor protección brindo.

Experimentos con bacterinas han demostrado que la eficacia de los inmunógenos puede depender del tipo de adyuvante usado. Recientemente el uso de vacunas con organismos vivos atenuados han dado resultados prometedores en la prevención de enfermedades causadas por P. multocida., así mismo el estudio y experimentación de algunos extractos celulares de esta bacteria han dado frutos tal es el caso de la toxina inactivada de P. multocida. que en el cerdo ha brindado protecciones cercanas al 100% en el combate de la rinitis atrófica (Mosier et al., 1989).

Las proteínas de membrana externa, la toxina de P. multocida., así como las vacunas con organismos atenuados o modificados químicamente, deberán de ser investigados a fondo, para incorporar algunos de estos antígenos en futuras vacunas que ayuden a proteger a algunos animales domésticos contra la pasteurelisis.

IX. CONCLUSIONES.

1. La administración de adyuvantes a las bacterinas experimentales de Pasteurella multocida aumentó la respuesta humoral con respecto a la bacterina sin adyuvante.
2. La bacterina suplementada con adyuvante completo de Freund registro los títulos de anticuerpos mas altos pero no brindo la mayor protección.
3. La administración de adyuvantes a las bacterinas experimentales produjo títulos de anticuerpos iguales y/o mayores a la bacterina comercial.
4. La protección brindada por la bacterina comercial solo fue superada por la bacterina suplementada con hidróxido de aluminio.

Tabla No. 3

RESULTADO DE LAS PRUEBAS SEROLOGICAS (TITULO DE ANTICUERPOS) EN LAS CUATRO BACTERINAS Y SUS RESPECTIVAS DOSIS.

VACUNAS								
	H. de A.		A.C.F:		SIN/A.		COMERCIAL	
DOSIS ml	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5
TITULOS	1:16	1:32	1:16	1:32	1:2	1:8	1:16	1:16
	1:16	1:32	1:16	1:32	1:8	1:8	1:16	1:16
	1:16	1:32	1:16	1:64	1:8	1:8	1:32	1:16
	1:8	1:32	1:16	1:32	1:16	1:16	1:4	1:32
	1:16	1:16	1:32	1:64	1:8	1:8	1:16	1:16
	1:32	1:16	1:16	1:32	1:8	1:16	1:8	1:16
	1:16	1:16	1:16	1:64	1:8	1:8	1:16	1:32
	1:16	1:32	1:32	1:32	1:16	1:8	1:16	1:32
	1:16	1:16	1:16	1:32	1:8	1:8	1:32	1:16

H.de A.= Bacterina suplementada con Hidróxido de Aluminio.

A.C.F.= Bacterina suplementada con Adyuvante Completo de Freund.

SIN/A.= Bacterina sin adyuvante.

COMERCIAL.= Bacterina comercial.

Tabla No. 4

ANALISIS ESTADISTICO DE LAS BACTERINAS CON SUS RESPECTIVAS DOSIS MEDIANTE LA PRUEBA U DE MAN WITNEY CON UN ALFA DE 0.05.

VACUNAS									
		H. de A.		A.C.F.		SIN/A.		COM.	
DOSIS ml		0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	0.5
RESULTADO		S		S		NS		NS	

H. de A. = Bacterina suplementada con Hidróxido de Aluminio.

A.C.F.= Bacterina suplementada con ady. completo de Freund.

SIN/A.= Bacterina sin adyuvante.

COM.= Bacterina comercial.

S= Diferencia estadísticamente significativa.

NS= Diferencia estadísticamente no significativa.

Tabla No. 5

ANALISIS ESTADISTICO COMPARANDO TODAS LAS BACTERINAS MEDIANTE LA PRUEBA KRUS
KAL WALLIS CON UN ALFA DE 0.05.

VACUNAS				
	H. de A.	A.C.F.	SIN/A	COM.
H. de A.	-	S	S	NS
A.C.F.	S	-	S	S
SIN/A	S	S	-	S
COM.	NS	S	S	-

H. de A. = Bacterina suplementada con Hidróxido de Aluminio.

A.C.F.= Bacterina suplementada con ady. completo de Freund.

SIN/A.= Bacterina sin adyuvante.

COM.= Bacterina comercial.

S= Diferencia estadísticamente significativa.

NS= Diferencia estadísticamente no significativa.

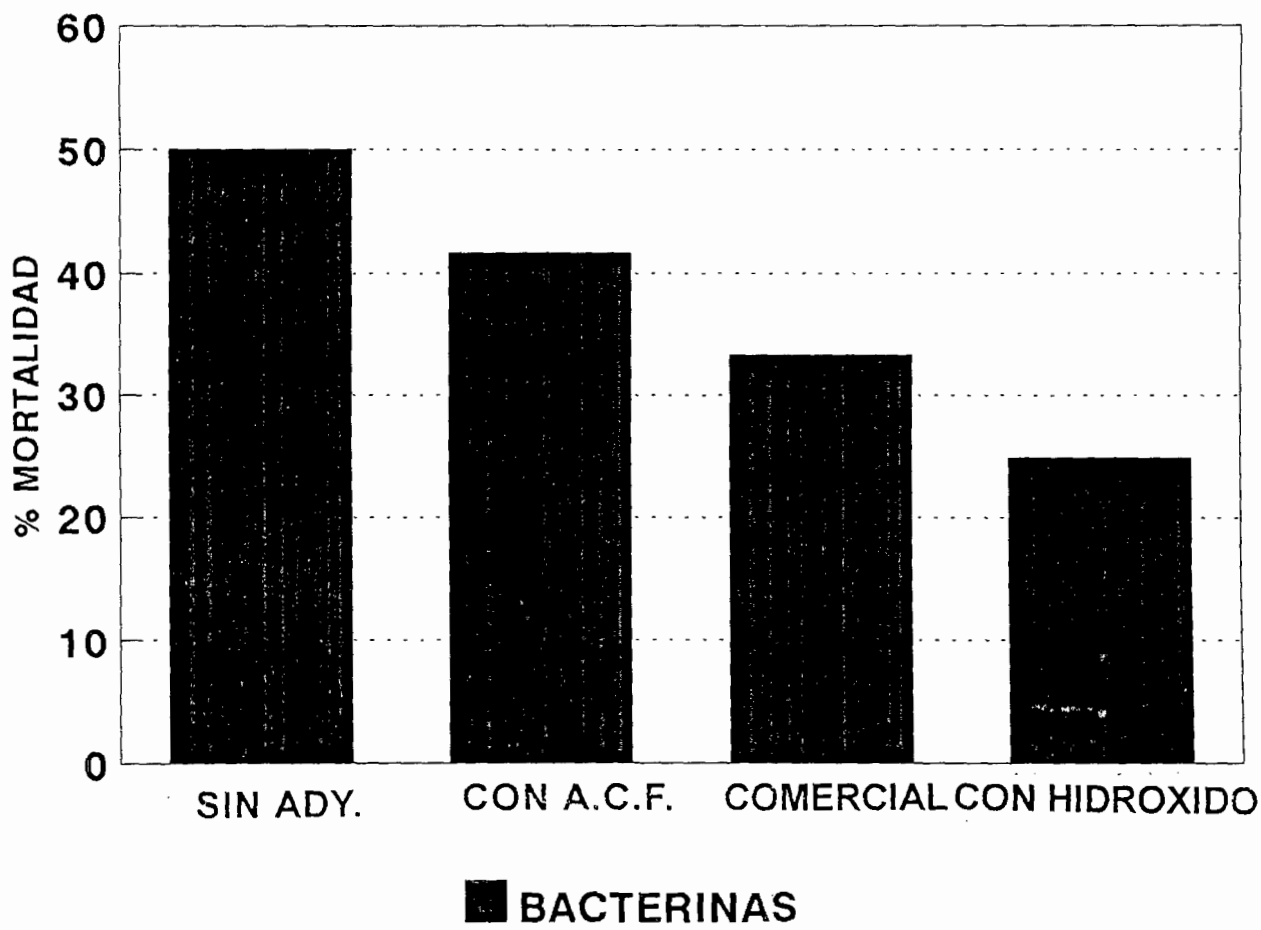


FIG.1 PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN LOS RATONES CON LAS DIFERENTES BACTERINAS DOSIS 0.25 ML.

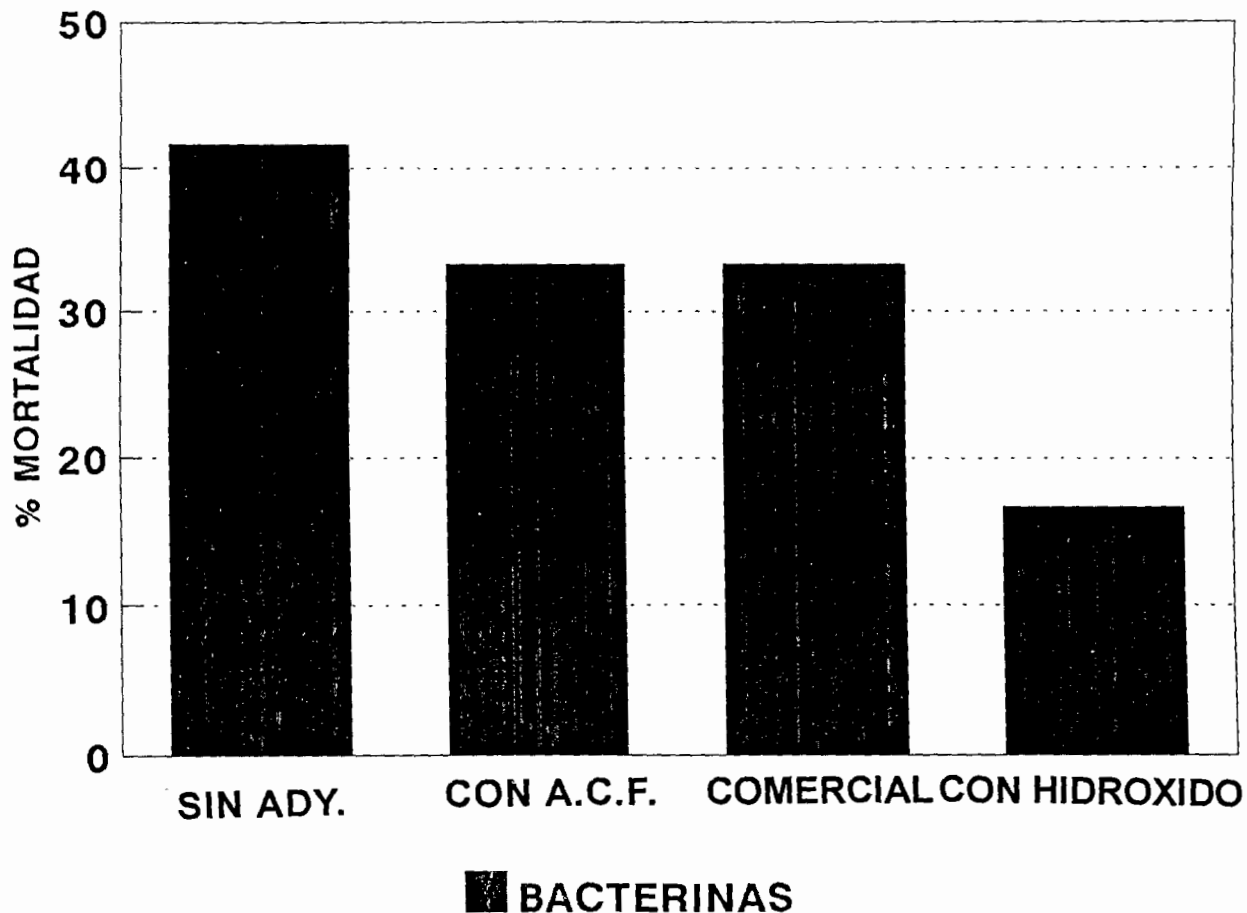


FIG. 2. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LOS RATONES CON LAS DIFERENTES BACTERINAS DOSIS 0.5 ML.

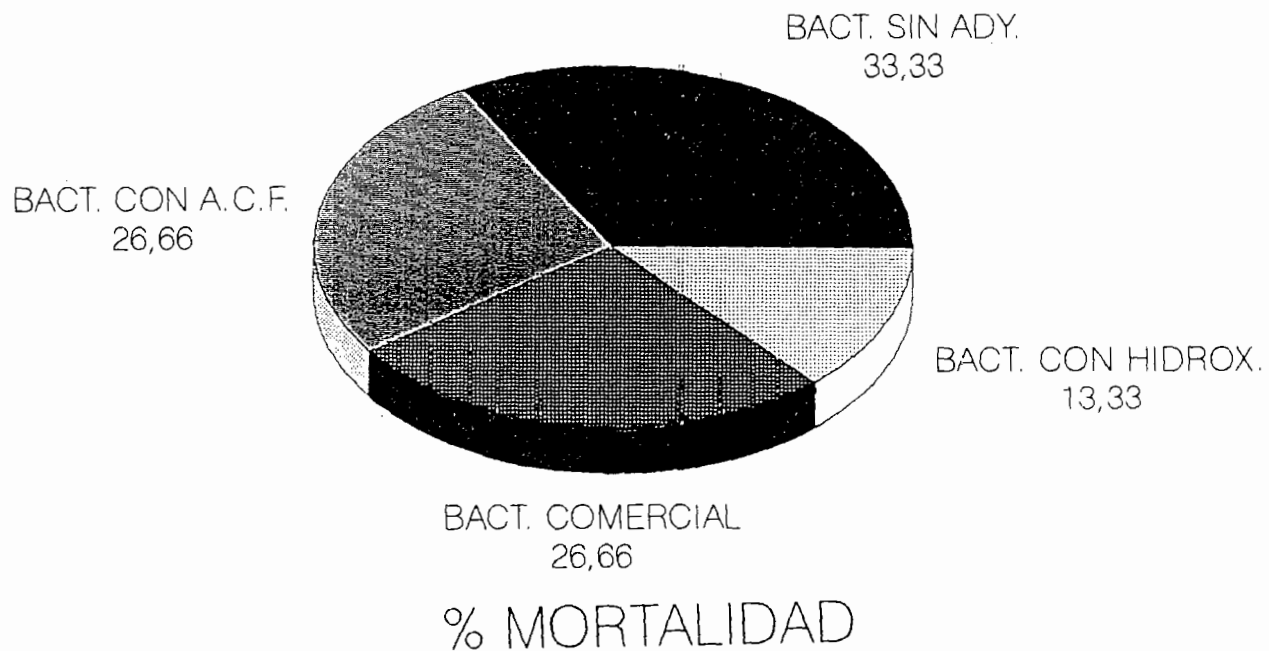


FIG. 3. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LA POBLACION DE RATONES DOSIS 0.5 ML.

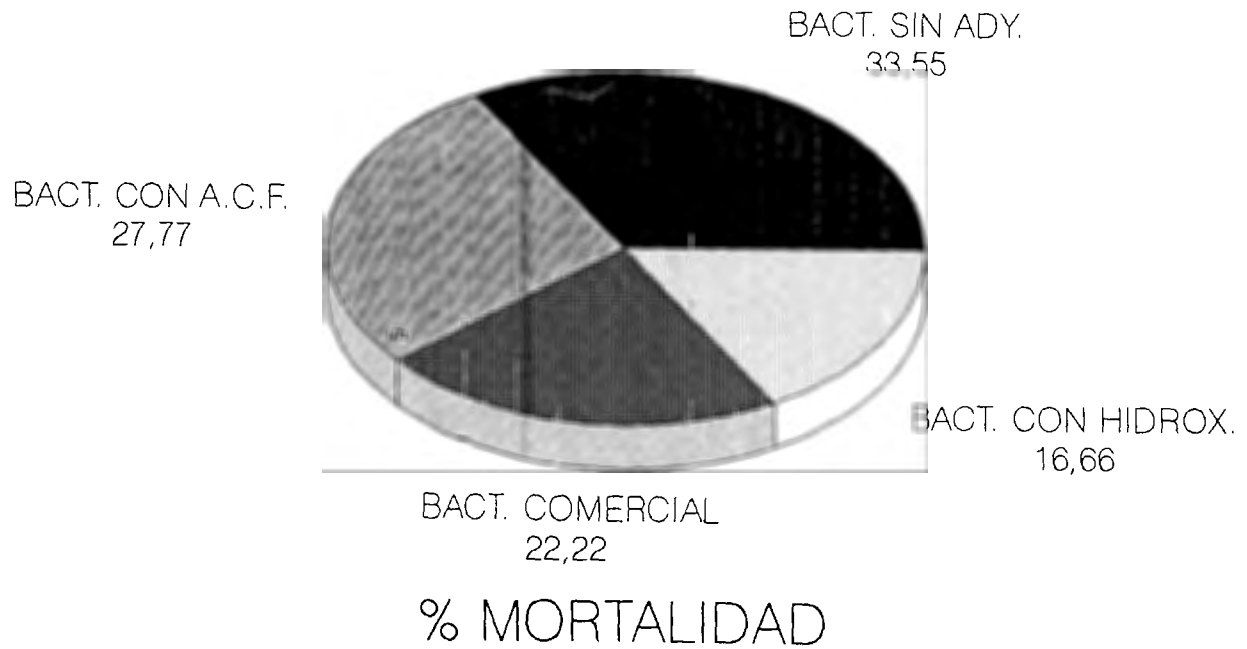


FIG. 4. PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LA POBLACION DE RATONES DOSIS 0.25 ML.

X. BIBLIOGRAFIA.

- Abdullahi, M.Z., Gilmour, N.J.L., 1990. Outer membrane proteins of bovine strains of Pasteurella multocida type A and their doubtful role as protective antigens. J. Med. Microbiol., 32: 55-61.
- Acosta, E.M., 1989. Enfermedades producidas por Pasteurella con especial referencia en enfermedades respiratorias en Bovinos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad de Guadalajara. México.
- Avakian, A.P., Dick, J.W., Dirieux, W.T. and Henry, C.W., 1986. Comparison of various antigens and their ability to detect protective antibodies against Pasteurella multocida using enzymelinked immunosorbent assay. Avian dis., 30: 527-535.
- Avakian, A.P., Dick, J.W. and Dirieux, W.T., 1989. Fowl cholera immunity induced by various vaccines in broiler minibreeder chickens determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis., 33:97- 102.
- Bach, J.F., 1984. Inmunología. LIMUSA. Segunda ed. México. 489 pp.
- Carpenter, P.L., 1984. Inmunología y Serología. PRENSA MEDICA MEXICANA. Segunda ed. México. 518 pp.
- Carter, G.R., 1984. Genus I. Pasteurella Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Vol 1., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 552-557.
- Carter, G.R. and DeAlwis, M.C.L., 1989. Hemorrhagic septicemia. In: C. Adlam and J.M. Tutter (Editors), Pasteurella and Pasteurellosis. Academic Press, London, pp. 132-160.
- Castañeda, V.H., 1987. Vergleichende Untersuchungen an Pasteurella multocida und Pasteurella haemolytica-Kulturen unter besonderer Berücksichtigung mutmaßlicher Pathogenitätsfaktoren. Tesis de doctorado. Universidad Gießen. Alemania Federal.
- Castañeda, V.H., 1989. Importancia de bacterias patógenas aisladas de pulmones neumónicos bovinos. Ciencia Animal., 6:18-22.
- Chanter, N., 1990. Molecular aspects of the virulence of Pasteurella multocida. Can. J. Vet. Res., 54; suppl. :S45- S47.
- Confer, A.W., 1993. Immunogens of Pasteurella. Veterinary Microbiology., 37: 353-368.

- Dali, C., Foged, N.T., Ffradsen, P.L., Nielsen, M.H. and Elling, F., 1991. Ultrastructural localization of the Pasteurella multocida toxin in a toxin-producing strain. J. Gen. Microbiol., 137: 1067-1071.
- Dawkins, H.J., Ramdani, Johnson, R.B. and Spencer, T.L., 1991. Haemorrhagic septicaemia: Correlation of Vaccinal antibody responses in mice with protection against Pasteurella multocida strain M1404. Vet. Microbiol., 27: 309-326.
- Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Olsen, I. and Fraser, G.J., 1992. Phylogeny of 54 representative strains of species in the family Pasteurellaceae as determined by comparison of 16S rRNA sequences. J. Bacteriol., 174: 2002-2013.
- Dunworth, D.C., 1985. The respiratory system. In: K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer (Editors), Pathology of Domestic Animals, 3rd Ed. Vol.2, Academic Press, Orlando, pp. 488-489, 528.
- Foged, N.T., 1988. quantitation and purification of the Pasteurella multocida toxin by using monoclonal antibodies. Infect. Immun., 56: 1901-1906.
- Foged, N.T., Nielsen, J.P. and Jorsal, S.E., 1989. Protection against progressive atrophic rhinitis by vaccination with Pasteurella multocida toxin purified by monoclonal antibodies. Vet. Rec., 125: 71
- Frank, G.H., 1989. Pasteurellosis of cattle. In: C. Adlam and J.M. Rutter (Editors), Pasteurella and Pasteurellosis. Academic press, London, pp. 197-222.
- García, H.E., Trigo, T.F., Sanchez-Mejorada, P., Aguilar, R.F., 1988. Serotipos de Pasteurella multocida en bovinos productores de carne en México. Veterinaria México, 19:199- 204.
- Heddleston, K.L., Gallagher, J.E. Rebers, P.A., 1972. Fowl Cholera: gel diffusion precipitin test of serotyping Pasteurella multocida from avian species. Avian Dis., 16:925-396.
- Kellner, J., Erhard, M., Schraner, I., and Losch, U., 1992. The influence of various adjuvants on antibody synthesis following immunization with a haptén. Biol. Chem. Hoppe seyler. 373:51-55.

- Lee, M.D., Wooley, R.E., Brown, J., and Glisson, J.R., 1991. A survey of potential virulence markers from avian strains of Pasteurella multocida. Vet. Microbiol., 26: 213-255.
- Lu, Y.S., Afendis, S.J. and Pakes, S.P., 1988. Identification of immunogenic outer membrane proteins of Pasteurella multocida. 3:A in rabbits. Infect. Immun., 56:1532-1537.
- Lu, Y.S., Lai, W.C., Pakes, S.P. and Nie, L.C., 1991. A monoclonal antibody against a Pasteurella multocida outer membrane protein protects rabbits and mice against pasteurellosis. Infect. Immun., 59: 172-180.
- Lu, Y.W., Agila, H.N., Lai, W.C. and Pakes S.P., 1991. Antibodies to outer membrane proteins but not to lipopolysaccharide inhibit pulmonary proliferation of Pasteurella multocida in mice. Infect. Immun., 59: 1470-1475.
- Lugtenberg, B., Van Boxtel, R. and de Jong, M., 1984. Atrophic rhinitis in swine: correlation of Pasteurella multocida pathogenicity with membrane protein and lipopolysaccharide patterns. Infect. Immun., 46: 54.
- Mosier, D.A., Simons, K.R., Confer, A.W., Panciera, R.J., Clinkenbeard, K.D., 1990. Pasteurella haemolytica antigens associated with resistance to pneumonia Pasteurellosis. Infect. Immun. 57:711-716.
- Mutters, R., Ihm, P., Pohl, S., Frederiksen, W. and Mannheim, W., 1985. 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., 35:309-312.
- Nielsen, J.P., Foged, N.T., Sorensen, V., Barfod, K., Bording, A and Petersen, S.K., 1991. Vaccination against progressive atrophic rhinitis with a recombinant Pasteurella multocida toxin derivative. Can. J. Vet. Res., 55:128-138.

- Olsen, I., Rosseland, S.K., Thorsrud, A.K. and Jellum, E., 1987. Diferentiation between Haemophilus Paraphrophilus, H.influenzae, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Pasteurella multocida, P. haemolytica, and P. ureae by high resolution two-dimensional protein electrophoresis. Electrophoresis, 8: 532:535.
- Ortiz, O.L., 1987. Inmunología. INTERAMERICANA. Primera ed. México. 251 pp.
- Penn, C.W. and Nagy, L.K., 1976. Isolation of a protective, non- t o x i c capsular antigen from Pasteurella multocida, types B and E. Res. Vet. Sci., 20:90-96.
- Petersen, S.K. and Foged, N.T., 1989. Cloning and expression of the Pasteurella multocida toxin gene and evidence for a transcriptional repressor, TxaR. Mol. Microbiol., 4:821-830.
- Pijoan, C., 1986. Effect of Pasteurella multocida and Haemophilus Pleuropneumoniae toxin on swine alveolar macrophages. Vet. Immunol. Immunopathol., 13:141-149.
- Pohl, J. 1984. Pasteurellaceae Ergey's manual of determinative Bacteriology. Williams and Wilkins company. Eight Edition, 550-552.
- Ramdani, and Adler, B., 1991. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide (LPS) antigens of Pasteurella multocida and the ~~rx~~ of the LPS in inmunity. Vet. Microbiol., 26:335-347.
- Rhoades, K.R. and Rimler, R.B., 1989. Fowl colera. In: C. Adlam and J.M: Ritt (Editors), Pasteurella and Pasteurellosis. Academic press, London, pp. 95-113.
- Rimler, R.B., 1984. Comparisons of serologic responses of white Leghorn and New Hampshire chickens to purified lipopolysaccharide of Pasteurella multocida. Avian Dis., 28: 984-989.
- Rimler, R.B. and Philips, M., 1986. Fowl cholera: Protection against Pasteurella multocida by ribosome-Lipopolysaccharide vaccine. Avian Dis., 30:400-415.
- Rimler, R.B. and Rhoades, K.R., 1989. Solubilization of membrane- asociated cross-protection factor(s) of Pasteurella multocida. Avian Dis., 33:258-263.
- Riott, M.I., Delves, P.T., 1992. Encyclopedia of immunology. Academic press. Sn. Diego.

- Sclink, G.T. and Olson, L.D., 1989. Relationship between anti-Pasteurella multocida antibody titer after challenge. Avian Dis., 33:506-510.
- Turston, J.R., Rimler, R.B., Ackerman, M.R., Cheville, N.F. and Sacks, J.M., 1991. Immunity induced in rats vaccinated with toxoid prepared from heat-labile toxin produced by Pasteurella multocida serogrup D. Vet. Microbiol., 27:169-174.
- Truscott, W.M. and Hirsh, D.C., 1988. Demostration of an outer membrane protein with antiphagocytic activity fromm Pasteurella multocida o f avian origin. Infect immun., 56:1538-1544.
- Tsuji, M. and Matsumoto, M., 1988. Evaluation of relationship among three purified antigen from Pasteurella multocida strain P-1059 and of their protective capacities in turkeys. Am. J. Vet. Ras., 49:1516-1521.
- Tsuji, M. and Matsumoto, M., 1989. Pathogenesis of fowl cholera: influence of encapsulated on the fateof Pasteurella multocida after intraveous inoculation into turkeys. Avian Dis., 33:238-247.
- Wijewardana, T.G., Wilson, C.F., Gilmour, N.J. and Poxton, I.R., 1990. Production of mouse monoclonal antibodies to type A and the immulogical properties of a protective anti-Polysaccharide antibody. J. Med. Microbiol., 33:217-222.