

Trabajo Fin de Máster

VALORACIÓN DE LA PROTECCIÓN CONFERIDA POR DIFERENTES VACUNAS FRENTE A CEPAS DE *PASTEURELLA MULTOCIDA* AISLADAS EN CONEJO UTILIZANDO EL MODELO RATÓN

Autor

Celia Sanz Tejero

Directores

Dra. Ana Belén Fernández Ros

Dr. Raúl Carlos Mainar Jaime

Facultad de Veterinaria

Junio 2014

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDOS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
Situación del sector cunícola en España	6
1. Pasteurelosis en conejos	7
2. Agente etiológico, <i>Pasteurella multocida</i>	10
2.1. Factores de virulencia	11
2.2. Caracterización de cepas y estudios previos de cepas aisladas en conejo	16
3. Control de la pasteurelosis	18
4. Estudios experimentales de <i>Pasteurella multocida</i> en el modelo ratón	21
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
Cepas bacterianas	24
Animales y condiciones de alojamiento	25
Vacunas utilizadas	25
Determinación de la dosis letal 50	26
Diseño experimental	26
Análisis estadísticos	27
Ensayos experimentales	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
Ensayo 1	34
Ensayo 2	36
Ensayo 3	39
Ensayo 4	42
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

RESUMEN

La pasteurelisis, causada por *Pasteurella multocida*, es una de las principales enfermedades de la cunicultura industrial, a pesar de lo cual no existe ninguna vacuna comercial para su prevención. El objetivo principal de este trabajo fue valorar la protección conferida por diferentes vacunas elaboradas con cepas de *P. multocida* aisladas de conejos utilizando un modelo de infección en ratón. Se evaluó la protección conferida por una vacuna basada en exopolisacáridos capsulares frente a una autobacterina, la protección producida por distintas bacterinas frente al desafío con cepas patógenas, y la protección cruzada entre cepas heterólogas de distinto tipo capsular y perfil de virulencia basado en la presencia o ausencia de los genes *hgbB* y *pfhA*.

El modelo se basó en la letalidad producida por el desafío con distintas cepas patógenas en grupos de 10 ratones vacunados con dos dosis separadas 14 días frente a la letalidad observada en los grupos control sin vacunar. Para el desafío se calculó previamente la DL50 de cada una de las cepas utilizadas y se utilizó la vía intraperitoneal. El modelo se consideró válido para el objetivo planteado. En todos los animales desafiados que murieron durante los ensayos se aisló *P. multocida*, mientras que no se aisló en ninguno de los animales sacrificados con posterioridad. La protección conferida por algunas autobacterinas resultó del 100% frente a la falta de protección de otras bacterinas elaboradas con cepas heterólogas, aunque esto no se cumplió en todos los casos. La autovacuna a base de exopolisacáridos no resultó efectiva mientras que la autobacterina elaborada con la misma cepa protegió al 100% de los ratones frente al desafío con esa misma cepa. Algunas bacterinas han demostrado ser efectivas frente al desafío con cepas heterólogas pero no ha podido demostrarse una relación entre la protección y el tipo capsular o el perfil de virulencia. La utilización de autobacterinas y bacterinas puede ser muy útil en la prevención de la pasteurelisis del conejo pero se desconoce que componentes bacterianos son los responsables de la inducción de una respuesta inmune protectora.

ABSTRACT

Pasteurellosis by *Pasteurella multocida* is one of the main diseases in the rabbit industry. Despite of its importance, there is no commercial vaccine to prevent it. The main aim of this study was to evaluate the protection provided by different vaccines based on different strains of *P. multocida* isolated from rabbits and using a mouse infection model. We assessed the protection conferred by a vaccine based on capsular exopolysaccharides *versus* an autobacterin. It was also evaluated the protection conferred by different bacterins when mice were challenged with different pathogenic strains. Last, the prospective cross protection between heterologous strains of different capsular types and virulence profiles based on the presence or absence of *hgbB* and *pflA* genes was also evaluated.

The model used was based on comparing estimates of mortality rates caused after the challenge with pathogenic strains in different groups of 10 mice which had been vaccinated twice 14 days of difference, with mortality rates observed in control (unvaccinated) groups. For each challenge dose, LD50 was calculated previously for each of the strains after using the intraperitoneal route. The model was considered valid for the aim of this study. *Pasteurella multocida* was isolated from all challenged animals that died during the study, while it was not isolated in any of the mice that survived the period of study and were subsequently slaughtered. The protection conferred by some of the autobacterins was 100%, compared to the lack of protection from other bacterins based on heterologous strains, although this finding was not consistently observed. The autovaccine based on exopolysaccharides was not effective, while the autobacterin based on the same whole strain conferred 100% protection to vaccinated mice challenged with that strain. Some bacterins appeared to be effective against a challenge with heterologous strains, but a relationship between protection and capsular type or virulence profile could not be demonstrated. The use of autobacterins and bacterins can be very useful in preventing rabbit pasteurellosis, but it is unknown which bacterial components are responsible for the induction of a protective immune response.

INTRODUCCIÓN

Situación del sector cunícola en España

La cunicultura, como actividad pecuaria, ha experimentado en los últimos años una importante evolución, alcanzando una considerable relevancia y un creciente interés, siendo España uno de los principales productores mundiales de carne de conejo que, junto con Italia y Francia, forma parte del grupo líder de países a nivel continental. La producción mundial de carne de conejo en 2004 fue de 1.115.000 toneladas. El principal país productor del mundo es China (460.000 t); a continuación se encuentran Italia (222.000 t), España (111.000 t) y Francia (85.200 t). El número aproximado de conejos sacrificados en España en 2004 fue de 90 millones, ocupando la producción de carne de conejo el quinto lugar después de la de porcino, aves, bovino y ovino-caprino.

En la actualidad, el conejo se explota económicamente para la producción de carne y también para la producción de piel y pelo, aunque esta segunda aptitud suele ser un producto secundario en la mayoría de los casos. También es utilizado como animal de compañía (razas enanas), de experimentación y para la realización de repoblaciones cinegéticas (conejo silvestre).

El censo y el número de explotaciones en España en el año 2014 según los datos del Registro General de Explotaciones Ganaderas (REGA) es de 6.280.625 animales y 3.315 explotaciones. La gran mayoría de éstas se dedican a la producción de gazapos para carne (73,6%). Más de la mitad del censo de animales se encuentra repartido entre tres Comunidades Autónomas: Cataluña (24,2%), Galicia (19,0%) y Castilla León (17,0%). En Cataluña se localiza además el mayor porcentaje de granjas (33,2%).

El balance exterior de este tipo de carne ha sido habitualmente favorable para el sector nacional aunque las exportaciones de carne de conejo son poco importantes, alrededor de unas 5.000 toneladas anuales, dirigidas preferentemente hacia otros países de la Unión Europea, entre los que destacan Portugal y Francia. Las importaciones apenas llegan a las 500 toneladas (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; principales indicadores económicos del sector cunícola en el año 2014).

1. Pasteurelosis en conejos

Dentro de las enfermedades infecciosas no digestivas más frecuentes en explotaciones de conejos, se encuentra la pasteurelosis (Peeters, 1995; Coudert *et al.*, 1999), la cual se puede definir como la infección clínica o subclínica de cualquier sistema, órgano o tejido por microorganismos del género *Pasteurella* (Rosell, 2000). La pasteurelosis es la responsable de al menos el 50% de las causas principales de sacrificio de las conejas de reposición (Balençon *et al.*, 1982). Cuando hablamos de la pasteurelosis en conejos, el agente etiológico mayormente involucrado es *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) (Coudert *et al.*, 2006).

En España cerca del 50% de la mortalidad en las explotaciones cunícolas industriales se produce por trastornos respiratorios (Villa *et al.*, 2001), siendo *P. multocida* el principal agente causal de este tipo de problemas (Rosell, 2000). Además, las infecciones con abscesos producidas por este agente representan la causa principal de eliminación de conejas de cría (Coudert, 1980).

La pasteurelosis del conejo se origina por la colonización de las vías respiratorias superiores y, a partir de esta zona, algunas cepas son capaces de invadir otros órganos, desencadenando una gran variedad de signos clínicos que incluyen otitis media y tortícolis (Fox *et al.*, 1971; Snyder *et al.*, 1973; Flatt *et al.*, 1977; Coudert *et al.*, 1986), necrosis del pabellón auricular o de otros órganos (Badiola *et al.*, 1992), meningitis y encefalitis (Kpodekon, 1983), neumonía y pericarditis (Webster, 1926; Badiola *et al.*, 1992), abscesos cutáneos (DiGiacomo *et al.*, 1983), peritonitis (Bjotvedt, 1979; Badiola *et al.*, 1992), metritis (Thigpen *et al.*, 1978; Holmes *et al.*, 1983; Badiola *et al.*, 1992; Johnson y Wolf, 1993), y orquitis (Flatt, 1974).

Forma respiratoria

Es la forma más común de pasteurelosis en conejo. Engloba un proceso conocido como rinitis o coriza que se caracteriza por secreción nasal mucopurulenta, ruidos y dificultad respiratoria asociada frecuentemente a conjuntivitis (Boucher y Nouaille, 1996; Langan *et al.*, 2000; Rosell, 2000a; Percy y Barthold, 2001).

En algunas ocasiones puede ocurrir la progresión de rinitis a neumonía. Los conejos afectados mueren generalmente de forma aguda sin mostrar signos clínicos de enfermedad (especialmente los conejos jóvenes). No obstante, suele detectarse anorexia, letargia, fiebre, disnea, taquipnea y cianosis (Hagen, 1958; Langan *et al.*, 2000).

Macroscópicamente las lesiones observadas en una neumonía aguda son: focos de consolidación de color rojo a gris en los lóbulos craneoventrales, con o sin hemorragia, conocido como bronconeumonía catarral aguda. Este proceso puede cronificarse dando lugar a una consolidación generalizada, abscesos, pleuritis y pericarditis fibrinosa e incluso purulenta (Deeb y DiGiacomo, 2000a; Percy y Barthold, 2001).

Forma septicémica

La septicemia es poco frecuente o rara vez se diagnostica. La muerte se produce entre 24 y 48 horas después de los síntomas iniciales que a menudo son inaparentes. La septicemia puede desencadenar otras formas clínicas: la rinitis, la perineumonía, abscesos, etc.

Abscesos

Normalmente aparecen en procesos de evolución crónica. Se observan formaciones purulentas en el tejido conjuntivo subcutáneo (únicas o múltiples), frecuentemente localizadas en cabeza, pudiéndose afectar también ganglios linfáticos, glándulas mamarias, articulaciones y vísceras. A partir de esta forma crónica pueden producirse complicaciones de carácter septicémico o respiratorio.

Otitis media y encefalitis

La extensión de la infección por *P. multocida* de la nariz al oído medio ocurre probablemente a través de la trompa de Eustaquio. La otitis media puede ser asintomática o, en caso de afección del oído interno, en animal puede desarrollar tortícolis. Pueden observarse signos nerviosos y ataxia si la bacteria se extiende a las meninges. Aparece un exudado de color blanquecino y consistencia cremosa en el oído medio, que puede ser tanto unilateral como bilateral (Deeb *et al.*, 1990b; Deeb y DiGiacomo, 2000a).

Forma genital y mamitis

En animales adultos se puede presentar una forma genital que se caracteriza por procesos inflamatorios catarrales o purulentos. Suele ser más frecuente en las hembras (endometritis y mamitis) que en los machos (orquitis, prostatitis).

En el caso de las hembras, las bacterias llegan al útero por vía sanguínea como consecuencia de la infección del tracto respiratorio. Las conejas presentan el vientre abultado y eliminan un exudado muco-purulento por la vulva. Además se producen abortos y existe disminución de la fertilidad e incluso la esterilidad. En el macho solamente se puede apreciar un aumento considerable del tamaño de los testículos e incluso abscesos purulentos.

Otras localizaciones

Se han descrito otras formas de pasteurelosis, tales como la conjuntivitis, osteomielitis mandibular (Hinton, 1978), la peritonitis (Bjotvedt *et al.*, 1979), la osteoartritis tibiotarsal (Hago *et al.*, 1987) y la dacriocistitis (Jones *et al.*, 1988). Estas formas de la enfermedad son casos aislados y casi inexistentes en la producción intensiva. Algunos autores opinan que la capacidad de inducir o no, un determinado cuadro clínico, depende de la cepa (Rosell, 2000) y se ha podido demostrar que un mismo animal puede ser portador de más de una cepa.

Aunque el portal de entrada del microorganismo es usualmente la vía respiratoria (Quinn *et al.*, 1994), también se ha descrito la ruta conjuntival, oral, transcutánea y vaginal.

Gran parte de los animales de una explotación pueden presentar *P. multocida* en la mucosa nasal, como portadores aparentes o inaparentes, en una tasa que varía del 20 al 70% (Flat, 1974). La colonización de vías respiratorias altas tiene tasas de prevalencia del 75 al 90% (DiGiacomo *et al.*, 1983; Holmes *et al.*, 1984), con un 30-45% de animales con signos clínicos (DiGiacomo *et al.*, 1983). La prevalencia de lesiones neumónicas macroscópicas en animales aparentemente sanos de 8-10 semanas de vida puede llegar hasta el 20% y se han encontrado tasas de otitis media en matadero en el 4% de los animales jóvenes y en el 32% de los adultos (Flatt *et al.*, 1977).

La principal fuente de infección la constituyen los animales portadores crónicamente infectados (Coudert *et al.*, 1986), y son dos las vías de transmisión del microorganismo:

- -Vía directa a través de aerosoles o por contacto directo. Ésta es la vía más frecuente según DiGiacomo (1987).
- -Vía indirecta a través de objetos inanimados o materiales en los que los agentes productores de enfermedades pueden ser vehiculados (Maning *et al.*, 1989; DiGiacomo, 1992). Holmes *et al.* (1983) apuntan a los bebederos contaminados como posible vía de infección cruzada, mientras que Shewen (1986) señala la importancia que pueden desempeñar los insectos. Por otra parte el material utilizado para la inseminación artificial puede ser un vector importante de infecciones vaginales.

2. Agente etiológico, *Pasteurella multocida*

El género *Pasteurella* está dentro de la familia *Pasteurellaceae*, un grupo complejo de microorganismos que incluye, además, los géneros *Actinobacillus* y *Haemophilus*.

Solamente *Pasteurella multocida* tiene un papel destacado como patógeno en los conejos de granja. Sin embargo, en el ámbito experimental se han logrado reproducir cuadros patológicos con *Mannheimia haemolytica* (Ramirez-Romero *et al.*, 1997) y, en una granja libre de *P. multocida* se ha podido aislar *Pasteurella pneumotropica*, pero sin que se demostrase su participación en proceso patológico alguno (Kirchner *et al.*, 1983; Rosell, 2000).

Pasteurella multocida es una bacteria Gram negativa, de forma cocobacilar de 0,5x1µ, inmóvil, sin esporas ni flagelos, aerobia facultativa. Requiere para su crecimiento la presencia de ciertos aminoácidos y vitaminas pero, a diferencia de otros géneros de la familia *Pasteurellaceae*, no es NAD dependiente. Es aconsejable para su aislamiento el cultivo en medios que contengan sangre, donde da colonias no hemolíticas. Crece bien en medios ricos como TSA o BHA y no es capaz de crecer en medios selectivos como el MacConkey o el SS. Todas las cepas de *P. multocida*

aisladas de conejo son catalasa, oxidasa e indol positivas, así como fermentadoras de la sacarosa y el manitol.

Este microorganismo es muy sensible a los tratamientos físico-químicos. Las temperaturas de 60°C son capaces de destruir la bacteria en pocos minutos así como los ambientes secos durante 1 o 2 días. Puede resistir durante algunos días a 4°C, pero es capaz de sobrevivir durante semanas en los purines y en el interior de los cadáveres.

2.1. Factores de virulencia

Los principales factores de virulencia descritos para *P. multocida* son la cápsula, el lipopolisacárido, las toxinas, las proteínas de exterior de membrana, los factores relacionados con la adquisición del hierro, las adhesinas y fimbrias y las sialidasas.

Cápsula

En 1995 Carter desarrolló una prueba de hemaglutinación indirecta y clasificó las cepas en función de sus antígenos capsulares en cuatro serogrupos: A, B, D y E. El serogrupo F, un nuevo serogrupo capsular de *P. multocida*, se describió más tarde (Rimler y Rhoades, 1987) a partir de cepas que fueron aisladas por primera vez en pavos en EE.UU.

Como la mayoría de las bacterias Gram negativas, la cápsula está formada por carbohidratos (Pyliotis y Mukkur, 1981; Manning, 1984). En algunos serotipos la cápsula contiene una elevada cantidad de ácido hialurónico. Esta cantidad es mayor en las cepas con serotipo capsular A que en las cepas con serotipo capsular D. El ácido hialurónico hace que aumente la capacidad de adhesión a la célula hospedadora (Glorioso *et al.*, 1982; Esslinger *et al.*, 1994). Sin embargo este componente capsular es no-antigénico y hace imposible la producción de anticuerpos (Carter, 1955; Namioka y Murata, 1961).

La cápsula de tipo D parece contener heparina y la de tipo F condroitin sulfato (Pandit y Smith, 1993; Rimler, 1994; DeAngelis y Padgett-McCue, 2000). El tipo capsular B contiene arabinosa, manosa y galactosa entre otros monosacáridos, pero se

desconoce su estructura (Muniandy *et al.*, 1992; Townsend *et al.*, 2001), mientras que aún se desconoce la composición de la cápsula de tipo E.

Es ampliamente aceptado que la cápsula juega un papel importante en la resistencia a la fagocitosis, y esto ha sido demostrado *in vitro* por Harmon *et al.*, (1991) que correlacionaron la sensibilidad a la fagocitosis con la presencia y el grosor de la cápsula bacteriana (Truscott y Hirsh, 1988; Harmon *et al.*, 1991; Pruimboom *et al.*, 1996). Sin embargo no tiene ningún papel positivo en la fase de colonización de las vías respiratorias altas y su presencia es, por el contrario, un factor negativo (Jaques *et al.*, 1993). En términos generales las bacterias que tienen cápsula son más virulentas que las variantes acapsuladas (Snipes *et al.*, 1987; Tsuji y Matsumoto, 1989; Jacques *et al.*, 1993). Además, la cápsula favorece la supervivencia del microorganismo en el medio ambiente y su transmisión al hospedador ya que es capaz de conferir resistencia a la desecación (Boyce *et al.*, 2000).

Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS) de *P. multocida* juega un papel crítico en la patogénesis de la enfermedad y además puede jugar también un importante papel en la fase de colonización nasal (Lebrun *et al.*, 1992, Jaques *et al.*, 1993). Estimula la inmunidad humoral y se considera que los anticuerpos que se producen frente a él son protectores. Los anticuerpos monoclonales producidos contra el lipopolisacárido de una cepa de serotipo A, fueron bactericidas y protegieron ratones contra el desafío homólogo (Wijewardana *et al.*, 1990). Además, un anticuerpo monoclonal de opsonización contra el lipopolisacárido de una cepa del serotipo B de *P. multocida* protegió parcialmente ratones contra la infección (Ramdani y Adler, 1991).

El lipopolisacárido de *P. multocida* aislado a partir de dos cepas de tipo I (clasificación de Heddleston) contiene residuos terminales de fosfocolina, que en otras bacterias juega un papel clave en la adhesión bacteriana y en la invasión de las células huésped mediante la unión directamente al factor activador de plaquetas del receptor (PAF) (Cundell *et al.*, 1995; Schenkein *et al.*, 2000; Serino y Virji, 2002). Aunque el papel de los residuos de fosfocolina en el lipopolisacárido de *P. multocida* sigue siendo desconocido, se ha demostrado en el modelo bovino que el lipopolisacárido ayuda en la

adhesión a los neutrófilos y en la trans migración a través de células endoteliales (Galdiero *et al.*, 2000).

En 1972 Heddlestone propuso otro método de clasificación de *P. multocida* basado en las características del antígeno somático, lo que permitía distinguir 16 serotipos diferentes. Finalmente, en 1981, Carter y Chengappa propusieron adoptar el sistema de clasificación de Carter-Heddlestone. Este último sistema de clasificación estaba basado en el antígeno capsular y en el antígeno somático.

Toxinas

Aunque en la mayoría de las cepas de *P. multocida* que causan enfermedades como el cólera aviar, la septicemia hemorrágica o las neumonías, se desconoce si se expresan o no toxinas, la producción de toxina está descrita como participante en la capacidad de colonización de las fosas nasales por *P. multocida* (Pijoan y Trigo, 1990; Suckow *et al.*, 1995). En este sentido, la toxina dermonecrótica (PMT) está expresada principalmente por las cepas del serogrupo D y es la responsable de los signos clínicos y patológicos de la rinitis atrófica en porcino (Foged *et al.*, 1987; Rimler y Rhoades, 1989). Esta toxina es también un importante factor de virulencia de algunos aislados de conejos (Suckow, *et al.*, 1995). El gen que codifica la PMT fue aislado y caracterizado por Petersen y Foged (1989), siendo denominado *toxA*.

También se han aislado cepas toxigénicas de *P. multocida* en otras especies animales como vacas, cabras, conejos, gatos, humanos, perros, pavos, etc., tanto en individuos asintomáticos como con diferentes patologías (de Jong, 1980; Kielstein, 1986; Nielsen *et al.*, 1986; Rimler y Brogden, 1986).

La capacidad del toxoide de *P. multocida* para instaurar una perfecta respuesta inmunitaria se ha demostrado ampliamente. Esta respuesta es capaz de neutralizar los efectos de la toxina termolábil causante de rinitis atrófica en el cerdo (Frymus *et al.*, 1989; Bording y Foged, 1991; Confer, 1993; Sakano *et al.*, 1997).

Proteínas de exterior de membrana

Las proteínas de exterior de membrana (OMPs, *Outer Membrane Proteins*) están presentes en muchas bacterias Gram negativas. Las OMPs de *P. multocida* son de particular interés ya que están relacionadas con el potencial patógeno de las bacterias y por lo tanto, poseen propiedades inmunogénicas (Kennet *et al.*, 1993; Srivastava, 1998a; Borkowska-Opacka y Kedrak, 2002). Además determinadas proteínas de la membrana externa están relacionadas con la fase de colonización nasal (Lu *et al.*, 1991a).

Los anticuerpos monoclonales producidos contra las OMPs son capaces de proteger pasivamente conejos y ratones contra la infección por *P. multocida*, observándose una fuerte protección cuando se utilizan cepas homólogas y una protección limitada frente a cepas heterólogas (Lu *et al.*, 1991). Una de las principales proteínas de la membrana externa de *P. multocida* es OmpH.

Factores relacionados con la adquisición de hierro.

El hierro es un elemento crítico requerido por casi todas las células vivas. Es esencial para el crecimiento bacteriano y la replicación, así como para el establecimiento y la progresión de la infección. Sin embargo, debido a su toxicidad inherente, el nivel de hierro libre disponible *in vivo* es muy limitado, por lo que *P. multocida*, al igual que otras especies bacterianas, ha desarrollado múltiples mecanismos para la absorción de hierro (May *et al.*, 2001).

Las proteínas de exterior de membrana sintetizadas por muchos patógenos bacterianos Gram negativos se unen a diferentes moléculas de unión al hierro, incluyendo la transferrina, lactoferrina, compuestos hemo o ferritina, presentes en la sangre y en la mucosa de sus organismos hospedadores (Abel *et al.*, 2007). La expresión de casi todas estas OMPs está bajo el control del FUR (proteína reguladora de la captación del hierro) que se une al hierro en el citoplasma de las células bacterianas (Stojiljkovic *et al.*, 1994). Muchas proteínas de exterior de membrana reguladas por el hierro son potentes antígenos así como factores de virulencia esenciales durante el proceso de infección (Ratledge *et al.*, 2000). Las proteínas de unión a la hemoglobina son las denominadas HgbA y HgbB, codificadas por los genes *hgbA* y *hgbB*, respectivamente, y cuya expresión está regulada por el hierro (Bosch *et al.*, 2002b).

Ninguna de ellas juega, aparentemente, papel alguno en la virulencia, pero sí en la supervivencia y en el crecimiento de *P. multocida* (Bosch *et al.*, 2002b; Cox *et al.*, 2003). Los receptores de la transferrina utilizados por especies bacterianas de las Familias *Pasteurellaceae* y *Neisseriaceae* suelen consistir en dos receptores de unión a hierro TbpA y TbpB (Gray-Owen y Schryvers, 1996), pero la evidencia reciente sugiere que el receptor de la transferrina en las cepas de la especie bovina de *P. multocida* es una proteína única TbpA (Ogunnariwo y Schryvers, 2001).

Adhesinas y fimbrias

Hay muchos genes en el genoma de *P. multocida* que codifican proteínas similares a las fimbrias en otras bacterias. Es probable que las fimbrias desempeñen un papel en la adhesión a la superficie, como se ha observado en fimbrias de algunos aislados de *P. multocida* del tipo capsular A (Glorioso *et al.*, 1982; Rebers *et al.*, 1988; Isaacson y Trigo, 1995; Ruffolo *et al.*, 1997).

Se han aislado y caracterizado fimbrias del tipo IV a partir de cepas de *P. multocida* con los serotipos A, B y D (Ruffolo *et al.*, 1997) las cuales a menudo están asociadas con la virulencia en otras bacterias, uniéndose a la superficie de la célula hospedadora. Estas fimbrias están codificadas por el gen *ptfA* (Doughty *et al.*, 2000).

Dos genes de *P. multocida*, el *pfhA* B1 y el *pfhA* B2 comparten una similitud significativa con una clase de genes que codifican otro tipo de adhesinas, las hemaglutininas filamentosas, que en *Bordetella pertussis* juegan un papel importante en la colonización del tracto respiratorio superior favoreciendo la adhesión a su epitelio (Kimura *et al.*, 1990; Mooi *et al.*, 1992).

Metabolismo del ácido siálico

Los genes *nanH* y *nanB* codifican para dos sialidasas: NanH y NanB respectivamente (Mizan *et al.*, 2000). Las sialidasas son producidas por algunas especies bacterianas y actúan eliminando el ácido siálico de las proteínas y los lípidos glicosilados de los hospedadores, para su propio uso como fuente de carbono. Estas enzimas también pueden aumentar la virulencia bacteriana descubriendo receptores clave de las

membranas mucosas del hospedador y/o reduciendo la eficacia de las defensas de éste. La mayoría de las cepas de *P. multocida* producen sialidasas (Scharmann *et al.*, 1970; Drzeniek *et al.*, 1972; White *et al.*, 1995).

2.2. Caracterización de cepas y estudios previos de cepas aisladas en conejo

Numerosos estudios abordan las características serológicas de los aislados de *P. multocida* en conejos (Perreau *et al.*, 1962; Lu *et al.*, 1978,1983; Chengappa *et al.*, 1982; Manning, 1984; Rideaud *et al.*, 1992b; Rideaud y Coudert, 1994; Jaglic *et al.*, 2004). Los serogrupos A, D, B y F se han encontrado en estas cepas. El serogrupo A es el más ampliamente encontrado (Perreau *et al.*, 1962; Chengappa *et al.*, 1982; Lu *et al.*, 1983; Rideau *et al.*, 1992a; Rideau y Coudert 1994); el serogrupo D es poco frecuente y generalmente limitado a granjas pequeñas o instalaciones de laboratorio(Manning, 1984; Jaglic *et al.*, 2004; Virag *et al.*, 2005).

En conejos, las características antigénicas no han sido suficientes para caracterizar las cepas de *P. multocida* de acuerdo con su patogenicidad o su origen epidemiológico. Cepas del mismo serotipo pueden tener diferentes patogenicidades. En los EE.UU. el serotipo A:12 (método de Heddlestone) podría ser el más frecuente (Chengappa *et al.*, 1982) y el más patógeno. En lo que respecta a *P. multocida* en las granjas intensivas de Europa, nunca ha sido posible establecer una relación entre patogenicidad y serotipo. En un estudio de aislados de *P. multocida* a partir de la mucosa nasal de conejos sanos y de lesiones halladas en conejos muertos, las cepas exhibieron heterogenicidad genética pero sin ninguna correlación con el estado de los conejos muestreados. Esto sugiere que los conejos sanos pueden actuar como reservorios de cepas patógenas de *P. multocida* (Virag *et al.*, 2005).

Recientemente en nuestro país se tipificaron 102 aislamientos de *P. multocida* a partir de distintos procesos patológicos de conejo (procesos respiratorios, abscesos cutáneos, mamitis, procesos reproductivos y septicemias) que provenían de 24 provincias españolas y Portugal. El serotipo A fue el serotipo capsular más frecuente, englobando casi la mitad de las cepas (48%). El resto de las cepas se distribuyó casi por igual entre los serotipos D (25,5%) y el F (24,5%). En cuanto a la asociación de los serotipos capsulares y los procesos patológicos, los serotipos A y F se aislaron de

cualquier tipo de proceso mientras que el serotipo D pareció asociarse a los procesos respiratorios y septicémicos. En ninguno de los aislados se detectó el gen de la necrotoxina de *P. multocida* (toxA) y tan solo un aislado dio resultado positivo para el gen *tbpA*, el cual hasta ahora se ha descrito exclusivamente en aislados de *P. multocida* de rumiantes (Atashpaz *et al.*, 2009). Más del 60% de los aislados fueron positivos al gen *hgbB* y muchos de ellos negativos tanto al gen *hgbB* como al *tbpA*. No se detectó una asociación significativa entre los distintos factores de virulencia testados en el estudio y el proceso patológico. En cuanto a la procedencia geográfica, no se detectaron agrupaciones de serotipos (datos no publicados).

En un estudio en Texas (EE.UU.) llevado a cabo entre los años 1977 y 1981 en el cual los aislamientos fueron testados sólo para los antígenos capsulares A o D, los principales serotipos de *P. multocida* aislados a partir de la cavidad nasal de conejos sanos eran serotipos 12:A (33%), no tipificable:A (50%), y no tipificable:D (10%). Por otra parte, los serotipos más importantes de *P. multocida* obtenidos de conejos que presentaban rinitis, neumonía, conjuntivitis, otitis o abscesos cutáneos eran 12:A (32%), no tipificable:A (30%), y 3:A (16%). El serotipo 12:A fue el predominante independientemente de si los aislamientos fueron recuperados de animales sanos o enfermos (Lu *et al.*, 1983), tal y como se comprobó en otro estudio en Canadá, a partir de los aislados que se obtuvieron de infecciones respiratorias superiores, bronconeumonías, neumonías fibrinosas agudas, abscesos y otitis media. El 47% eran de tipo 12:A, el 30,5% 3:D y el 12% eran 3:A. El antígeno somático 3 se aisló mayoritariamente de neumonías agudas, mientras que el serogrupo 12:A fue más frecuente en las infecciones del tracto respiratorio superior y en la bronconeumonía crónica localizada (Percy *et al.*, 1984).

Como se ha mencionado anteriormente, las cepas del serogrupo F en aislados de conejo se han detectado recientemente cuando se ha dispuesto de la tipificación genética molecular de los genes de la cápsula (Jaglic *et al.*, 2004; Virag *et al.*, 2005). En varias explotaciones de la República Checa durante el período comprendido entre 2001 y 2004 se analizaron una serie de aislamientos por PCR para determinar el antígeno capsular. A parte de los aislados identificados como serogrupos A (58,4%) y D (8,3%), el 33,3% de los aislamientos se identificaron como miembros del serogrupo F. Este serogrupo había sido principalmente asociado hasta ahora con las infecciones de aves. Posteriormente en el año 2008, este mismo grupo de investigadores estudió el papel del serogrupo F de *P.*

multocida, induciendo la enfermedad en conejos. Tres grupos de conejos libres de *Pasteurella* fueron desafiados por vía intranasal, subcutánea y por vía oral respectivamente. Seis conejos de cada grupo fueron inmunosuprimidos con dexametasona. Las observaciones en este estudio indicaron que, además de los serogrupos A y D, el serogrupo F también podía ser altamente patógeno para los conejos y por lo tanto, podría ser causante de pérdidas económicas considerables en producción (Jaglic *et al.*, 2008).

También en el continente americano se han hecho estudios sobre la tipificación de cepas de *P. multocida*. Por ejemplo en México, de un total de 34 aislamientos de *P. multocida* de conejos y de otros animales domésticos con problemas respiratorios se obtuvo un aislado de ovejas que resultó pertenecer al serogrupo capsular D, mientras que el resto de los aislados de conejos, ovejas, vacas, cerdos, cabras y patos pertenecieron al serogrupo capsular A. Este fue el primer informe del tipo capsular A de *P. multocida* aislada a partir de conejos y patos en México (Soriano-Vargas *et al.*, 2011). Por otra parte en granjas de conejos con síntomas respiratorios en São Paulo (Brasil), el 45,6 % de los aislados pertenecían a tipo capsular A y el 54,34 % de los aislamientos fueron no tipificables. Ninguna de las cepas albergaba genes *toxA* o *pflA* (Porfida Ferrerira *et al.*, 2012).

3. Control de la Pasteurelosis

Las manifestaciones clínicas y las pérdidas de productividad pueden controlarse mediante la utilización de antibióticos y quimioterápicos, aplicados generalmente en el agua de bebida o en piensos medicados (Rosell *et al.*, 2000). La mayoría de aislamientos de *P. multocida* son sensibles a penicilina, un antibiótico que por sus características no puede utilizarse por vía oral y se reserva para la intervención parenteral a hembras y machos de alto valor. Las tetraciclinas por vía intramuscular o subcutánea (oxitetraciclina o tetraciclina), los derivados de nitrofuranos y aminoglucósidos (estreptomina o DH-estreptomina, gentamicina) y las quinolonas (flumequina o enrofloxacina) han dado resultados más o menos exitosos (Coudert *et al.*, 2006). La tilmicosina es otro de los quimioterápicos con una elevada actividad frente a *P. multocida* pero por sus características miocardiotoxicas, solo puede ser utilizada por vía subcutánea (Rosell *et al.*, 2000).

Sin embargo el tratamiento antibiótico de *Pasteurella* es caro, largo e ineficaz debido a la cada vez mayor resistencia a los antibióticos de la bacteria. El ácido hialurónico presente en la cápsula del microorganismo puede prevenir que ciertos medicamentos puedan penetrar en las bacterias (Beckenlehner *et al.*, 1992). Algunos autores han descrito recidivas frecuentes de la enfermedad después de los tratamientos (Broome y Brooks, 1991) o la ineficacia de los tratamientos antibióticos (Jaslow *et al.*, 1981; Mähler *et al.*, 1995).

Las medidas higienico-sanitarias a tomar para prevenir y controlar la pasteurelosis consisten en el control de la humedad, la temperatura y la ventilación de la explotación, controlar la densidad de animales, adecuada limpieza y desinfección de jaulas, suelos y paredes, evitar situaciones estresantes, cuarentena de todos los animales que se introducen y eliminación de enfermos (Astorga *et al.*, 1997).

Uno de los problemas prácticos básicos de la pasteurelosis en las granjas es la existencia de un elevado número de animales portadores inaparentes, cuyo control debe hacerse mediante medidas inmunoprolácticas.

En España no existe ninguna vacuna comercial registrada frente a *P. multocida* en conejos. Se han llevado a cabo numerosos estudios experimentales con vacunas. Sin embargo, la efectividad de dichas vacunas en condiciones de campo nunca ha sido demostrada.

La inmunización intranasal de conejos con una vacuna realizada a partir de la toxina termolábil de *P. multocida* (PMT), estimuló el desarrollo de anticuerpos frente a PMT en el suero y en las superficies de la mucosa de las vías respiratorias. Esta respuesta se consiguió mejorar utilizando la toxina del cólera (CT), un potente adyuvante para el sistema inmune de la mucosa (Suckow *et al.*, 1995). También la vacunación intranasal de conejos con proteínas externas de membrana (OMP) de *P. multocida* (A:3) que expresan proteínas reguladas por el hierro (IROMP) en combinación con la toxina del cólera (CT) como adyuvante, estimuló la respuesta de anticuerpos tanto en la mucosa como en el suero. Además esta vacuna fue capaz de estimular la inmunidad frente a la neumonía producida por *Pasteurella* realizando un desafío experimental (Confer *et al.*, 2001).

La vacunación oral es una forma simple y eficiente para inducir inmunidad frente a patógenos infecciosos que colonizan las superficies mucosas. En otro estudio realizado por Suckow en 1996, se utilizaron microesferas de alginato que incorporaban en su interior extracto de tiocianato de potasio (PTE) de *P. multocida* como inmunógeno. De esta forma los antígenos quedaban protegidos de la degradación enzimática del tracto digestivo. La administración de estas microesferas en el agua potable estimuló de forma significativa los niveles de anticuerpos anti-PTE en suero y en los lavados nasales de los conejos. Además se desarrolló una inmunidad protectora frente al desafío vía intranasal con *P. multocida*. El extracto de tiocianato de potasio (PTE) producido por *P. multocida* con el serotipo D:3,12,15 se utilizó en un estudio de campo para vacunar conejos libres de *Pasteurella* y posteriormente introducirlos en una explotación con pasteurelisis endémica con el serotipo A:3. La vacuna estimuló la inmunidad protectora frente a la cepa heteróloga, obteniéndose unos mejores resultados administrando la vacuna por la vía subcutánea en comparación con la vía intramuscular (Suckow *et al.*, 2008).

En un estudio reciente en Egipto se ha evaluado el efecto protector de los propóleos como adyuvantes ya que, debido a sus propiedades biológicas y farmacológicas (antimicrobianos, antiinflamatorios, antioxidantes, antiparasitarios, estimulantes de la inmunidad) ha crecido el interés por su uso en combinación con las vacunas. En este estudio se demostró que con un extracto etanólico de propóleos administrado por vía subcutánea tanto sólo, como combinado con una bacterina inactivada con formol de *P. multocida*, se mejoraron las condiciones generales de salud de los conejos además de reducir la gravedad de los signos clínicos adversos, las tasas de mortalidad, y los cambios histopatológicos asociados con el desafío de los conejos con una cepa de *P. multocida* (Nassar *et al.*, 2013).

Por los variables resultados obtenidos con una bacterina estándar y por los mejores resultados aportados por las autobacterinas (vacunas bacterianas producidas con las cepas de los microorganismos aislados de la explotación donde se aplican), parecería que los antígenos básicos para neutralizar la infección por *P. multocida* han de ser algunos componentes minoritarios de las estructuras superficiales de la bacteria. Además hay que tener en cuenta la existencia de una gran variedad de cepas en las explotaciones, como ha podido demostrarse (Badiola *et al.*, 1996).

4. Estudios experimentales de *Pasteurella multocida* en el modelo ratón

Los modelos con grandes animales son costosos y requieren instalaciones especializadas para experimentación, por ello varios modelos de animales pequeños han sido ampliamente empleados para estudiar las diferentes enfermedades. La lista incluye ratones, ratas y conejos que se han utilizado para evaluar diferentes estrategias terapéuticas. Son asequibles, de fácil cuidado y manejo, y no requieren grandes espacios para el mantenimiento. Además, pueden utilizarse suficientes animales en un solo estudio para llevar a cabo el análisis estadístico.

En este sentido se han realizado numerosos estudios en los cuales los ratones han demostrado ser sensibles a este agente. En 1973 F.M. Collins ya describió que los ratones CD-1 libres de patógenos específicos eran altamente susceptibles a la infección por *P. multocida*. Utilizó para su ensayo la cepa 5A aislada de pavos y la introdujo por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o aerógena. La mayoría de las cepas aviarias encapsuladas causantes del cólera aviar, también son virulentas para ratones por ello este modelo se ha utilizado para los ensayos experimentales de las vacunas contra *P. multocida* (Collins 1973). Posteriormente utilizó esta misma cepa para estudiar la respuesta inmune de ratones infectados de forma experimental (Woolcock y Collins 1976).

Durante los años 80 poco se sabía acerca de la septicemia hemorrágica, una enfermedad infecciosa reconocida desde hace años que afecta a bovinos y búfalos y está causada por serotipos particulares de *P. multocida*. Este desconocimiento era debido principalmente a la falta de modelos animales adecuados. Para estudiar la enfermedad se empleó también el modelo ratón, el cual permitió evaluar la dosis infectiva, la cinética de infección, la patología de la enfermedad y la resistencia a la reinfección utilizando ratones BALB/c (Ramdani *et al.*, 1989). Gracias a este modelo se pudieron realizar otros estudios posteriores relacionados con esta enfermedad: en 2002 se realizó un estudio cuyos objetivos fueron la construcción de mutaciones definidas en los genes *aroA* de dos cepas de *P. multocida* con el serotipo B:2 para ponerlas a prueba en un modelo ratón experimental y así determinar su grado de atenuación y sus propiedades de protección, así como para comparar los derivados mutantes con las cepas parentales para la propagación y persistencia en el hospedador (Tabatabaei *et al.*, 2002). Más

adelante en 2005 se utilizó el modelo ratón para evaluar la eficacia inmunoprotectora de una vacuna obtenida a partir de las OMPs de *P. multocida* utilizando el serotipo de la septicemia hemorrágica (B:6) combinada con adyuvantes mejorados frente a un desafío homólogo (Basagoudanavar *et al.*, 2006).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La pasteurellosis, causada por *Pasteurella multocida*, es una de las principales enfermedades de la cunicultura industrial. Dada la inexistencia de vacunas comerciales frente a *P. multocida* en conejos, la única alternativa actual de inmunoprofilaxis descansa en la utilización de autovacunas, bacterinas elaboradas con cepas aisladas de una explotación para ser aplicadas en dicha explotación. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante la aplicación de las mismas no siempre han sido satisfactorios. El objetivo principal de este trabajo es valorar como mejorar los resultados de las autovacunas frente a *P. multocida* de conejos basándonos para ello en un modelo animal previamente establecido como válido, el modelo ratón.

Los objetivos específicos han sido:

- Establecer y ajustar un modelo ratón bajo las condiciones de nuestro laboratorio basado en la letalidad producida por cepas de *P. multocida* aisladas de conejo.

- Valorar la eficacia de una autovacuna basada en una bacterina convencional frente a una autovacuna basada en la introducción de antígenos en liposomas en dicho modelo animal.

- Valorar la protección conferida por distintas bacterinas elaboradas con distintas cepas frente al desafío con una cepa virulenta.

- Valorar la protección cruzada conferida por una vacuna elaborada con una cepa frente al desafío con cepas de distinto tipo capsular y perfil de virulencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas

Las cepas de *P. multocida* utilizadas para este estudio fueron obtenidas a partir de muestras tomadas por veterinarios clínicos de procesos patológicos de conejos que llegaron al laboratorio Exopol para su diagnóstico entre los años 2010 y 2012 procedentes de distintas regiones de España (Tabla I). Las muestras se cultivaron a 37°C en agar sangre Columbia (OXOID PB5039A) y las cepas obtenidas fueron identificadas como *P. multocida* mediante pruebas bioquímicas estandarizadas, incluyendo la producción de catalasa, oxidasa e indol, actividad ureasa, citrato y TSI (Triple Sugar Iron) (Quinn *et al*, 1994).

Todas las cepas fermentaban el TSI, sin producción de gas ni de ácido sulfhídrico y eran Catalasa +, Oxidasa +, Indol +, Urea - y Citrato -.

Cepa ^a	Origen
70336	Proceso respiratorio
67576	Septicemia
69193	Proceso respiratorio
74622 AII	Proceso respiratorio
73739 AII	Proceso respiratorio
76918 AI	Proceso reproductivo
76939 AIII	Absceso cutáneo/mamitis
76236 AIV	Proceso respiratorio
75039 DII	Septicemia
76849 FI	Proceso respiratorio
73688 FII	Absceso cutáneo/mamitis
76154 FIII	Septicemia

Tabla I. Cepas utilizadas y origen. ^a La letra indica el serotipo capsular y los números romanos el perfil de virulencia.

Nueve de las 12 cepas utilizadas se caracterizaron genéticamente por PCR para determinar la presencia de genes codificadores del serotipo capsular y de determinados factores de virulencia. Esta caracterización incluyó los genes *toxA*, *tpbA*, *hgbB*, *pfhA* y

se realizó en el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad Complutense de Madrid. En función de la detección de los factores de virulencia las cepas se caracterizaron en los perfiles de virulencia que se muestran en la Tabla II.

PERFIL	toxA +	tbpA A+	hgbB+	pfhA +
I	-	-	+	+
II	-	-	+	-
III	-	-	-	+
IV	-	-	-	-

Tabla II. Perfiles de virulencia observados en las distintas cepas de *P. multocida*.

Animales y condiciones de alojamiento

Se utilizaron hembras de ratones Hsd: ICR (CD-1) (Harlan Ibérica, Barcelona, Spain) con un peso de 25-30gr. que se alojaron en jaulas de 10 individuos cada una. Los animales se alimentaron con un pienso comercial para ratones y agua *ad libitum*. Los ratones tuvieron un período de adaptación en las instalaciones de una semana antes de ser utilizados para los diversos estudios. El animalario presentaba unas condiciones ambientales controladas: se mantuvo una temperatura de 24-25°C con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad además de un sistema de extracción de aire.

Vacunas utilizadas

Se elaboraron bacterinas con las siguientes cepas de *P. multocida*: 70336, 67576, 69193, 74622 AII, 73739 AII, 76918 AI, 76939 AIII, 76236 AIV, 75039 DII, 76849 FI, 73688 FII y 76154 FIII. Para ello cada una de las cepas de *P. multocida* fue descongelada a temperatura ambiente y sembrada en placas de agar sangre. A continuación las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Una vez comprobada la pureza de la cepa, el crecimiento obtenido en cada placa se recogió con asa de Drigalsky en 3 ml de PBS (Phosphate buffered saline) creando una suspensión densa y homogénea a partir de la cual se sembraron nuevamente placas de agar sangre en función de la cantidad de bacterina necesaria. Estas se incubaron a 37°C durante 24 horas. El crecimiento de todas las placas cultivadas se recogió de nuevo en PBS. La suspensión bacteriana final se homogeneizó y, para calcular la concentración, se llevó a cabo un recuento de las bacterias viables mediante diluciones en base 10 y siembra de dichas

diluciones en placas de agar sangre. Las bacterias en suspensión fueron inactivadas mediante la adición de formol comercial al 1% durante 24 horas a temperatura ambiente. El recuento de colonias en las placas inoculadas con las distintas diluciones se realizó tras 24 horas de incubación a 37°C. La suspensión inactivada se sembró en agar sangre y en TSB (Tryptic Soy Broth, Oxoid) que se incubaron a 37°C durante 24 horas para así verificar la ausencia de crecimiento bacteriano. Finalmente la suspensión se ajustó con PBS estéril a una concentración final de 4×10^9 ufc/ml y se añadió Hidróxido de Aluminio (General Chemical) como adyuvante a una concentración final del 1%. La bacterina terminada se dispensó en viales estériles de 10 ml y se conservó refrigerada en nevera hasta su uso posterior. Por otra parte se utilizó una vacuna elaborada en el laboratorio Exopol a partir de la cepa 70336 con el método descrito previamente por Amorena *et al.*, 1994* para diversas especies de *Staphylococcus*. Básicamente la producción de dicha vacuna consistió en la obtención de exopolisacáridos liberados durante el cultivo en medio líquido al sobrenadante, concentrados mediante ultrafiltración e incluidos en liposomas y posteriormente liofilizados.

Determinación de la dosis letal 50

La dosis letal 50 (DL50) de cada cepa de *P. multocida* utilizada en cada desafío fue determinada antes de comenzar cada ensayo. Las cepas para las que la DL50 fue establecida fueron las siguientes: 70336, 74622 AII, 73739 AII, 76918 AI, 76939 AIII, 76236 AIV, 75039 DII, 76849 FI, 73688 FII y 76154 FIII. Para ello se obtuvieron suspensiones bacterianas de cada una de esas cepas a partir de cultivos de 24 horas que se ajustaron añadiendo PBS a una concentración de 2×10^8 ufc/ml mediante espectrofotometría a 600 nm. Se realizaron diversas diluciones que se inocularon a grupos de 6 ratones hasta calcular la cantidad mínima de bacterias necesarias para producir la mortalidad de al menos la mitad de los ratones durante una semana.

Diseño experimental

Para cada uno de los ensayos vacunales se trabajó con grupos de 10 animales alojados en la misma jaula que recibían el mismo tratamiento. Pasado el periodo de adaptación, cada uno de los grupos recibió dos dosis de su vacuna correspondiente a razón de 0,25ml por vía subcutánea, con un intervalo de 14 días entre vacuna y revacuna. El grupo control se inoculó con PBS también con dos dosis para que todos los grupos de

animales recibieran la misma manipulación. Entre los 17-20 días después de la segunda dosis de vacuna se desafió a los ratones con la DL50 de cada una de las cepas de *P. multocida* seleccionada para cada ensayo en 0,5ml administrados por vía intraperitoneal. La preparación de las suspensiones bacterianas utilizadas para el desafío se preparó el mismo día que se iban a inocular los ratones para que las bacterias mantuvieran su máxima actividad y poder patógeno.

A partir del día del desafío se hicieron recuentos diarios de mortalidad durante una semana. Se realizó la necropsia de los animales muertos y se sembraron en agar sangre Columbia y en agar McConkey (OXOID CM0115) el pulmón y el hígado. Finalmente se calculó el porcentaje de mortalidad y el índice de protección de cada grupo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ÍNDICE PROTECCIÓN: } (\% \text{muertos grupo control} - \% \text{muertos grupo vacunado}) / \% \text{muertos grupo control}$$

Los ratones que no fallecieron pasada una semana se sacrificaron mediante dislocación cervical y se necropsiaron para realizar el cultivo microbiológico de hígado y riñón.

Análisis estadísticos

Para cada ensayo, se comparó la mortalidad entre grupos utilizando tablas de contingencia y análisis de *Chi*-cuadrado (StatView 5.0.). El grado de significación se estableció para un valor de $p < 0.05$. También se comparó el tiempo medio de supervivencia de los ratones de cada grupo para cada ensayo mediante curvas de supervivencia de Kapla-Meier (MedCalc software, <http://www.medcalc.org>).

Ensayos experimentales

- **Ensayo 1: comparación de la protección conferida a ratones por una bacterina o una vacuna basada en exopolisacáridos incluidos en liposomas elaboradas con la misma cepa que se utiliza en el desafío.**

Tanto la bacterina como la vacuna con liposomas se elaboraron con la cepa 70336. Se establecieron 4 grupos de animales (G1, G2, G3 y G4). En la tabla III queda reflejado el tipo de tratamiento administrado a cada uno de los grupos siendo el G4 el grupo control inoculado con PBS. En el G1, los exopolisacáridos liofilizados se resuspendieron con la autobacterina obteniéndose una suspensión combinada que actuó como vacuna. La vacuna del G2 estaba hecha solamente con exopolisacáridos liofilizados que se resuspendieron en aluminio al 1% y la vacuna del G3 era la autobacterina. Todos los grupos se desafiaron con la DL50 estimada para esta cepa de *P. multocida* 70336 (500 ufc/ratón).

	Tratamiento	Cepa de desafío	Dosis de desafío
GRUPO 1	Vacuna combinada: exopolisacáridos + autobacterina 70336	70336	500 ufc/ratón
GRUPO 2	Vacuna con exopolisacáridos	70336	500 ufc/ratón
GRUPO 3	Autobacterina 70336	70336	500 ufc/ratón
GRUPO 4 CONTROL	PBS	70336	500 ufc/ratón

Tabla III: tratamiento administrado a los grupos del ensayo 1.

- **Ensayo 2: comparación de la protección conferida por una autobacterina frente a otras bacterinas elaboradas con cepas distintas a la utilizada en el desafío.**

Se establecieron 4 grupos de animales (G1, G2, G3 y G4). En la tabla IV queda reflejado el tipo de tratamiento administrado a cada uno de los grupos siendo el G2 en este caso el grupo control. Todos los grupos se desafiaron con la cepa de *P. multocida* 70336 con una dosis de 500 ufc/ratón.

	Tratamiento	Cepa de desafío	Dosis de desafío
GRUPO 1	Autobacterina 70336	70336	500 ufc/ratón
GRUPO 2 CONTROL	PBS	70336	500 ufc/ratón
GRUPO 3	Bacterina 67576	70336	500 ufc/ratón
GRUPO 4	Bacterina 69193	70336	500 ufc/ratón

Tabla IV: tratamiento administrado a los grupos del ensayo 2.

- **Ensayo 3: comparación de la protección conferida por una autobacterina frente a otras bacterinas elaboradas con cepas de distintos serotipos capsulares y perfiles de virulencia y distintas a la cepa utilizada en el desafío.**

En la tabla V queda reflejado el tipo de tratamiento administrado a cada uno de los grupos siendo el G10 en este caso el grupo control. Todos los grupos se desafiaron con la cepa de *P. multocida* 74622 AII. La DL50 calculada previamente para esta cepa fue de 40.000 ufc/ratón. Sin embargo, debido a la dificultad para ajustar la concentración, inoculamos finalmente 89.000 ufc/ratón. El grupo 1 se vacunó con la autobacterina de la cepa 74622 AII (misma cepa del desafío final) y el resto de grupos se vacunaron con una bacterina diferente.

	Tratamiento	Cepa de desafío	Dosis de desafío
GRUPO 1	Autobacterina 74622 AII	74622 AII	89.000 ufc/ratón
GRUPO 2	Bacterina 73739 AII	74622 AII	89.000 ufc/ratón
GRUPO 3	Bacterina 76918 AI	74622 AII	89.000 ufc/ratón
GRUPO 4	Bacterina 76939 AIII	74622 AII	89.000 ufc/ratón
GRUPO 5	Bacterina 76236 AIV	74622 AII	89.000 ufc/ratón
GRUPO 6	Bacterina 75039 DII	74622 AII	89.000 ufc/ratón
GRUPO 7	Bacterina 76849 FI	74622 AII	89.000 ufc/ratón
GRUPO 8	Bacterina 73688 FII	74622 AII	89.000 ufc/ratón
GRUPO 9	Bacterina 76154 FIII	74622 AII	89.000 ufc/ratón
GRUPO 10	PBS	74622 AII	89.000 ufc/ratón
CONTROL			

Tabla V: tratamiento administrado a los grupos del ensayo 3.

- **Ensayo 4: comparación de la protección conferida por una misma bacteria común para todos los grupos vacunales frente a diferentes cepas de desafío con distintos serotipos capsulares y perfiles de virulencia.**

Se establecieron en total 16 grupos de animales. Los grupos G1A, G2A, G3A, G4A, G5A, G6A, G7A y G8A fueron los grupos vacunados, todos ellos con la bacteria 73739 AII, mientras que los grupos G1B, G2B, G3B, G4B, G5B, G6B, G7B y G8B formados también por 10 animales por grupo, actuaron como grupo control de cada uno de los grupos vacunados correspondientes. En la tabla VI queda reflejado el tipo de tratamiento administrado a cada uno de los grupos así como las cepas utilizadas para el desafío y su dosis de desafío correspondiente.

	Tratamiento	Cepa de desafío	Dosis de desafío
GRUPO 1A	Bacterina 73739AII	76154 FIII	5.000.000 ufc/ratón
GRUPO 1B	PBS	76154 FIII	5.000.000 ufc/ratón
GRUPO 2A	Autobacterina 73739AII	73739 AII	5.000.000 ufc/ratón
GRUPO 2B	PBS	73739 AII	5.000.000 ufc/ratón
GRUPO 3A	Bacterina 73739AII	76918 AI	500 ufc/ratón
GRUPO 3B	PBS	76918 AI	500 ufc/ratón
GRUPO 4A	Bacterina 73739AII	76939 AIII	40.000 ufc/ratón
GRUPO 4B	PBS	76939 AIII	40.000 ufc/ratón
GRUPO 5A	Bacterina 73739AII	76236 AIV	500 ufc/ratón
GRUPO 5B	PBS	76236 AIV	500 ufc/ratón
GRUPO 6A	Bacterina 73739AII	75039 DII	500 ufc/ratón
GRUPO 6B	PBS	75039 DII	500 ufc/ratón
GRUPO 7A	Bacterina 73739AII	76849 FI	5.000.000 ufc/ratón
GRUPO 7B	PBS	76849 FI	5.000.000 ufc/ratón
GRUPO 8A	Bacterina 73739AII	73688 FII	5.000.000 ufc/ratón
GRUPO 8B	PBS	73688 FII	5.000.000 ufc/ratón

Tabla VI: tratamiento administrado a los grupos del ensayo 4 y cepas de desafío.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El modelo animal utilizado en este estudio, basado en la letalidad producida en ratones al ser inoculados con cepas de *P. multocida* aisladas de procesos patológicos de conejos, ha demostrado ser válido, pues se ha conseguido producir letalidad en al menos 50% de los ratones de los grupos controles con todas las cepas utilizadas. Este modelo es por tanto válido también para estudiar la protección conferida por las vacunas utilizadas frente a *P. multocida*, como ya demostraron otros autores anteriormente en ratones (Ryu *et al.*, 2000; Basagoudanavar *et al.*, 2006; Garrido *et al.*, 2008).

Otras especies animales utilizadas en modelos de infección experimental para el estudio de vacunas frente a *P. multocida* son los pollos para el estudio del cólera aviar (Wu *et al.*, 2007) o los conejos (Suckow *et al.*, 1995, 1996; Confer *et al.*, 2001; Nassar *et al.*, 2013). El modelo conejo también se ha utilizado para realizar estudios experimentales sobre la patogenicidad de determinadas cepas de *P. multocida* de tipo capsular F (Jaglic *et al.*, 2008). Sin embargo estos modelos son mucho más difíciles de realizar de forma experimental por la infraestructura necesaria y el coste.

En todos los animales de este estudio que habían sido desafiados con alguna cepa de *P. multocida* y que murieron durante los 7 días post-inoculación se aisló *P. multocida* de al menos uno de los órganos internos muestreados. No se aisló *P. multocida* en ninguno de los animales sacrificados después de una semana desde el desafío. Esto demuestra que murieron por la infección y aquellos animales que no murieron fueron capaces de superarla.

Las dosis letales obtenidas para cada una de las cepas utilizadas en los diferentes ensayos fueron muy variables tal y como se muestra en la tabla VII. La DL50 de cuatro cepas (70336, 76918 AI, 76236 AIV y 75039 DII) fue inferior a 500 ufc. Dada la dificultad de establecer la DL50 real y considerando que en el primer ensayo 500 ufc permitió valorar la protección conferida por las vacunas utilizadas, se utilizó para esas cepas una dosis de desafío de 500 ufc.

Cepa	DL50
70336	<500
74622AII	40.000
73739 AII	5.000.000
76918 AI	<500
76939 AIII	40.000
76236 AIV	<500
75039 DII	<500
76849 FI	5.000.000
73688 FII	5.000.000
76154 FIII	5.000.000

Tabla VII: dosis letal 50 para las distintas cepas utilizadas.

La DL50 calculada por otros autores para cepas de *P. multocida* de distintas enfermedades como la septicemia hemorrágica bovina o el cólera aviar, también ha sido muy variable entre cepas (Woolcock *et al.*, 1976; Tabatabaei *et al.*, 2001; Ali *et al.*, 2004; Herath *et al.*, 2010). Esta variabilidad puede deberse a la diferencia en el grado de patogenicidad entre cepas o la vía de inoculación utilizada. En este sentido, en un estudio realizado por Collins en 1973 se describen las dosis de desafío con la misma cepa de *P. multocida* cuando se administraba la bacteria por diferentes vías de inoculación: infección intravenosa 10^2 - 10^4 bacterias; infección intraperitoneal 10^2 - 10^4 bacterias; infección subcutánea 10^2 - 10^3 bacterias e infección aerógena 10^5 - 10^7 bacterias.

Ensayo 1

La mortalidad de G1 y G3 (vacunados con autobacterina combinada con exopolisacáridos o sola, respectivamente) fue del 10 y el 0% respectivamente, mientras que la mortalidad del G2 (vacunados solo con exopolisacáridos en aluminio) y el grupo control fue del 100% (Gráfico 1), lo que nos da un índice de protección muy alto (0,9 y 1) para G1 y G3 y nulo para G2.

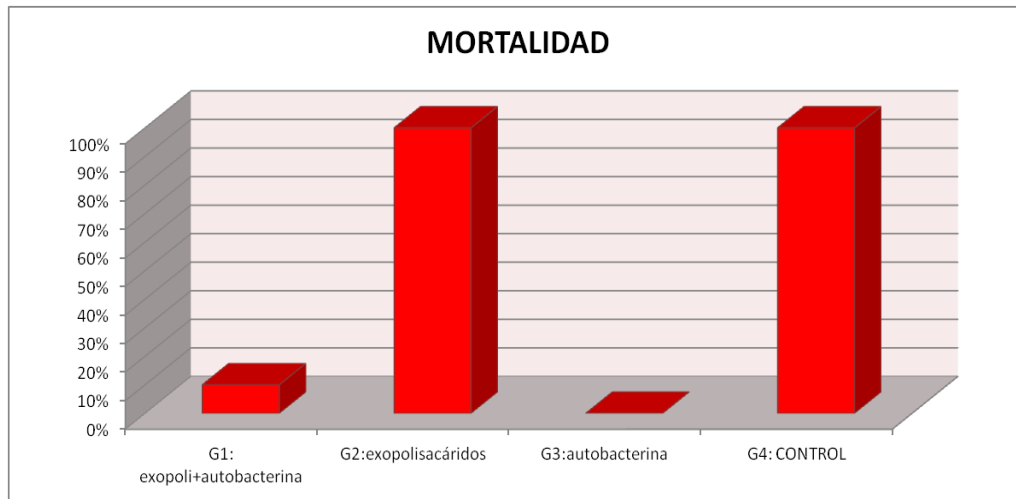


Gráfico 1. Resultados de mortalidad en el ensayo 1.

Las diferencias entre el G1 y el grupo control, entre el G3 y el grupo control, entre el G1 y el G2 y entre el G2 y G3 fueron estadísticamente significativas ($P < 0.01$).

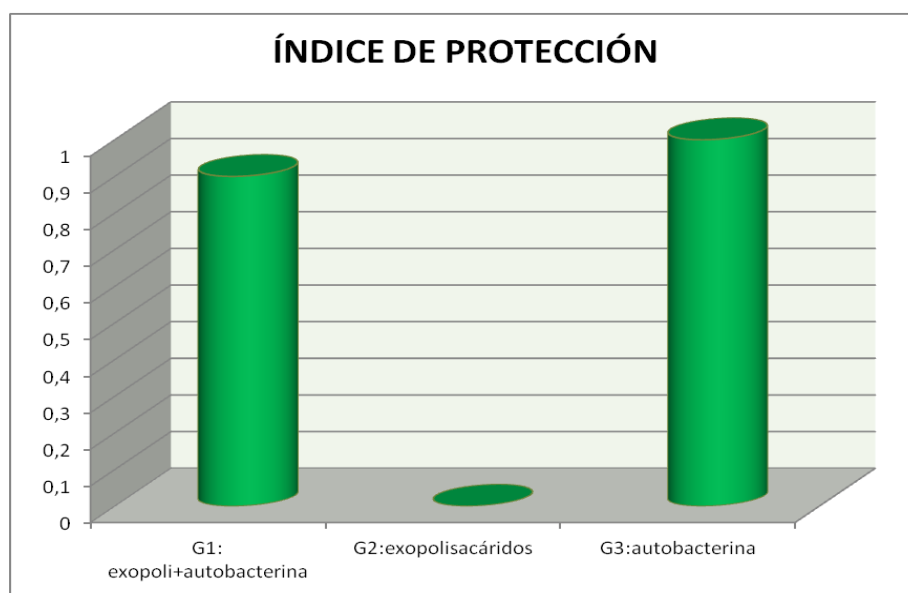


Gráfico 2. Resultados del índice de protección en el ensayo 1.

Los resultados obtenidos en este primer ensayo indican que la mayor eficacia vacunal se obtiene con las vacunas que incluyen la autobacterina (G1 y G3), la cual incluye en la vacuna todos sus componentes. Por el contrario, la vacuna a base de exopolisacáridos solos no confirió ningún tipo de protección. Los exopolisacáridos bacterianos son hidratos de carbono creados por la propia bacteria en su citosol, que posteriormente expulsa al exterior, lo que incluye los polisacáridos capsulares, considerados como importantes factores de virulencia en el caso de *P. multocida* (Boyce *et al.*, 2000). Los exopolisacáridos ayudados de los adyuvantes adecuados pueden ser inmunógenos. De hecho, vacunas elaboradas con exopolisacáridos incluidos en liposomas frente a *Staphylococcus aureus* sí han funcionado obteniéndose tasas de protección elevadas (Amorena *et al.*, 1994). Sin embargo en nuestro caso, los exopolisacáridos de *P. multocida* incluidos en liposomas no indujeron ningún tipo de protección. Es de destacar que sin embargo no afectan negativamente a la protección inducida por la bacterina cuando se aplican simultáneamente, lo que puede tener una importante implicación en la prevención de patologías del conejo. Las autovacunas frente a *S. aureus* compuestas por los exopolisacáridos de esas bacterias e incluidos en liposomas se utilizan habitualmente en veterinaria y su utilización es frecuente en conejos. Según estos resultados sería factible una vacuna combinada a base de exopolisacáridos en liposomas de *S. aureus* y una bacterina de *P. multocida* que podría aplicarse al mismo tiempo con un único pinchazo.

Ensayo 2

La mortalidad del G1 (vacunado con la autobacterina) fue del 10% mientras que las mortalidades de los G3 y G4 (vacunados con otras bacterinas de *P. multocida*) fue de 90 y 100% respectivamente (Gráfico 3). La mortalidad del grupo control fue del 100%, lo que nos da un índice de protección muy elevado para el G1 (0,9) mientras que para G3 y G4 el índice de protección fue muy bajo o nulo (0,1 y 0) (Gráfico 4).

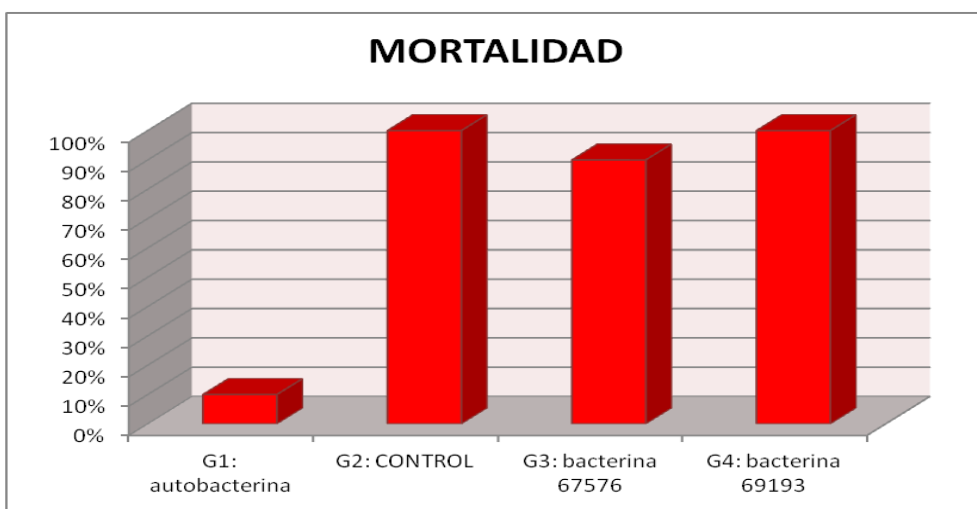


Gráfico 3. Resultados de mortalidad en el ensayo 2.

Estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre el G1 y el grupo control; entre el G1 y el G3 y entre el G1 y el G4 ($p < 0.01$). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el resto de grupos.

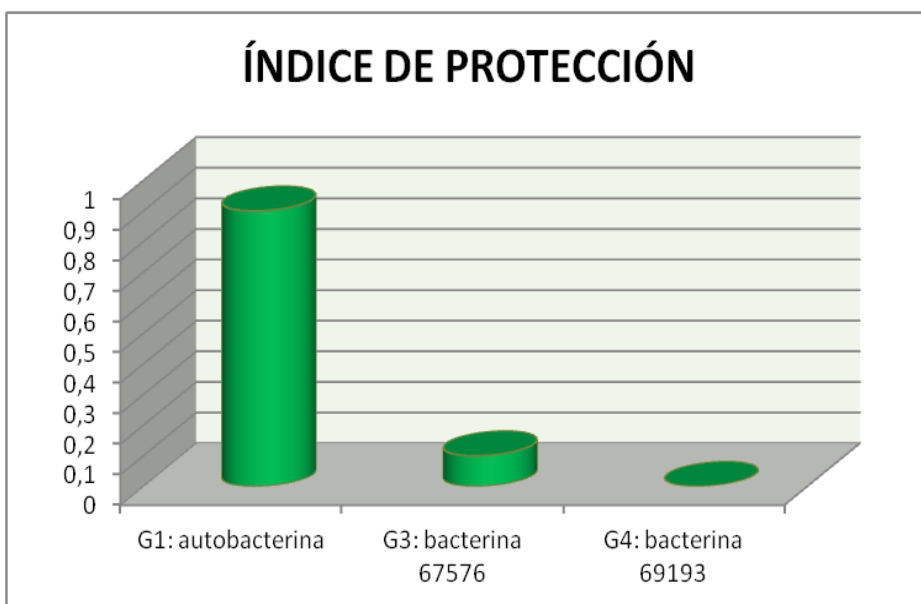


Gráfico 4.
Resultados del
índice de
protección en el
ensayo 2.

Como se muestra en el gráfico 5, el grupo G2 mostró un tiempo medio de supervivencia (2,2 días) significativamente inferior ($P<0,001$) al resto de los grupos (G1=5,5, G3=5,6 y G4=4). También se observaron diferencias significativas entre los grupos vacunados G1 y G4.

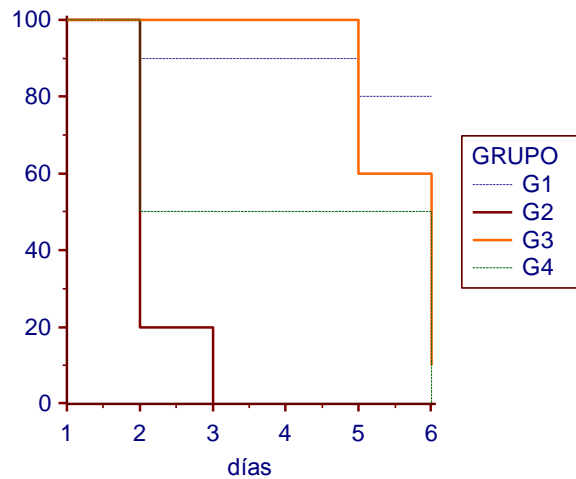


Gráfico 5. Probabilidad de supervivencia de los ratones de cada grupo.

Cuando se realizó el ensayo las cepas utilizadas estaban sin caracterizar. Lo único que se conocía de ellas era el tipo de patología de la que provenían y que habían sido aisladas de animales provenientes de distintas explotaciones sin relación alguna entre ellas. Mientras que la cepa del G3 se aisló de un caso de septicemia, la cepa del G4 se aisló de una neumonía, al igual que la cepa de desafío en este ensayo (70336). Los resultados de este ensayo indicaron que la protección se produjo únicamente con la cepa homóloga. Las cepas heterólogas no fueron capaces de inducir una protección cruzada.

Algunos autores (Gyles *et al.*, 2004) han llegado a la conclusión de que la vacunación con bacterinas tiene muchas desventajas ya que éstas no tienen la capacidad de producir protección cruzada con otros serotipos, dan lugar a una inmunidad corta e ineficaz y los animales inmunizados todavía sufren brotes de enfermedades. Además, producen inflamación en el punto de inoculación. Sin embargo en nuestros ensayos ningún animal vacunado con estas bacterinas a base de cuerpos bacterianos completos e hidróxido de aluminio como adyuvante presentó reacción inflamatoria en el punto de inoculación, ni síntomas de afección generalizada. La ausencia de vacunas comerciales frente a *P. multocida* para conejos y los resultados obtenidos en estos ensayos nos

llevan a pensar en la utilidad de las autobacterinas como método inmunoproláctico para esta especie animal, aunque sería necesario estudiar tanto el índice de protección en conejos como la duración de la inmunidad en los mismos. Antes de eso, consideramos importante ampliar el estudio en el modelo ratón con otras cepas caracterizadas previamente.

Ensayo 3

En el gráfico 6 se muestra la mortalidad producida en los grupos vacunados con las bacterinas elaboradas con cepas de distinto serotipo capsular y perfil de virulencia y en el grupo control sin vacunar, tras el desafío con la cepa de *P. multocida* 74622 de serotipo capsular A y perfil de virulencia II. El G1 fue vacunado con la autobacterina.

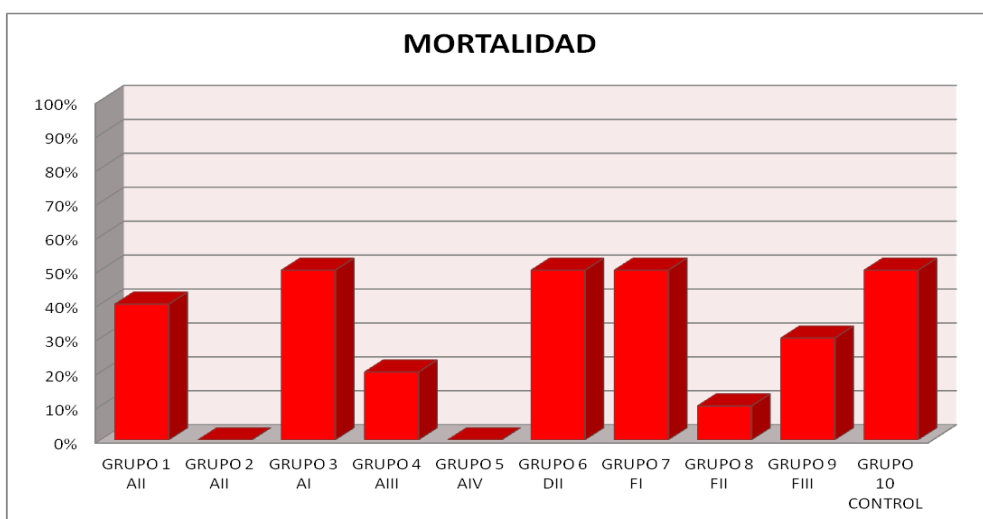


Gráfico 6. Resultados de mortalidad en el ensayo 3.

Al comparar el grupo control con cada uno de los grupos vacunados, solamente se vieron diferencias estadísticamente significativas con el G2 (vacunado con la bacterina 73739 AII) y el G5 (vacunado con la bacterina 76236 AIV) ($p < 0.01$). No hubo diferencias estadísticamente significativas en el resto de las comparaciones. La mortalidad de G2 y G5 fue 0% siendo por tanto su índice de protección 1.

Los grupos G2 y G5 son los grupos con máximo tiempo medio de supervivencia, porque todos los ratones sobrevivieron más allá de los 7 días del experimento. No hay diferencias significativas entre el resto de los grupos.

En este ensayo elegimos para el desafío de todos los grupos una cepa de tipo capsular A y perfil de virulencia II por ser una de las combinaciones mayoritarias encontradas en un estudio de caracterización de cepas de *P. multocida* aisladas de conejo realizado por la Universidad Complutense de Madrid (48% del total de cepas caracterizadas fueron de tipo capsular A y 48,50% tuvieron un perfil de virulencia II). Cada uno de los grupos se vacunó con una bacterina distinta, elaborada con cepas de tipo capsular y perfil de virulencia distintos a la cepa de desafío, excepto el grupo 1 para

el que se utilizó una autobacterina elaborada con la misma cepa del desafío. En este caso la autobacterina (G1) no presentó los mejores índices de protección tal y como habíamos demostrado en los dos ensayos anteriores con una cepa diferente. Hubo dos grupos (G2 y G5) que indujeron una protección del 100%. El G2 fue vacunado con una cepa distinta a la del desafío pero que comparte con ella el tipo capsular A y el perfil de virulencia II. El G5 se vacunó así mismo con una cepa distinta a la del desafío pero que presentaba tipo capsular A y perfil de virulencia IV. Lo esperable en este ensayo era que la autobacterina tuviese los mejores índices de protección y que hubiese protección cruzada entre cepas del mismo tipo capsular y/o el mismo perfil de virulencia. La primera hipótesis no se ha cumplido. Sin embargo sí podemos afirmar que los grupos con mayor protección presentaban el mismo tipo capsular (A) que la cepa de desafío. Sin embargo en otros grupos vacunados con bacterinas de cepas de tipo capsular A como son los grupos 3 y 4, no se ha encontrado un índice de protección significativo. En base a estos resultados podemos afirmar que no se produce protección cruzada en base al tipo capsular, aunque sí que se produce protección cruzada entre algunas cepas.

Tampoco se ha encontrado relación entre el perfil de virulencia y la protección. *P. multocida* posee diversos factores de virulencia que han demostrado tener un papel en la patogénesis del proceso que provoca. Sin embargo, la base molecular de esta patogenicidad aún no ha sido establecida (Verma *et al.*, 2013). Los perfiles de virulencia utilizados en este estudio contemplan la presencia o ausencia de los genes *hgbB* y *pfhA*, que codifican un factor de adquisición del hierro y una adhesina respectivamente. La cepa de desafío utilizada en este ensayo con perfil de virulencia tipo II, es positiva para el gen *hgbB* y negativa para el *pfhA*, para el que son positivas los perfiles I y III. Sin embargo, ninguna las vacunas elaboradas con cepas tipo I (G3 y G7) o tipo III (G4 y G9) han protegido frente al desafío. Sin embargo, el G5 vacunado con una vacuna elaborada con una cepa tipo IV, carente de ambos genes si ha conferido protección significativa, lo que descarta a ambos factores como candidatos a utilizarlos para la inmunización activa.

Las bacterinas incluyen la bacteria completa en la vacuna, la cual presenta una gran cantidad de sustancias en su composición capaces de comportarse como antígenos. Se sabe que el componente capsular por sí solo no es antigénico por su naturaleza química (Fenwick, 1995) y hace imposible la producción de anticuerpos (Carter, 1955;

Namioka y Murata, 1961) aunque es ampliamente aceptado que la cápsula está relacionada con la resistencia a la fagocitosis, (Harmon *et al.*, 1991). Sí se ha demostrado en términos generales que las bacterias que tiene cápsula son más virulentas que las variantes acapsuladas (Snipes *et al.*, 1987; Tsuji y Matsumoto, 1989; Jacques *et al.*, 1993). Por este motivo deberíamos pensar que hay otros componentes que no han sido caracterizados en las cepas utilizadas para este estudio, que sí podrían actuar como inmunógenos, como por ejemplo el lipopolisacárido, el cual estimula la inmunidad humoral considerándose que los anticuerpos que se producen frente a él son protectores. Las proteínas de exterior de membrana (OMPs) están relacionadas con el potencial patógeno de las bacterias y por lo tanto, también poseen propiedades inmunogénicas (Kennet *et al.*, 1993; Srivastava, 1998a; Borkowska-Opacka y Kedrak, 2002). Los anticuerpos monoclonales producidos contra las OMPs son capaces de proteger pasivamente conejos y ratones contra la infección de *P. multocida*, observándose una fuerte protección cuando se utilizan cepas homólogas y una protección limitada frente a cepas heterólogas (Lu *et al.*, 1991). Las OMPs reguladas por el hierro son potentes antígenos así como factores de virulencia esenciales durante el proceso de infección (Ratledge *et al.*, 2000).

La DL50 previamente calculada para la cepa de desafío 74622AII fue de 40.000 ufc/ratón, aunque la dosis real inoculada en el desafío fue de 89.000 ufc/ratón. A pesar de ello, la mortalidad en el grupo control no fue mayor del 50%. Por el contrario, la mortalidad de la cepa 70336 utilizada en los ensayos 1 y 2 fue del 100% para una dosis de infección de 500 ufc/ratón. Por lo tanto, cabe pensar que la virulencia de la cepa de este ensayo, al menos para los ratones, es significativamente menor que la de la cepa 70336 y por lo tanto es posible que no haya sido buena candidata para el estudio.

Ensayo 4

Las diferentes mortalidades de cada uno de los grupos vacunados con una misma bacterina (73739 AII) y su correspondiente grupo control no vacunado se muestran a continuación en el gráfico 7. El G2 corresponde al grupo vacunado con la autobacterina.

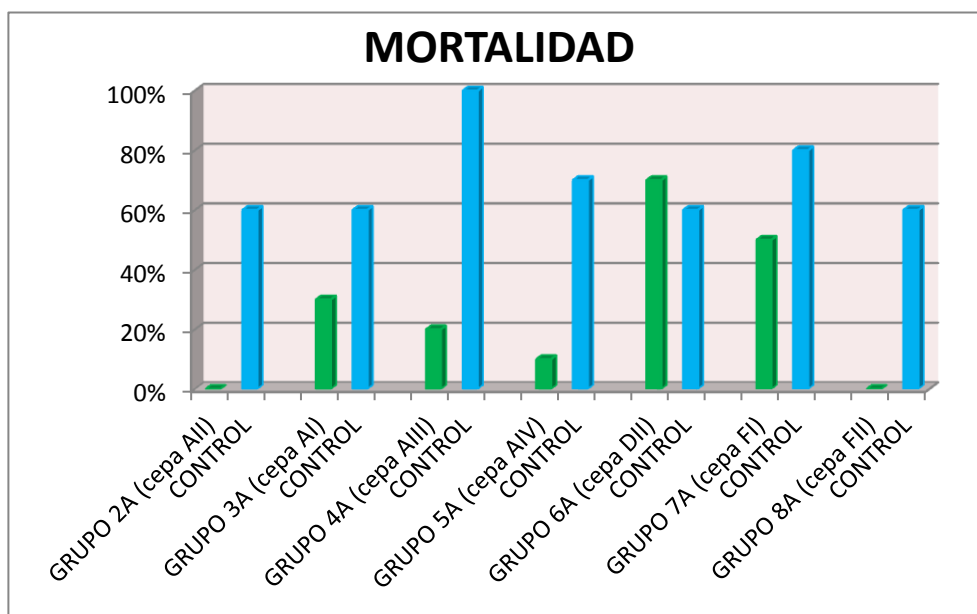


Gráfico 7. Resultados de mortalidad en el ensayo 4.

El G1 fue eliminado del estudio ya que no fuimos capaces de establecer la DL50. Solamente se vieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos vacunados y sus respectivos controles en G2, G4 y G8 ($p < 0.01$). No hubo diferencias estadísticamente significativas para el resto de grupos. El índice de protección fue 1 para G2 y G8 y 0.8 para el G4.

Los gráficos que se presentan a continuación representan el tiempo medio de supervivencia durante los 7 días siguientes al desafío para cada uno de estos tres grupos vacunados y su grupo control correspondiente. La letra A es el grupo vacunado y la letra B es el grupo control.

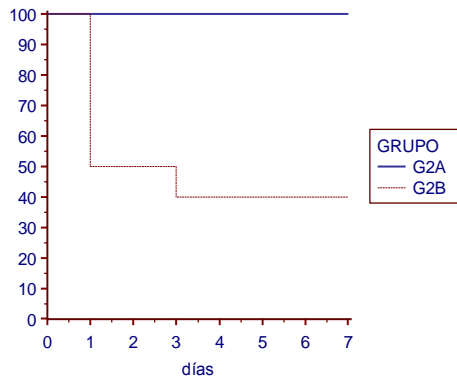


Gráfico 8: Grupo 2A vacunado con autobacterina 73739 AII y Grupo 2B inoculado con PBS. Ambos grupos se desafiaron con la cepa 73739 AII.

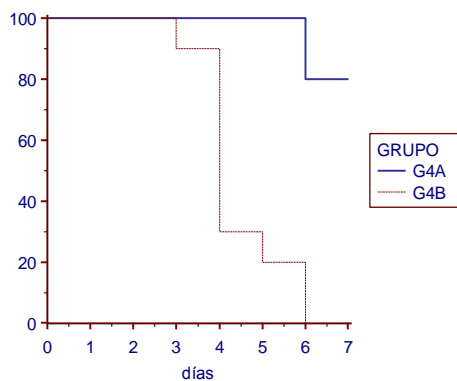


Gráfico 9: Grupo 4A vacunado con la bacterina 73739 AII y Grupo 4B inoculado con PBS. Ambos grupos se desafiaron con la cepa 76939 AIII.

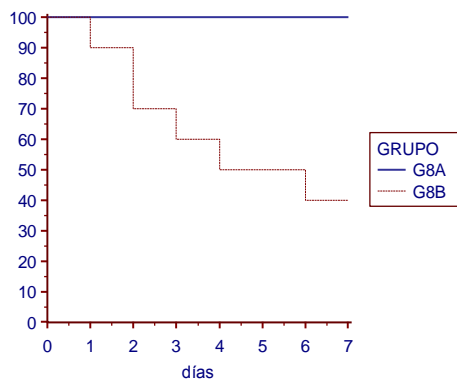


Gráfico 10: Grupo 8A vacunado con la bacterina 73739 AII y Grupo 8B inoculado con PBS. Ambos grupos se desafiaron con la cepa 73688 FII.

En este último ensayo se vacunaron todos los grupos de ratones con una bacterina elaborada a partir de la cepa 73739 AII. Se seleccionó dicha cepa para la vacuna por pertenecer al tipo capsular y perfil de virulencia mayoritario entre las cepas aisladas de procesos patológicos en conejos y porque con ella en el ensayo 3 habíamos obtenido una protección del 100% frente a un desafío con una cepa distinta aunque también de

tipo AII, por lo que cabía la posibilidad de que fuese más inmunógena que otras que no habían inducido protección. Cada uno de los grupos se desafió con una cepa distinta con un tipo capsular y un perfil de virulencia diferente y por lo tanto, cada grupo de ratones necesitó su grupo control correspondiente.

En la tabla VIII se muestra la cepa con la que se desafió cada grupo así como su dosis de desafío y el porcentaje de mortalidad que esa cepa causó en cada grupo control.

	Cepa	Dosis desafío	Mortalidad grupo control
GRUPO 2	73739 AII	5.000.000 ufc/ratón	60%
GRUPO 3	76918 AI	500 ufc/ratón	60%
GRUPO 4	76939 AIII	40.000 ufc/ratón	100%
GRUPO 5	76236 AIV	500 ufc/ratón	70%
GRUPO 6	75039 DII	500 ufc/ratón	60%
GRUPO 7	76849 FI	5.000.000 ufc/ratón	80%
GRUPO 8	73688 FII	5.000.000 ufc/ratón	60%

Tabla VIII. Cepas y dosis de desafío utilizadas en el ensayo 4 para cada uno de los grupos. Mortalidad en cada grupo control.

La mortalidad producida en los distintos grupos control con las distintas cepas utilizadas en el desafío fue variable aunque no proporcional a la dosis de desafío utilizada. Esto puede deberse a la distinta virulencia de cada una de las cepas como ya han descrito otros autores (Ewers *et al.*, 2006).

La mortalidad para el grupo control del G2 fue del 60%. La cantidad de bacterias inoculadas fue elevada, 5.000.000. Esta cepa podría considerarse poco virulenta ya que hacen falta muchas bacterias para producir mortalidad. Aún así vemos que la autobacterina indujo una protección significativa, sobreviviendo todos los ratones al desafío.

El G4 ha tenido una mortalidad del 100% en el grupo control inoculando 40.000 bacterias. Comparte con la bacterina el tipo capsular pero no el perfil de virulencia. El G8 ha tenido una mortalidad del 60% en el grupo control inoculando 5.000.000 de bacterias. Comparte con la bacterina el perfil de virulencia pero no el tipo capsular.

Ambas cepas vacunales indujeron una protección significativa frente a la infección experimental.

Con los resultados obtenidos en este ensayo, no se ha podido determinar qué factores son determinantes para inducir protección, ni qué es lo que desencadena una mayor respuesta inmunitaria. En los ensayos realizados con cepas caracterizadas, no hemos observado relación entre tipo de cápsula y la virulencia ni entre tipo de cápsula e índice de protección. Lo mismo ocurre con el perfil de virulencia. *P. multocida* es capaz de causar enfermedad en una amplia variedad de animales. Existe una correlación clara entre el tipo capsular y la enfermedad: los serotipos capsulares A y F están asociados típicamente con el cólera aviar, los serotipos B y E con la septicemia hemorrágica en el ganado vacuno y las cepas de serotipo D que expresan la toxina de PMT con la rinitis atrófica en cerdos. Lo que no está claro es si la expresión de un tipo particular de lipopolisacárido o el tipo y la cantidad de proteínas que se presentan en la superficie bacteriana también contribuyen a la especificidad de la enfermedad (Harper *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

- Se ha conseguido establecer y ajustar el modelo ratón para el estudio de la protección conferida por vacunas frente a *P. multocida* aisladas de procesos patógenos de conejos.
- Existe una gran variabilidad en las cepas de conejos estudiadas en cuanto al tipo capsular y al perfil de virulencia.
- La virulencia de cada cepa no parece depender ni del tipo capsular ni del perfil de virulencia utilizado en este estudio.
- Las dosis letales obtenidas para cada una de las cepas utilizadas en los diferentes ensayos fueron muy variables, lo que implica distintos grados de virulencia. La protección conferida por las autovacunas puede llegar a ser muy alta aunque no se produce un 100% de protección con todas las cepas.
- Los exopolisacáridos de *P. multocida* incluidos en liposomas no indujeron protección. Es de destacar que sin embargo no afectan negativamente a la protección inducida por la bacteria cuando se aplican simultáneamente.
- Las bacterinas pueden inducir protección cruzada frente a varias cepas pero esta no parece depender ni del tipo capsular ni del perfil de virulencia en base a los factores de patogenicidad *hgbB* y *pflhA*, por lo que se deduce que hay otros componentes que no han sido caracterizados en las cepas utilizadas para este estudio, que sí podrían actuar como inmunógenos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel A., Sánchez S., Arenas J., Criado M.T., Ferreirós C.M., 2007. Bioinformatic analysis of outer membrane proteome of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. *Int. Microbiol.* 10:5-11.
- Ali H.A., Sawada T., Noda K., 2004. Protectivity of an immunoaffinity-Purified 39 kDa Capsular Protein of Avian *Pasteurella multocida* in Mice. *J. Vet. Med. Sci.* 66:1603-1604.
- Amorena B., Baselga R., Albizu I., 1994. Use of liposome-immunopotentiated exopolysaccharide as a component of an ovine mastitis staphylococcal vaccine. *Vaccine.* 12:243-249.
- Astorga R., Maldonado A., Arenas A., Tarradas C., Luque I., Perea, A., 1997. La pasteurelosis del conejo. 94: 33-38.
- Atashpaz S., Shayegh J., Hejazi MS., 2009. Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR. *Res. Vet. Sci.* 87:355-357.
- Badiola-Saiz J.I., Pujols J., Pérez de Rozas A.M., Saco M., Rosell J.M., 1996. Theoretical and practical aspects of the differentiation of *Pasteurella multocida* strains through the study of the biochemical kinetics. Proc. 6th World Rabbit Congress, 9-12 juillet, Toulouse, France, 3:23-27.
- Badiola-Sáiz J.I., Rosell J.M., Pujols J., Pérez de Rozas A., Rafel O., Ramón J., Segura LL., Saco M.M., 1992. Biological features of *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits in the northeast area of Spain. *J. Appl. Rabbit Res.* 15:1366-1374.
- Balençon M., Rideaud P., Coudert P., 1982. Etude bactériologique des otites et torticolis chez des lapines reproductrices réformées. 3^{èmes} Journées de la Recherche Cunicole, 8-9 décembre, Paris, France, Communication 29-1/29-10.
- Basagoudanavar S.H., Singh D.K., Varshney B.C., 2006. Immunization with Outer Membrane Proteins of *Pasteurella multocida* (6:B) Provides Protection in Mice. *J. Vet. Med.* 53:524-530.
- Beckenlehner K., Bannke S., Spruss T., Bernhardt G., Schonenberger H., Schiess W., 1992. Hyaluronidase enhances the activity of adriamycin in breast cancer models *in vitro* and *in vivo*. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 188:591-596
- Bjotvedt G., Bertke E.M., Hendricks G.M., 1979. Peritonitis due to *Pasteurella multocida* in rabbit. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 74:215-216.
- Bjotvedt G., Bertke E.M., Hendricks G.M., 1979. Peritonitis due to *Pasteurella multocida* in a rabbit. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 74:215-216.
- Bording A., Foged N.T., 1991. Characterization of the immunogenicity of formaldehyde detoxified *Pasteurella multocida* toxin. *Vet. Microbiol.* 29:267-280.
- Borkowska-Opacka B., Kedrak A., 2012. Expression of iron-regulated outer membrane proteins (IROMPs) by *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 46:157-164.
- Bosch M., Garrido M.E., Llagostera M., de Rozas A.M.P., Badiola I., Barbe J., 2002b. Characterization of the *Pasteurella multocida* hgBA gene encoding a hemoglobin-binding protein. *Infect. Immun.* 70:5955-5964.

- Boucher S., Nouaille L., 1996. *Maladies des lapins*. Paris, France: Agricole éditeur. 255 p.
- Boyce J.D., Adler B., 2000. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). *Infect. Immun.* 68:3463-3468.
- Broome R. L., Brooks D.L., 1991. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of respiratory pasteurellosis in rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 41:572-576.
- Carter G.R., 1995. Studies on *Pasteurella multocida*. I A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.* 16:481-484.
- Carter G.R., Chengappa M.M., 1981. Recommendations for a standard system of designating serotypes of *Pasteurella multocida*. *Assoc. Vet. Lab. Diagn.* 24:37-42.
- Chengappa M.M., Myers R.C., Carter G.R., 1982. Capsular and somatic Types of *Pasteurella multocida* from Rabbits. *Can. J. comp. Med.* 46: 437-439.
- Collins F.M., 1973. Growth of *Pasteurella multocida* in Vaccinated and Normal Mice. *Infection and Immunity.* 8:868-875.
- Confer A.W., 1993. Immunogens of *Pasteurella*. *Vet. Microbiol.* 37:353-368.
- Confer A.W., Suckow M.A., Montelongo M., Dabo S.M., Miloscio L.J., Gillespie A.J., Meredith G.L., 2001. Intranasal vaccination of rabbits with *Pasteurella multocida* A:3 outer membranes that express iron-regulated proteins. *Am. J. Vet. Res.* 62:697-703.
- Coudert P., 1980. Pathologie et conduite de l'élevage des lapines reproductrices. *Point Vet.* 10: 61-65.
- Coudert P., Rideaud P., Balençon M., 1986. Pasteurellose non respiratoire en élevage intensif. L'otite moyenne des lapines reproductrices. *4èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, France, 10-11 décembre, Communication 31.
- Coudert P., Rideaud P., Kpodekon M., 1999. Le point sur les pasteurelloses du lapin. *8èmes Journées de la Recherche Cunicole*, Paris, France, 9-10 juillet, pp: 3-12.
- Cox A.J., Hunt M.L., Boyce J.D., Adler B., 2003. Functional characterization of HgbB, a new hemoglobin binding protein of *Pasteurella multocida*. *Microb. Pathog.* 34:287-296.
- Cundell D.R., Gerard N.P., Gerard C., Idanpaan-Heikkilä I., Toumanen E.I., 1995. *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature.* 377:435-438.
- De Jong, M.F., 1980. [Some aspects of the study of atrophic rhinitis in pigs (author's transl)]. *Tijdschr Diergeneeskd.* 105:711-714.
- DeAngelis P.L., Padgett-McCue A.J., 2000. Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* type F. *J. Biol. Chem.* 275:24124-24129.
- Deeb B. J., DiGiacomo R.F., 2000. Respiratory diseases of rabbits. *Vet. Clin. North. Am. Exot. Anim. Pract.* 2:465-480.
- Deeb B. J., DiGiacomo R.F., Bernard B.L., Silbernagel S.M., 1990. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. *J. Clin. Microbiol.* 28:70-75.
- DiGiacomo R.F., 1992. Natural history of *Pasteurella multocida* infection in rabbit. *J. Applied. Rabbit. Res.* 15:1515-1523.

- DiGiacomo R.F., Garlinghouse L.E.Jr., Van Hoosier G.L., 1983. Natural history of infection with *Pasteurella multocida* in rabbits. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183:1172-1175.
- DiGiacomo R.F., Jones C.R.D., Wathes C.M., 1987. Transmission of *Pasteurella multocida* in Rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 37: 621-623.
- Doughty S.W., Ruffolo C.G., Adler B., 2000. The type 4 fimbrial subunit gene of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 72:79-90.
- Drzeniek R., Scharmann W., Balke E., 1972. Neuraminidase and N-acetylneuraminase pyruvate-lyase of *Pasteurella multocida*. *J. Gen. Microbiol.* 72: 357-368.
- Esslinger J., Herrmann G., Blobel H., 1994. Adhésion de *Pasteurella multocida* aux macrophages de lapin. 6 mes Journées de la Recherche Cunicole, La Rochelle, France, 6-7 décembre, 1:53-60.
- Ewers C., L bke-Becker A., Bethe A., Kiebling S., Filter M., Wieler L.H., 2006. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Vet. Microbiol.* 114:304-317.
- Fenwick B., 1995. Liposaccharides and capsules of HAP group bacteria. In: *Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella*. Donachie W., Lainson F.A. (eds) New York, EE.UU. & London, England: Plenum Press. pp. 75-87.
- Ferreira T.S., Felizardo M.R., Sena de Gobbi D.D., Gomes C.R., Nogueira Filsner P.H., Moreno M., Paix o R., Pereira J de J., Micke Moreno A., 2012. Virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits in Brazil. *Sci. World. Journal.* 10: 1100.
- Flatt R.E., 1974. Capítulo n  8. Bacterial diseases. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Weisbroth S.H., Flatt R.E., Kraus A.K. (eds) London, England: Academic Press Limited. pp. 131-162.
- Flatt R.E., Deyoung D.W., Hogle R.M., 1977. Suppurative otitis media in the rabbit: prevalence, pathology and microbiology. *Lab. Anim. Sci.* 27:343-347.
- Fodged N.T., Pedersen K.B., Elling F., 1987. Characterization and biological effects of the *Pasteurella multocida* toxin. *FEMS. Microbiol. Lett.* 43:45-51.
- Fox R.R., Norberg R.F., Myers D.D., 1971. The relationship of *Pasteurella multocida* to otitis media in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab. Anim. Sci.* 21:45-48.
- Frymus, T., Muller, E., y Petzoldt, K., 1989. Antigenic relationship between the dermonecrotic toxins produced by *Pasteurella multocida* type D and type A. *Zentralbl. Veterin rmed.* B36:199-202.
- Galdiero M., Folgore A., Nuzzo I., Galdiero E., 2000. Neutrophil adhesion and transmigration through bovine endothelial cells *in vitro* by protein H and LPS of *Pasteurella multocida*. *Immunobiology.* 202:226-238.
- Garrido M.E., Bosch M., Bigas A., Badiola I., Barb  J., Llagostera M., 2008. Heterologous protective immunization elicited in mice by *Pasteurella multocida* fur ompH. *Int. Microbiol.* 11:17-24.
- Glorioso J.C., Jones G.W., Rush H.G., Pentler L.J., Darif C.A., Coward J.E., 1982. Adhesion of a type A *Pasteurella multocida* to Rabbit pharyngeal cells and its possible role in Rabbit respiratory tract infections. *Infect. Immun.* 35:1103-1109.
- Glorioso J.C., Jones G.W., Rush H.G., Pentler L.J., Darif C.A., Coward J.E., 1982. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infect. Immun.* 35:1103-1109.
- Gray-Owen S.D., Schryvers A.B., 1996. Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends. Microbiol.* 4:185-191.

- Gyles C.L., Prescott J.F., Thoen C.O., 2004. *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. Ames, Iowa, EE.UU.: Blakwell publishing. 456 p.
- Hagen K.W., 1958. Enzootic pasteurellosis in domestic rabbits. I. Pathology and bacteriology. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 133:77-80.
- Hago B.E.D., Magid O.Y.A., El Sanousi S.M., Gameel A.A., Abu-Samra M.T., 1987. An outbreak of suppurative osteoarthritis of the tibiotarsal joint in rabbits caused by *Pasteurella multocida*. *J. Small. Anim. Pract.* 28:763-766.
- Harmon B.G., Glisson J.R., Latimer K.S., Steffens W.L., Nunnally J.C., 1991. Resistance of *Pasteurella multocida* A:3,4 to phagocytosis by turkey macrophages and heterophils. *Am. J. Vet. Res.* 52:1507-1511.
- Harper M., Boyce J.D., Adler B., 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS. Microbiol. Lett.* 265:1-10.
- Herath C., Kumar P., Singh M., Kumar D., Ramakrishnan S., Goswami T.K., Singh A., Ram G.C., 2010. Experimental iron-inactivated *Pasteurella multocida* A:1 vaccine adjuvanted with bacterial DNA is safe and protects chickens from fowl cholera. *Vaccine.* 28:2284-2289.
- Hinton M., 1978. Mandibular osteomyelitis in the Rabbit. *Vet. Rec.* 103:263-264.
- Holmes H.T., Patton N.M., Chekke P.R., 1983. The incidence of vaginal and nasal *Pasteurella multocida* in commercial rabbitry. *J. Appl. Rabbit Res.* 6:95-96.
- Isaacson R.E., Trigo E., 1995. Pili of *Pasteurella multocida* of porcine origin. *FEMS. Microbiol. Lett.* 132: 247-251.
- Jacques M., Kobisch M., Belanger M., Dugal F., 1993. Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. *Infect. Immun.* 61:4785-4792.
- Jaglic Z., Jeklova E., Leva L., Kummer V., Kucerova Z., Faldyna M., Maskova J., Nedbalcova K., Alexa P., 2008. Experimental study of pathogenicity of *Pasteurella multocida* serogroup F in rabbits. *Vet. Microbiol.* 126:168-177.
- Jaglic Z., Kucerova Z., Nedbalcova K., Hlozek P., Bartos M., 2004. Identification of *Pasteurella multocida* Serogroup F Isolates in Rabbits. *J. Vet. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 51: 467-469.
- Jaslow B.W., Ringler D.H., Rush H.G., Glorioso J.C., 1981. *Pasteurella* associated rhinitis of Rabbits: efficacy of penicillin therapy. *Lab. Anim. Sci.* 31:382-385.
- Johnson J.H., Wolf A.M., 1993. Ovarian abscesses and pyometra in a domestic rabbit. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203:667-669.
- Jones S.M., Carrington S.D., 1988. *Pasteurella dacryocystitis* in rabbits. *Vet. Rec.* 122:514-515.
- Kielstein, P., 1986. On the occurrence of toxin-producing *Pasteurella-multocida* strains in atrophic rhinitis and in pneumonias of swine and cattle. *Zentralbl. Veterinarmed.* B33:418-424.
- Kimura A., Mountzouros K.T., Realman D.A., Falkow S., Cowell J.L., 1990. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect. Immun.* 58:7-16.
- Kirchner B., Magoc T.J., Sidor M.A., 1983. *Pasteurella pneumotropica* in rabbits from a "Pasteurella-free" production colony. *Lab. Anim. Sci.* 33:461-462.

- Kpodekon M., 1983. Pathology and pathogenesis of ear and brain complications of pasteurellosis in rabbits bred for food. *Ann. Rech. Vet.* 14:225-232.
- Langan G., Lohmiller J., Swing S., Wardrip, C., 2000. Respiratory diseases of rodents and rabbits. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 6:1309-1335.
- Lebrun A., Caya M., Jaques M., 1992. Effects of sub-MICs of antibiotics on cell surface characteristics and virulence of *Pasteurella multocida*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 36:2093-2098.
- Lu Y.S., Lai W.C., Pakes S.P., 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.S., Pakes S.P., Stefanu C., 1983. Capsular and somatic serotypes of *Pasteurella multocida* isolates recovered from healthy and diseased rabbits in Texas. *J. Clin. Microbiol.* 18:292-295.
- Lu Y.S., Ringler D.H., Park J.S., 1978. Characterization of *Pasteurella multocida* isolates from the nares of healthy rabbits with pneumonia. *Lab. Anim. Sci.* 28: 691-697.
- Maertens L., Coudert P., 2006. Pasteurellosis in rabbits. In: *Recent Advances in Rabbit Sciences*. Coudert P., Rideaud P., Virag G., Cerrone A. (eds) Merelbeke, Belgium: ILVO. pp. 147-162.
- Mähler M., Stunkel S., Ziegowski C., Kunstyr I., 1995. Inefficacy of enrofloxacin in the elimination of *Pasteurella multocida* in rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 29:192-199.
- Manning P.J., 1984. Naturally occurring pasteurellosis in laboratory rabbits: chemical and serological studies of whole cells and lipopolysaccharides of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 44:502-507.
- Manning P.J., DiGiacomo R.F., DeLong D., 1989. Pasteurellosis in Laboratory Animals. In: *Pasteurella and Pasteurellosis*. Adlam C., Rutter J.M. (eds) London, England: Academic Press Limited. pp. 163-262.
- May B.J., Zhang Q., Li L.L., Paustian M.L., Whittam T.S., Kapur V., 2001. Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa.* 98:3460-3465.
- Mizan S., Henk A., Stallings A., Maier M., Lee M.D., 2000. Cloning and characterization of sialidases with 2-6' and 2-3'sialyl lactose specificity from *Pasteurella multocida*. *J. Bacteriol.* 182:6874-6883.
- Mooi F.R., Jansen W.H., Brunings H., Gielen H., van der Heide H.G., Walvoort H.C., Guinee P.A., 1992. Construction and analysis of *Bordetella pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb. Pathog.* 12:127-135.
- Muniandy N., Edgar J., Woolcock J. B., Mukkur T. K. S., 1992. Virulence, purification, structure, and protective potential of the putative capsular polysaccharide of *Pasteurella multocida* type 6:B. *Pasteurellosis in Production Animals* 43:47-54.
- Namioka S., Murata M., 1961. Serological studies on *Pasteurella multocida*. Characteristics of somatic O antigen of the organism. *Cornell. Vet.* 51:507-521.
- Nassar S.A., Mohamed A.H., Soufy H., Nasr S.M., 2013. Protective effect of Egyptian propolis against rabbit pasteurellosis. *Biomed. Res. Int.* doi:10.1155/2013/163724
- Nielsen, J. P., Bisgaard, M., Pedersen, K. B., 1986. Production of toxin in strains previously classified as *Pasteurella multocida*. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 94:203-204.

- Ogunnariwo J.A., Schryvers A.B., 2001. Characterization of a novel transferring receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *J.Bacteriol.* 183:890-896.
- Pandit K.K., Smith J.E., 1993. Capsular hyaluronic acid in *Pasteurella multocida* type A and its counterpart in type D. *Res. Vet. Sci.* 54:20-24.
- Patten B.E., Spencer T.L., Jonhson R.B., Hoffmann D., Lehane L. 1993. Comparative Protective Potential of Non-living Intact Cells and Purified Outer Membrane and Associated Proteins of *Pasteurella multocida* Type B:6 Grown Under Iron-Regulated Conditions. In: *Pasteurellosis in Production Animals*. Kennet L., Muniandy N., Mukkur T.K.S. (eds) Bali, Indonesia: ACIAR Proceedings. pp. 144-148.
- Peeters J.E., 1995. Economically important diseases in comercial rabbits. En: *Proc.VII Jornadas Técnicas sobre Cunicultura*. Barcelona, España, 7-10 de noviembre, pp: 861-866.
- Percy D.H., Barthold S.W., 2001. *Pathology of laboratory rodents and rabbits*. Ames, Iowa, EE.UU: Iowa State Press. 356 p.
- Percy D.H., Prescott J.F., Bhasin J.L., 1984. Characterization of *Pasteurella multocida* Isolated from Rabbits in Canada. *Can. J. Med.* 48:162-165.
- Perreau P., Renault L., Valle A., 1962. Types sérologiques de *Pasteurella multocida* rencontrés en France chez le lapin et la poule. *Bull. Acc. Vet.* 34:296-298.
- Petersen S. K., Foged N.T., 1989. Cloning and expression of the *Pasteurella multocida* toxin gene, *tox A* in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57:3907-3913.
- Pijoan C., Trigo F., 1990. Bacterial adhesion to mucosal surfaces with special reference to *Pasteurella multocida* isolates from atrophic rhinitis. *Can. J. Vet. Res.* 54 Suppl: S16-S21.
- Pruimboom I.M., Rimler R.B., Ackermann M.R., Brogden K.A., 1996. Capsular hyaluronic acid-mediated adhesion of *Pasteurella multocida* to turkey air sac macrophages, *Avian. Dis.* 40:887-893.
- Pyliotis N.A., Mukkur T.K.S., 1981. Ultrastructural observations on *Pasteurella multocida* type A. Bovine origin. *Res. Vet. Set.* 31:87-89.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R., 1994. *Clinical veterinary microbiology*. London, England: Wolfe Publishing, Mosby -Year Book Europe Limited. 648 p.
- Ramdani H.J.S., Dawkins H.J., Jonhson R.B., Spencer T.L., Adler B., 1989. *Pasteurella multocida* infections in mice with reference to haemorrhagic septicaemia in cattle and buffalo. *Immunol. Cell. Biol.* 68:57-61.
- Ramdani., Adler B., 1991. Opsonic monoclonal antibodies against lipopolysaccharide (LPS) antigens of *Pasteurella multocida* and the role of LPS in immunity. *Vet. Microbiol.* 26:335-347.
- Ramirez-Romero R., Brogden K. A., Cutlip R.C., 1997. Influence of immunization on the pulmonary inflammatory response of rabbits induced by *Pasteurella haemolytica* A1 lipopolysaccharide. *J. Comp. Pathol.* 117:137-145.
- Ratledge C., Dover L.G., 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:881-941.
- Rebers P.A., Jensen A.E., Laird G.A., 1988. Expression of pili and capsule by the avian strain P-1059 of *Pasteurella multocida*. *Avian. Dis.* 32:313-318.
- Rideaud P., Coudert P., 1992b. *Pasteurella* epidemiology: effect of age of weaning rabbits. *J. Appl. Res.* 15:1411-1414.

- Rideaud P., Coudert P., 1994. Identification des souches pathogènes de *Pasteurella multocida* chez le lapin. 6èmes Journées de la Recherche Cunicole, La Rochelle, France, 6-7 décembre 1:113-120.
- Rideaud P., Coudert P., Mercier P., Hervouet P., 1992a. Comparative study of the virulence of *Pasteurella multocida* from Rabbit O. cuniculus. *J. Appl. Rabbit. Res.* 15:1189-1400.
- Rimler R.B., 1994. Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F by capsule depolymerisation with mucopolysaccharidases. *Vet. Rec.* 134:191-192.
- Rimler R.B., Brogden K.A., 1986. *Pasteurella multocida* isolated from rabbits and swine: serologic types and toxin production. *Am. J. Vet. Res.* 47:730-737.
- Rimler R.B., Rhoades K.R., 1987. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.* 25:615-618.
- Rimler R.B., Rhoades K.R., 1989. *Pasteurella multocida*. In: *Pasteurella and Pasteurellosis*. Adlan C., Rutter J.M. (eds) California, EE.UU.: Academic Press Limited. pp. 37-74.
- Rosell J.M., 2000. Capítulo nº 17. Pasteurellosis. En: *Enfermedades del conejo*. Rosell J.M., Badiola I., de la Fuente L.F., Cuervo L. (eds) Barcelona, España: Ediciones Mundi-Prensa. pp. 275-288.
- Ruffolo C.G., Tennent J.M., Michalski W.P., Adler B., 1997. Identification, purification, and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 65: 339-343.
- Ryu H.I., Kim C.J., 2000. Immunologic reactivity of a lipopolysaccharide-protein complex of type A *Pasteurella multocida* in mice. *J. Vet. Sci.* 1:87-95.
- Sakano T., Okada M., Taneda A., Mukai T., Sato S., 1997. Effect of *Bordetella bronchiseptica* and serotype D *Pasteurella multocida* bacterin-toxoid on the occurrence of atrophic rhinitis after experimental infection with *B.bronchiseptica* and toxigenic type A *P.multocida*. *J. Vet. Med. Sci.* 59:55-57.
- Scharmann W.R., Drzeniek R., Blobel H., 1970. Neuraminidase of *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 1: 319-320.
- Schenkein H.A., Barbour S.E., Berry C.R., Kipps B., Tew J.G., 2000. Invasion of human vascular endothelial cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* via the receptor for platelet-activating factor. *Infect. Immun.* 68:5416-5419.
- Serino L., Virji M., 2002. Genetic and functional analysis of the phosphorylcholine moiety of commensal *Neisseria* lipopolisaccharide. *Mol. Microbiol.* 43:437-448.
- Snipes K.P., Ghazikhanian G.Y., Hirsh D.C., 1987. Fate of *Pasteurella multocida* in the blood vascular of turkeys following intravenous inoculation: comparison of an encapsulated, virulent strain with its avirulent, acapsular variant. *Avian. Dis.* 31:254-259.
- Snyder S.B., Fox J.G., Soave O.A., 1973. Subclinical otitis media associated with *Pasteurella multocida* infections in New Zealand white rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Lab. Anim. Sci.* 23:270-272.
- Soriano-Vargas E., Vega-Sánchez V., Zamora-Espinosa J.L., Acosta-Dibarrat J., Aguilar-Romero F., Negrete-Abascal E., 2011. Identification of *Pasteurella multocida* capsular types isolated from rabbits and other domestic animals in Mexico with respiratory diseases. *Trop. Anim. Health. Prod.* 44:935-937.
- Srivastava S.K., 1998a: Outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype B:2 is immunogenic and antiphagocytic. *Indian J. Exp. Biol.* 36:530-532.

- Stojiljkovic I., Baumler A.J., Hantke K., 1994. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J. Mol. Biol.* 236:531-545.
- Suckow M., Bowersock T.L., Nielsen K., Chrisp C.E., Frandsen P.L., Janovitz E.B., 1995. Protective immunity to *Pasteurella multocida* heat-labile toxin by intranasal immunization in rabbits. *Lab. Anim. Sci.* 45:526-532.
- Suckow M.A., Bowersock T.L., Park H., Park K., 1996. Oral immunization of rabbits against *Pasteurella multocida* with an alginate microsphere delivery system. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 8:131-139.
- Suckow M.A., Haab R. W., Miloscio L.J., Guilloud N.B., 2008. Field trial of a *Pasteurella multocida* extract vaccine in rabbits. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 47:18-21.
- Tabatabaei M., Liu Z., Finucane A., Parton R., Coote John., 2002. Protective Immunity Conferred by Attenuated aroA Derivates of *Pasteurella multocida* B:2 Strains in a Mouse Model of Haemorrhagic Septicemia. *Infect. Immun.* 70:3355-3362.
- Thigpen J.E., Clements M.E., Gupta B.N., 1978. Isolation of *Pasteurella aerogenes* from the uterus of a rabbit following abortion. *Lab. Anim. Sci.* 28:444-447.
- Townsend K. M., Boyce J. D., Chung J. Y., Frost A. J., Adler, B., 2001. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.* 39: 924-929.
- Truscott W.M., Hirsh D.C., 1988. Demonstration of an outer membrane protein with antiphagocytic activity from *Pasteurella multocida* of avian origin. *Infect. Immun* 56:1538-1544.
- Tsuji M., Matsumoto M., 1989. Pathogenesis of fowl cholera: influence of encapsulation on the fate of *Pasteurella multocida* after intravenous inoculation into turkeys. *Avian. Dis.* 33:238-247.
- Verma S., Sharma M., Katoch S., Verma L., Kumar S., Dogra V., Chahota R., Dhar P., Singh C., 2013. Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Vet. Res. Commun.* doi:10.1007/s11259-012-9539-5.
- Villa A., Gracia E., Fernández A., Albizu I., Baselga R., 2001. Patología Respiratoria en conejos de granja. *Veterinary Record.* 23:788-790.
- Virag G., Kulcsar G., Farsang A., Makranszki L., 2005. Mice pathogenicity of *Pasteurella multocida* strains isolated from diseased and health rabbits. *ASM Conf. on Pasteurellaceae*, Kohala Coast, Big Island, Hawaii, USA, 23-26 october, Abstract 57.
- Webster L.T., 1926. Epidemiological studies on respiratory infections of the rabbit. VII. Pneumonias associated with *Bacterium leprosepticum*. *J. Exp. Med.* 43:555-572.
- White D.J., Jolley W.L., Purdy C.W., Straus D.C., 1995. Extracellular neuramidase production by a *Pasteurella multocida* A-3 strain associated with bovine pneumonia. *Infect. Immun.* 63:1703-1709.
- Wijewardana T.G., Wilson C.F., Gilmour N.J., Poxton I.R., 1990. Production of mouse monoclonal antibodies to *Pasteurella multocida* type A and the immunological properties of a protective anti-lipopolysaccharide antibody. *J. Med. Microbiol.* 33:217-222.
- Woolcock J.B., Collins F.M., 1976. Immune Mechanism in *Pasteurella multocida*-Infected Mice. *Infection and Immunity.* 13:949-958.
- Wu J.R., Shien J.H., Shien H.K., Chen C.F., Chang P.C., 2007. Protective immunity conferred by recombinant *Pasteurella multocida* lipoprotein E (PlpE). *Vaccine.* 25:4140-4148.