

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA Y ANTICITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* EN SUERO DE BOVINOS Y CAPRINOS^a

HECTOR SANCHEZ MEJORADA P.^b

J. FRANCISCO MORALES A.^b

ORLANDO ZEPEDA MONTES DE O.^b

GUADALUPE ESPINO R.^b

FRANCISCO J. TRIGO T.^b

RESUMEN

Determinación de la presencia de anticuerpos anticitotoxina en suero de bovinos, ovinos y caprinos; y de la seroprevalencia de los diversos serotipos de *Pasteurella haemolytica*. Se recolectaron 320 sueros de bovinos de Tizayuca, Hgo., Estado de México y del Distrito Federal; 1167 sueros de ovinos criollos del Distrito Federal e importados de E.U.A. y 977 sueros de caprinos de varios estados de México, de diferente raza y función zootécnica. Los títulos de anticuerpos anticitotoxina se determinaron mediante un ensayo simple visual, con utilización de leucocitos de sangre periférica de bovino como células "blanco" y los anticuerpos anticápsula por hemoaglutinación indirecta por medio de una batería con los 12 serotipos de referencia de *P. haemolytica*.

Para ambas especies existió una variedad amplia de anticuerpos contra los diversos serotipos de *P. haemolytica*, destacaron el A5, A6, A7, y A8. En cabras los serotipos más comunes fueron el A6, A2 y A1. Se demostró la importancia de la inmunogenicidad de la citotoxina debido al hallazgo de un porcentaje alto de animales con títulos de anticuerpos específicos para dicha citotoxina.

Las determinaciones obtenidas colaboran a la profilaxis de la enfermedad causada por esta bacteria.

a. Recibido para su publicación el 29 de octubre de 1987.

b. Proyecto Sistema de Referencia en Diagnóstico Veterinario.

Sector Pecuario INIFAP-SARH, km. 15.5 Carr. Méx.-Tol. México, D.F., 05110.

Téc. Pec. Méx. Vol. 26, No. 2 (1988)

INTRODUCCION

Los problemas respiratorios de rumiantes son considerados importantes debido a las pérdidas económicas que ocasionan¹⁷.

Entre las diferentes causas de mortalidad en rumiantes, las neumonías representan una de las más importantes a nivel mundial¹. Estudios realizados en México demuestran que alrededor del 25% de los pulmones de ovinos sacrificados en rastro presentan lesiones neumónicas³.

En otra investigación realizada en el rastro de Ferrería de la Cd. de México, se obtuvieron muestras de pulmones de becerros y se demostró que la prevalencia de neumonías fue del 8.7%; las neumonías exudativas fueron las más importantes, además, existió una relación estadística significativa entre el aislamiento de bacterias del género *Pasteurella* con la presencia de neumonía exudativa²⁶.

Se han reconocido 12 serotipos de *P. haemolytica* por hemoaglutinación indirecta con antígenos capsulares superficiales, también se han establecido dos biotipos: el A y el T, debido a las características morfológicas y bioquímicas de las cepas de *P. haemolytica*; por ejemplo, el biotipo T fermenta la trealosa y el biotipo A la arabinosa⁵.

Los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12 corresponden al biotipo A que produce neumonía y septicemia en corderos y neumonías en borregos adultos y los serotipos 3, 4 y 10 al biotipo T causante de septicemia en adultos²³.

Recién se han descubierto otros tres serotipos el A13, A14 y A15 pero son considerados de poca importancia debido a su baja patogenicidad²³.

También se ha demostrado que *P. haemolytica* produce una sustancia soluble en fase logarítmica de crecimiento que es tóxica para los leucocitos, considerada como factor de virulencia y patogenicidad^{4, 16, 20, 27} sin embargo, no hay variaciones significativas de su producción entre serotipos y biotipos²³.

En México es escasa la información acerca de la prevalencia de *P. haemolytica* y sus serotipos en bovinos, ovinos y caprinos. El conocimiento de los serotipos predominantes de *P. haemolytica* en México y el determinar la importancia de la respuesta inmunoló-

gica a la citotoxina puede ser importante para la profilaxis de la enfermedad respiratoria causada por esta bacteria. En la actualidad el uso de bacterinas contra *P. haemolytica* en los animales de México se lleva a cabo en un número reducido de explotaciones, sin saber con certeza los serotipos que están contenidos en las bacterinas comerciales; por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de anticuerpos anticitotoxina y anticápsula de los diversos serotipos de *P. haemolytica* en suero de bovinos, ovinos y caprinos.

MATERIAL Y METODOS

Animales. De un banco de sueros, se evaluaron 320 sueros de bovinos de los cuales 100 provenían de terneros del rancho Cuatro Milpas en el Edo. de México; 192 de bovinos adultos de Tizayuca, Hgo., y 28 de bovinos adultos propiedad de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica (FMVZ) de la UNAM. También 847 sueros de ovinos criollos de la zona del Ajusco en el Distrito Federal; 249 de ovinos adultos importados de E.U.A. de razas definidas localizadas en el Centro Ovinario (COPEA) y 71 corderos de esta misma explotación; además 977 sueros de caprinos de Coahuila, Chihuahua, Guanajuato, Guerrero, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Querétaro y Sonora; entre los cuales se encontraban animales importados y criollos, de diferente raza y función zootécnica.

PREPARACION DE CITOTOXINA DE *P. haemolytica*. La citotoxina se obtuvo de *P. haemolytica* serotipo 1, biotipo A, aislada de un pulmón de becerro Holstein, sacrificado en el rancho de Tlalnepantla, Edo. de México. La citotoxina se obtuvo durante la fase logarítmica de crecimiento, para lo cual se incubó *P. haemolytica* durante 18 h a 37°C en agar sangre y luego en caldo de infusión cerebro-corazón durante 4.5 h en movimiento constante. Al finalizar este período que corresponde al inicio de la fase logarítmica, se centrifugó a 3000 G por 20 min. en una centrífuga con unidad refrigerante. El sobrenadante fue decantado y el paquete de bacterias resuspendido en medio RPMI-1640 suplementado con 7% de suero fetal de bovino e incubado por una hora a 37°C en movimiento constante (producción alta de citotoxina). El cultivo se centrifugó a 3500 G durante 20 min. y el sobrenadante rico en citotoxina fue esterilizado por filtración en membrana de 0.22 µm, envasado en viales y liofilizado de acuerdo al método descrito por Gentry, Confer y Kreps¹⁴.

SUSPENSION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE BOVINO PARA LA PRUEBA DE CITOTOXICIDAD. Se utilizó un bovino sano al análisis clínico, el cual fue sangrado por punción en la vena yugular con equipo vacutainer heparinizado. Los eritrocitos fueron lisados por choque hipotónico con agua destilada; la lisis se detuvo después de 15 seg. al

agregar SSAF (solución salina amortiguada de fosfatos) pH 7.2, concentrada 2X. La suspensión se centrifugó a 1500 G por 10 min, el sobrenadante fue decantado y al paquete celular se le hizo otra lisis hipotónica. Las células fueron lavadas una vez por centrifugación con SSAF, mientras que, la concentración de células por ml se determinó por conteo directo en cámara cuantaglobulos de Neubauer, la concentración se ajustó 1×10^7 células por ml en RPMI-1640 de acuerdo a la técnica descrita por Gentry, Confer y Kreps¹⁴.

PREPARACION DE ANTIGENO SOLUBLE DE *P. haemolytica* y SENSIBILIZACION DE ERITROCITOS PARA LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA. Se utilizaron 12 serotipos (cepas) de referencia de *P. haemolytica*. Cada serotipo a probar fue crecido en caldo infusión cerebro-corazón por 18 h a 37°C en agitación constante, al término de los cuales se realizó una tinción de Gram para verificar la presencia de cápsula, así como la de posibles contaminantes; después el cultivo fue calentado a 56°C durante 30 min. Enseguida se agregaron eritrocitos de bovino (EB), lavados antes, tres veces con SSAF, de tal forma que quedó una suspensión de EB al 2%. Estos se incubaron durante una hora en Baño María a 37°C; al finalizar este período la mezcla fue lavada tres veces por centrifugación con SSAF y por último el sobrenadante fue eliminado y el paquete de EB

resuspendido al 0.5% con SSAF con formaldehído al 0.3% de acuerdo al método descrito por Biberstein, Gills y Knight⁶.

ENSAYO SIMPLE VISUAL PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE *P. haemolytica*. Esta prueba se fundamenta en la capacidad del suero (título de anticuerpos) para neutralizar la citotoxina de *P. haemolytica* con utilización como células "blanco" de leucocitos de sangre periférica de bovino. Se utilizó la prueba descrita por Gentry, Confer y Kreps¹⁴ que consistió en realizar diluciones dobles del suero con SSAF en una placa de microtitulación de 96 pozos con fondo plano. Una vez practicada la dilución del suero se agregó 100 ML de la citotoxina de *P. haemolytica* y se incubó 10 min. a temperatura ambiente. Enseguida se agregó la suspensión de leucocitos y se incubó una hora a 37°C; al finalizar este período las placas fueron centrifugadas a 500 G por 5 min. A cada pozo se le agregaron 100 ML de formalina amortiguada al 10%. Las microplacas se incubaron 30 min. a temperatura ambiente, se tiñeron con 100 ML de cristal violeta al 1% durante 5 min. y fueron lavadas con agua de la llave. La observación de un fondo azul en los pozos indicó la presencia de células teñidas y por lo tanto la existencia de anticuerpos que fueron capaces de neutralizar la citotoxina de *P. haemolytica*. Un fondo claro indicó ausencia de anticuerpos por lo que la

citotoxina quedó libre y al ejercer su efecto sobre las células "blanco" causó lisis.

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE *P. haemolytica*. Se realizaron diluciones dobles del suero con SSAF en placas de microtitulación de fondo en "U" de 96 pozos, se le adicionaron EB sensibilizados con antígeno soluble de *P. haemolytica* del serotipo a probar a una concentración de 0.5% y se incubaron por 2h a 37°C. Al finalizar este período se realizó una primera lectura y se incubaron las placas durante toda la noche a temperatura ambiente para después realizar la segunda lectura de acuerdo a la técnica descrita por Frank¹⁰. La prueba de hemoaglutinación indirecta se llevó a cabo con los serotipos homólogos y heterólogos de *P. haemolytica* obtenidos por inoculación en conejos según la técnica descrita por Biberstein⁶ para observar posibles reacciones cruzadas entre serotipos y así poder eliminar falsos positivos a determinadas diluciones. Un suero se consideró positivo cuando mostró un título de 1:16.

ANALISIS ESTADISTICO. Se realizó un análisis de correlación entre los títulos de anticuerpos anticápsula de los diversos serotipos y los títulos de anticuerpos anticitotoxina; los títulos anticápsula fueron la variable independiente y los anticitotoxina la dependiente. También se realizó una prueba de X² para determinar si exis-

CUADRO 1

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

P. haemolytica serotipos	A N T I S U E R O											
	PhA1	PhA2	PhT3	PhT4	PhA5	PhA6	PhA7	PhA8	PhA9	PhT10	PhA11	PhA12
PhA1	+++	----	----	----	1:2	1:2	----	----	----	----	----	----
PhA2		++++	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
PhT3	1:8	----	++++	1:4	----	----	----	----	----	1:8	----	----
PhT4	1:32	1:16	1:128	++++	1:4	1:8	1:16	----	1:4	1:8	1:2	1:4
PhA5	1:4	----	----	----	++++	----	----	1:2	----	----	----	----
PhA6	1:2	----	----	----	----	++++	----	1:4	----	----	----	----
PhA7	----	----	----	----	----	----	+++	1:8	----	----	----	----
PhA8	----	----	----	----	----	----	----	+++	----	----	----	----
PhA9	----	----	----	----	----	----	----	----	+++	----	----	----
PhT10	1:4	1:4	1:32	1:4	1:4	1:4	1:8	----	1:4	++++	1:4	1:2
PhA11	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	+++	----
PhA12	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	+++

*Se utilizó el método descrito por Frank (1980).

CUADRO 2

SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA Y ANTICITOTOXINA DE Pasteurella haemolytica (Ph) EN BOVINOS POR MEDIO DE LA PRUEBA DE HEMOAGLUTINACION INDIRECTA.

ANIMALES (No)	CITOTOXINA	S E R O T I P O D E <u>Pasteurella haemolytica</u>											
		PhA1	PhA2	PhT3	PhT4	PhA5	PhA6	PhA7	PhA8	PhA9	PhT10	PhA11	PhA12
TERNEROS (100)	57 ^a	11	11	0	0	33	12	49	29	0	0	29	1
ENO. MEX.	(57) ^b	(11)	(11)	(0)	(0)	(33)	(12)	(49)	(29)	(0)	(0)	(29)	(1)
BOVINOS (192)	146	74	90	12	0	105	16	14	66	3	0	56	6
TIZAYUCA Hgo.	(76)	(39)	(47)	(6)	(0)	(55)	(8)	(8)	(34)	(2)	(0)	(29)	(3)
BOVINOS (28)	27	20	10	3	1	24	21	7	11	0	0	15	12
FMVZ UNAM	(96)	(71)	(36)	(11)	(4)	(86)	(75)	(25)	(39)	(0)	(0)	(54)	(43)

*Se consideró a un animal como positivo a aquel que mostró un título de anticuerpos \geq 1:16.

a. No. de sueros positivos.

b. (porcentaje).

CUADRO 3

SEROPREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTICAPSULA DE *Pasteurella haemolytica* (Ph)
EN OVINOS POR HEMOAGLUTINACION INDIRECTA.

NUMERO DE ANIMALES	SEROTIPOS DE <i>Pasteurella haemolytica</i> *											
	PhA1	PhA2	PhT3	PhT4	PhA5	PhA6	PhA7	PhA8	PhA9	PhT10	PhA11	PhA12
847												
OVINOS CRIOLLOS	282 ^a	292	20	93	287	359	484	380	68	17	131	29
D.F.	(33) ^b	(34)	(2)	(10)	(34)	(42)	(57)	(45)	(8)	(20)	(15)	(3)
249												
OVINOS ADULTOS	68	97	8	3	116	145	148	144	8	2	41	1
IMPORTADOS (COPEA)	(27)	(39)	(3)	(1)	(47)	(59)	(59)	(58)	(3)	(1)	(16)	(1)
71												
CORDEROS (COPEA)	66	0	0	0	0	2	0	6	0	0	1	0
	(93)					(3)		(8.4)			(1.4)	

*Se consideró a un animal como positivo a aquel que mostró un título de anticuerpos $\geq 1:16$. Algunos animales reaccionaron con más de un serotipo.

a. número de sueros positivos

b. (porcentaje).

tía diferencia estadística entre los títulos anticítotoxina y anticápsula de animales jóvenes y adultos.

sueros positivos aquellos que tuvieran títulos iguales o superiores a 1:16.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se observan los resultados de las pruebas de antigenicidad cruzada de los antisueros de conejo contra los serotipos homólogos y heterólogos de *P. haemolytica*. Se puede notar que los serotipos T4 y T10 tienen antígenos comunes con casi todos los serotipos de *P. haemolytica*, con títulos hasta de 1:128 para el caso de T4 y T3. Debido a que la mayoría de los títulos de reacción cruzada fueron inferiores a 1:16, en la prueba de hemoaglutinación se tomaron como

En el Cuadro 2 se puede observar que el serotipo predominante de *P. haemolytica* en los terneros del Estado de México fue el A7 con 49% de seropositividad, seguido del A5 con 33%, el A8 y A11 con 29%. De estos animales el 57% presentó títulos de anticuerpos anticítotoxina. En los bovinos de Tizayuca, Hgo., se encontró que el serotipo más común fue el A5 con 55% de animales positivos, seguido del A2 con 47% y el A1 con el 39%. El 76% de los sueros presentaron anticuerpos anticítotoxina. En los bovinos de la FMVZ los serotipos predominantes fueron el A5 con 86%, el

PORCENTAJE DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA DE *Pasteurella haemolytica* (Ph) EN SUERO DE OVINOS.*

No. DE ANIMALES	NEGATIVOS	TÍTULO							
		1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:156
71									
CORDEROS (COPEA)	10%	24%	36%	22%	6%	2%	0%	0%	0%
249									
ADULTOS IMPORTADOS (COPEA)	13%	2%	3%	9%	14%	24%	21%	7%	7%
817									
ADULTOS CRIOLLOS	1%	1%	6%	21%	29%	26%	9%	3%	4%

*Se utilizó la técnica descrita por Gentry, Confer y Kreps (1985).

A6 con 75% y el A1 con 71%; se encontraron anticuerpos con anticitotoxina en el 96% de los animales. Asimismo, fue evidente que los títulos de anticuerpos anticitotoxina se incrementaron conforme a la edad de los animales, y el porcentaje de seropositividad, mostrando diferencias significativas ($P < 0.05$) entre animales jóvenes y animales adultos. En el Cuadro 3 se resumen los resultados obtenidos para los ovinos. Los serotipos de *P. haemolytica* más comunes en los ovinos criollos e importados, fueron el A6, A7 y A8. En los ovinos importados la seropositividad para esos serotipos fue de 59, 59, y 58% en forma respectiva.

En los corderos el serotipo más común fue el A1 con 93% de sueros positivos.

En los ovinos importados y criollos con títulos positivos a anticuerpos anticitotoxina, el mayor porcentaje de sueros estuvo comprendido entre 1:32 y 1:64 y 1:16 y 1:32 en forma respectiva; en tanto el título más alto encontrado en los corderos de COPEA fue de 1:32 (Cuadro 4). Los corderos de COPEA tuvieron títulos anticápsula y anticitotoxina más bajos que los adultos, y mostraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Los serotipos predominantes en cabras fueron el A6 con 49.1% de seroposi-

CUADRO 5

DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTICITOTOXINA Y ANTICAPSULA DE *Pasteurella haemolytica* (Ph) EN SUERO DE CABRAS DE VARIOS ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA.*

ESTADO	No. TOTAL DE SUEROS	CITOTOXINA	SEROTIPOS DE <i>Pasteurella haemolytica</i> **												
			PhA1	PhA2	PhT3	PhT4	PhA5	PhA6	PhA7	PhA8	PhA9	PhT10	PhA11	PhA12	
CHIHUAHUA	239	180 ^a (79) ^b	122 (51)	149 (62)	73 (31)	15 (6)	65 (27)	197 (82)	55 (23)	29 (12)	18 (8)	23 (9)	96 (40)	9 (4)	
COAHUILA	193	177 (92)	157 (81)	133 (69)	49 (25)	10 (5)	64 (33)	107 (55)	26 (19)	14 (7)	31 (16)	2 (4)	31 (16)	1 (0.5)	
GUANAJUATO	86	85 (99)	18 (20)	49 (57)	7 (8)	2 (2)	20 (23)	33 (38)	15 (17)	29 (33)	6 (7)	5 (6)	22 (26)	6 (7)	
GUERRERO	19	18 (94)	1 (5)	0	0	0	3 (16)	0	1 (5)	0	0	0	6 (32)	0	
MEXICO	223	208 (93)	54 (24)	77 (35)	30 (13)	10 (4)	59 (26)	49 (22)	29 (13)	30 (13)	20 (9)	1 (0.4)	37 (17)	0	
MICHOACAN	51	50 (98)	4 (8)	18 (35)	15 (29)	6 (12)	27 (53)	40 (78)	7 (14)	3 (6)	13 (25)	8 (16)	17 (36)	0	
N. LEON	59	39 (66)	4 (7)	8 (14)	8 (14)	3 (5)	7 (12)	5 (8)	7 (12)	4 (7)	2 (3)	2 (3)	11 (19)	0	
QUERETARO	22	22 (100)	6 (27)	11 (50)	4 (18)	0	5 (23)	8 (36)	2 (9)	5 (23)	1 (4)	0	5 (23)	0	
SONORA	85	84 (99)	10 (12)	47 (55)	30 (35)	2 (2)	39 (46)	63 (74)	13 (15)	3 (3)	4 (4)	22 (26)	41 (48)	2 (2)	
Σ PORCENTUAL		91.1	26.1	43.1	19	4	28.7	49.1	14	11	18	6	28	3.3	

*Para la determinación de anticuerpos anticapsula se utilizó la prueba de hemoaglutinación indirecta descrita por Biberstein, 1978. Para detectar anticuerpos anticitotoxina se usó la técnica descrita por Gentry, 1985.

**Algunos animales reaccionaron con más de un serotipo

tividad, el A2 con 43.1%, el A5 con 28.7% y el A1 con 26.1%. En tanto, el 91.1% de los sueros tuvieron títulos de anticuerpos específicos contra la citotoxina de *P. haemolytica* (Cuadro 5); además se observó que los serotipos predominantes por regiones fueron similares. Es importante mencionar que los serotipos T4, T10 y A12 fueron los que menor seropositividad presentaron. El análisis de datos demostró la existencia de correlación entre los títulos de anticuerpos anticitotoxina con los títulos de al menos uno de los serotipos más comunes en las tres especies animales.

DISCUSION

Las pruebas de antigenicidad cruzada han sido realizadas por otros autores con técnicas como la de ELISA, con utilización de otros animales de laboratorio diferentes al conejo para la elaboración de los antisueros específicos^{8, 12}. La baja antigenicidad cruzada encontrada en el presente trabajo, es similar a la descrita por estos investigadores quienes dan una muestra positiva cuando tienen títulos de anticuerpos superiores a 1:8.

En México es escasa la información acerca de los agentes involucrados en problemas neumónicos de los rumiantes, en especial de *P. haemolytica* y sus serotipos. En otros países, se menciona que los serotipos importantes en bovinos son el A1 y A2, y en forma esporádica se han aislado otros serotipos como el T3, A6, A7, T10 y A11^{6, 9, 13, 18, 24, 28}. Los resultados de este trabajo demuestran la importancia de otros serotipos como el A5, A7, A8 y A11 y no sólo de los serotipos A1 y 2 como se esperaba.

Los serotipos encontrados en ovinos coinciden con lo descrito por diversos autores que han aislado una variedad amplia de serotipos, tanto de animales enfermos como sanos^{7, 15, 18, 22, 25}. Sin embargo, destacan los serotipos A6, A7 y A8 por su alto porcentaje de seropositividad.

En un estudio realizado en caprinos de Kenia por Mwangota, Muhammed y Thomson¹⁸ se observó que el serotipo más común de *P. haemolytica* fue el A11. En este trabajo se determinó la importancia de serotipos como el A6 y A2, entre otros.

En estudios realizados con animales jóvenes se ha observado que el serotipo predominante es el A1^{2, 21} lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo para los corderos de COPEA. La mayor serovariedad encontrada en animales adultos puede ser debida a que durante su crecimiento

los animales se exponen a los diversos serotipos de *P. haemolytica*. Por otro lado, se considera que los títulos altos de anticuerpos encontrados en los sueros de animales adultos son importantes, ya que estudios realizados en bovinos adultos demostraron que animales con títulos altos fueron más resistentes al desafío con cepas virulentas de *P. haemolytica*, en tanto que animales con títulos bajos sucumbieron al desafío¹⁹. La baja seropositividad observada para los serotipos T4, T10 y A12 en todos los estados, sugiere que es poca la importancia de estos serotipos como causantes de problemas en caprinos. En este trabajo los títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina encontrados en los animales se consideran como adecuados para proteger a los animales debido a que estudios realizados en Estados Unidos demuestran que animales con títulos similares resisten al desafío con cepas virulentas de *P. haemolytica*, los títulos de anticuerpos en los trabajos mencionados han sido inducidos en forma natural y por vacunación a nivel experimental^{14, 20}. La correlación encontrada entre los serotipos más frecuentes determinados con los títulos de anticuerpos de los serotipos en cuestión, son considerados como una variable independiente que va a inducir una respuesta directamente proporcional en los títulos de anticuerpos anticitotoxina, debido a que la proliferación de la bacteria, da como consecuencia la producción de citotoxina que actúa sobre leucocitos como el macrófago alveolar, los neutrófilos y

los linfocitos que son considerados los principales mecanismos de defensa del pulmón, con la subsecuente respuesta del huésped a este antígeno. En la actualidad se desconoce qué serotipos están contenidos en las bacterinas comerciales y si son los adecuados para proteger a los animales si se consideran los serotipos predominantes según la especie y la región, por lo que, es de suma importancia determinar los serotipos más comunes de *P. haemolytica* por regiones y tener la seguridad que las bacterinas comerciales contengan estos serotipos y la citotoxina como antígeno adicional para llevar a cabo una profilaxis adecuada contra la enfermedad causada por esta bacteria.

SUMMARY

This study was conducted to determine the presence of antibodies anticytotoxin in sera of cattle, sheep and goats; as well as to know the seroprevalence of the different serotypes of *Pasteurella haemolytica*. Three-hundred and twenty cattle sera were collected from the states of Hidalgo, Mexico and Distrito Federal. From sheep, 1167 samples were studied from Distrito Federal and imported sheep. From goats, 977 were collected from different states of Mexico. Antibody titers anticytotoxin were determined through the simple visual assay; and the antipcapsule antibodies were evaluated through the indirect haemagglutination test, using a set of 12 reference strains of *P. haemolytica*. Results showed that for cattle and sheep there was a wide variety of antibodies against different serotypes, mainly A1, A5, A6, A7 and A8, in goats the most common serotypes were A6, A2, A5 and A1. Concerning the anticytotoxin antibodies, most of the animals showed titers, which increased with the age of the ruminants. The results obtained contribute to the knowledge of the epizootiology of *P. haemolytica* infection in Mexico.

LITERATURA CITADA

1. ALLEY, M.R. and CLARKE, J.L., 1977. The influence of micro organisms on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. **N. Z. Vet. J.** 25: 200.
2. ARGUETA, G.J., 1987. Frecuencia de *Pasteurella haemolytica* en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D.F.
3. AYALA, M.A., 1977. Incidencia y prevalencia de neumonías en becerros Holstein Fresian en etapa de lactancia y destete durante un año en un centro de recría. Tesis de licenciatura, Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D.F.
4. BERGGREN, K.A., BABEYUT, C.S., SIMONSON, R.R., BEMRICK, W.J. and MAHESWARAN, S.K., 1981. Cytotoxic effects of *Pasteurella haemolytica* on ovine neutrophils. **Am. J. Vet. Res.** 42: 1383.
5. BIBERSTEIN, E.L., 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. Methods in Microbiology. Edited by T. and J. Academic Press Inc. New York. 253.
6. BIBERSTEIN, E.L., GILLS, H., KNIGHT, R., 1960. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. **Cornell Vet.** 50: 283.
7. BIBERSTEIN, E.L. and THOMPSON, D.A., 1966. Epidemiological studies on *Pasteurella haemolytica* in sheep. **J. Comp. Path.** 76: 83.
8. BURRELLS, H.B.E. and DAWSON, A. McL., 1983. Antigenic relationships between the serotypes of *Pasteurella haemolytica* demonstrable by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Vet. Microbiol.** 8: 187.
9. CONFER, A.W., CORSTVET, R.E., PANCIERA, R.J. and RUMMAGE, J.A., 1983. Isolation of *Pasteurella haemolytica* and correlation with serum antibody response in clinically normal beef calves. **Vet. Microbiol.** 8: 601.
10. FRANK, G.H., 1980. Serological groups among untypable bovine isolates of *Pasteurella haemolytica*. **J. of Clin. Microbiol.** 12: 579.

11. FRANK, G.H. and SMITH, P.C., 1983. Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. **Am. J. Vet. Res.** 44: 981.
12. FRANK, G.H. and WESSMAN, G.E., 1978. Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. **J. Clin. Microbiol.** 7: 142.
13. FOX, M.L., THOMSON, R.G. and MAGWOOD, S.E., 1971. *Pasteurella haemolytica* of cattle serotype, production of betagalactosidase and antibacterial sensitivity. **Can. J. Comp. Med.** 35: 313.
14. GENTRY, M.J., CONFER, A.W. and KREPS, J.A., 1985. Simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing antibody titers in cattle sera. **J. Clin. Microbiol.** 22: 968.
15. GILMOUR, N.J.L., THOMPSON, D.A. and FRASER, J., 1974. The recovery of *Pasteurella haemolytica* from the tonsils of adults sheeps. **Res. Vet. Sci.** 17: 41.
16. HIMMEL, M.E., YATES, M.D., LAVERMAN, L.R., SQUIRE, P.G., 1982. Purification and partial characterization of a macrophage cytotoxin from *Pasteurella haemolytica*. **Am. J. Vet. Res.** 43: 764.
17. MARTIN, S.W., MEEK, A.H., DAVIS, D.G., THOMSON, R.G. JOHNSON, J.A., LOPEZ, A., STEPHEN, L., CURTIS, R.A., PRESCOTT, J.F., ROSENDAL, S., SAVAN, M., ZUBAIDY, A.V. and BOLTON, M.R., 1980. Factors associated with mortality in feedlot cattle the bruce country beef project. **Can. J. Comp. Med.** 44: 1.
18. MWANGOTA, A.V., MUHAMMED, S.I. and THOMSON, R.G., 1977. Serological types of *Pasteurella haemolytica* in Kenya. **Cornell Vet.** 68: 84.
19. SHEWEN, P.E. and WILKIE, B.N., 1982. Antibody titers to *Pasteurella haemolytica*. All in Ontario beef cattle. **Can. J. Comp. Med.** 46: 354.
20. SHEWEN, P.E. and WILKIE, B.N., 1983. *Pasteurella haemolytica* cytotoxin by type-specific rabbit antisera. **Am. J. Vet. Res.** 44: 715.
21. SHREEVE, B.J., BIBERSTEIN, E.L. and THOMPSON, D.A., 1972. Variation in carrier rates of *Pasteurella haemolytica*. **J. Comp. Path.** 82: 111.
22. SMITH, G.R., 1961. The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions in sheep. **J. Path. Bact.** 81: 431.
23. SUTHERLAND, A.D., DONACHIE, W., 1986. Cytotoxic effect of serotypes of *Pasteurella haemolytica* on sheep bronchoalveolar macrophages. **Vet. Microbiol.** 11: 331.
24. THOMSON, R.G., BENSON, M.L. and SAVAN, M., 1969. Pneumonic pasteurellosis of cattle: Microbiology and Immunology. **Can. J. Comp. Med.** 33: 194.
25. THOMPSON, D.A., FRASER, J. and GILMOUR, N.J.L., 1977. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* in ovine pasteurellosis. **Res. Vet. Sci.** 22: 130, 131.
26. TRIGO, T.E., TRIGO, T.F., HERNANDEZ, G.H., RAMIREZ, C.C. and BERRUECOS, V.M., 1982. Patología y Bacteriología de pulmones neumónicos de becerros. **Vet. Méx.** 13: 131.
27. WALKER, R.D., HOPKING, F.M., SCHULTZ, T.W., Mc. CRACKEN, M.D. and MOORL, R.N., 1985. Changes in leukocyte populations in pulmonary lavage fluids of calves after inhalation of *Pasteurella haemolytica*. **Am. J. Vet. Res.** 46: 2429.
28. WRAY, C. and THOMPSON, D.A., 1971. Serotypes of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves. **Br. Vet.** 127: 56.