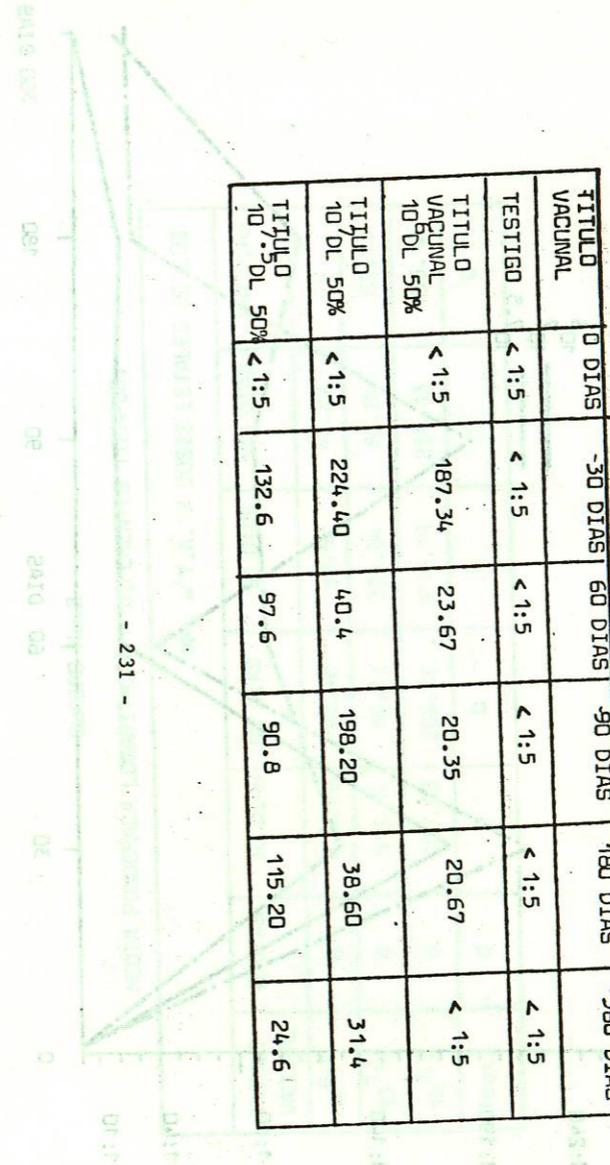


1:31, 4 a 360 días. Los resultados obtenidos son alagadores ya que la vacuna inactivada con un título de  $10^{7.0}$  D.L 50% o más alto, perduran los anticuerpos hasta 360 días a buen nivel. Se sugiere la prueba de desafío para demostrar la eficacia en cuanto a inmunidad celular dada por la vacuna. Cabe mencionar que la producción de este biológico es bastante económico, utilizable en campañas para el control del derriengue y con todas las ventajas que posee un producto inactivado en cuanto a su manejo. No hubo ningún animal vacunado o testigo muerto por derriengue durante el período de la prueba.

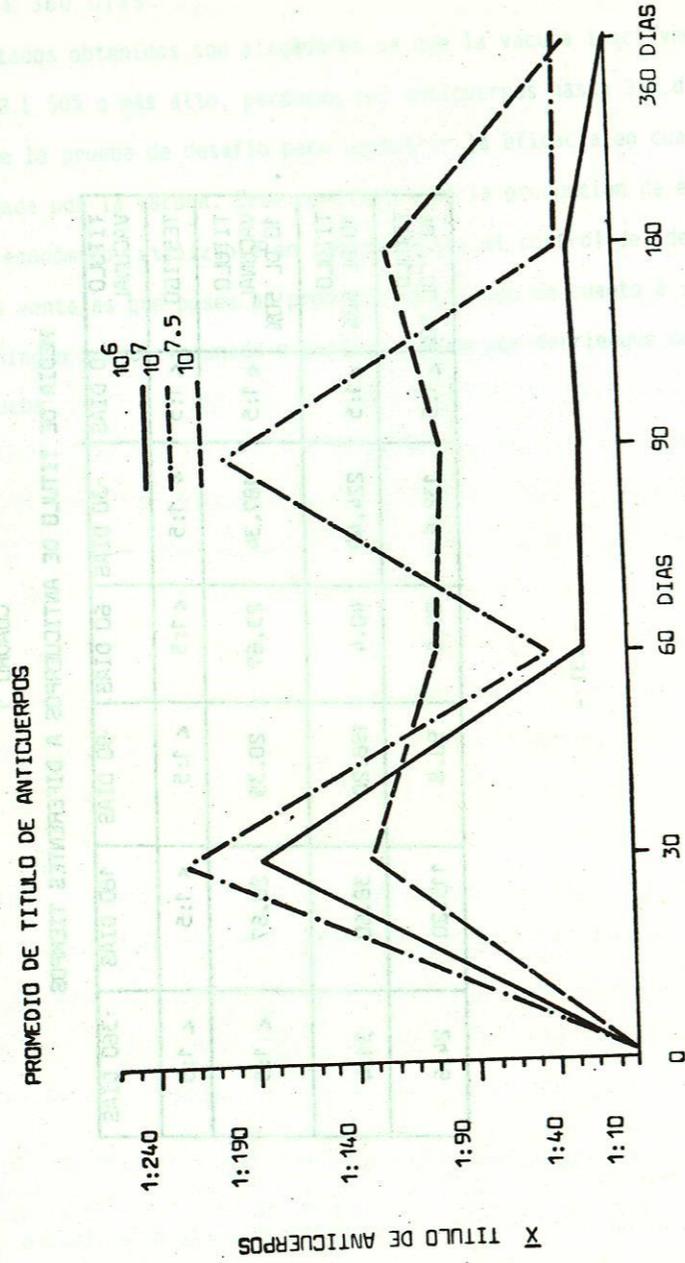
CUADRO 1  
MEDIA DE TITULO DE ANTICUERPOS A DIFERENTES TIEMPOS

TITULO VACUNAL	0 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	180 DIAS	360 DIAS
TESTIGO	< 1:5	< 1:5	< 1:5	< 1:5	< 1:5	< 1:5
TITULO VACUNAL 10 <sup>6</sup> DL 50%	< 1:5	187.34	23.67	20.35	20.67	< 1:5
TITULO 10 <sup>7</sup> DL 50%	< 1:5	224.40	40.4	198.20	38.60	31.4
TITULO 10 <sup>7.5</sup> DL 50%	< 1:5	132.6	97.6	90.8	115.20	24.6



- 231 -

GRAFICA # 1

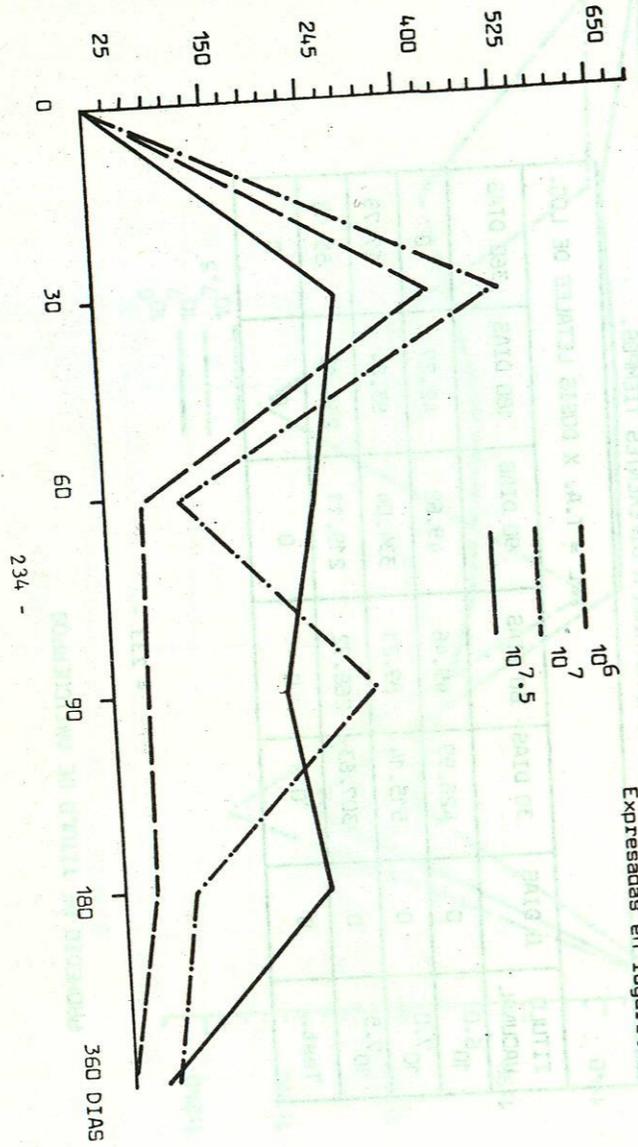


CUADRO No.2

MEDIA PONDERADA LOGARITMICA A DIFERENTES TIEMPOS.

MPL = T.A. X DOSIS LETALES DE LOG.

TITULO VACUNAL	0 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	180 DIAS	360 DIAS
10 <sup>6.0</sup>	0	428.99	49.46	49.62	42.27	0
10 <sup>7.0</sup>	0	515.14	89.21	334.04	83.84	67.79
10 <sup>7.5</sup>	0	307.63	266.92	219.11	258.13	55.12
Test.	0	0	0	0	0	0



MEDIA PONDERADA LOGARITMICA

M.P.L. = T. Absoluto X Dosis Letales  
Expresadas en Logaritmos

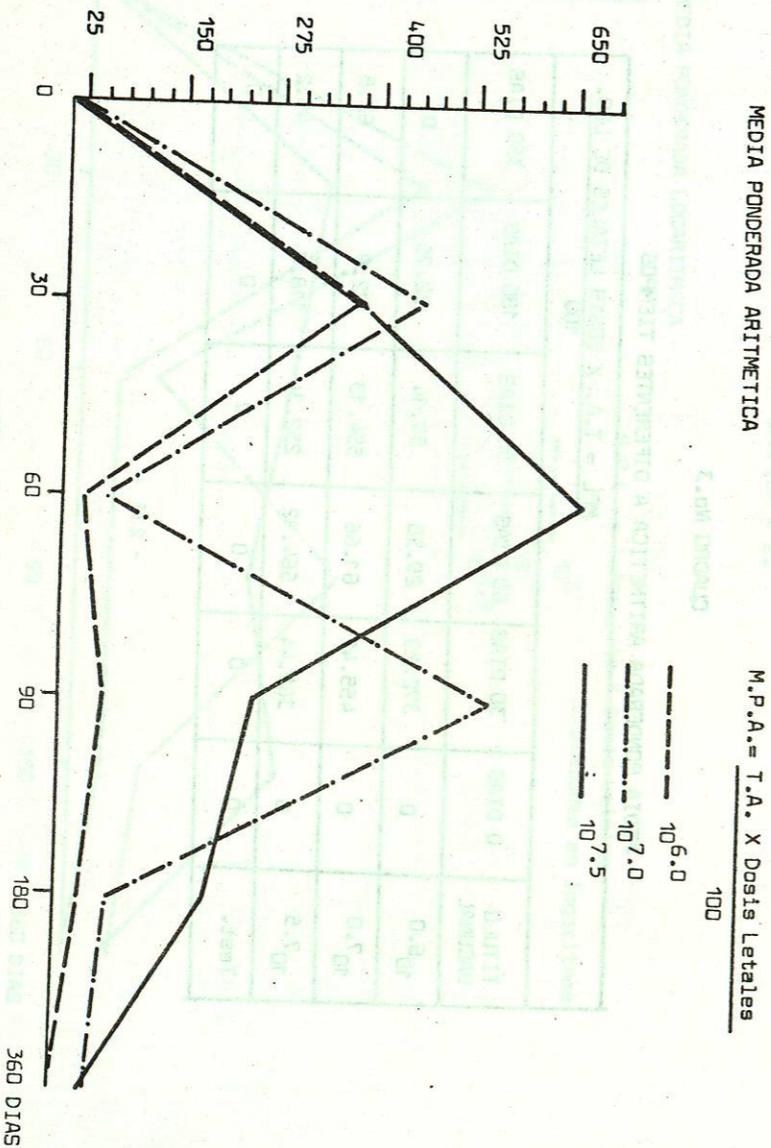
GRAFICA # 2.

234 -

CUADRO No.3

MEDIA PONDERADA ARITMETICA A DIFERENTES TIEMPOS

TITULO VACUNAL	MPL = T.A. X DOSIS LETALES DE LOG. 100							
	0 DIAS	30 DIAS	60 DIAS	90 DIAS	180 DIAS	360 DIAS	0	0
10 <sup>6.0</sup>	0	372.29	29.58	57.14	32.75	0	0	0
10 <sup>7.0</sup>	0	455.42	61.66	554.13	72.9	62.8	0	0
10 <sup>7.5</sup>	0	369.44	664.12	252.34	118.8	49.2	0	0
Test.	0	0	0	0	0	0	0	0



GRAFICA # 3

BIBLIOGRAFIA.

CUNHA, R.G., SILVA, R.A., SILVA N.M. 1977, Effect of stabilizer on the esin tenence of the immunoizing potency of an inactivated antirrabies vaccine. Revista - Brasileira de Biología, 37 (2), 345-350.

HERNANDEZ BAUMGARTEN. E.M. 1976. La rabia pareasiente bovina, definición del - problema y metodología de control. Ciencia Veterinaria, Vol. 1:104-106, UNAM.

KOPROWSKY, H., 1976. Prueba de inoculación al ratón. Técnicas de laboratorio en rabia, 3a. Ed. Organización Mundial de la Salud Ginebra.

LARGHI, O.P. SAVY, V.P., NEVEL A.E. and RODRIGUEZ A. 1976. Ethylenimime-B-Pro piolactone-inactivated rabies vaccine of tissue culture origin, j. Clin, Microbiol. 3(1) 26-33.

PETERMAN, H.G., SOBLEBOY, J.P. LANG, BRANCHE, R. 1971. Vaccination against -- rabies of carnivores and herbivores with on inactivated vaccine produced in tissue culture. Bolletin de Societe Des Sciences veterinaires at de Médecine Comparés de Lyon, 73 (2): 123-140.

## RESUMEN.

20 borregos divididos en 4 grupos fueron vacunados con diferentes dosis de vacuna antirrábica, cepa V-319/Acatlán inactivada con B-propiolactona. El grupo 1 fué inoculado con un título antes de inactivar de  $10^{6.0}$  D.L 50%/ml, el grupo 2 con un título de  $10^{7.0}$  DL 50%/ml., el grupo 3 con  $10^{7.5}$  D.L 50%/ml. Y el grupo 4 fueron controles. El adyuvante usando fué el FAS-16. Los animales fueron sangrados a los 0, 30, 60, 90, 180 y 360 días y mantenidos en una zona que frecuentemente se presentan casos de derriengue (Mocochá, Yucatán).

Un buen nivel de anticuerpos neutralizantes se encontraron a los 360 días en los animales vacunados con un título de  $10^{7.0}$  D.L 50% 1 ml  $10^{7.5}$  D.L 50%/ml. con la dosis  $10^{6.0}$  D.L 50%/ml. a los 360 días el título fué mucho mas bajo que con los anteriores. Ningun animal murió de derriengue durante el período de observación.

INVESTIGACION SEROLOGICA COMPARATIVA PARA LA EVIDENCIA DE INFECCION POR *Chlamydia psittaci* EN UN HATO OVINO DE MEXICO.  
COMPARATIVE SEROLOGICAL INVESTIGATION OF A SHEEP FLOCK FROM MEXICO FOR EVIDENCE OF *Chlamydia psittaci* INFECTION.

C. Escalante Ochoa.\*  
Departamento de Bacteriología. Fac. Med. Vet. Zoot. UNAM.

## RESUMEN.

Infecciones debidas a *Chlamydia (C.) psittaci* ocurren en una amplia variedad de especies animales que comprenden una gran diversidad de procesos patológicos. En ovinos, una de las principales enfermedades causadas por este microorganismo es Aborto Enzootico Ovino (AEO), donde infecciones subclínicas intestinales pueden estar involucradas. Para evaluar la presencia o ausencia de clamidiasis en un hato en México, se analizaron 50 sueros ovinos, 14 de corderos y 36 de hembras adultas, del hato ovino del Centro Ovino del Programa de Extensión Agropecuaria de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, (hoy CEPIER), mediante tres diferentes métodos serológicos: fijación de complemento (FC), inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inmunoblotting (inmunoadsorción).

## INTRODUCCION.

*Chlamydia* spp. son de interés biológico debido a dos razones principales: su único y característico ciclo de desarrollo, y por las distintas enfermedades que causa en el hombre. Actualmente, existen tres especies de esta bacteria intracelular obligada: *C. trachomatis*, y *C. pneumoniae*, ambas afectando al hombre como huésped primario (excepto el biotipo de ratón de *C. trachomatis*), y *C. psittaci* que primordialmente afecta animales, pero que puede incluso afectar al hombre.

Los antígenos clamidiales han sido agrupados como género-, especie- y serovar-específicos. Todos los miembros del género comparten un antígeno común de grupo termoestable, de naturaleza glicolípida con un peso molecular menor a 10 kilodaltons (kDa). Antígenos específicos de especie y serovar son representados principalmente por epitopes de la proteína principal de la membrana externa, misma que en *C. psittaci* tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa (38-42 kDa).

Las infecciones clamidiales regularmente establecen una relación balanceada huésped-parásito en sus huéspedes (reservorios) naturales. Asimismo, infecciones intestinales subclínicas conducen a la excreción intestinal prolongada de chlamydiae, lo cual es un factor importante en la perpetuación y la manutención eficiente de estas infecciones dentro de las poblaciones animales.

En hatos ovinos afectados con *C. psittaci* la bacteria se ha encontrado en grandes cantidades en las membranas fetales de hembras que han abortado. Chlamydiae ha sido aislada de heces de borregas y corderos, pero la relación existente entre los organismos placental y

fecal permanece sin clarificar, así como también el papel de cepas fecales en la epidemiología del AEO. Sin embargo, progresos recientes se han hecho en diferenciar entre dichas cepas clamidiales mediante morfología de inclusiones, inmunofluorescencia indirecta e inmunoblotting, habiéndose demostrado diversidad antigénica entre ambas.

En las ovejas infectadas no existen signos clínicos evidente de la infección de AEO. Puede darse fiebre por 1 ó 2 días antes de que ocurra el aborto, pero ninguna otra evidencia de infección es observada hasta que este se presenta.

Es probable que el AEO esté presente en la mayoría de los países donde la industria ovina se ha desarrollado. En el Reino Unido es la causa de aproximadamente el 20% de los incidentes de aborto diagnosticados, y es a la fecha la más frecuente etiología de fetopatías. En México no existen previos casos de AEO reportados; sin embargo, estudios preliminares recientes sugieren la presencia del microorganismo.

La prueba diagnóstica rutinaria para infecciones por *C. psittaci* en ruminantes domésticos se basa en investigaciones serológicas mediante la prueba de fijación de complemento. Otras técnicas como la inmunofluorescencia indirecta, y más recientemente métodos desarrollados como ELISA y la prueba de inmunoblotting pueden proveer de pruebas más específicas para chlamydiae, y en el futuro permitir la tipificación serológica de infecciones clamidiales.

#### MATERIAL Y METODOS.

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio Central Veterinario en Weybridge, Inglaterra bajo el auspicio de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Fueron utilizados 50 sueros provenientes de CEPIER, 14 de los cuales correspondían a corderos menores de 2 meses de edad y 36 a hembras adultas, como sueros problema. Como controles se usaron 4 sueros: 1 positivo a la cepa abortiva A22 de *C. psittaci*, 1 positivo a la cepa entérica T23 de *C. psittaci*, 1 suero negativo obtenido de un cordero privado de calostro y 1 suero fetal bovino como control negativo para la prueba de FC. Como sueros de referencia fueron empleados sueros provenientes de dos hatos ovinos británicos, 8 de un hato con historia de aborto (Panel A) y 4 de un hato sin historia de aborto (Panel B).

Como antígenos fueron utilizadas dos cepas de *C. psittaci*: cepa de aborto A22 y cepa de infecciones entéricas T23, ambas prolongadas en embriones de pollo y purificadas. Estos fueron empleados en todas las pruebas serológicas realizadas con excepción de la FC, donde únicamente se utilizó la cepa A22 de *C. psittaci* propagada en células McCoy.

Fijación de C'. Se utilizó C' comercial de cuye en una dilución 1/35, y un sistema hemolítico de eritrocitos de borrego al 4% sensibilizados con hemolisina comercial. Este procedimiento se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos con fondo de U con un esquema de ajedrez habiéndose preparado diluciones dobles de los sueros 1/4 a

1/4096 y del antígeno 1/2 a 1/128 (a partir de una dilución inicial 1/16), de acuerdo al procedimiento estándar establecido en el Depto. de Virología del Lab. Central Vet. en Inglaterra para el certificado de exportación de ovinos, caprinos y bovinos. El valor de corte para considerar un suero como positivo indicador de infección por chlamydiae se determinó en 1/32 de acuerdo a los lineamientos del Reino Unido.

Inmunofluorescencia indirecta. Esta se llevo a cabo sobre portaobjetos recubiertos de teflón de 15 pozos en monoestratos de células L-929 (en medio M199 suplementado de suero fetal bovino, aminoácidos esenciales y antibióticos) previamente infectados con *C. psittaci* cepas A22 y T23. Se utilizó un conjugado de isotiocianato de fluoresceína comercial de burro anti-IgG ovino en una dilución 1/40 al que se le adicionó azul de Evans con contrastante en una concentración final de 0.05% y se centrifugó a 6500 rpm por 5 min. Los sueros se probaron en diluciones dobles de 1/4 a 1/2048. Finalmente, los portaobjetos fueron examinados en un microscopio de luz ultravioleta con una magnificación final de X 252. El título fue determinado como la última dilución de suero que diera la máxima fluorescencia de las inclusiones clamidiales.

Immunoblotting. Fue efectuado sobre membranas de polivinilideno difluorado a las que se transfirieron las proteínas de los antígenos clamidiales en diferentes concentraciones (3, 6, 9 g), saco vitelino no infectado (control negativo, 6, 12, 18 g) y 2 marcadores proteicos comerciales separadas (resueltas) en geles de poliacrilamida mediante electroforesis. Los sueros se probaron todos a una dilución 1/50.

#### RESULTADOS Y DISCUSION.

Fijación de C'. Todos los sueros problema alcanzaron títulos de menos de 1/4 hasta 1/32, de los cuales ninguno de lo que se obtuvieron de corderos fue mayor de 1/8 y más del 50% por debajo de 1/4. Los sueros de hembras adultas presentaron todo el rango de títulos mencionado aunque sólo 2 de ellos (2/36) alcanzaron un título de 1/32 mientras que la mayoría dió un título de 1/8. De los sueros de referencia, el panel A presentó títulos de 1/4 a 1/256 y el panel B no mayores de 1/4.

Inmunofluorescencia indirecta. Se encontró reacción a ambos antígenos por parte de todos los sueros. Con el antígeno A22 los títulos demostrados por los sueros problema variaron de menos de 1/4 a 1/32, mientras que con el antígeno T23 se encontraron entre menos de 1/4 a 1/64. De éstos los máximos títulos registrados en los sueros de cordero fueron de 1/8 con A22 y 1/64 con T23; en el caso de los adultos 1/32 con ambos antígenos. 62% del total de sueros presentó una mayor reactividad con el antígeno intestinal T23. El panel A mostró gran afinidad por A22 y el panel B por T23.

Immunoblotting. De menos 20 bandas antigénicas fueron detectadas. Particular interés fue puesto en aquellas reacciones hacia proteínas de aparente peso molecular de 28, 38 y 61 kDa +/- 3kDa para A22, y de 26, 40 y 62 kDa +/- 3 kDa para T23. La mayoría de los sueros de corderos no reaccionó particularmente fuerte con

ninguno de los antígenos clamidiales bajo observación. Los de adulto dieron reacciones fuertes sólo con proteínas de la cepa A22 de aproximadamente 61 kDa. El panel A presentó reacciones más fuertes con el antígeno A22, y el panel B con el antígeno T23.

Es interesante mencionar dos puntos: primero, que los resultados obtenidos con la prueba de FC de los sueros problema no sugieren la infección debido a cepas abortivas de *C. psittaci* en el hato de estudio en base al análisis del esquema de salud de ovinos y caprinos del Reino Unido; y segundo, que los tres métodos serológicos efectuados indican la posible presencia de una infección entérica dentro del hato. Sin embargo, las reacciones encontradas en el immunoblotting podrían sugerir que una infección mixta puede estar teniendo lugar en dicha población ovina y, de ser así, representar un problema potencial de aborto.

Las investigaciones serológicas y el análisis final de los resultados sugieren que la prueba de inmunofluorescencia indirecta parece ser un "lazo de unión" en la interpretación de los resultados de la FC y el immunoblotting. Sin embargo, dicho método no parece ser la prueba serológica ideal cuando se requiere el análisis de un gran número de muestras.

Finalmente, algunas diferencias antigénicas entre las cepas abortiva A22 y entérica T23 de *C. psittaci* fueron observadas en este estudio, como son la morfología de inclusiones citoplasmáticas maduras y el tiempo de su formación que pudiera tener implicaciones epidemiológicas o diferencias en el ciclo de desarrollo de ambas cepas bacterianas, así como las bandas de reacción de las proteínas de dichas cepas, lo que ha llegado a sugerir que las infecciones por cepas abortivas protegen de futuras infecciones intestinales, pero que infecciones intestinales no inducen protección contra la forma placentotrófica.

#### BIBLIOGRAFIA.

- Anderson, I.E. 1987. Vet. Microbiol. 13: 69-74.  
Anderson, I.E. and Baxter, T.A. 1986. Vet. Rec. 119: 453-454.  
Caldwell, H.D.; Kromhout, J. and Schachter, J. 1981. Infect. Immunol. 31: 1161.  
Caldwell, H.D. and Perry, L.J. 1982. Infect. Immunol. 38: 745-754.  
Dhir, S.P.; Kenny, G.E. and Graystone, J.T. 1986. J. Clin. Microbiol. 34: 285-309.  
Dhir, S.P. and Boatman, E.S. 1982. J. Bacteriol. 111:267.  
Escalante-Ochoa, C. 1988. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM  
Griffiths, P.C.; Phillips, H.L; Dawson, M. and Clarkson, M.J. Vet. Microbiol. (in press)  
Johnson, F.W.A. 1984. Irish Vet. News. Pp. 10-15.  
McClenagha, M.; Inglis, N.F. and Herring, A.J. 1991. Vet. Microbiol. 26: 269-278  
Pérez-Martínez, J.A., Schemer, N. and Storz, J. 1986. Am. J. Vet. Res. 47: 1501-1506.

#### EVALUACION DE LA INMUNIDAD PASIVA CONTRA *Pasteurella haemolytica* A-1 EN CORDEROS PROVENIENTES DE BORREGAS INOCULADAS CON DIFE-- RENTES ANTIGENOS BACTERIANOS\*\*. IMMUNITY PASSIVE EVALUATION AGAINST *Pasteurella haemolytica* A-1 IN LAMBS FROM INOCULATED EWES WITH DIFFERENTS ANTIGENS.

L. Jaramillo Meza, F. Aguilar Romero\*, F. Trigo Tavera y F. Suárez Guemes.

CENID-Microbiología INIFAP-SARH.  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.

#### RESUMEN.

Con el objeto de incrementar los niveles de anticuerpos calos-trales específicos contra *Pasteurella haemolytica* A-1 en corderos neonatos, se utilizaron 6 grupos de 10 borregas gestantes cada uno y fueron inmunizados bajo el siguiente esquema: El grupo I se inoculó con leucotoxina cruda (LC); el II con LC + Adyuvante Incompleto de Freund (AIF); el III con LC + Extracto Soluble Capsular (ESC) + AIF; el IV con ESC + AIF; el V con *P. haemolytica* viva y el grupo VI fue utilizado como testigo. Las borregas fueron sangradas el día de la inoculación (día 0) y posteriormente cada 7 días hasta el día 42. Con respecto a los corderos se sangraron al momento del nacimiento y a los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 35 y 42. Los sueros tanto de las borregas como de los corderos fueron evaluados por las técnicas de Hemoaglutinación Indirecta y Ensayo Visual Simple, para determinar los niveles de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina respectivamente. Los resultados se sometieron al análisis estadístico de Varianza y a la prueba de significancia de Tukey, el cual mostró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en los corderos de madres inmunizadas con LC y con LC+AIF. Es posible que la inmunización con LC de *P. haemolytica* en borregas gestantes, sirva para proteger al cordero neonato contra la pasteurelisis pulmonar.

#### INTRODUCCION.

*Pasteurella haemolytica* es un importante patógeno del tracto respiratorio de los bovinos, ovinos y cabras, que coloniza normalmente la parte alta de éste, y que bajo ciertas condiciones de inmunosupresión en el huésped, tales como primoinfección por virus o micoplasmas, cambios de temperatura, humedad, ventilación deficiente, etc. afecta los mecanismos de defensa, permitiendo el establecimiento del microorganismo y el daño al tejido pulmonar (3, 4).

CENID-Microbiología INIFAP-SARH. Proyecto Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes. A.P.41-652, México D.F. C.P.05110.  
Departamentos de Patología y Bacteriología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México D.F.

\*\* Presentado en el XXII Congreso Nacional de Microbiología.  
Estudio parcialmente financiado por: International Foundation for Science. Grant No. B/1626-1

P. haemolytica presenta diversos factores asociados con su virulencia. Por ejemplo produce una exotoxina que ha demostrado ser tóxica para los macrófagos alveolares y linfocitos de rumiantes. Los macrófagos alveolares se consideran como la primera defensa a nivel pulmonar contra el establecimiento y desarrollo de infecciones pulmonares. Con la muerte de éstas células también se liberan enzimas proteolíticas, histamina y otros mediadores químicos del proceso inflamatorio que contribuyen en el daño pulmonar, por lo tanto se ha considerado a la leucotoxina de P. haemolytica como el principal factor de virulencia de la bacteria que es producida por todos los serotipos (5).

En la actualidad se han desarrollado inmunógenos experimentales para la prevención de la pasteurelisis pulmonar utilizando como antígenos, bacteria viva, leucotoxina y extractos solubles (1,2,6).

#### MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron 60 borregas en el último tercio de gestación, que fueron divididas en 6 grupos de 10 animales cada uno e inmunizadas por vía subcutánea de acuerdo al siguiente diseño experimental: El grupo I se inoculó con 2 ml. de Leucotoxina Cruda (LC); el II con 2 ml. de LC + 2 ml. de Adyuvante Incompleto de Freund (AIF); el III con 2 ml. de LC + 2 ml. de Extracto Soluble Capsular de P. haemolytica (ESC) + 4 ml. de AIF; el IV con 2 ml. de ESC + 2 ml. de AIF; el V con 2 ml. de suspensión de P. haemolytica en fase de crecimiento logarítmico a una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ml y el grupo VI fué el grupo testigo.

Las borregas fueron sangradas por punción de la yugular en el momento de la inmunización (día 0) y posteriormente cada 7 días hasta el día 42. Con respecto a los corderos, éstos fueron sangrados al momento de nacer y posteriormente a los días 1,3,7,14,21,28,35 y 42.

A todos los sueros se les determinaron los niveles de anticuerpos anticápsula y antileucotoxina con las técnicas de Hemoaglutinación Indirecta y Ensayo Visual Simple, respectivamente.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente por medio del análisis de varianza y la prueba de significancia de Tukey.

#### RESULTADOS Y DISCUSION.

Los títulos de anticuerpos de los grupos de borregas inmunizadas con leucotoxina cruda y leucotoxina cruda + adyuvante incompleto de Freund tuvieron diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) con respecto a los demás grupos. Con referencia, a los corderos, mostraron valores diferentes estadísticamente significativos ( $P < 0.05$ ) los que procedían de los grupos de borregas antes mencionados.

Los resultados del presente estudio nos indican que es posible incrementar los anticuerpos específicos contra P. haemolytica en corderos neonatos inoculando borregas en el último tercio de gestación y pudiera servir para proteger a los corderos contra

la pasteurelisis pulmonar, aunque para poder evaluar esto es necesario realizar desafíos experimentales, ya que en algunos estudios previos en ocasiones no se ha encontrado una relación directa entre títulos de anticuerpos y protección.

#### BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Fulton, R.W., Gentry, M.J., and Rummage, J.A. 1985 Am. J. Vet. Res. 46: 342-347.
- 2.- Confer, A.W., Panciera, R.J., Gentry, M.J. and Fulton R.W. 1986 Am. J. Vet. Res. 47: 1853-1857.
- 3.- Filion, L.G., Wilson, P.J. and Bielefeldt-Ohamann. 1984 Can. J. Comp. Med. 48: 268-274.
- 4.- Jones, C.D. 1987. Res. Vet. Sci. 42: 179-186.
- 5.- Markham, R.J., Wilkie, B.N. 1980. Am. J. Vet. Res. 41: 18-22.
- 6.- Sutherland, A.D., Donachie, G.E., Jones, H.G. 1989. Vet. Microbiol. 19: 175-181.