



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Medicina Veterinaria

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria

“Evaluación de la inmunogenicidad *in vivo* de una proteína recombinante de *Pasteurella multocida* aislada de un brote de neumonía aguda en alpacas (*Vicugna pacos*)”

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Gerald Urbano MORENO MORALES

ASESOR

Dr. Abelardo Lenin MATURRANO HERNÁNDEZ

Lima, Perú

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

Trabajo sustentado y aprobado ante el Jurado designado por la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria mediante Resolución Directoral N° 0206-EPMV/FMV-2018.

PRESIDENTE:


.....
Hermelinda Rivera Gerónimo

MIEMBROS :

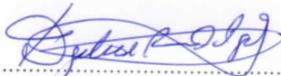

.....
Abelardo Lenin Maturrano Hernández
Asesor de la Tesis


.....
Nieves Nancy Sandoval Chaupe


.....
Miguel Angel Rojas Montes

San Borja, 06 de Diciembre de 2018

V° B°



.....
Dra. Daphne Doris Ramos Delgado
Directora
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria





Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Medicina Veterinaria
Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

En el Auditorio Principal de la Facultad de Medicina Veterinaria, el día **Viernes 07 de Setiembre de 2018**, a las **12:00** horas, se constituyó el Jurado Examinador designado mediante Resolución Directoral N° 0206-EPMV/FMV-2017, integrado por los siguientes profesores:

MV. Mg. Hermelinda Rivera Gerónimo	Presidente del Jurado
Blgo. Dr. Abelardo Lenin Maturrano Hernández	Asesor de la Tesis
MV. Mg. Nieves Nancy Sandoval Chaupe	Miembro del Jurado
MV. Dr. Miguel Ángel Rojas Montes	Miembro del Jurado

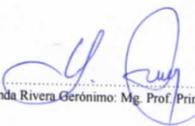
Luego de la instalación del Jurado, a cargo del Presidente del Jurado y bajo la dirección del mismo, el Bachiller Don: **MORENO MORALES, GERALD URBANO** para optar el Título Profesional de Médico Veterinario, procedió a sustentar públicamente la Tesis:

“EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD *in vivo* DE UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE DE *Pasteurella multocida* AISLADA DE UN BROTE DE NEUMONÍA AGUDA EN ALPACAS (*Vicugna pacos*)”,

Luego de absolver las preguntas del Jurado y del público asistente, el Jurado deliberó con la abstención reglamentaria del Asesor de la Tesis y acordó su **APROBACIÓN** por **UNANIMIDAD**, otorgándole la nota de **DIECISIETE (17)**.

Habiéndose aprobado la sustentación pública de la Tesis, el Presidente en representación del Jurado recomienda que la Escuela Profesional de Medicina Veterinaria proponga la aprobación del **TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO** a la Facultad de Medicina Veterinaria y que ésta proponga al Rectorado el otorgamiento respectivo.

Siendo las **13:00 horas**, concluyó el acto académico de sustentación pública de Tesis en fe de lo cual suscriben la presente acta por cuadruplicado los integrantes del Jurado:


Hermelinda Rivera Gerónimo: Mg. Prof. Principal, D.E.


Abelardo Lenin Maturrano Hernández: Dr. Prof. Asociado T.C.


Nieves Nancy Sandoval Chaupe: Mg. Prof. Auxiliar I, D.E.


Miguel Ángel Rojas Montes: Mg. Prof. Auxiliar T.C.

*A los futuros Médicos Veterinarios Inmunólogos, a los estudiantes que nunca se rinden,
aunque todo juegue en su contra, a los amantes del metal ya todas las personas que
sufren de depresión o de algún vicio*

AGRADECIMIENTOS

Al Jefe de la Unidad de Biología y Genética Molecular, el Dr. Raúl Rosadio Alcántarapor la confianza depositada, por la constante crítica constructiva y su interés en esta rama que es la vacunología, y a mi asesor de tesis, el Dr. Lenin Maturrano Hernández, por su mentoría, consejos, por guiarme y alentarme en esta empresa.

Al Dr. Guido Medina Suca y a todos los miembros del CIP “La Raya” Puno, por permitirme el uso de los animales necesarios en esta investigación, por involucrarse científicamente con este proyecto, por ser mentor y amigo a la vez. A los alumnos de la escuela de Medicina Veterinaria de la UNA y a los alumnos de la Escuela técnica agropecuario de la UNA.

Gracias a Jorge Maximiliano, Anita Chero por su amistad y su compromiso sustancial y paciencia en las fases iniciales y finales de este estudio.

Gracias a Juan Siuce, Marjorie Aleman, Dennis Carhuaricra, Susana Ascencios por apoyarme siempre en todo momento, en cada fase de esta tesis. A todos los miembros del laboratorio que laboraron en el periodo 2017 y 2018: Carla, Grecia, Christian, Laura, y tesisistas del labo.

A mi familia y a mi Deisy por las palabras de ánimo, soportarme todo este periodo de mucho estrés y a Dios por mantener viva mi fe.

El presente estudio fue financiado por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad INNOVATE Perú (Fincyt), proyecto contrato N°133-FINCYT-IB-2013: “Vacunología Reversa: Desarrollo de una Vacuna de Nueva Generación para el control y/o prevención de la neumonía pasteurelósica en alpacas”.

Este estudio recibió el apoyo del Vicerrectorado de Investigación y Postgrado a través del Programa de promoción de tesis de pregrado de la UNMSM 2017 – 2da etapa.

Innovate Perú



CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE CUADROS	vi
LISTA DE ANEXOS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	3
1. Producción de alpacas en el Perú	3
2. <i>Pasteurella multocida</i>	4
3. Enfermedades causadas por <i>Pasteurella multocida</i>	6
3.1. <i>Pasteurella multocida</i> en animales.....	6
3.2. Neumonía aguda de las alpacas.....	8
4. Factores de virulencia de <i>Pasteurella multocida</i>	16
4.1. Proteínas de membrana externa (OMPs) de <i>Pasteurella multocida</i>	16
4.2. Lipoproteínas asociadas al peptidoglicano	17
4.3. Otras proteínas estructurales de membrana externa	19
4.4. Cápsula.....	20
4.5. LPS	20
4.6. Proteínas de adquisición y reguladoras de hierro	21
4.7. Toxina dermonecrótica (PMT)	21
5. Inmunidad contra <i>Pasteurella multocida</i>	22
6. Mecanismos inmunológicos de la vacunación.....	24
7. Vacunas veterinarias.....	28
7.1. Adyuvantes inmunológicos	30
7.2. Vacunas contra <i>Pasteurella multocida</i>	31
7.2.4. Ensayos con otras vacunas en animales	36
8. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).....	38
8.1 Prueba de ELISA indirecta	38
III. MATERIALES Y MÉTODOS	42
1. Lugar de ejecución	42
2. Animales.....	42
3. Preparación de bacterina para inoculación	43
4. Preparación de proteína recombinante para inoculación	43
5. Preparación de antígeno total de <i>P. multocida</i> para ELISA.....	43

6.	Preparación de proteína recombinante para ELISA.....	44
7.	Estandarización de ELISA indirecta.....	44
8.	Materiales de ELISA indirecta	45
9.	Procedimiento ELISA indirecto de punto único	45
10.	Diseño de estudio.....	46
11.	Análisis estadístico	46
12.	Consideraciones éticas	47
IV.	RESULTADOS	48
V.	DISCUSIÓN	55
VI.	CONCLUSIONES	59
VII.	RECOMENDACIONES	60
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	61
IX.	ANEXOS.....	87

RESUMEN

La neumonía aguda de las alpacas es causada principalmente por la bacteria Gramnegativa denominada *Pasteurella multocida*, por lo que es necesario el control de la proliferación de esta bacteria a través de la vacunación. Estudios bioinformáticos han propuesto a la P6-like como un buen candidato vacunal, así mismo, ensayos *in vitro* y en modelo ratón han comprobado su inmunogenicidad. El objetivo del presente estudio es evaluar la inmunogenicidad de la proteína recombinante de *Pasteurella multocida* denominada rP6-like en alpacas, mediante la prueba de ELISA. El ensayo de campo se realizó en el Centro de Investigación y Producción “La Raya”-UNA y el procesamiento de las muestras, en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología, sección Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria, UNMSM. Para ello se formaron cuatro grupos de cinco animales cada uno (n=5), a los cuales se les inocularon cuatro productos, solución salina normal, bacterina, rP6-like y rP6-like + bacterina, se tomaron muestras de sangre en el día cero (prevacunación) y el quinto, séptimo, noveno, décimo segundo y décimoquinto día postvacunación. Posteriormente se estandarizaron pruebas de ELISA *in house* indirecta de punto único, para la cuantificación relativa de anticuerpos específicos anti rP6-like de los grupos inoculados con la proteína y del grupo control, y otro ELISA para anticuerpos anti-antígeno total de *P. multocida* para evaluar los grupos inoculados con bacterina y bacterina + rP6-like. El grupo que presentó mayor elevación en sus niveles de anticuerpos séricos con respecto al día cero, fue el inoculado con la rP6-like, además, este produjo una respuesta más temprana, encontrándose diferencias significativas a partir del séptimo día con respecto al grupo control. En el caso de la bacterina se observó elevación significativa a partir del noveno día a comparación del día cero, para posteriormente presentar elevación no significativa hasta último día de seguimiento. En cambio, la bacterina junto con la proteína, no produjo elevación significativa en ningún día del ensayo. Con este estudio se evidencia la inmunogenicidad de la rP6-like lo cual sugiere continuar con estudios de eficacia.

Palabras clave: *Pasteurella multocida*, vacuna recombinante, P6-like, alpacas, ELISA.

ABSTRACT

The acute pneumonia of the alpacas is caused mainly by the Gram negative bacterium called *Pasteurella multocida*, so it is necessary to control the proliferation of this bacterium through vaccination. Bioinformatic studies have proposed rP6-like as a good vaccine candidate, and in vitro and mouse models have proven their immunogenicity. The objective of the present study is to evaluate the immunogenicity of the recombinant protein of *Pasteurella multocida* called rP6-like in alpacas, by means of the ELISA test. The field trial was carried out in the Research and Production Center "La Raya" - UNA and the processing of the samples, in the Laboratory of Microbiology and Parasitology, section Biology and Molecular Genetics of the Faculty of Veterinary Medicine, UNMSM. To this end, four groups of five animals were formed (n = 5), which were inoculated with four products, normal saline solution, bacterin, rP6-like and rP6-like + bacterin, blood samples were taken on the day zero (pre-vaccination) and the fifth, seventh, ninth, twelfth and fifteenth day post-vaccination. Subsequently, single-point indirect in house ELISA tests were standardized for the relative quantification of specific anti-rP6-like antibodies of the groups inoculated with the protein and of the control group, and another ELISA for anti-total antigen of *P. multocida* for evaluate the groups inoculated with bacterin and bacterin + rP6-like. The group with the highest elevation in serum antibody levels with respect to day zero, was the one inoculated with the rP6-like, in addition, this produced an earlier response, finding significant differences from the seventh day with respect to the control group. In the case of the bacterin, a significant elevation was observed from the ninth day onwards compared to the zero day, to subsequently present non-significant elevation until the last day of follow-up. In contrast, the bacterin together with the protein did not produce significant elevation on any day of the trial. This study demonstrates the immunogenicity of rP6-like, which suggests continuing efficacy studies.

Key words: *Pasteurella multocida*, recombinant vaccine, P6-like, alpacas, ELISA.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

APC: Células presentadora de antígeno

CD: Marcador de linaje

***toxA*:** Gen que codifica la toxina dermonecrotica.

PMT: Toxina de *Pasteurella multocida* o dermonecrotina.

rPMT: Toxina dermonecrotica de *Pasteurella multocida* recombinante

Pm: *Pasteurella multocida*.

OmpH: Proteína de membrana externa H.

PlpE: Lipoproteína E.

***omp16*:** Gen que codifica la proteína de membrana externa P6-like de *P. multocida*.

P6-like: Proteína de 16KDa ubicada en la membrana externa de *P. multocida*.

rP6-like: Proteína recombinante P6-like.

FPT: Falla en la transferencia de la inmunidad pasiva.

IgG: Inmunoglobulina G.

IgM: Inmunoglobulina M.

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción de enzimas ligadas.

RA: Rinitis atrófica.

CA: Cólera aviar

FE: Fiebre del embarque.

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

NEB: Neumonía enzootica bovina.

ERB: Enfermedad respiratoria bovina.

OMP: Proteína de membrana externa.

PAL: Lipoproteína asociada al peptidoglicano.

LPS: Lipopolisacárido.

Ag: Antígeno.

IL: Interleucina.

TLR: Toll-like receptor.

PRR:Receptor de patrones moleculares asociados a patógenos.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

BCR: Receptor de células B

TCR: Receptor de células T

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

ADN:Ácido desoxirribonucleico.

UV: Radiación Ultravioleta

HRP:Peroxidasa de rábano picante

TMB:3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Placa petri con cultivo de <i>Pasteurella multocida</i> a las 24 horas, cepa local.	12
2. Modelo de patogénesis de <i>Pasteurella multocida</i> de disbiosis de microbiota nasal.	16
3. Secuencia y estructura predicha de la Omp16 (P6-like) de <i>Pasteurella multocida</i> serotipo B:2 cepa P52. A.	19
4. Programación de respuesta inmune humoral mediante vacunación.	27
5. Correlación entre los títulos de anticuerpos con varias fases de la respuesta vacunal.	28
6. Diagrama esquemático que explica el principio de la ELISA indirecta.	41
7. Resultados del ELISA para los niveles de IgG (OD ₆₅₀) anti-proteína total de PM frente a la inoculación de la bacterina.	50
8. Resultados del ELISA para los niveles de IgG (OD ₆₅₀) anti- rP6-like frente a la inoculación de la rP6-like.	50
9. Resultados del ELISA para los niveles de IgG (OD ₆₅₀) anti-proteína total de PM frente a la inoculación de la bacterina + rP6-like.	51
10. Resultados del ELISA para los niveles de IgG (OD ₆₅₀) frente a tres productos biológicos y grupo control.	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Medidas de tendencia central y de dispersión de los cuatro grupos empleados en el experimento.	52
2. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD650) anti-proteína total de PM en cada uno de los animales inoculados con la bacterina	53
3. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD650) anti-rP6-like en cada uno de los animales inoculados con la P6-like	53
4. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD650) anti-proteína total de PM en cada uno de los animales inoculados con la bacterina + rP6-like	54
5. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD650) anti rP6-like en cada uno de los animales inoculados con solución salina normal	54

LISTA DE ANEXOS

Cuadro anexo	Página
1. Listado de animales usados en el experimento.	87

I. INTRODUCCIÓN

La producción de alpacas es la principal actividad económica para los pequeños, medianos productores y empresas asociativas de las comunidades del altiplano peruano; sin embargo, las enfermedades de origen infeccioso que inciden principalmente en alpacas de edad temprana, merman la producción y rentabilidad de esta actividad económica (Ameghino y De Martini, 1991; FAO, 2005). El alto índice de mortalidad neonatal y de alpacas jóvenes (tuis), se refleja en la reducción de la población total, reducción de logrados al destete, disminución de hembras y machos de reemplazo, y reducción de la producción de fibra (FAO, 2005). Dentro del grupo de enfermedades que afectan a las alpacas, destaca la neumonía aguda como una de las principales causas de muerte en las crías y tuis (Ameghino y De Martini, 1991).

En crías, se han reportado cifras de mortalidad mayores al 27% (Ramírez, 1989), siendo *Pasteurella multocida* el principal agente bacteriano involucrado en este complejo respiratorio. Se teoriza que en alpacas invade el tejido pulmonar luego de un evento de estrés o previa infección viral (Rosadio *et al.*, 2011). Existen medidas de prevención de la neumonía aguda que se han introducido en la población expuesta, tales como uso de antibióticos, uso de cobertizos, mejoras en el manejo, ingestión de calostro, etc.; sin embargo, estos métodos no poseen elevada eficacia empleados por sí mismos (Cid, 2010).

Las vacunas comerciales basadas en toxoides contra otras enfermedades como la enterotoxemia, causada por *Clostridium perfringens*, son efectivas para la prevención de enfermedad en ovinos (Titball, 2009), y alpacas (Yaya y Rosadio, 2005); sin embargo,

no existen estudios a cerca de eficacia de vacunas contra la neumonía aguda en las alpacas (Espada *et al.*, 2010). Todas las vacunas deberán inicialmente ser probadas en cultivos celulares y animales experimentales, para posteriormente ser evaluadas en la especie de destino, con el objetivo de medir su eficacia protectora e inmunogenicidad, en este último caso, es comúnmente usada la prueba de ELISA indirecta en muestras de suero de animales vacunados, colectadas en diferentes momentos (OIE, 2015a).

Debido a la falta de estudios en la neumonía aguda de las alpacas, especialmente en su tratamiento, diagnóstico, patogénesis y en la interacción entre *Pasteurella multocida* y las defensas del organismo, son muy usados los modelos explicativos diseñados para la enfermedad en bovino, particularmente a la enfermedad denominada neumonía enzootica de los terneros y fiebre del embarque (Rosadio *et al.*, 2011).

El objetivo del presente estudio es evaluar la capacidad inmunogénica de una proteína recombinante denominada rP6-like, comparándola contra un grupo control y tomando como referencia relativa un grupo inoculado con una bacterina de *P. multocida* y otro inoculado con rP6-like + bacterina de *P. multocida*, mediante la técnica de ELISA *in house* indirecta de punto único.

II. ANTECEDENTES

1. Producción de alpacas en el Perú

La alpaca (*Vicugna pacos*) constituye un importante recurso genético de gran importancia social, económica y científica para el Perú y el mundo. Los productos más resaltantes que se obtienen de este camélido son: la fibra, la cual es muy cotizada por sus cualidades textiles, y la carne, que tiene propiedades nutricionales superiores a otros animales, además de las pieles y cueros por su uso artesanal (FAO, 2005).

El Perú es el país que posee la mayor cantidad de alpacas (*Vicugna pacos*) ya que cuenta con tres millones 592 mil 482 unidades, representando el 89% de la población de alpacas del mundo (INEI, 2013). La crianza de alpacas en el Perú está distribuida principalmente en los departamentos de Puno (55%), Cuzco (12%), Arequipa (10%) y Huancavelica (6%) (INEI, 2013). Además, esta crianza se distribuye principalmente en la sierra sur y central, y en altitudes que van desde los 3800 msnm y por encima de los 5000 msnm (FAO, 2005; Ameghino y DeMartini, 1991).

La producción de alpacas, en la región llamada puna o jalca, es la principal actividad económica para los pequeños, medianos productores y empresas asociativas de las comunidades del altiplano peruano (Ameghino y DeMartini, 1991; FAO, 2005). Los pequeños productores concentran el 85% de las unidades agropecuarias, y se encuentran dispersas en grupos de 50 a 100 cabezas por rebaño (INEI, 2013). En efecto, estos animales son en muchos casos, la única fuente de alimento e ingresos para una gran cantidad de población rural que vive por encima de los 3800 msnm (Bustinza *et al.*, 1988).

Esta actividad productiva se encuentra mermada, pues existe una elevada mortalidad en las crías y una baja natalidad (Ramírez, 1989). La presentación de estos problemas varían según la región, por ejemplo, en la región de Puno predominan las enfermedades infecciosas, las cuales son la primera causa de muerte en alpacas de esa región (Ameghino y DeMartini, 1991).

Dentro del grupo de enfermedades infecciosas, destaca la neumonía como la segunda principal causa de muerte en las crías (Rosadio *et al.*, 2011; Rosadio *et al.*, 1990) y una de las principales causas de muerte en tuis (Guzmán *et al.*, 2013), eso se traduce en pérdidas económicas para los productores, ya sea por la reducción de la población total, reducción de logrados al destete, disminución de animales de reemplazo y reducción de la saca (FAO, 2005). La mortalidad por neumonía, en alpacas de todas las edades, representa del 17,4% de la mortalidad total en el Centro de Investigación y Producción “La Raya” de la Universidad Nacional de Puno (Mamani *et al.*, 2009).

Este mal, frecuentemente adopta el nombre de neumonía aguda, debido a su fugaz período de presentación clínica. A esta enfermedad también se le conoce como complejo respiratorio debido a que es ocasionado, en orden temporal, tanto por agentes virales como bacterianos, siendo el agente bacteriano más importante *Pasteurella multocida* (Rosadio *et al.*, 2011).

2. *Pasteurella multocida*

A este género pertenecen bacterias Gram negativas con forma bacilar o cocobacilar, midiendo 0,3 – 1 μm de diámetro y 1-2 μm de longitud, dependiendo de la fase de crecimiento se pueden mostrar aislados, en pares o en cadenas cortas. Son inmóviles, no esporulados y poseen un metabolismo quimioorganotrofo, pudiendo ser tanto de tipo oxidativo como fermentativo. La mayoría de las especies reducen los nitratos a nitritos y son negativas a en la reacción de rojo de metilo y la producción de acetoina (Voges-Proskauer) (Mutters *et al.*, 2015; Holt *et al.*, 1994). Casi todas las especies son oxidasa y catalasa positivas, catabolizan la D-glucosa y otros carbohidratos con la producción de ácido, pero no de gas (Vadillo *et al.*, 2003). Además, se caracterizan por ser anaerobias facultativas, pudiendo crecer bajo condiciones aeróbicas, microaerófilas o anaeróbicas, y crecen de manera óptima de 37°C a 41°C (Boyce *et al.*, 2010).

La especie *Pasteurella multocida* pertenece al dominio: *Bacteria*, phylum: *proteobacteria*, clase: *gammaproteobacteria*, orden: *pasteurellales*, familia *Pasteurellaceae*, género *Pasteurella*. (Mutters *et al.*, 2015; Harper *et al.*, 2006). Mutters *et al.* (1985) reclasificaron este género mediante estudios de hibridación de ADN-ADN y desde el 1999, este género ha sufrido muchas modificaciones (Jaramillo *et al.*, 2009). Dentro del género *Pasteurella* están incluidas 12 especies con nombre propio (Boyce *et al.*, 2010), pero basado en estudios filogenéticos de similaridad del gen 16S rRNA y genes los housekeeping, *infB*, *rpoB*, *infB*, y *atpD* (Kuhnert *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 2005; Kuhnert y Korczak, 2006), sólo las especies *P. multocida*, *P. dagmatis*, *P. canis* y *P. stomatisson* postuladas como miembros del género *Pasteurella sensu stricto* (Korczak y Kuhnert, 2008; Mutters *et al.*, 2015).

El nombre *Pasteurella multocida* fue propuesto en 1938 para incluir a las bacterias típicamente productoras de indol, no hemolíticas y aisladas de casos de Septicemia Hemorrágica (Rosenbusch y Merchant, 1939). Actualmente esta especie puede ser separada de los otros miembros del género por su reacción positiva a la ornitina descarboxilasa, formación de indol, producción de ácido a partir de (-) D-manitol, y negativa a la producción de maltosa y dextrina (Mutters *et al.*, 2015). *Pasteurella multocida* se subdivide en tres subespecies: *P. multocida* subsp. *multocida*, *P. multocida* subsp. *gallicida* y *P. multocida* subsp. *septica* en base a los análisis de hibridación DNA-DNA y producción de ácido a partir de dulcitol y (-) D-sorbitol (Boerlin *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2001).

Existen 5 tipos capsulares o serogrupos (A, B, D, E y F) en base a su composición capsular y el test de hemaglutinación directa (Carter *et al.*, 1952) y 16 serotipos somáticos (1-16) LPS y al test de inmunodifusión en agar gel (Heddleston *et al.*, 1972). En efecto se utiliza una nomenclatura que incluye ambos test serológicos para designar las diferentes cepas aisladas (ej. A:3, que significa posee serovar A y serotipo LPS 3) (Boyce *et al.*, 2010). Debido al tiempo, al costo de ejecución de las pruebas serológicas clásicas y a la dilucidación la estructura de los *loci* de biosíntesis de la cápsula y LPS, se han desarrollado métodos de genotipado por PCR más accesibles y precisos, usados actualmente en todo el mundo (Townsend *et al.*, 2001; Harper *et al.*, 2015; OIE, 2015b).

Pasteurella multocida forma parte de la microbiota de las vías respiratorias altas de alpacas adultas y otros rumiantes sanos (Barsallo, 1985); pero siguiendo el modelo de patogénesis del bovino, en condiciones de estrés, infección vírica, y otros factores desencadenantes puede convertirse en invasores secundarios y desempeñar un papel significativo en la patogénesis de la neumonía aguda en las alpacas (Rosadio *et al.*, 2011).

3. Enfermedades causadas por *Pasteurella multocida*

3.1. *Pasteurella multocida* en animales

La especie *Pasteurella multocida* es agente primario de enfermedades como la rinitis atrófica en el cerdo (Chanter y Rutter, 1989), la septicémia hemorrágica de los ungulados (DeAlwis *et al.*, 1980), el Cólera aviar (Derieux *et al.*, 1978), y rinitis purulenta (*snuffles*) en el conejo (DiGiacomo *et al.*, 1991). Además, puede ser un agente secundario importante (*major contributor*) de muchas otras enfermedades complejas, como el complejo respiratorio bovino (neumonía enzoótica y fiebre del embarque) y también de otros rumiantes (Dowling *et al.*, 2002; Dabo *et al.*, 2008a), la neumonía enzoótica del cerdo (Hansen *et al.*, 2010), y la neumonía aguda de las alpacas (Rosadio *et al.*, 2011). De igual modo, se puede comportar como una zoonosis que se transmite a través de rasguños, mordidas y contacto con secreciones de mucosas provenientes de animales, originando a veces condiciones graves tales como bacteremia, meningitis, abscesos cerebrales, peritonitis espontáneas, y abscesos intraabdominales (Oehler *et al.*, 2009).

El cólera aviar es una enfermedad sistémica que afecta a un amplio abanico de especies de aves domésticas y silvestres (Derieux *et al.*, 1978), en esta enfermedad está involucrada en esencia, el serogrupo A, no obstante, también se ha reportado el serogrupo E en pavos (Wilkie *et al.* 2012). A parte de los signos y lesiones respiratorias, esta bacteria causa lesiones necróticas en hígado y lesiones hemorrágicas en el epicardio, peritoneo y otros órganos (Saif *et al.*, 2008).

En el caso de la rinitis atrófica en el cerdo que se produce una destrucción de los huesos etmoturbinados en los cerdos jóvenes, estos efectos son atribuidos a la

dermonecrotóxina o PMT sintetizada por *P. multocida* toxigénica (Ackermann *et al.*, 1991) y esta a su vez, asociada a los serogrupos A y D (Davies *et al.*, 2003; Eamens *et al.*, 1988).

La rinitis purulenta (*snuffles*) en el conejo se caracteriza por una seria descarga nasal que evoluciona de serosa a mucopurulenta y puede derivar en una neumonía supurativa fulminante y fatal (Dillehay *et al.* 1991), esta enfermedad es causada por los serovares A y D (DiGiacomo *et al.*, 1989).

La septicemia hemorrágica de los ungulados, la cual tiene curso agudo con signos respiratorios, entre otros, se origina cuando un animal portador dispersa el agente infeccioso a otros animales susceptibles desencadenando un brote (De Alwis *et al.*, 1990), los serovares implicados son el B y el E. (De Alwis, 1992).

El complejo respiratorio bovino (neumonía enzoótica y fiebre del embarque), y la neumonía aguda de las alpacas como se explica en apartados posteriores, son causadas por el serogrupo de *Pasteurella multocida*, el serogrupo A (Rosadio *et al.*, 2011).

La neumonía enzoótica de los terneros, usualmente se refiere a la enfermedad respiratoria en terneros en confinamiento (Dabo *et al.*, 2008a) y es una enfermedad que posee muchas similitudes con la neumonía en alpacas (Rosadio *et al.*, 2011), por presentarse frecuentemente a manera de brotes y estar causado por patógenos similares, tales como, *Mycoplasma sp* (Virtala *et al.*, 2000), *Mannheimia haemolytica* (Van Donkersgoed *et al.*, 1993), así mismo, Coronavirus (Storz *et al.*, 2000; Autio *et al.*, 2007), Adenovirus (Autio *et al.*, 2007), Parainfluenza-3 y el Virus respiratorio sincitial bovino (BRSV) (Van Donkersgoed *et al.*, 1993; Autio *et al.*, 2007) e *Histophilus somni* (Gagea *et al.*, 2006). Ocurre generalmente en terneros de 2 a 6 meses de edad (Ames, 1997), en estudios de terneros más jóvenes se ha encontrado que posee pico de incidencia es cercano a las cuatro a seis semanas de edad (Waltner Toews *et al.*, 1986); aunque también hay casos en terneros mayores a 1 año de edad (Campbell, 2016). Los criterios diagnósticos de esta enfermedad no están muy bien establecidos, pero se puede notar típicamente: depresión, tos, descarga nasal, fiebre, apetito reducido (Dabo *et al.*, 2008a; Dowling *et al.*, 2004). Hasta el momento, el desarrollo de esta enfermedad se le ha atribuido al serogrupo A de *Pasteurella multocida* (Frank, 1989; Rimler y Rhoades, 1989). Se ha logrado reproducir la enfermedad mediante la administración

intratraqueal de una dosis infectiva de 1×10^8 UFC de *P. multocida* serotipo A:3 (Dowling *et al.*, 2002). La contribución de *P. multocida* parece ser mayor en la neumonía de los terneros que en la fiebre del embarque, encontrándose más frecuentemente que *Mannheimia haemolytica* (Bryson *et al.*, 1978; Virtala *et al.*, 2000). A pesar de que se pueden distinguir subpoblaciones comensales y patógenas de *P. multocida* responsables de enfermedades como la rinitis atrófica y neumonía porcina (Davies *et al.*, 2003), aún se desconoce las diferencias entre las subpoblaciones comensales y patógenas para la neumonía enzootica de los terneros (Dabo *et al.*, 2008a) y la neumonía aguda de las alpacas (Rímac *et al.*, 2017).

En efecto, existe asociación entre el serogrupo capsular, la enfermedad producida y la especie animal afectada. El aislamiento de otros tipos capsulares no clásicos es posible debido a los constantes cambios evolutivos del patógeno y la infección cruzada entre especies (Dziva *et al.* 2008) lo que resulta en la emergencia de nuevas cepas patógenas (Narayan *et al.*, 2014). Un estudio recientemente publicado, donde se usó una aproximación pangenómica, señalan que las cepas de *Pasteurella multocida*, incluida la cepa de alpaca, están evolutivamente distanciadas, siendo hospedero específicas (Maturrano *et al.*, 2017).

3.2. Neumonía aguda de las alpacas

3.2.1. Etiología

La neumonía aguda de las crías de alpaca es una descripción más que un diagnóstico, por ello muchas veces adopta el nombre de neumonía de las alpacas jóvenes, puesto que se ha observado el mismo cuadro clínico en alpacas tuis (de 8 meses aprox.) (Guzmán *et al.*, 2013). Esta enfermedad ha recibido también la denominación de “Complejo respiratorio”, ya que es causado por múltiples agentes virales y bacterianos como, el virus Parainfluenza 3 (PI3) y el virus respiratorio sincitial bovino (BRSV), los cuales provocan una infección primaria que permite la proliferación de bacterias como *Pasteurella multocida* y *Manheimia haemolytica* (Rosadio *et al.*, 2011; Guzmán *et al.*, 2013). También han sido reportadas coinfecciones del Coronavirus bovino tipo 2 (Crossley *et al.*, 2010; Luna, 2015), Adenovirus bovino tipo 3 (Guzmán *et*

al., 2013), *Klebsiella spp* (Arratia y Herrera, 1992), así como *Streptococcus spp*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria spp* y *Escherichia coli* (Ameghino y Calle, 1989; Guzmán *et al.*, 2013), además existe evidencia serológica de *Mycoplasma spp* (Hung *et al.*, 1988), de Herpesvirus bovino 1 y del Virus de la diarrea viral bovina (Rivera *et al.*, 1987; Manchego *et al.*, 1998). Dela Cruz *et al.* (2017) detectó un polyomavirus de alpaca en los pulmones de una alpaca de 6 meses de edad con linfoma generalizado. También se ha diagnosticado a *Pasteurella multocida* como agente único en la neumonía de alpacas (Cirilo *et al.*, 2012) y bovinos (Dowling *et al.*, 2002), pero su capacidad de originar una infección en condiciones naturales por sí sola es una cuestión de debate (Bryson *et al.*, 1978).

Pasteurella multocida es la bacteria aislada con mayor frecuencia a partir de crías de alpaca y tuis con cuadros de neumonía aguda. En el CIP “La Raya” del departamento de Puno, se aisló *P. multocida* como agente secundario de neumonía aguda de alpacas neonatas (de 5 a 39 días) y posteriormente en alpacas tuis (8 meses) con frecuencias de 50% (11/22) y 55% (15/27) respectivamente (Cirilo *et al.*, 2012; Guzmán *et al.*, 2013). En un estudio realizado en CIICAS – La Raya y Maranganí se encontró 60% (18/30) de frecuencia de aislamiento de *P. multocida* a partir de alpacas muertas por neumonía (León, 2012).

3.2.2. Epidemiología

La neumonía aguda de las alpacas es una enfermedad multifactorial, entre estos factores de riesgo están incluidos: manejo estresante, pobre estado inmunitario, ambiente desfavorable (Ameghino y DeMartini, 1991). Se presume que un factor determinante es la existencia de la amplia fluctuación de más de 20°C de diferencia entre temperaturas bajas y altas (veranillo), esto acompañado de las precipitaciones nocturnas y granizadas que se dan durante la época húmeda, los que coinciden con los meses de parición (enero - marzo) (Winterhalder y Thomas, 1978). Otros factores importantes en el caso de tuis, son la presencia friaje (inclemencias de la época seca), primera esquila (octubre) y destete (Rosadio *et al.*, 1990; Guzmán *et al.*, 2013). Esta enfermedad afecta con mayor frecuencia a las crías de alpaca durante la tercera semana de vida, seguida por la cuarta semana (Rosadio, *et al.* 1990; León, 2012).

Entre los años 1973 y 1979, Ramírez (1991) reportó cifras de mortalidad de 27,5% en las crías, y 26,3% en los tuis. La mortalidad por neumonía, en alpacas de todas las edades, representa del 17,4% de la mortalidad total en el Centro de Investigación y Producción “La Raya” de la Universidad Nacional de Puno (Mamani *et al.*, 2009). Al haber un amplio rango en las cifras de mortalidad por neumonía aguda en cada provincia del Perú, se puede aproximar un rango de mortalidad que oscila entre el 2 y 27% tanto en alpacas como en llamas del altiplano peruano (Ramírez, 1991).

Un estudio de brote, que produjo la mortalidad de 46 alpacas jóvenes ocurrido en el 2014 en la estación “La Raya” UNA Puno, Perú, se encontró que el 96% de aislados (23/24) presentaron el mismo perfil ERIC sugiriendo que la epizootia fue causada por una propagación clonal de una cepa virulenta en la población susceptible. Además, el 100% de aquellos aislados bacterianos presentaron marcadores para serogrupo A, genotipo L6 (asociado a los serotipos LPS 10, 11, 12 y 15) y los genes asociados a virulencia *tox A* y *tbp A*. (Rimac *et al.*, 2017).

Existe un sinnúmero de agentes estresantes de origen ambiental, que juegan un rol muy importante en la patogenia de la enfermedad respiratoria en alpacas tales como, la temperatura durante el período seco (mayo - octubre) la cual oscila de -3 a 18°C, ello acompañado de la escasez de alimento incrementan las probabilidades de infección respiratoria en las alpacas (McGregor *et al.*, 2012). Estos agentes estresantes mencionados aumentan la producción de glucocorticoides y esto incide en la producción de citoquinas tales como IL-1 β , TNF- α y IL-6, las cuales son secretadas por los linfocitos Th1 (Calcagni y Elenkov, 2006; Webster Glaser, 2008). En un experimento *in vitro* realizado por Arias *et al.* (2016) se encontró que existe una mayor regulación positiva para las citoquinas IL-1 α , IL- β , IL-6 y TNF α en las alpacas expuestas a bajas temperaturas a comparación con alpacas que viven a nivel del mar, esto puede ser explicado por la mayor propensión al estrés por una actividad adrenocortical aumentada.

3.2.3. Signos Clínicos

La neumonía aguda de las crías es una enfermedad muchas veces fulminante, en casos hiperagudos el curso es rápido y los animales amanecen muertos, no obstante, en los casos menos severos o agudos se puede notar: depresión, orejas dirigidas hacia atrás, tos, descarga nasal, elevación de la temperatura corporal y respiración superficial

(disnea); la muerte puede ocurrir en uno a tres días después de haberse presentado los signos (Ameghino y DeMartini, 1991). Otros signos reportados son: taquipnea, anorexia, tos, los sonidos pulmonares en auscultación son muy poco frecuentes o muy ligeros (Cebra, 2013).

3.2.4. Lesiones

En crías fallecidas por neumonía aguda, se ha aislado *P. multocida* a partir de pulmones con tres tipos de lesiones histopatológicas, las cuales corresponden a, bronconeumonía aguda fibrinonecrotizante supurativa severa y difusa, bronconeumonía aguda leve a moderada supurativa difusa, y congestión y edema pulmonar aguda, moderada a severa y difusa (Cirilo *et al.*, 2012). En cuadros de neumonía en tuis, se ha aislado *P. multocida* de lesiones similares a las encontradas por Cirilo *et al.* (2012) a excepción de que en estos últimos se ha observado agregado linfocítico peribronquial (Guzmán *et al.*, 2013).

3.2.5. Diagnóstico

La mera presencia de *Pasteurella multocida* en las vías respiratorias altas no es diagnóstica de la enfermedad, además hace falta realizar *in vivo* pruebas invasivas como lavado transtraqueal (LTT) o biopsia pulmonar (BP) y exámenes *post mortem* como necropsias, histopatología y cultivo bacteriano de pulmón (Dabo *et al.*, 2008a).

Los signos clínicos mencionados en secciones anteriores serán de mucha utilidad, la auscultación en alpacas es complicada y por consecuencia no muy usada (Johnson, 2016). La radiografía torácica, y los lavados traqueales para el examen citológico y cultivo bacteriano, son muy usados en EEUU para confirmar el diagnóstico y la elección del antibiótico (Cebra, 2013). Se ha demostrado que la haptoglobina es un buen marcador de la enfermedad pulmonar causada por *P. multocida* en el ganado bovino (Dowling *et al.*, 2004).

3.2.6. Aislamiento e identificación de *P. multocida*

El medio más utilizado para el aislamiento de *P. multocida* es el agar sangre al 5% de bovino u ovino. Para la recuperación a partir de exudados nasales se recomienda

usar un medio selectivo con clindamicina (2 µg/mL). Las placas se deben incubar durante 24 horas a 37°C en atmósfera aerobia. Las colonias de *P. multocida* son de color blanco, grisáceo, redondas, brillantes y mucoides, estas liberan un olor dulzón característico (Vadillo *et al.*, 2003). Las pruebas bioquímicas más usadas para la identificación de *P. multocida* son: catalasa (positiva), oxidasa (positiva), ureasa (negativa), ornitina descarboxilasa (positiva), L(+)Arabinosa (negativa), D(+)Xylosa, D(-)Mannitol (positiva) (Mutters *et al.*, 2015).

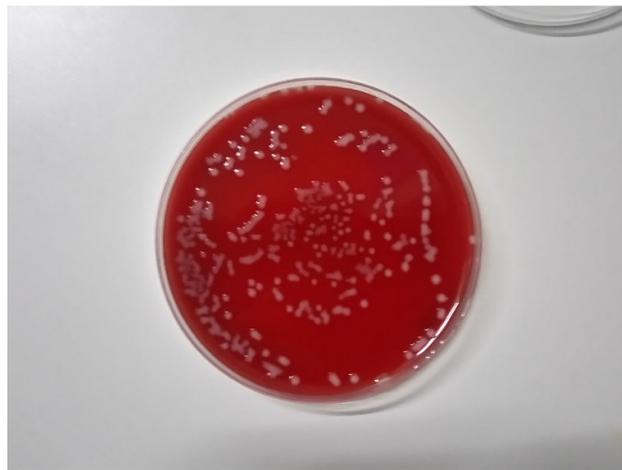


Figura 1. Placa petri con cultivo de *Pasteurella multocida* a las 24 horas, cepa local. Foto cortesía de Dr. Jorge Maximiliano

3.2.7. Tratamiento

El tratamiento de pasteurelisis neumónica en la alpaca, se basan en la experiencia y ensayos ejecutados por empresas de productos veterinarios principalmente en bovinos; pero no se han publicado descripciones detalladas de la eficacia de los diferentes tratamientos (Radostits *et al.*, 2010).

Debido al componente bacteriano, tanto la ERB (Edwards, 2010) y la enfermedad respiratoria de alpacas ha sido tratada con antibióticos. Especies de *Pasteurella sp.* son susceptibles lincosaminas (como la clindamicina) o ciertos β-lactámicos como dicloxacilina o cefalexina, no son muy susceptibles la eritromicina (pero sí a la azitromicina) (Oehler *et al.*, 2009). Pero a pesar de ser un microorganismo relativamente susceptible a una gran variedad de fármacos, el tratamiento de la

enfermedad propiamente dicha es costosa y últimamente ineficaz debido a la corta historia natural de la enfermedad, por ello dependerá del temprano diagnóstico de la enfermedad (Radostits *et al.*, 2010).

En un estudio realizado con cepas de *P. multocida* causante de septicemia hemorrágica, los antibióticos frente a los que resultó tener una mayor sensibilidad fueron con la ciprofoxacina, enrofloxacina, gentamicina (Naz *et al.*, 2012). Existen evidencias que la aparición de *P. multocida* multidrogorresistente proveniente de cerdos en España, está asociado a la presencia de pequeños plásmidos de resistencia, en los cuales se ha encontrado múltiples genes de resistencia tales como: *bla_{ROB-1}*, *strA*, *sul2*, los cuales están vinculados a la resistencia a los β -lactámicos, tetraciclinas/estreptomicina, sulfonamidas (San Millan *et al.*, 2009). El análisis de la cepa 36950 (serotipo A:3), aislada de un caso de ERB reveló la presencia de un elemento conjugativo denominado ICEP*mul* está asociado a la multidrogorresistencia a las tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, espectinomicina, estreptomicina, enrofloxacina, florfenicol, tilmicosina y tulatromicina (Michael *et al.*, 2012)

En el caso de la fiebre del embarque, el cual puede ser análogo a los casos menos severos de neumonía aguda de las alpacas, 85-90% de los bóvidos se recuperan a las 24 horas, con el uso de oxitetraciclina, tilmicosina, sulfadoxina-trimetoprim, sulfamidas, penicilina (Radostits *et al.*, 2010). Las concentraciones de oxitetraciclinas son más elevadas en los pulmones de los animales afectados que en los pulmones de animales sanos y se sugiere mantener intervalos de administración de 12 horas (Ames *et al.*, 1985). Mediante una inyección subcutánea de tilmicosina a 10 mg/ Kg, alcanza concentraciones relativamente altas en el tejido patológico que en el sano (Morck *et al.*, 1997). En terneros destetados, la tilmicosina fue muy eficaz como tratamiento en dosis únicas de las neumonías bacterianas secundarias a la neumonía por Virus respiratorio sincitial bovino (Scott *et al.* 1996).

Hasta cierto punto, es viable el uso de fármacos aprobados para el uso en bovinos para el tratamiento de la neumonía aguda de las alpacas, los camélidos sin complicaciones sistémicas pueden recuperarse si se detecta a tiempo la enfermedad (Cebra 2013).

3.2.1. Patogénesis de la neumonía aguda

La neumonía aguda de las alpacas se asemeja mucho a la neumonía enzoótica bovina tanto en patogénesis como en cuadro clínico (Rosadio *et al.*, 2011), por lo que se tomará a esta última como modelo sin dejar de mencionar los estudios hechos en la alpaca. Las bacterias asociadas con la ocurrencia de bronconeumonía en el ganado de engorde, incluyen *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, and *Mycoplasma bovis* las cuales residen como parte de la microbiota del ganado sano (Griffin *et al.*, 2010); pero bajo condiciones de estrés, supresión de la inmunidad o infecciones virales, se multiplican con rapidez en las vías respiratorias altas (Frank y Smith 1983) y colonizan las vías respiratorias inferiores cuando descienden por inhalación (figura 1). Al llegar las bacterias al pulmón, se adhieren con distintos factores de virulencia, para más tarde colonizar la superficie epitelial pulmonar, en efecto se produce la inflamación del pulmón en dirección craneocaudal (bronconeumonía) que se observa como lesiones severas con distinto tipo de exudado (Rosadio *et al.*, 2011) comenzando con patrón de lesiones que se extienden primero en los lóbulos pulmonares craneoventrales (Lopez, 2007). Hay evidencias que la principal fuente de daño del pulmón en el pulmón de bovino con enfermedad respiratoria es el reclutamiento de neutrófilos, los cuales son atraídos por la IL-8, un potente quimioatrayente (Caswell *et al.*, 1998).

La inmunidad del hospedero controla la sobrepoblación de la mucosa nasofaríngea por las especies bacterianas comensales por lo que recientemente se entiende la importancia de esta microbiota en el mantenimiento en la salud respiratoria (De Steenhuijsen *et al.*, 2015; Holman *et al.*, 2015) ya que otorga resistencia a la colonización (Laufer *et al.*, 2011). La disbiosis o disrupción de esta microbiota predispone al desarrollo de enfermedades respiratorias (Pettigrew *et al.*, 2012; De Steenhuijsen *et al.*, 2016). Existe evidencia que la colonización de la nasofaringe por agentes patógenos asociados con el desarrollo de enfermedad respiratoria, por ejemplo, en ganado de engorde, *M. haemolytica* se encuentra en una población normal sana en prevalencia de 13-20% (Klima *et al.*, 2011) frente a una prevalencia de 85-100%, la cual se ha encontrado en poblaciones con bronconeumonía (Booker *et al.*, 2008). Estos datos sugieren que, limitar la colonización de patógenos bacterianos oportunistas reducirá la enfermedad respiratoria en el ganado, y como tal, las estrategias actuales de

manejo para mitigarla enfermedad, está dirigida a la reducción de patógenos mediante el uso de antimicrobianos (metafilaxis) y programas de vacunación (Edwards, 2010).

La adherencia es un requisito indispensable antes de que se establezca una colonización (Hatfaludi *et al.*, 2010). En lo correspondiente a las moléculas de adherencia de *P. multocida* a las células del hospedero o adhesinas, se sabe que el genoma de la cepa Pm70 (código de acceso: AE004439) posee varios genes de proteínas putativas fimbriales y adhesinas tales como, *ptfA*, *flp1* y *flp2*, y las denominadas, hemaglutininas filamentosas, como *hsf1* y *hsf2* (May *et al.*, 2001). Fimbrias tipo IV han sido identificados en la superficie una gran cantidad de bacterias de la especie más su rol en la virulencia permanece indeterminado (Ruffolo *et al.*, 1997). Mediante estudios de mutagénesis, se ha comprobado que, las subunidades pilina Flp, las proteínas de adherencia TadD, y las hemaglutininas filamentosas PfhB1 y PfhB2, cumplen la función de factor de virulencia (Fuller *et al.*, 2000; Harper *et al.*, 2003; Tatum *et al.*, 2005). Se demostró la actividad que desempeña la OmpA en la adhesión a las células Madin Darbin, de riñón de bovino, y a componentes de la matriz extracelular como, fibronectina y heparina (Dabo *et al.*, 2003). Mediante el uso de librerías de fago display se demostró que la ComE1, una adhesina, se une a la fibronectina y al DNA de doble cadena (Mullen *et al.*, 2008a; 2008b).

En lo concerniente al metabolismo del ácido siálico, mediante ensayos *in vivo* de atenuación de los genes *nanE*, *nanA* y *pm1709* la captación de ácido siálico desempeña un papel importante en la virulencia con la reducción significativa de su virulencia. Sumado a eso, se ha postulado que las sialiltransferasas como enzimas relacionadas a la producción de glicoformas sialadas de LPS (Steenberg *et al.*, 2005). Se ha atribuido un rol crítico en la virulencia a las sialiltransferasas codificadas por *pm0188* y *pm0508* en estudios de atenuación (Boyce *et al.*, 2010; Ni *et al.*, 2007).

El genoma de Pm70 posee 104 genes putativos asociados a la virulencia (May *et al.*, 2001). En un estudio reciente donde se analizó el genoma de una cepa nacional de *P. multocida* de alpaca, se han encontrado 42 genes putativos asociados a factores de virulencia, como genes de proteínas de membrana externa *ompH* y *ompA*; hialuronidasas como *nana*, *nanB* y *nanH*, y el gen de la dermonecrotina, *toxA* (Hurtado *et al.*, 2017).

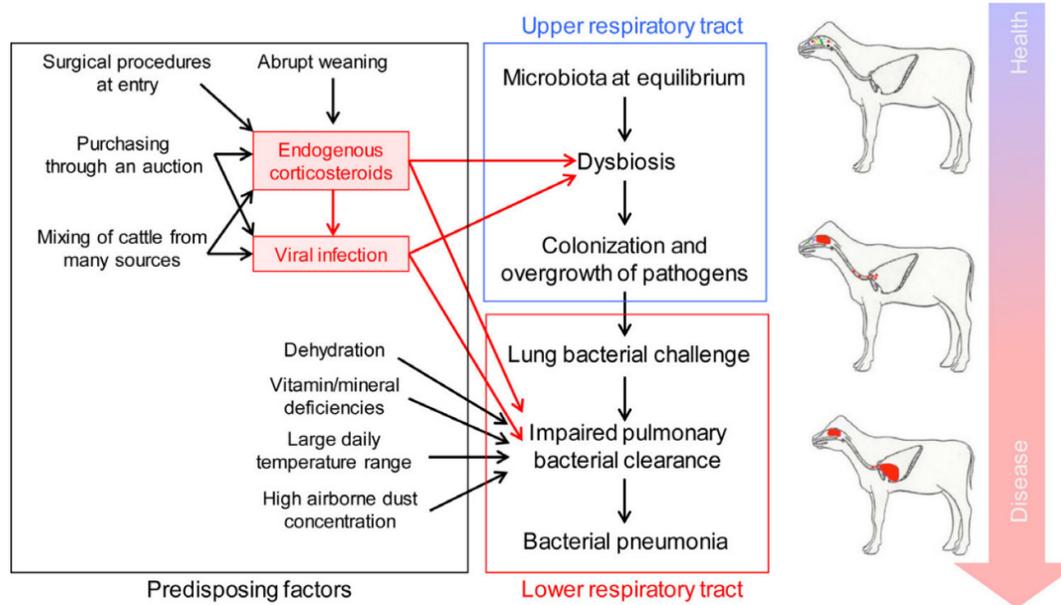


Figura 2. Modelo de patogénesis de *Pasteurella multocida* de disbiosis de microbiota nasal. Todo comienza con un proceso de estrés o disfunción de las microvellosidades por diferentes factores como uso de corticoides, condiciones climáticas abruptas, infección viral, etc. lo que propicia el crecimiento de algunas especies de bacterias que posteriormente desencadenarán la neumonía al descender (Imagen tomada de Timsit *et al.*, 2016).

4. Factores de virulencia de *Pasteurella multocida*

4.1. Proteínas de membrana externa (OMPs) de *Pasteurella multocida*

Existe una gran cantidad de genes que codifican para proteínas de membrana externa (20 - 30% del genoma) y alrededor del 50% de la masa de la membrana externa, está formada por proteínas (Koebnik *et al.*, 2000). Estas proteínas juegan un papel decisivo en la interacción patógeno - hospedero y se caracterizan por ser solubles (al igual que las proteínas citoplasmáticas) y más fáciles de caracterizar que las proteínas de membrana citoplasmática. Estas proteínas se pueden clasificar en 5 categorías, proteínas estructurales (donde se encuentran las lipoproteínas al peptidoglicano), proteínas transportadoras, proteínas de unión, adhesinas, y otras proteínas (Hatfaludi *et al.*, 2010). Mediante análisis bioinformático se predijeron 79 proteínas de membrana

externa de *Pasteurella multocida* (Al-Hasaniet *et al.*, 2007). Muchos autores consideran que las OMPs provenientes de *P. multocida* serogrupo A de bovino son buenos candidatos vacunales basados en la correlación entre altos niveles de anticuerpos y la resistencia ante el desafío experimental (Confer *et al.*, 1996). La correlación entre elevación de anticuerpos y protección ante la inoculación de un extracto de OMPs de *Pasteurella multocida* serogrupo A, no se evidenció en ratones, pero muchos OMPs recombinantes puros, si poseen esa correlación (Abdullahi *et al.*, 1990).

4.2. Lipoproteínas asociadas al peptidoglicano

Las lipoproteínas asociadas al peptidoglicano (PALs) son un tipo de proteínas estructurales y comprende gran parte de las proteínas ubicadas en la membrana externa de las bacterias, estas proteínas estructurales son consideradas a menudo como potenciales antígenos para desarrollo de vacunas contra muchos agentes Gram-negativos incluidos *Pasteurella multocida* (Kovacs *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2007; Shivachandra *et al.*, 2014) y son esenciales para la supervivencia bacteriana y patogénesis; pero su rol en la virulencia no está claro (Godlewska *et al.*, 2009).

El mecanismo de la inmunidad protectora que proveen muchas lipoproteínas no está muy claro, pero se ha demostrado que muchas de ellas se unen a los TLR2 presentes en las células presentadoras de antígeno (APCs) provocando su maduración y su posterior activación de los linfocitos T cooperadores y células B productoras de anticuerpos. (Kovacs *et al.*, 2011)

4.2.1. P6-like

La proteína similar a la P6 o P6-like-*Omp16*, proteína de 16 KDa fue descrita por primera vez por Rickie *et al.* (1995) a partir de una cepa de *P. multocida* de conejo. La secuencia clonada del gen codificante de P6-like presenta elevada homología (81-82% de identidad) con la P6 de *Haemophilus influenzae* (Rickie *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2011). Se ha postulado que la P6-like posee un rol estructural en la membrana debido a que, en realidad es una lipoproteína asociada al peptidoglicano, esto puede actuar como

un anclaje que mantiene juntos a la membrana externa y el peptidoglicano (Nelson *et al.*, 1988). También se cree que esta proteína estabiliza la membrana externa mediante unión no covalente al peptidoglicano (Parsonset *al.*, 2006). Análisis bioinformático indica que la P6-like, pertenece a la superfamilia de lipoproteínas asociadas al peptidoglicano (PAL) tipo OmpA (Babu *et al.*, 2006).

La elevada prevalencia de *Omp16* (el gen de P6-like) en serotipos diferentes y la amplia conservación de la secuencia proteica (100% de identidad a nivel aminoacídico y 97-99% de identidad a nivel nucleotídico) en cepas de distintos serotipos de *Pasteurella multocida* de diferentes fuentes (Shivachandra *et al.*, 2017) y su expresión independientemente del medio en que se encuentra (Wheeler, 2009), nos da pistas de su posible rol fundamental en la célula bacteriana (Kumar *et al.*, 2015). Mediante el análisis del genoma de *Pasteurella multocida* nativa, se han identificado proteínas de membrana externa candidatas vacunales para prevenir esta enfermedad, dentro de estos candidatos figura la proteína de membrana externa P6-like codificada por el gen *Omp16* como candidato vacunal *in silico* (Juscamayta *et al.*, 2014), la cual también fue evaluada *in vitro* obteniéndose resultados prometedores (Maximiliano, 2017).

Se ha dilucidado mediante predicción por SWISS-MODEL *server* la estructura tridimensional de la Omp16 (figura 2), el cual es un monómero α/β sándwich que consiste en 18 residuos ubicados en la región N-terminal seguida por cuatro dominios alfa hélice ($\alpha1 - \alpha4$) y beta ($\beta1 - \beta4$) plegada intercalados, los cuales se unen mediante varias regiones loop flexibles de cuatro a nueve residuos luego de la hoja $\beta4$ se encuentra el extremo C. Omp16 forma una estructura tridimensional α/β sándwich en el siguiente orden: $\alpha1 - \beta1 - \alpha2 - \beta2 - \alpha3 - \beta3 - \alpha4 - \beta4$, se sabe que el punto de lipidación se encuentra en un residuo de cisteína (C20) y está ubicado en el extremo N-terminal de la proteína madura (Kumar *et al.*, 2015).

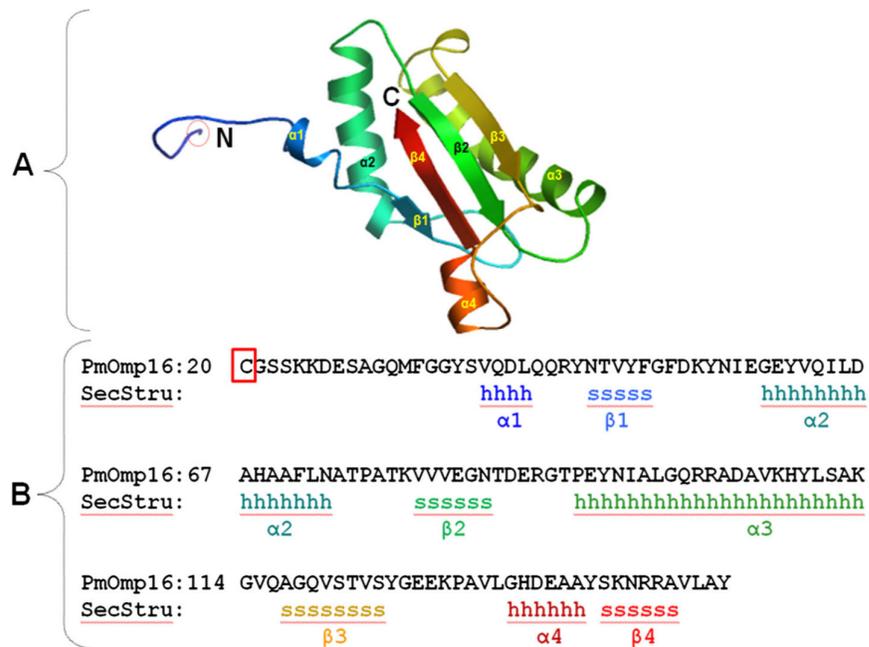


Figura3. Secuencia y estructura predicha de la Omp16 (P6-like) de *Pasteurella multocida* serotipo B:2 cepa P52. A. Sepuede visualizar la estructura de la P6-like de α/β sándwich conformado por cuatro dominios alfa hélice ($\alpha1$ - $\alpha4$) y beta ($\beta1$ - $\beta4$) plegada intercalados. **B.**Secuencia de aminoácidos de la proteína P6-like proveniente de *P. multocida* serotipo B:2 cepa P52 (figura tomada de Kumar *et al.*, 2015).

4.3. Otras proteínas estructurales de membrana externa

Dentro de las proteínas asociadas al peptidoglicano se encuentran la PCP-*lpp* (*Peptidoglycan-associated lipoprotein cross-reacting protein*), una proteína de 15 KDa, la cual se expresa durante la infección (Lo *et al.*, 2004) tanto *in vivo* e *in vitro*, a través de un mecanismo de regulación hacia abajo (Boyce *et al.*, 2006). En ensayos vacunales efectuados en pollos y en ratones donde se inoculó la proteína lipidada y no lipidada, se encontró que ninguno induce protección ante un desafío de *P. multocida* homóloga (Lo *et al.*, 2004).

Las denominadas “Small β -barrel membrane anchors” tal como, OmpA, una proteína de 36 KDa, la cual puede servir también como adhesina (Dabo *et al.*, 2003) y,

además se comprobó que inoculación suero monoclonal anti-OmpA no protege contra una dosis letal de *P. multocida* en ratones (Marandi y Mittal, 1997); pero en otros estudios se concluyó que la OmpA recombinante es inmunogénica y se expresa *in vivo* (Carpenter *et al.*, 2007; Khalid *et al.*, 2008).

4.4. Cápsula

La mayoría de cepas de *P. multocida* producen polisacárido capsular en su superficie. El tipo capsular A y B producen una cápsula compuesta principalmente de ácido hialurónico, polímero de alto peso molecular con la estructura repetitiva de β -D-ácido glucurónico y β -D-N-acetilglucosamina (Rosner *et al.*, 1992; Carter y Chegappa, 1980); el tipo capsular D, expresa heparina representada por β -D-ácido glucurónico y α -D-N-acetylglucosaminay el tipo capsular F presenta condroitina, con la estructura repetitiva de β -D-ácido glucurónico y β -D-N-acetilgalactosamina (DeAngelis *et al.*, 2002; Muniandy y Mukkur, 1993). Varios estudios comprueban la atenuación que sufren los mutantes acapsulados de cepas de *P. multocida* tipo A al ser inoculados en ratones, siendo por lo tanto un factor de virulencia (Boyce y Adler, 2000; Chung *et al.*, 2001). Watt *et al.* (2003) reportó la pérdida y recuperación de la virulencia en cepas variantes no capsuladas tipo A en ratones.

4.5. LPS

A diferencia de muchas bacterias Gram-negativas, este consiste sólo en dos regiones: el lípido A y un no repetitivo núcleo interno y externo (*inner and outer core*) de oligosacárido. El antígeno Ono se encuentra en especies de *Pasteurella sp* (Raetz y Whitfield, 2002) y es similar al Lipooligosacárido presente en bacterias como *Haemophilus influenzae*. Los diferentes serotipos de Heddleston expresan LPS con diferentes núcleos externos; sin embargo, el núcleo interno está bien conservado (Harper *et al.*, 2012). Se sabe que *P. multocida* expresa un LPS truncado (Harper *et al.*, 2004), su rol en la virulencia y patogénesis ha sido comprobado en el modelo cólera aviar, en el cual, la mutación de cualquier sitio del locus de síntesis reduce la virulencia

(Boyce *et al.*, 2009) y su inoculación puede emular los signos clínicos de la enfermedad en el ganado bovino respectivamente (Horadagoda *et al.*, 2002). Como ya se mencionó anteriormente los serotipos relacionados con la neumonía aguda de la alpaca son los serotipos 10, 11, 12 y 15 (genotipo LPS 6) (Rímac *et al.*, 2017).

En cuanto a la inmunidad contra *P. multocida*, Adler *et al.* (1999) realizaron una revisión de los candidatos a antígenos vacunales y concluyeron que el LPS puede conferir protección contra serotipos homólogos; pero no heterólogos.

4.6. Proteínas de adquisición y reguladoras de hierro

Casi todas las bacterias requieren hierro para sobrevivir y esto lo logran, secuestrando el hierro a partir de los precipitados de hidróxido de hierro o a partir de proteínas ricas en hierro del hospedero, como la hemoglobina o la transferrina (Boyce *et al.*, 2010). El genoma de *P. multocida* (cepa Pm70) codifica 53 proteínas homólogas a proteínas del metabolismo o adquisición de hierro (May *et al.*, 2001). El genoma secuenciado de una cepa de *P. multocida* autóctona (cepa nativa) posee 54 genes que codifican proteínas homólogas a proteínas del metabolismo o adquisición de hierro (Hurtado *et al.*, 2017).

4.7. Toxina dermonecrótica (PMT)

Es una proteína de 146 KDa codificada por un bacteriófago lisogénico hallado solamente en el genoma de *P. multocida* toxigénica (Pullinger *et al.*, 2004) y Usualmente es hallada en el tipo D y A (Narayan *et al.*, 2014; Foged *et al.*, 1987), e incluso se ha encontrado el gen *toxA* en cepas tipo A aisladas de alpacas; pero todavía no se conoce el papel que juega esta toxina en la patogénesis de la enfermedad respiratoria de alpacas (Rímac *et al.*, 2017). Esta proteína es secretada durante la lisis bacteriana y luego es internalizada vía endocitosis para llegar al citoplasma y activar diferentes proteínas tales como las MAPPK particularmente en los osteoclastos (Pettit *et al.*, 1993; Lacerda *et al.*, 1996).

Además del ganado porcino, se han aislado cepas *toxA* positivas de *P. multocida* en otras especies animales como: vacas, cabras, conejos, gatos, hombres, perros, pavos, etc. (Narayan *et al.*, 2014), tanto en individuos asintomáticos como con diferentes patologías; pero todavía no se sabe el rol que cumple esta toxina en la patogénesis de la neumonía (Rimler, 1994). Los resultados de Shayegh (2008) sugieren que el serotipo A toxigénico de *P. multocida* podría ejercer un papel decisivo en la patogénesis de la neumonía en ovinos de Irán.

5. Inmunidad contra *Pasteurella multocida*

Aún se entiende poco a cerca de la inmunidad contra *Pasteurella multocida* serogrupo A (Adler *et al.*, 1999) a comparación de los serotipos B:2 y E:2, los causantes de la septicemia hemorrágica del ganado bovino (Confer, 1993). Animales clínicamente sanos pueden mantener una población de *P. multocida* por periodos largos (De Alwis *et al.*, 1990; Muhairwa *et al.*, 2000).

Los mecanismos principales de la inmunidad innata frente a las bacterias gramnegativas son, la vía del complemento mediante C3-convertasa, una consecuencia de la activación del complemento es la opsonización y la potenciación de la fagocitosis bacteriana y posteriormente la activación de estos fagocitos (Abbas *et al.*, 2011). La respuesta inmune adaptativa frente a microorganismos extracelulares está dada en esencia por las inmunoglobulinas, a través de sus mecanismos efectores como son: la neutralización, donde participan los isotipos IgG e IgA; la fijación de complemento donde participan IgG e IgM; y la opsonización donde participan las dos últimas (Abbas *et al.*, 2011).

Se han reportado antígenos inmunogénicos de *P. multocida*, de los cuales se sugiere que los OMPs pueden ser buenos candidatos vacunales debido a su correlación entre los altos títulos de anticuerpos obtenidos y la resistencia con la neumonía inducida por *P. multocida* serogrupo A (Dabo *et al.*, 2007).

Se presume que la inmunidad en la pasteurelosis respiratoria bovina, es mediada por anticuerpos debido a los estudios (Dabo *et al.*, 2007). Es común hallar anticuerpos anti-*P. multocida*(OD: 1.4 a una dilución de 1:100) en animales tanto positivos como

negativos al cultivo microbiológico. Se ha demostrado la presencia de anticuerpos anti-*P. multocida* en calostro de vacas lecheras por inmunofluorescencia indirecta y aglutinación (Gresham *et al.*, 1984). Estos anticuerpos maternos contra *P. multocida* serogrupo A fueron demostrados en el suero de terneros neonatos de carne y leche, además, estos duran menos de 4-6 semanas, duración de la inmunidad antiviral (Virtala *et al.*, 1996; Fulton *et al.*, 2004; Step *et al.*, 2005; Prado *et al.*, 2006). Los anticuerpos maternos contra los OMPs, están presentes ya, a las 24 h del nacimiento (Fulton *et al.*, 2004; Step *et al.*, 2005) y se ha encontrado que estos decaen dentro de los 47 a 73 días de edad en terneros lecheros (Step *et al.*, 2005).

En terneros de engorde se halló que el nivel de IgG1 materno disminuyó entre los 60 a 90 días de edad. Esto es seguido por un alza en la IgM, la cual alcanza un pico entre los 150 y 180 días de edad; sin embargo, no se determinó el vínculo entre la protección contra la enfermedad con la presencia de anticuerpos maternos/adquiridos (Prado *et al.*, 2006).

P. multocida posee varios mecanismos para evadir la inmunidad innata tales como la cápsula, el cual le provee resistencia contra la fagocitosis y la unión del complemento (Boyce y Adler, 2000), además son pobremente inmunogénicos, por estar compuestos de moléculas similares a las encontradas en los animales hospederos, a este mecanismo se le llama “mimetismo molecular” (Harmon *et al.*, 1991).

La primera línea de defensa en el pulmón son los macrófagos alveolares y células epiteliales, los cuales detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), un ejemplo de estos son los receptores tipo toll (TLRs) (Takeda *et al.*, 2003; Basu y Fenton, 2004). Estudios previos se enfocaron en el rol del TLR2 y TLR4 que son los principales receptores involucrados en el reconocimiento de varios componentes de la pared celular de bacterias, porinas y OmpH con el TLR2 (Wetzler, 2010), y LPS con el TLR4 (Abbas *et al.*, 2011). El TLR 4 es crucial para la respuesta efectiva contra el LPS de las Gram-negativas (Chow *et al.*, 1999). Guzmán (2011) determinó que la secuencia nucleotídica del gen *tlr4* de alpaca presenta alta identidad con secuencias de bovino y porcino, además, no encontró asociación entre los que polimorfismos del gen *tlr4* con desarrollo de enfermedad respiratoria en la alpaca.

Se ha comprobado que *Pasteurella multocida* serotipo A:3 puede sobrevivir dentro de macrófagos, siendo considerado por algunos autores como una bacteria intracelular (Dowling *et al.*, 2004), esto puede estar relacionado a la cápsula del polisacárido hialuronano que posee (DeAngelis *et al.*, 1998). El mecanismo de supervivencia intracelular puede estar relacionado al impedimento de unión del lisosoma y el fagosoma, (DeAngelis *et al.*, 1998).

6. Mecanismos inmunológicos de la vacunación

La inoculación de sustancias antigénicas produce una reacción en cadena, donde intervienen células y moléculas clave para la activación inicial de la inmunidad innata y la consecuente activación final de la inmunidad adaptativa. El sistema inmune innato puede detectar a vacunas y adyuvantes inoculados mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los TLR, los cuales están presentes en varios tipos celulares, incluyendo a las células dendríticas y macrófagos (Kawai *et al.*, 2010), estas células a su vez secretan citoquinas proinflamatorias provocando la extravasación de monocitos, granulocitos y células natural killer resultando en un microambiente inflamatorio (Pashine *et al.*, 2005).

La inducción de la respuesta inmune adaptativa contra antígenos vacunales requiere, en primera instancia, la activación de las células presentadoras de antígeno (APC) tales como, células dendríticas circulantes y monocitos, que son reclutados al sitio de inoculación, la activación de estas células mejora la expresión de sus receptores de superficie denominados “receptores homing”, lo que provoca su migración hacia el linfonódulo de drenaje donde se producen una serie de eventos (Pashine *et al.*, 2005), estos eventos puede ser de dos tipos, la respuesta T-independiente y la respuesta T-dependiente (Siegrist, 2008).

La respuesta T-independiente es la que se produce con la inoculación de antígenos no protéicos tales como los polisacáridos capsulares bacterianos, en la que no participan células T helper. Los antígenos polisacáridos sólo alcanzan la zona marginal del bazo y linfonódulos cuando se esparcen a través de la sangre, donde se unen a los receptores Ig de la superficie de células B ubicadas en la zona marginal de la zona de células B activándolas y promoviendo la (MacLennan *et al.*, 2003), en una

semana se producen anticuerpos con algún grado de cambioclase (de IgM a IgG e IgA) y, en ratones se produce una respuesta rápida de anticuerpos de baja afinidad, con baja tasa de mutación somática en su región variable, con ausencia de memoria inmunológica (Southers *et al.*, 2004).

Cuando un antígeno protéico es inoculado por primera vez, promueve en primera instancia, una respuesta inmune respuesta T-independiente denominada respuesta extrafolicular, estrechamente ligada a la respuesta inmune primaria, la que está compuesta por una reacción extrafolicular y la reacción del centro germinal. En la reacción extrafolicular se inicia mediante la activación de células B circulantes mediante la unión de su receptor IgM al antígeno, produciendo la expresión de CCR7 estimulando la migración de este a la zona marginal de células T (Reif *et al.*, 2002), en ese lugar es coestimulada por células dendríticas activadas y células T CD4+ tanto de tipo Th1 como Th2, del linfonódulo local, para producir células B productoras de anticuerpos de baja afinidad, lo que es llamada reacción extrafolicular (MacLennan *et al.*, 2003). En esta reacción de tipo extrafolicular existe cambio de clase, ya que las IgG empiezan a aparecer pocos días después de la exposición primaria; pero no existe hipermutación/selección y además es de corta duración, jugando un papel menor en la eficacia de la vacuna (Siegrist, 2008).

En paralelo, bajo ciertas condiciones, produce la reacción del centro germinal, la se lleva a cabo cuando las células B han recibido suficiente estímulo de células T helper en lugares especializados llamados centros germinales, pasando a transformarse, las primeras, en células plasmáticas. La diferenciación de las células B inicia con su movilización de estas, hacia los folículos donde se encuentran con las células dendríticas foliculares (FDCs) y las células T foliculares (T_{FH}), a continuación, se promueve la proliferación, supervivencia y selección de células B con alta especificidad por el antígeno (Vinuesa *et al.*, 2005). En esta reacción, los dos eventos más resaltantes que ocurren son, el cambio de clase de cadena pesada de IgM a IgG, IgE o IgE, y la maduración de afinidad de las células B por su antígeno específico. Esto resulta en una alta tasa de producción de anticuerpos de alta afinidad (Crotty *et al.*, 2003).

La naturaleza de la vacuna influye directamente en el tipo de repuesta que se llevará a cabo por el sistema inmune (Abbas *et al.*, 2011). Las vacunas no vivas (bacterinas, polisacáridos, glicoconjugados y proteínas) esencialmente activan la

inmunidad innata en el sitio de inyección, por lo que deben de estar acompañadas de adyuvantes (Pashine *et al.*, 2005) que proporcionen las señales de alerta necesarias, en especial si la inyección es por vía subcutánea, donde las células dendríticas escasean (De Lalla *et al.*, 1988), además la respuesta de anticuerpos primaria es focal o unilateral, es decir, sólo centros germinativos al ganglio de drenaje (Siegrist, 2008). No obstante, las vacunas vivas proveen de una prolongada inflamación en el sitio de inoculación y en otros lugares provocando una respuesta prolongada y eficaz, debido probablemente a la persistencia de estas vacunas en el cuerpo y su capacidad de diseminación (Siegrist, 2008).

Los polisacáridos capsulares conllevan principalmente a una respuesta T-independiente y los anticuerpos que se producen no perduran en el tiempo (Weintraub, 2003). En respuesta a antígenos protéicos y glicoconjugados se produce una ruta distinta de diferenciación de linfocitos B denominada T-dependiente, en la cual se reclutan linfocitos B y T en los centros germinales del bazo o linfonódulos (Hanekom *et al.*, 2005) produciéndose una coestimulación donde se activan simultáneamente linfocitos B y T (figura 3). Las células T foliculares (T_{FH}) producen IL4, IL-21 y ayudan a la diferenciación de las células B caracteriza por la formación de anticuerpos de alta afinidad y de células B de memoria (Crotty., 2011) y en paralelo, las células T se diferencian en células $CD4^+$, las cuales ayudan a la maduración de afinidad secretando IL-4, IL-5, IL-6 e IL10 (Sallusto *et al.*, 2010).

Los linfonódulos, las células B, capaces de unirse a este antígeno, se activarán, harán expansión clonal y se diferenciarán en células B productoras de anticuerpos de baja afinidad (IgG+) en un proceso llamado cambio de clase de cadena pesada (Abbas *et al.*, 2011). En simultáneo, durante la activación de células B, células T $CD4^+$ también son activadas, y se diferencian en una subpoblación denominada células T foliculares (T_{FH}), las cuales, junto con las células dendríticas foliculares, son las principales colaboradoras en la expansión clonal, cambio de clase de cadena pesada y la maduración por afinidad (Crotty, 2011).

Las respuestas inmunes primaria y secundaria (figura 4) frente a los antígenos protéicos, difieren cualitativamente y cuantitativamente. La respuesta primaria se debe a linfocitos vírgenes no estimulados, en tanto, la respuesta inmune secundaria se debe a la estimulación de clones expandidos de linfocitos B de memoria, por ello la respuesta

secundaria tarda menos en aparecer y se producen mayores cantidades de anticuerpos que en la primaria (Abbas *et al.*, 2011).

La mayoría de estudios de inmunogenicidad vacunal tienen como objetivo final, la obtención de anticuerpos neutralizantes (Plotkin,2008) y se intenta a menudo, relacionar los anticuerpos a la protección contra los virus que se esparcen por la sangre, virus que ingresan vía mucosal, bacterias que secretan toxinas, aquellos que infectan las neuronas, neumococos y meningococos, pudiendo también ser válido para las bacterias que forman parte de la microbiota como *Pasteurella spp.* Estos estudios de inmunogenicidad consisten en medir los títulos de anticuerpos mediante mediante las pruebas de: ELISA, Hemaglutinación y capacidad de opsonofagocitosis (Pulendran *et al.*, 2010).

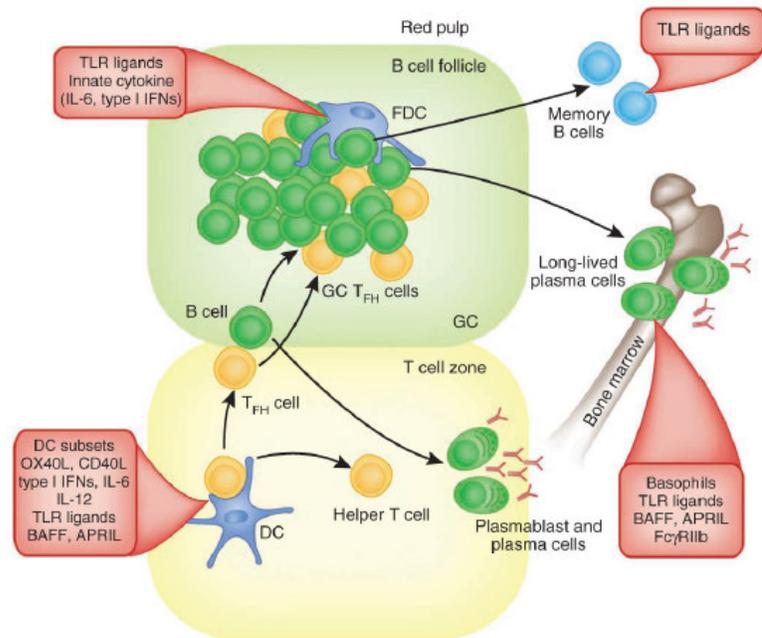


Figura 4. Programación de respuesta inmune humoral mediante vacunación. La respuesta humoral T-dependiente es iniciada por la vía de las células dendríticas, las cuales estimulan a las células T_H en las áreas ricas en células T, mientras las células B activadas hacia la periferia de la zona rica en células T, promoviendo la expansión y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas de vida corta. La otra vía importante es la que se inicia cuando se diferencian las células T_{FH} . En los recuadros rojos se pueden observar las moléculas que median cada respuesta. (Imagen tomada de Pulendran y Ahmed., 2011)

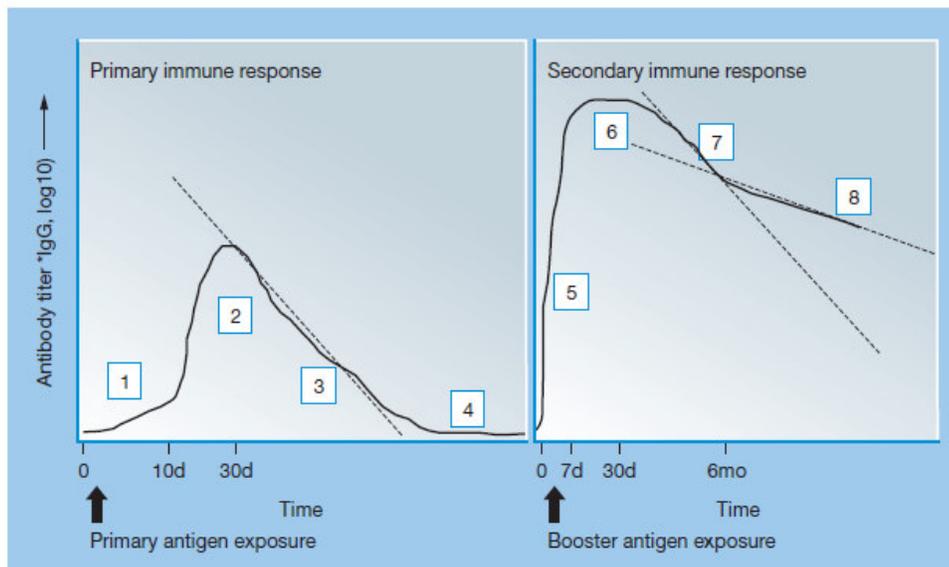


Figura 5. Correlación entre los títulos de anticuerpos con varias fases de la respuesta vacunal. La respuesta primaria produce una elevación de los (1) títulos de IgG, la cual llega al pico (2) de producción a las cuatro semanas post-inoculación. La muerte de células plasmáticas de vida corta resultan en una (3) rápida depesión de IgGs, (4) las cuales retornan a sus niveles basales. En la respuesta inmune secundaria, se produce una reactivación de las células de memoria y (5) resulta en una rápida (<7 días) elevación de la IgG, de igual manera, (6) las células plasmáticas mantienen el pico de anticuerpos (7) por pocas semanas. Sin embargo, si se han formado suficientes células de vida larga, (8) entonces los anticuerpos perdurarán en el tiempo (Imagen tomada de Siegrist, 2008).

7. Vacunas veterinarias

La palabra vacuna (del latín “vacca”, vaca en español) fue acuñada por Eduard Jenner para describir la inoculación del Virus de la viruela bovina (Cowpox) en humanos infectados con el Virus variola (Smallpox) (Barquet *et al.*, 1997). La definición clásica y todavía vigente de vacunación es, la inducción o el desarrollo de la inmunidad, mediante la inoculación de un agente o componentes no patógenos (vacunas) para conferir protección contra el patógeno en cuestión u organismos relacionados, siendo esto último la definición de vacuna. Todo esto con el objetivo de imitar la inmunidad adquirida, por una infección natural (Meeusen *et al.*, 2007). La definición actual de vacuna veterinaria varía según el país; pero una definición general

es que, son productos diseñados para estimular la inmunidad activa de los animales contra las enfermedades(OIE, 2015a).

Las vacunas veterinarias han tenido un gran impacto en estos últimos años y su importancia radica en que permiten una mejor eficiente producción y el acceso a proteína de alta calidad por la población humana (Roth, 2010; FAO, 2009), controlan incidencia de zoonosis como la Brucelosis, Rabia, Leptospirosis, Influenza, (Pastoret y Brocher, 1996; FAO, 2010), previenen la ocurrencia de enfermedades emergentes y exóticas, reduce la necesidad por el uso de antibióticos (Singer *et al.*, 2003), contribuyen a la inocuidad alimentaria reduciendo los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Smith, 2014) y mejoran el bienestar y la salud animalreduciendo el estrés y sufrimiento en animales(Roth *et al.*, 2010).

Para el mantenimiento de la salud animal, es de vital importancia la administración de vacunas puras, inocuas, potentes y eficaces. Para lograr ello, se han descrito estándares y controles de producción generales tales comoinstalaciones de producción apropiado, documentación del proceso de fabricación y mantenimiento de registros, ensayos de inóculo primario (cepa vacunal) y pruebas de eficacia (OIE, 2015a).

Existen criterios y requisitos que se recomiendan cumplir y evaluar para instaurar un programa de vacunación tales como, la enfermedad por prevenir deberá ser enzoótica en la región geográfica donde habita el animal, tipo de biológico a emplear, edad de los animales a vacunar, maduración del sistema inmunitario de la especie de que se trate, fin zootécnico de la especie, riesgo y reacciones a la vacunación. (Basurto, 2010) Estos criterios son cumplidos por la enfermedad estudiada.

Las vacunas en general a menudo son clasificadas en bacterias vivas atenuadas o muertas, virus atenuados, vacunas de subunidades (antígenos), vacunas conjugadas, vacunas sintéticas (proteínas recombinantes), vectores virales y las modernas vacunas de ADN (Abbas *et al.*, 2011). Por otro lado, según la OIE(2015a), las vacunas de uso veterinario, dependiendo del tipo de antígeno que contienen, se identifican como bacterinas, extractos bacterianos, subunidades convencionales, toxoides bacterianos o toxoides. Los productos inactivados pueden contener: 1) cultivos de microorganismos que han sido inactivados por medios químicos u otros medios; 2) toxinas inactivadas; o

3) subunidades (partes antigénicas de los microorganismos) que se han extraído de los cultivos o que se han producido mediante procedimientos de ADN recombinante. Todas ellas deberán ser evaluadas en animales experimentales para evaluar su eficacia protectora e inmunogenicidad, en este último caso, es comúnmente usada la prueba de ELISA indirecta, empleando muestras de suero colectado en diferentes tiempos, en animales vacunados (Subhash, 2015).

Por último, son ejecutados los estudios de eficacia, donde se confirma que la vacuna protege contra una infección *in vivo*, esto puede deberse a las distintas propiedades de las inmunoglobulinas G (Pulendran y Ahmed, 2011) tales como la aglutinación, opsonización y la activación de la vía clásica del complemento (Tizard *et al.*, 2002).

7.1. Adyuvantes inmunológicos

Una definición todavía vigente de los adyuvantes inmunológicos es la que dio Ramon (1924) es que “son sustancias que, inoculadas en combinación con antígenos específicos, pueden provocar una respuesta inmune más potenciada que al usar los antígenos solos, pudiendo ser estas de diferente naturaleza química. Los adyuvantes más estudiados, usados y ampliamente aprobados para su uso rutinario en humanos por la FDA, hasta la fecha, son las sales de aluminio, esto es debido a su inocuidad y su buena capacidad inductora de la producción de anticuerpos (HogenEsch, 2012; Lindblad, 2004). Los adyuvantes más usados en medicina veterinaria tanto para uso rutinario como para ensayos clínicos de nuevas vacunas, debido a su bajo costo, han sido el hidróxido de aluminio y emulsiones de aceite mineral (Singh *et al.*, 2003). Los factores a tener en cuenta para elegir un adyuvante inmunológico son la reactogenicidad y la biodegradación en el sitio de inoculación (Singh *et al.*, 2003). Particularmente, se ha usado el hidróxido de aluminio en gran cantidad de vacunas contra la Pasteurellosis en bovinos, ovejas (Rosadio, comunicación personal) y, además se ha demostrado la inocuidad de una bacterina, adyuvada con hidróxido de aluminio en crías de alpaca (Moreno *et al.*, 2016)

Los adyuvantes basados en aluminio tienen la propiedad de sesgar una respuesta preferentemente Th2 e inducir finalmente la producción de anticuerpos (Eisenbarth *et*

al., 2008; HogenEsch, 2012), aunque la vía por el cual esto se logra es todavía desconocida, existen teorías (Pulendran y Ahmed, 2011). Se pensó que los adyuvantes basados en aluminio, ejercían señal importante sobre losTLRs;pero se ha comprobado que pueden montar una respuesta inmune humoral independientemente de los TLR (Gavinet *al.*, 2006). Se ha comprobado, las sales de aluminio, estimulan un sistema de respuesta inmune intracelular denominado inflamasoma Nalp3, principalmente a través de sus componentes: Nalp3o Caspasa-1 (Eisenbarth *et al.*, 2008); sin embargo,algunos estudios señalan que el efecto de Nalp3 no es significativo (Kool *et al.*, 2008). Se ha comprobado *in vitro* que partículas de aluminio son fagocitadas por macrófagos yestimulan la producción deIL-1 β y IL-18 a través de la vía de la caspasa-1 (Li *et al.*, 2007), además se ha evidenciado la activación de las células GR-1+(neutrófilos, células dendríticas y monocitos)con su consecuente producción la producción de IL-4, induciendo la expansión clonal de las células B esplénicas *in vivo* (Jordan *et al.*, 2004).

Luego de ser inoculado el Ag junto con aluminio, este último forma enlaces no covalentes con las proteínas y provocan una inflamación leve) (Abbas *et al.*, 2011). El Ag es liberado del depósito de aluminio dentro de las horas postvacunación (Weissburget *al.*, 1995; Gupta *et al.*, 1996). El hidróxido de aluminio (AlOOH) posee un efecto mayor a comparación que el fosfato de aluminio (Al(OH) $_x$ (PO $_4$) $_y$) en estimular la diferenciación de las células dendríticas y su posterior activación de las células CD4+ (Sokolovska *et al.*, 2007). Tanto las vacunas vivas como inactivadas se pueden formular con adyuvantes diseñados para aumentar su eficacia tales como el hidróxido de aluminio o la saponina(OIE, 2015a).

Algunos estudios han demostrado la buena eficacia de los adyuvantes oleosos tales como el aceite mineral; pero el inconveniente radica en su elevada viscosidad, pobre estabilidad y sus reacciones adversas son mayores que las encontradas en otros adyuvantes como el hidróxido de aluminio (Mckercher, 1986)

7.2. Vacunas contra *Pasteurella multocida*

A pesar de los esfuerzos realizados por una gran cantidad de investigadores, las vacunas actuales contra la enfermedad respiratoria para bovinos y otros rumiantes, no

confieren completa protección contra la infección (Larson y Step, 2012). Las que cuentan con estudios científicos publicados, se encuentran en los siguientes apartados.

7.2.1. Vacunas inactivadas (muertas) contra *Pasteurella multocida*

Son preparadas a partir de cultivos de *P. multocida* inactivandolas (vacuna muerta) con ya sea, desecado, calor, formaldehido, fenol, azida de sodio (Ahmad *et al.*, 2013). La eficacia de una bacterina de *P. multocida* inactivada con formol fue probada inicialmente en corderos (Hamdy *et al.*, 1963). Sin embargo, Dowling *et al.* (2004) no pudo probar que la exposición intratraqueal a una *P. multocida* (A:3) inactivada con formalina, protege contra desafío homólogo. Las bacterinas que se aplican por vía intratraqueal pueden fracasar cuando los animales experimentales poseen niveles altos de IgG anti *P. multocida* antes de la inmunización (Black *et al.*, 1985), o también debido a que la incapacidad de movilidad de las bacterinas inactivadas con formalina impiden que estas traspasen la barrera epitelial (Wilkie, 1982).

En un estudio realizado por Kumar *et al.* (2012), se probó y comparó la eficacia de dos adyuvantes, encontrándose que la vacuna con adyuvante oleoso junto con saponina (S-OAV) puede llegar a un 80% de eficacia y los anticuerpos se mantuvieron altos durante los 4.5 meses de evaluación, en cambio la vacuna con adyuvante oleoso sin saponina (OAV) alcanza el 60% de protección contra un desafío contra *P. multocida* serogrupo B. Por otra parte, se ha reportado la eficacia de las vacunas adyuvadas con emulsión múltiple, las cuales consisten en la reemulsificación de las vacunas oleosas con un volumen igual de Tween 80, siendo exitosas en caso de bovinos con septicemia hemorrágica y sosteniendo la inmunidad por más de 1 año (Chandrasekaran *et al.*, 1994). Con respecto a la bacterina formulada con Hidróxido de aluminio, la protección contra la septicemia hemorrágica duró 6 meses a diferencia de las formulaciones con adyuvante oleoso, que duraron 12 meses (Chandrasekaran *et al.*, 1994; Shah *et al.*, 1997; Tabatabaei *et al.*, 2002).

En una investigación realizada por Sun, 2009, donde se probó una formulación de una bacterina de *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica* en ovejas y carneros, los títulos de IgG anti *P. multocida* de las hembras, tuvieron un pico a los 14 días y a los 28 días postvacunación y fueron mayores que los títulos del grupo control; sin embargo, en los carneros no hubo diferencia entre el grupo control y el grupo vacunado en ningún día, esto demuestra la ineficacia de la bacterina.

Se probó que las bacterinas inactivadas con formalina y adyuvante oleoso conducen a una pobre respuesta inmune (Okerman *et al.*, 1980) y además causan irritación y lesiones en ratones (Okerman *et al.*, 1981). Sin embargo, otros demostraron su potencia en bovinos con neumonía (Cardella *et al.*, 1987) y en ratones, usando en estos últimos, una bacterina inactivada por calor (Wijewardana *et al.*, 1990). Esta bacterina inactivada por calor y con adyuvante oleoso confiere una protección del 60% en ratones frente a un desafío homólogo (Garrido *et al.*, 2008). En el caso de ensayos vacunales contra la septicemia hemorrágica de los bóvidos, usando una bacterina inactivada con formalina, junto a diferentes tipos de adyuvantes, ya sea de aluminio precipitado, adyuvante oleoso o saponina, se obtuvieron buenos resultados al lograr una inmunidad sostenida frente a la *P. multocida* (Muneer *et al.*, 1989; Kumar *et al.*, 2012).

El grado de protección con la vacuna inactivada depende del número de dosis en ratones (Okerman y Devriese *et al.*, 1987). La vacunación de terneros con una sola dosis de bacterina de *M. Haemolytica* junto con toxoide confirió alta producción de anticuerpos pero no confirió protección (Mosier *et al.*, 1998). Con respecto a la bacterina formulada con Hidróxido de aluminio, la protección contra la septicemia hemorrágica duró 6 meses a diferencia de las formulaciones con adyuvante oleoso, que duraron 12 meses (Chandrasekaran *et al.*, 1994; Shah *et al.*, 1997; Tabatabaei *et al.*, 2002).

La inmunización con la una cepa B:2,5 produjo altos niveles de anticuerpos de larga duración y protección homóloga en búfalo, sin embargo no produjo protección ante un desafío heterólogo en ratones (Shah *et al.*, 2001). Una mejora en las vacunas muertas de *P. multocida* han sido las preparaciones multivalentes las cuales existen en el mercado actualmente, vacunas pentavalentes disminuyen los signos en bovinos (Cho *et al.*, 2008).

A diferencia de los mamíferos, el uso de bacterinas es más efectivo y recomendado en aves (OIE, 2015b). Se ha probado una alta protección homóloga en pollos, usando una cepa inactivada con formalina (Heddleston y Hall *et al.*, 1958). En pavos se reduce el número de infectados usando una bacterina emulsionada con aceite y agua (Heddleston *et al.*, 1970), inactivada con formalina. Luego se comprobó que la bacteria propagada *in ovo*, y luego inactivada por formalina induce una inmunidad hospedero específica (Heddleston *et al.*, 1974).

La vacunación con bacterinas tiene muchas desventajas como su baja eficacia, el cual puede deberse a la gran cantidad de serotipos que pueden ocasionar la enfermedad (Vadillo *et al.*, 2003) ya que estas carecen de protección cruzada de serotipo, esto se traduce en una una inmunidad ineficaz y de corta duración, luego, los animales vacunados aún se enferman y se desencadenan brotes (Boyce *et al.*, 2010; Nassar *et al.*, 2012). Además, las bacterinas frecuentemente resultan en inflamación en el sitio de inyección y otras reacciones adversas (Ahmed *et al.*, 1974).

7.2.2. Vacunas vivas contra *Pasteurella multocida*

Kadelet *al.*(1985) demostraron que existe mejor ganancia de peso, menos signos clínicos y menor tasa de mortalidad cuando se usa una vacuna doble de *P. multocida* y *M. haemolytica* dependientes a la estreptomicina. La eficacia de la vacuna viva de *Pasteurella multocida* estreptomicina dependiente aplicada sólo, fue probada en bovinos por Chengappa *et al.* (1989) en un ensayo experimental dondese comprobó que se reducen los signos clínicos y las lesiones fueron mucho más leves en el grupo experimental, pero los anticuerpos IgM e IgG no tuvieron un incremento significativo en el grupo vacunado. Se ha detectado riesgos que colleva el uso de cepas dependientes de estreptomicina de otras especies bacterianas tales como la reversión de la virulencia (Detmer *et al.*, 2006).

7.2.3. Vacunas recombinantes contra *Pasteurella multocida*

Llamadas también “vacunas de tercera generación” (Ahmad *et al.*, 2014). El primer ensayo fue usando la toxina recombinante de *Pasteurella multocida* (rPMT)(Bording *et al.*, 1994). El uso de una vacuna consistente en rPMT junto con una bacterina logran alta eficacia *in vivo* e *in vitro*, mediante la técnica de seroneutralización.(Hsuan *et al.*, 2009). Luego se demostró que una rOmpH truncada protege cerdos y ratones contra la pasteurelosis (Kwonet *al.*, 2007).

Okay *et al.* (2012) comprobaron mediante la técnica de ELISA, que la inoculación de proteínas recombinantes de *Pasteurella multocida* serotipo A:3 denominadas PlpE, y la proteína fusión PlpEC-OmpH elevaron de manera significativolos niveles de anticuerpos en forma significativa, y formuladas con los adyuvantes oleosos CpG ODN otorgaron 100% de protección. También, mediante la

inoculación de una rOmpA en modelo murino, se logró conferir elevados niveles de anticuerpos, los cuales se hicieron notar a partir del día 14 y continuaron hasta el día 35 de medición; pero no se correlacionaron con protección debido probablemente a la falta de opsonofagocitosis (Dabo *et al.*, 2008b).

La proteína rOmpH, proveniente de *P. multocida* A:3, inoculada de manera intraperitoneal no indujo la producción de anticuerpos ni indujo protección en modelo murino (Okay *et al.*, 2012). Otros estudios evidenciaron que la rOmpH de *P. multocida* serotipo B:2 (causante de septicemia hemorrágica) resulta en una protección de 80 % a 100% en las vías de inoculación subcutánea e intraperitoneal respectivamente (Tan *et al.*, 2012). Remarcando con esto, la necesidad de realizar estudios independientes para cada vacuna y serotipo en particular.

Se ha reportado el efecto deletéreo de algunas vacunas recombinantes como la rOmpA, la cual al ser inoculada junto con OMPs de *P. multocida*, disminuyen la capacidad protectora de esta última, este fenómeno puede explicarse mediante la ocupación de la proteína recombinante en los sitios de reconocimiento de las OMPs (Dabo *et al.*, 2008b). Sin embargo, estudios realizados por Wei *et al.* (2017) hallaron que la rPlpB de *P. multocida* serogrupo A, confiere una protección contra la neumonía del 60% en ratones.

Mediante un estudio de inmunogenicidad en modelo murino, se inoculó por vía subcutánea la proteína recombinante no lipídica Omp16 (rP6-like) proveniente de *P. multocida* serotipo B:2, y se logró obtener altos niveles de anticuerpos (IgG) predominantemente IgG1 (respuesta Th2) al día 21, y aumentaron hasta el día 35 (Shivachandra *et al.*, 2017). Zheng *et al.* (2017) comprobaron que la rOmp16 de *Haemophilus parasuis* induce altos niveles de anticuerpos específicos en ratones, los cuales aumentaron significativamente desde el día 14 y continuaron elevándose hasta el día 42 de evaluación, además demostraron su elevado nivel de protección (70-80%) ante una infección experimental. En otro estudio con la rP6-like llevado a cabo en Perú, se encontró que estimula tanto rutas para la activación de inmunidad celular y humoral en un experimento *in vitro*, ya que eleva las proteínas de Th1 (TNF- α , IFN- γ e IL-2) y Th2 (IL-10 e IL-4) en células monocucleares de alpaca (Maximiliano, 2017).

En un estudio llevado a cabo por Joshi *et al.*, 2013, donde se comparó mediante ELISA indirecta, en modelo murino, la eficacia de una OmpH recombinante, OmpH nativa, extracto de OMPs, bacteria total inactivada y una bacterina comercial, de los cuales, la bacterina comercial produjo anticuerpos, más rápido (día 7 y 14) incluso que las vacunas protéicas y la bacteria total; pero días posteriores, las vacunas protéicas excepto la rOmpH, produjeron mayor elevación de anticuerpos que la vacuna comercial, en el día 28 todas tuvieron una respuesta similar excepto la rOmpH cuya respuesta fue menor.

La combinación de antígeno protéico recombinante y bacterina pueden ser más inunogénicos que la proteína sola, probablemente debido a que al usar una mayor cantidad de antígenos, provee de una respuesta más variada, tal es el caso de una vacuna contra la Rinitis atrófica en cerdos, compuesta por rPMT y bacterina de *P. multocida* tipo A, incrementan el título de anticuerpos neutralizantes en el calostro de manera más eficaz que la proteína recombinante sola (Liao *et al.*, 2006).

7.2.4. Ensayos con otras vacunas en animales

Para comparar la inmunogenicidad de una potencial vacuna tipo subunidad como una proteína y una vacuna inactivada como un toxoide, se suelen medir para ambos casos simultáneamente, anticuerpos anti proteína y anti moléculas inactivadas. Un estudio comparó la inmunogenicidad de una proteína recombinante TeNT-Hc (tetanus neurotoxin Hc subunity) y la vacuna toxoide (toxina tetánica) en tres modelos animales, y se comprobó que la subunidad recombinante produce mayores niveles de anticuerpos que la vacuna toxoide especialmente después de una segunda dosis; sin embargo, en primates no humanos (PNH), los anticuerpos anti toxina tetánica (TT) producido por la proteína recombinante TeNT-Hc tienen una elevación más tardía que la vacuna toxoide (Yu, 2016). En otro ensayo clínico se evaluó la inmunogenicidad de la proteína rSAO junto con una vacuna inactivada de *Streptococcus suis* serotipo 2 en cerdas preñadas, esta combinación produjo tanto elevación significativa de anticuerpos anti- rSAO y anti- *S.suis*; los anticuerpos anti- rSao se mantuvieron hasta la semana 6; sin embargo los anticuerpos anti- *S.Suis* disminuyeron de manera marcada en la semana 6 (Hsuehet *al.*, 2017). Obteniendo como resultado en la mayoría de los casos, una

mayor inmunogenicidad por parte de las proteínas recombinantes a comparación de las vacunas inactivadas.

Algunas proteínas recombinantes contrarrestan la inmunogenicidad y eficacia de otras cuando se las aplica en simultáneo, ello es llamado el efecto de interferencia inmunitaria. En un ensayo clínico llevado a cabo en ratones, en los dos primeros grupos experimentales se inocularon múltiples proteínas recombinantes de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y en el tercer grupo se inoculó la bacteria completa inactivada, teniendo como resultado, una alta seroconversión y protectividad en el primer grupo sobre los demás, el segundo grupo tuvo una inmunogenicidad inferior incluso que el grupo inoculado solamente con bacteria inactivada ya que poseía en su composición una proteína con efecto negativo sobre las demás (Shao *et al.*, 2010). Otro ensayo similar incluyó la proteína PalA en una mezcla de proteínas recombinantes de *A. pleuropneumoniae* también se encontró el fenómeno de interferencia (Van den Bosch *et al.*, 2003). Pudiendo este fenómeno, ser más frecuente de lo que se cree.

La protección provista por vacunas inactivadas no es proteínas suficientemente eficaz en muchas enfermedades de origen respiratorio tal como pleuroneumonía contagiosa porcina causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Fenwick *et al.*, 1986; Haesebrouck *et al.*, 1997), debido a que las proteínas pueden dañarse durante el proceso de inactivación y porque generalmente el preparado final no incluye exotoxinas liberadas en el medio de cultivo (Van den Bosch *et al.*, 2003; Frey *et al.*, 1993).

Para evaluar la calidad de inmunidad que produce una bacterina, un aspecto importante es evaluar el perfil de anticuerpos generados por la bacterina en particular ya que, si bien los anticuerpos anti-proteína total de PM, pueden ser alto, puede no estar produciendo respuesta frente a antígenos clave, lo cual puede estar relacionado al fracaso de muchas vacunas inactivadas basadas en bacterias enteras o antígenos crudos. En un estudio se evaluó el perfil de anticuerpos contra proteínas principalmente tipo adhesinas que mostraban un grupo de bacterinas comerciales contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, la mayoría de tales bacterinas no generaron anticuerpos frente a las proteínas de superficie clave fuertemente inmunogénicas (Fisch *et al.*, 2016). El problema yace en que las cepas usadas para la fabricación de vacunas inactivadas o avirulentas, reducen la expresión de los antígenos principalmente adhesinas (Li *et al.*, 2009).

8. Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

La prueba de ELISA, descrita por Engvall y Perlmann (1972) es una técnica simple y rápida para detectar y cuantificar anticuerpos o antígenos adsorbidos a una superficie sólida. Existen cuatro formas básicas de esta prueba, la forma directa, la indirecta, la forma sándwich y la competitiva (Lin, 2015). La prueba de ELISA ha emergido como un importante recurso para el diagnóstico y monitoreo de la respuesta inmune de los animales vacunados. Los avances recientes en tecnologías de proteínas recombinantes evitan los problemas asociados a la inespecificidad de antígenos crudos de los antígenos de ELISA (reacciones cruzadas), el desarrollo de ELISA indirecto basado enteramente en antígenos recombinantes, es ahora una práctica muy común (Subhash, 2015) y es la prueba más usada para detectar y cuantificar la respuesta inmune humoral (Jakeen *et al.*, 2016).

La prueba de ELISA es uno de los test serológicos recomendados para evaluar vacunas contra *Pasteurella multocida*, (Mosier *et al.*, 1998); sin embargo, posee la desventaja de no representar el estatus inmunitario del animal cuando se usan vacunas muertas tales como antígeno sonificado, antígeno hervido, extracto capsular y bacteria entera, entre otras (Afzal *et al.*, 1989).

8.1 Prueba de ELISA indirecta

8.1.1. Fase sólida

La fase sólida que se ha extendido más en su uso son las placas de 96 pocillos hecha a base de poliestireno (rígido) y en menor medida a base de Cloruro de polivinilo o PVC (flexible), los autores recomiendan un fondo plano, limpio y transparente para poder ser leído con espectrofotómetro (Crowther, 2009). En el caso que el material no sea tratado con ninguna sustancia extra, la interacción con el antígeno será del tipo hidrofóbica y será considerado como un material de baja afinidad; pero en caso esta superficie sea tratada con agentes ionizantes como la luz ultravioleta (UV), la interacción será de tipo iónica y será considerado como un material de alta afinidad (Gibbs *et al.*, 2001).

8.1.2. Lavado

Tal como en la mayoría de métodos inmunológicos, el propósito del lavado es separar los reactivos adheridos de los libres, esto consiste en el vaciamiento de los pocillos seguido por la adición de líquido denominado solución de lavado en el interior, el cual consiste principalmente en PBS (0,1 M, pH 7,4) (Crowther, 2009). Muchas veces son añadidos detergentes como el PBS Tween 20 a una concentración final de 0,05% (v/v). Generalmente son requeridos de tres a cinco lavados con un volumen de 200 μ L en cada paso (Crowther, 2009).

8.1.3. Antígeno

El antígeno debe estar contenido en un buffer que permita la interacción entre este y la fase sólida, los más usados son el buffer carbonato 50 mM, pH 9,6 y el buffer PBS 10 mM, pH 7,2. Desde un punto de vista teórico, da mejor resultado usar un buffer con un nivel de pH una o dos unidades mayor que el valor de pI del antígeno; pero para propósitos generales el PBS es efectivo con muchos tipos de antígeno. Es ideal usar antígenos puros ya que extractos crudos o relativamente crudos resulta en un alto ruido de fondo además hay adsorción irregular de las proteínas (Crowther, 2009). Como la afinidad del antígeno depende también de su naturaleza, las concentraciones recomendadas para antígenos crudos oscilan de 10-1000 μ g/mL y para los antígenos puros la concentración varía de 1-10 μ g/mL, esto es debido a la competencia que se da entre las impurezas y los antígenos proteicos por el anclaje al fondo de la placa (Crowther, 2009; Lin, 2015). La temperatura y tiempo de incubación de el antígeno se ha demostrado que están inversamente relacionados, en efecto se ha utilizado ampliamente la combinación 37°C por 1 h (Ledesma *et al.*, 2016).

8.1.4. Agente bloqueante

Los agentes bloqueantes cumplen la función de evitar la unión inespecífica entre los anticuerpos y los espacios no ocupados por el antígeno (Gibbs *et al.*, 2001). Las dos clases más elementales de agentes bloqueantes son detergentes no iónicos y los agentes proteicos, en este último grupo se encuentra la albumina sérica bovina (BSA), el cual a su vez es un buen agente bloqueante tanto para las superficies inespecíficas y las de alta

afinidad. El porcentaje de BSA indicado es de 1 a 3% (v/v) diluido en PBS (PBS-BSA) (Gibbs *et al.*, 2001). El tiempo y la temperatura de incubación de agentes bloquenas varían; pero se ha usado un tiempo de 18 horas a 4°C (Ledesma *et al.*, 2016).

8.1.5. Anticuerpo primario

Los anticuerpos primarios están contenidos en el suero problema, el cual se usa únicamente con una dilución determinada en el caso del ELISA de punto final. Las diluciones más usadas en en ELISA indirecto de punto único son 1/200, 1/400 o 1/800 (Shivachandra *et al.*, 2017; Crowther, 2009); no obstante, conviene estandarizar a diferentes diluciones en base dos, comprendidas entre 1/40 y 1/2560 (Crowther, 2009). El dilutor del suero consiste en BSA al 1% diluido en PBS (Shivachandra *et al.*, 2017).

8.1.6. Anticuerpo secundario o conjugado

Es anticuerpo secundario es por lo general un conjunto de anticuerpos policlonales de una especie animal diferente al del animal problema, además tiene particular afinidad por los anticuerpos del animal en cuestión (conjugado anti-especie) (Lin, 2015). Este anticuerpo puede ser químicamente conjugado a una con gran cantidad enzimas de las cuales, una muy usada por los investigadores es laHRP (Peroxidasa de rábano picante), una enzima de 40 KDa que cataliza la reacción entre el peróxido de hidrógeno y un sustrato orgánico (donador de electrones) para que por medio de su oxidación, forme un compuesto cromógeno (Brinkley, 1992; Veitch, 2004). Otras enzimas que pueden ser usadas son, AP (Fosfatasa alcalina), β -galactosidasa, etc (Crowther, 2009). Este anticuerpo secundario conjugado conHRP puede ser adquirido de forma comercial por lo que deberá ser diluido según la recomendación del fabricante, por lo general la dilución es de 1:10 000 de una solución stock que se encuentra 1 mg/ml (Lin, 2015).

8.1.7. Sustrato

Para cada enzima en particular, existe un conjunto estrecho de sustratos pueden ser usados, en el caso de la enzima HRP existen sustratos como OPD (Dihidrocloruro O-fenilenediamina), APS (Ácido sulfónico 2,2'-Azino(3-etil) benzotiazolina), Ácido 5-

aminosalicílico (ASA), 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB). El TMB es un compuesto que es oxidado en un compuesto de amina doble que posee un color azul (sin solución Stop) que puede ser leído en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 650 nm (Mesulam, 1978). Los cuales de igual manera que el conjugado, deben ser usados a la concentración y volumen indicado por el fabricante (Lin, 2015).

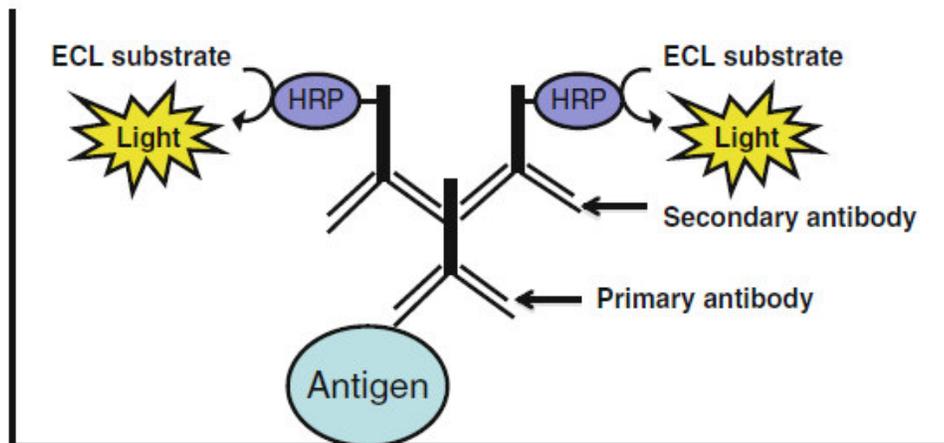


Figura6. Diagrama esquemático que explica el principio de la ELISA indirecta. Se observan las fases del iELISA donde se encuentran la fase sólida, el antígeno, el anticuerpo primario, el anticuerpo secundario (conjugado), el sustrato cromógeno (HRP en este caso). Nótese que a cada anticuerpo primario se puede unir más de un anticuerpo secundario (Imagen tomada de Lin, 2015)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Lugar de ejecución

El ensayo de campo se realizó en el mes de enero de año 2016, en el centro de investigación y producción C.I.P. La Raya de la Universidad del Altiplano, Puno, ubicado cerca al nudo de Vilcanota, en el distrito de Santa Rosa, provincia de Melgar región de Puno, a una altitud de 4200 msnm y entre las coordenadas geográficas de 10° 13' 33" de latitud sur y 70° 57' 12" de longitud Oeste. El procesamiento de las muestras se realizó en la sección de Biología y Genética Molecular del Laboratorio de Microbiología Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

2. Animales

Se formaron cuatro grupos de 20 animales cada uno, alpacas hembra huacaya, clínicamente sanas de aproximadamente 12 meses de edad (N=20). De esos grupos, se tomaron cinco animales al azar (n=5) por cada grupo para el seguimiento. Se inoculó una dosis única de 2 ml de los cuatro productos a evaluar a los cuatro grupos, un producto por grupo. Las dosis por cada animal fueron, 2×10^8 UFC/animal de la bacterina y $10 \mu\text{g} + 1 \times 10^8$ UFC/animal de ambos productos, $10 \mu\text{g}$ /animal de la proteína recombinante rP6-like y 2 ml de suero salino normal al grupo control. La vía de inoculación fue por vía subcutánea en la región axilar derecha, y luego se procedió a tomar muestras de sangre de la vena yugular los días 0 (tiempo control), 5, 7, 9, 12 y 15.

Se centrifugó la sangre a 1600 g x 10 min., y las muestras de suero recuperado se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio.

3. Preparación de bacterina para inoculación

Para su fabricación se utilizó el protocolo usado por Hsuan *et al.*, 2009. La bacterina está compuesta por una suspensión en Caldo BHI (Brain-Heart Infusion Broth) de cepas nativas de *Pasteurella multocida* (cepa nativa), aislada de un caso neumónico de alpaca de la región de Puno, a una concentración de 1×10^8 UFC/mL, e inactivada con formaldehído al 0.25 % y como adyuvante Hidróxido de aluminio al 0.25 % (v/v). La bacterina se almacenó en un frasco forrado con papel aluminio y se almacenó a una temperatura de 4°C en refrigeradora y posteriormente con geles refrigerantes durante el procedimiento de inoculación. Antes de ser inoculada fue evaluada su esterilidad mediante cultivos en agar sangre.

4. Preparación de proteína recombinante para inoculación

Se utilizó una vacuna de tipo subunidad compuesta por la proteína denominada rP6-like obtenida en la unidad de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria UNMSM. Luego del procedimiento purificación, la proteína fue diluida en PBS y combinada con coadyuvante. La proteína se almacenó en un frasco forrado con papel aluminio y se almacenó a una temperatura de 4°C en refrigeradora y posteriormente con geles refrigerantes durante el procedimiento de inoculación. Antes de ser inoculada fue evaluada su esterilidad mediante cultivos en agar sangre.

5. Preparación de antígeno total de *P. multocida* para ELISA

Los antígenos para el inmunoensayo fueron preparados usando el protocolo modificado de Ledesma *et al.*, 2016. Para ello se cosechó *Pasteurella multocida* (cepa nativa), la cual fue cultivada en caldo BHI a 37°C por 24 h, con agitación continua. El medio de cultivo fue centrifugado en tubos Falcon de 50 ml a 7000 g por 15 min. El pellet fue lavado tres veces con buffer fosfato salino PBS, y la lisis de las bacterias será obtenido suspendiendo el pellet en 10 ml de PBS frío y se realizarán tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido seguido de descongelación. Se realizará el sonicado de

las células bacterianas en siete pulsos de 10 seg cada uno, con 10 seg entre pulsos y se centrifugaron a 12 000 g por 30 min. a 4°C, el sobrenadante será separado para posterior uso. La proteína total de PM fue cuantificada mediante fluorometría usando Qubit™ Thermo Scientific y se almacenó una, y el lisado fue alicuotado y almacenado a -4°C hasta su uso en análisis serológicos.

6. Preparación de proteína recombinante para ELISA

Los prodecimientos de clonación, expresión y purificación son los mismos que se detallan en la sección de métodos “Preparación de proteína recombinante para inoculación”. El producto de esta purificación se cuantificó mediante Qubit™ Thermo Scientific para diluirla con PBS 0.1 M y obtener una dilución final de 100 µg/ml. Esta se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su evaluación mediante la prueba de ELISA.

7. Estandarización de ELISA indirecta

Para la estandarización de la concentración de antígenos y suero en las dos técnicas de ELISA, se utilizó el método de titulación en tablero de ajedrez detallado por Lin (2013). Para ambas pruebas de ELISA se usaron sueros de animales inoculados ya sea con la rP6-like o con la bacteria. Para el ELISA con la proteína recombinante como antígeno se tapizó con rP6-like a concentraciones de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,1 µg/mL y el suero se diluyó a concentraciones de 1/50, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, encontrándose concentraciones óptimas de rP6-like de 3,5 µg/mL y en el suero de 1/200. Para la estandarización del ELISA con la proteína total de *P. multocida* se usaron las concentraciones de antígeno de 140; 70; 35; 16,5; 8,25; 4,1 µg/mL y el suero, igualmente se diluyó a concentraciones de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, encontrándose concentraciones óptimas de encontrándose concentraciones óptimas de rP6-like de 35 µg/mL y en el suero de 1:200. Una vez obtenida las concentraciones óptimas de antígeno y suero, se probaron concentraciones de agente bloqueante (BSA) de 1, 3 y 5% (m/v). El conjugado y cromógeno fueron usados a las concentraciones recomendadas por los fabricantes.

8. Materiales de ELISA indirecta

Se preparó buffer fosfato salino (PBS) a concentración de 0.1 M, el cual sirvió para dilución de todos los reactivos. El buffer de lavado (PBS-T) consistió en una solución de Tween 20KPL® diluida en PBS a concentración de 0.05%. El suero problema se diluyó a razón de 1:200 en buffer de dilución, el cual está compuesto de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% en PBS 0.1 M. El anticuerpo conjugado que se usó en las pruebas fue anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-IgG de llama enlazado a la peroxidasa de rábano picante (HRP) Abcam® a concentración final de 1/20 000. El sustrato cromógeno 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidina (TMB) Sureblue™, de igual manera, se usó a la concentración recomendada por el fabricante (listo para usar). Para todos los procedimientos se usaron placas de poliestireno de alta afinidad de 96 pocillos Corning®.

9. Procedimiento ELISA indirecto de punto único

Las muestras de suero fueron analizadas por la prueba de ELISA indirecta de punto único siguiendo los protocolos de Ledesma *et al.* (2016) y Shivachandra *et al.*, (2017) para tapizado con proteína total de PM y proteína recombinante (rP6-like) respectivamente. Se utilizaron dos tipos de antígenos para recubrir las placas de poliestireno. La placa de ELISA fue tapizada con la proteína P6-like diluida en buffer Fosfato salino 0.1 M (PBS), pH 7.4, a una concentración de 3,5 µg/ml para la evaluación de inmunidad contra la proteína rP6-like. Para la evaluación de la inmunidad contra la bacterina y contra rP6-like + bacterina, se tapizó la placa con 100 µL de proteína total de PM a una concentración de 35 µg/mL mediante incubación a 37°C durante 1 h. Posteriormente se hicieron tres lavados con 200 µL de PBS-T luego se bloquearon los pocillos con 200 µL de BSA 3% a 4°C durante 16 h, seguidamente se efectuaron tres lavados con PBS-T para luego añadir por duplicado, 100 µL/pocillo de los sueros problema a dilución de 1/200 en solución de dilución, en esta etapa se incubó a 37°C por 1 h; nuevamente se realizaron los tres lavados y luego de ello se añadió 100 µL del anticuerpo conjugado con HRP a dilución 1/20 000. Se incubó una vez más a 37°C por 1 h, luego se realizaron tres lavados más y se añadió 100 µL sustrato cromógeno (TMB). Finalmente se incubó a temperatura ambiente durante 10 min en la oscuridad.

La placa fue leída a una longitud de onda de 650 nm en un espectrofotómetro multicanal Biorad®.

10. Diseño de estudio

Es un estudio experimental de campo, donde se utilizaron cuatro grupos, uno de ellos inoculado con solución salina normal (control) y tres grupos de tratamiento. Cada una de las intervenciones, bacterina, rP6-like y bacterina + rP6-like juntas fueron asignadas a un grupo de tratamiento. El seguimiento serológico se realizó mediante la toma de muestra de sangre los días: cero (preinoculación), cinco, siete, nueve, trece y quince post inoculación. Los sueros fueron analizados mediante la técnica de ELISA indirecta de punto único mediante dos pruebas de ELISA, el grupo control y el grupo inoculado con la rP6-like fueron evaluados mediante una prueba de ELISA que usó la rP6-like como antígeno de recubrimiento, en tanto que los grupos inoculados con la bacterina y con la bacterina + rP6-like fueron evaluados mediante la prueba de ELISA donde se usó la proteína total de PM como antígeno de recubrimiento. El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad inmunogénica de la rP6-like, para ello se inocularon los productos en un total de 80 animales (20 animales por grupo), de los cuales se seleccionaron 5 animales al azar para su seguimiento serológico.

11. Análisis estadístico

En este estudio se ejecutaron dos tipos de análisis estadísticos, el primero fue para comparar medias de las densidades ópticas (OD) del día cero con el OD de los demás días dentro de cada grupo, esto se realizó en los grupos inoculados con bacterina, bacterina + rP6-like y el grupo control, para ello se usó la prueba de Wilcoxon. El segundo análisis estadístico incluyó la comparación de las medias de las OD del grupo control y las medias de OD del grupo inoculado con la rP6-like en cada día de seguimiento, para ello se usará la prueba U de Mann-Whitney. Para estos propósitos anteriormente mencionados se usó el software STATA® 15.0. Para todos estos fines, se evaluó el valor p usando un nivel de significancia de 0.05. A nivel descriptivo se incluyó el reporte de medias y desviaciones estándares (SD) así como errores estándares (SE).

Los datos fueron presentados en gráficos de tipo líneal, donde se representaron las medias aritméticas de cada grupo en cada con sus respectivos errores estándares (SE), usando el software estadístico GraphPad Prism 7®.

12. Consideraciones éticas

Las diversas actividades llevadas se realizaron causando el menor estrés posible en la sujeción, los encargados de la sujeción del animal fueron personas capacitadas en el manejo animal. El ensayo se realizó la menor cantidad de días posibles (cinco días) y duró un promedio de dos horas por día, desde las 7:00 am hasta las 9:00 am para no interrumpir el horario de alimentación de los animales. El protocolo de toma de muestra de sangre se realizará tomando en cuenta el método publicado por Morton, *et al.*(1993).

IV. RESULTADOS

Dentro del grupo inoculado con la bacterina (grupo 1) se evaluó la respuesta inmune representada por IgG anti-proteína total de PM, inducida por la inoculación de la bacterina, esto provocó una ligera disminución en la media de OD₆₅₀ de los niveles de anticuerpos en el quinto día (OD₆₅₀ = 0,44) con respecto al día cero (OD₆₅₀ = 0,401) sin embargo esto no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$) (figura 7 y cuadro 1). A partir del séptimo día se comenzaron a elevar los niveles de IgG, pero de manera no significativa. El pico de elevación se presentó en el noveno día (OD₆₅₀ = 0,58), donde el OD₆₅₀ logra diferenciarse significativamente del día cero ($p < 0.05$). La densidad óptica media disminuye en los días 12 y 15 post inoculación ya que no existe diferencia estadísticamente significativa con respecto al día cero (cuadro 1). En el cuadro 2, se observa el aumento individual neto hasta el día 15 con respecto al día cero.

En los resultados obtenidos por el ELISA para el grupo inoculado con rP6-like (grupo 2), donde se midieron anticuerpos anti rP6-like (figura 8 y cuadro 1), se observa que en el quinto día de seguimiento hubo una ligera disminución en el promedio de densidad óptica lo cual ocurre de manera similar en el grupo control (grupo 4). En el quinto día no hay diferencia estadística significativa con respecto al quinto día del grupo control. A partir del séptimo día se evidenció una elevación en el OD₆₅₀ en el grupo inoculado con la rP6-like (OD₆₅₀ = 0.85), siendo significativamente diferente que en el séptimo día del grupo control (OD₆₅₀ = 0.45) ($p < 0.05$). En los días posteriores también se observa una tendencia al aumento de OD₆₅₀ y de igual manera, una diferencia significativa hasta el día 15 de seguimiento (último día) con respecto al grupo control ($p < 0.05$), observando un pico en el día 12 de OD₆₅₀ = 0.09, el cual se mantiene hasta el día 15. En el cuadro 3 se observa que todos los animales no aumentaron sus anticuerpos de manera homogénea, sin embargo se registró un aumento en cada uno de ellos en el 15. En el grupo inoculado con la bacterina junto con la rP6-like se evaluaron los niveles

de anticuerpos anti proteína total de *P. multocida*. En la figura 9 se observa que el quinto día de seguimiento hubo un declive considerable en la media de la densidad óptica ($OD_{650} = 0,50$), además se alcanzó la mínima media en el séptimo día ($OD_{650} = 0,44$). Los anticuerpos parecen estabilizarse en el noveno día; sin embargo no se evidencian cambios significativos en ninguno de los días de seguimiento con respecto al día cero ($p > 0.05$) (figura 9 y cuadro 1). En el cuadro 4, se observa que los animales uno, dos, tres y cuatro, disminuyen sus niveles de anticuerpos en el quinto día post inoculación, el animal cinco disminuye sus niveles de OD_{650} en el séptimo día; luego continúa disminuida en todos los animales hasta el séptimo día, para luego aumentar desde el día nueve sin embargo no llegó a ser significativamente diferente que el tiempo control (día cero).

El grupo control no mostró variación estadísticamente significativa en los niveles de OD_{650} en ningún día con respecto al día cero ($SD \leq 0.10$) (cuadro 1), tuvo promedios más bajos que los tres grupos experimentales en todos los días de seguimiento y las medias se mantuvieron constante en todos los días de seguimiento (figura 4 y cuadro 1). Además, en cada uno de los miembros del grupo control (cuadro 5), se observa que las densidades ópticas de cada animal individual no aumentaron ni disminuyeron considerablemente con respecto al tiempo control (día 0).

En figura 10 se muestra que el nivel de OD_{650} alcanzado por los tres tratamientos y el grupo control, donde se observa que el mayor nivel de OD_{650} obtenido es el del tratamiento con la rP6-like, luego se encuentran los tratamientos con bacterina y bacterina + rP6-like, los cuales obtuvieron medidas mayores que el grupo control. Se debe tener en consideración que este gráfico (figura 10).

La zona de inoculación de ningún animal presentó alteraciones inflamatorias durante el seguimiento y ningún animal falleció en el transcurso del experimento.

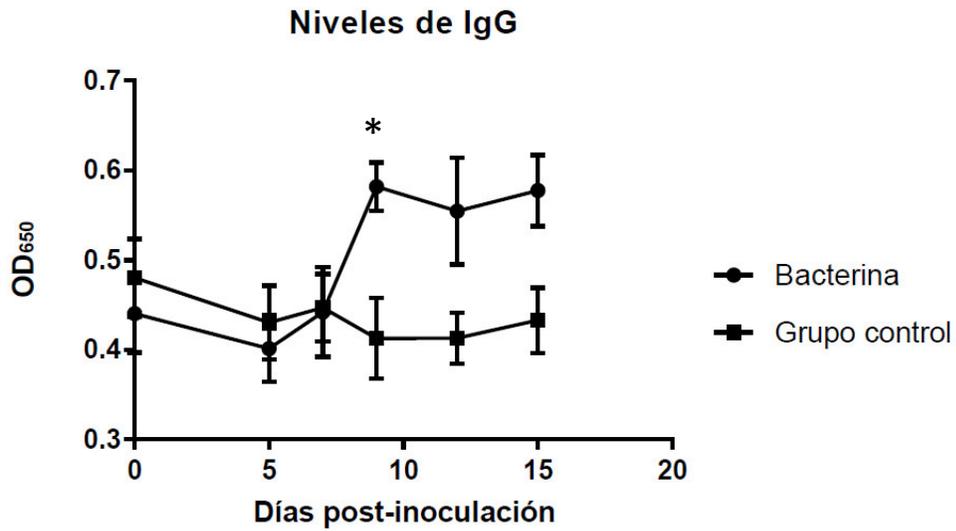


Figura 7. Resultados del ELISA para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti proteína total de PM frente a la inoculación de la bacterina. Los puntos representan las medias y las barras de error corresponden a errores estándares (SE). Los valores significativamente diferentes al día cero del mismo grupo inoculado con la bacterina están marcados con un asterisco ($p < 0.05$).

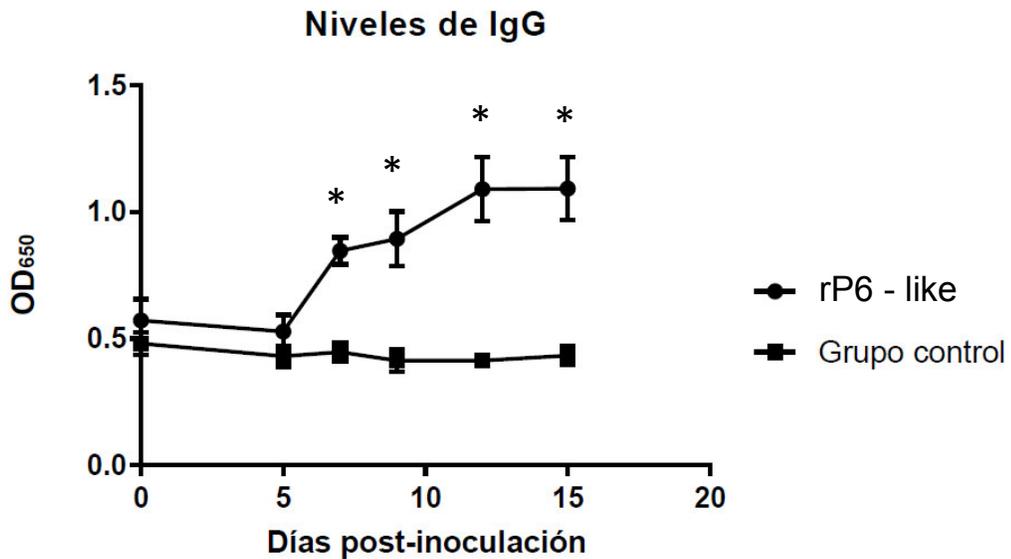


Figura 8. Resultados del ELISA para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti- rP6-like frente a la inoculación de la rP6-like. El grupo control es el mismo que fue graficado en la figura 1. Los puntos representan las medias y las barras de error corresponden a los errores estándares (SE). Los valores significativamente diferentes al grupo control están marcados con un asterisco ($p < 0.05$).

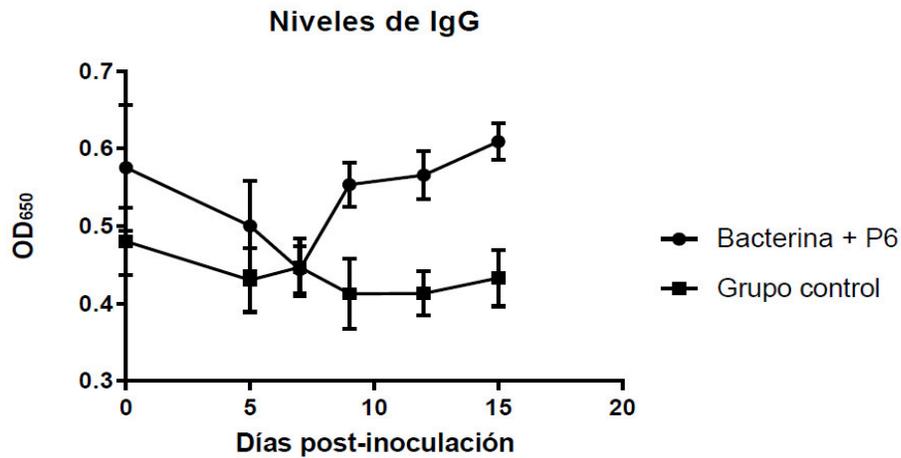


Figura 9. Resultados del ELISA para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti-proteína total de PM frente a la inoculación de la bacterina + rP6-like. Los puntos representan las medias y las barras de error corresponden a los errores estándares (SE). El grupo control es el mismo que en las figuras 7 y 8. Resultados del ELISA para los niveles de IgG (OD₆₅₀). No se observa ningún valor significativamente diferente del día cero.

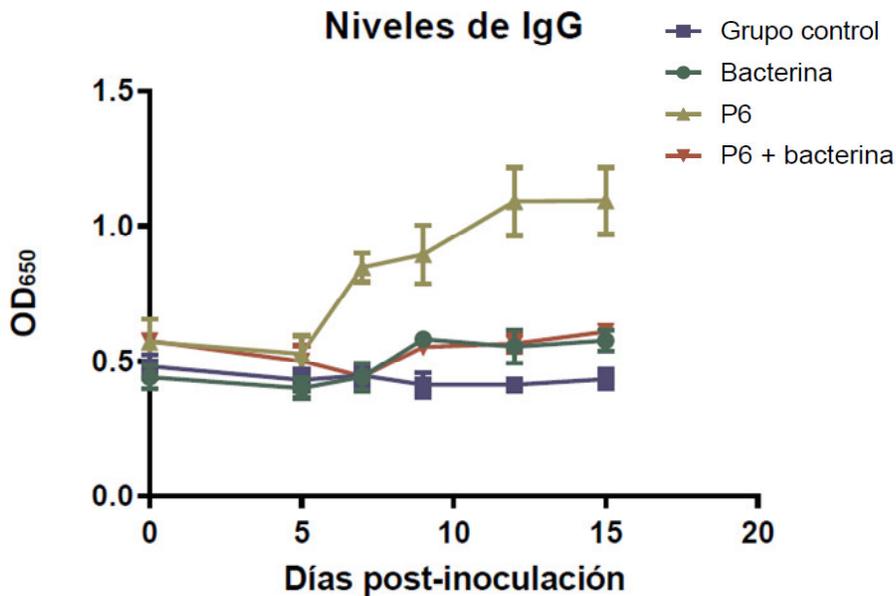


Figura 10. Resultados del ELISA para los niveles de IgG (OD₆₅₀) frente a tres productos biológicos y grupo control. Se visualiza al grupo inoculado con la rP6-like con mayores valores que otros grupos frente a tres productos biológicos y grupo control. Los puntos representan las medias y las barras de error corresponden a los errores estándares (SE).

Cuadro 1. Medidas de tendencia central y de dispersión de los cuatro grupos empleados en el experimento. Promedio, desviación estándar y errores estándar de las densidades ópticas correspondientes respectivamente a los grupos inoculado con bacterina (grupo1), grupo inoculado con a proteína rP6-like (grupo 2), grupoinoculado con bacterina + rP6-like (grupo 3) y el grupo control (grupo 4).

Día	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3			Grupo 4		
	Media*	SD	SE	Media**	SD	SE	Media*	SD	SE	Media*	SD	SE
Día 0	0,440 ^a	0,097	0,043	0,572 ^a	0,187	0,840	0,575 ^a	0,182	0,082	0,480 ^a	0,097	0,043
Día 5	0,401 ^a	0,031	0,037	0,528 ^a	0,148	0,066	0,500 ^a	0,130	0,058	0,430 ^a	0,093	0,042
Día 7	0,441 ^a	0,111	0,050	0,847 ^b	0,121	0,054	0,443 ^a	0,067	0,030	0,446 ^a	0,083	0,037
Día 9	0,581 ^b	0,060	0,027	0,894 ^c	0,241	0,130	0,553 ^a	0,063	0,028	0,412 ^a	0,100	0,045
Día 12	0,554 ^a	0,133	0,060	1,090 ^d	0,549	0,160	0,565 ^a	0,070	0,031	0,412 ^a	0,064	0,028
Día 15	0,577 ^a	0,088	0,040	1,092 ^e	0,281	0,169	0,609 ^a	0,052	0,023	0,433 ^a	0,081	0,037

*Promedios en la misma columna con letras diferentes son estadísticamente diferentes con respecto al día 0 de su mismo grupo (p<0.05).

**Promedios en la columna del grupo inoculado con la rP6-like(grupo 2) con letras diferentes son significativamente diferentes con el grupo control.

Cuadro 2. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti-proteína totalde PMen cada uno de los animales inoculados con la bacterina.

Grupo 1	Días					
	0	5	7	9	12	15
Animal 1	0,438	0,355	0,425	0,606	0,566	0,636
Animal 2	0,501	0,442	0,507	0,541	0,492	0,494
Animal 3	0,539	0,525	0,512	0,561	0,546	0,696
Animal 4	0,437	0,316	0,511	0,675	0,765	0,566
Animal 5	0,285	0,367	0,252	0,526	0,403	0,495

Cuadro 3. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti-rP6-like en cada uno de los animales inoculados con la P6-like.

Grupo 2	Días					
	0	5	7	9	12	15
Animal 1	0,687	0,609	0,866	1,019	1,285	1,327
Animal 2	0,581	0,435	0,639	0,665	0,747	0,812
Animal 3	0,803	0,748	0,940	1,050	1,284	1,416
Animal 4	0,470	0,465	0,924	0,603	0,819	0,825
Animal 5	0,320	0,384	0,865	1,132	1,316	1,081

Cuadro 4. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti-proteína totalde PM en cada uno de los animales inoculados con la bacterina + rP6-like.

Grupo 3	Días					
	0	5	7	9	12	15
Animal 1	0,865	0,634	0,354	0,620	0,656	0,638
Animal 2	0,401	0,354	0,479	0,541	0,504	0,533
Animal 3	0,620	0,479	0,506	0,461	0,486	0,583
Animal 4	0,539	0,398	0,388	0,539	0,598	0,625
Animal 5	0,450	0,634	0,490	0,605	0,583	0,666

Cuadro 5. Densidades ópticas para los niveles de IgG (OD₆₅₀) anti rP6-like en cada uno de los animales inoculados con solución salina normal.

Grupo 4	Días					
	0	5	7	9	12	15
Animal 1	0,546	0,415	0,479	0,456	0,433	0,487
Animal 2	0,467	0,446	0,477	0,377	0,410	0,396
Animal 3	0,428	0,450	0,366	0,346	0,389	0,425
Animal 4	0,356	0,290	0,357	0,317	0,327	0,322
Animal 5	0,603	0,549	0,554	0,566	0,503	0,534

V. DISCUSIÓN

La neumonía aguda de las alpacas, es la segunda causa de mortalidad en las crías, la tasa de mortalidad es de 27.5% en crías, y 26.3% (Ramírez, 1989). Sin embargo, a la fecha, no se cuenta con una vacuna segura, de calidad y eficaz para la prevención de neumonía aguda de las alpacas. Por ello este estudio tuvo como objetivo evaluar los niveles de anti rP6-like generados por la inoculación de la proteína rP6-like dentro de las dos primeras semanas mediante la técnica de ELISA indirecta, y la comparación de la cinética de anticuerpos anti antígeno total de *P. multocida* generados por una solución salina normal, una bacterina, y una bacterina +rP6-like juntas.

El producto biológico que produjo mayor elevación de anticuerpos que los demás fue la proteína recombinante rP6-like, estos resultados son compatibles con Sivachandra *et al.* (2017), quien obtuvo, al día 21, una elevación estadísticamente significativa de la IgG anti rP6-like en ratones. Sin embargo, la elevación de anticuerpos no fue tan marcada como en los estudios llevados a cabo en ratones por Okay *et al.* (2012) y Shivachandra *et al.* (2014) debido, probablemente, a que no se usaron alpacas libres de patógenos específicos y quizá por factores ambientales y factores del animal como por ejemplo la raza, condición corporal, los que pueden estar jugando un papel de confusores (Siegrist, 2008).

Los anticuerpos anti rP6-like del grupo inoculado con la rP6-like fueron los que tuvieron un pico de elevación más alto y más rápido que los demás productos biológicos y se mantuvieron en niveles significativamente altos hasta el último día de seguimiento con respecto al día cero (figura 7). Tal elevación se puede deber al estímulo

de los linfocitos Th2, donde según Maximiliano (2017), están implicadas las citoquinas IL-10 e IL-4. Toda esta cascada de reacciones que conllevan a la producción de anticuerpos IgG es compatible con la naturaleza proteica del antígeno, con lo cual se cumple con los requisitos expuestos por Vinuesa *et al.* (2008) sobre la formación de centros germinativos y respuesta T- dependiente.

Se encontró una respuesta retardada de la bacterina y elevación no significativa al día 15 con respecto al día cero siendo compatible tal resultado con una rápida degradación de los anticuerpos, lo cual concuerda con los resultados de Chandrasekaran *et al.* (1994); Shah *et al.* (1997) y Tabatabaei *et al.* (2002) quienes encontraron que la bacterina posee los anticuerpos elevados por un periodo de 6 meses. Además, estos resultados difieren de Joshi *et al.* (2013) quien encontró que la bacteria total tenía una elevación más rápida y superior a la estimulada por la rOmpH. La elevación de anticuerpos a los días 12 y 15 no son tan marcados a diferencia de los resultados de Sun *et al.* (2009); el cual, condujo su estudio por mayor cantidad de semanas y con mayor cantidad de animales; sin embargo el resultado global de este estudio concuerda con los suyos debido a que se desprende que la bacterina no es eficaz en la generación de anticuerpos. Los bajos títulos de anticuerpos generados por la bacterina también son compatibles con otros estudios donde se evalúa la inmunogenicidad de vacunas inactivadas contra otras bacterias tales como *Mycoplasma hyopneumoniae* (Fisch *et al.*, 2016), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Shao *et al.*, 2010) y *Streptococcus suis* (Hsueh *et al.*, 2017), especialmente en especie porcina. La ineficacia en la generación de anticuerpos por parte de la bacterina también puede deberse a la disminución en la concentración de las proteínas P6-like expresadas por la cepa de *P. multocida*, lo cual, según Fisch *et al.* (2016) está muy relacionado con la “domesticación” de la cepa laboratorial con la cual se produce la bacterina.

Los bajos títulos de la bacterina con respecto de la rP6-like, también pueden deberse a que el ELISA con proteína total de PM, carece de sensibilidad al momento de evaluar inmunidad según Afzal *et al.* (1989). Además, según Crowther (2009), el uso de antígenos puros mejora la sensibilidad del ELISA, a diferencia del antígeno sonificado, el cual, no es homogéneo y posee muchas impurezas tales como lípidos, polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas no específicas, que compiten por los sitios deberían ocupar las proteínas.

Los dos productos combinados no resultaron en una elevación de los niveles de anticuerpos, no siendo compatible con los resultados de Hsuan *et al.*(2009), quien comprobó que los anticuerpos aumentan considerablemente luego de inmunizar a cerdos con rPMT junto con una bacterina, esto puede ser debido a que, la bacterina posee un efecto deletéreo o anérgico en combinación con OMPs o proteína cruda de *P. multocida* tal como los expuestos en los resultados de Dabo *et al.*(2008b), quien describió el efecto deletéreo de la rPmOmpA sobre las OMPs en ratones. Si ese fuera el caso, la bacterina combinada con la rP6-like, es un mal candidato para continuar con ensayos clínicos de desafío.

El grupo control presentó ligeras desviaciones con respecto a la media del día cero según la figura 7, esto se puede deber a factores no controlados como la temperatura ambiental, la cual es un factor influyente sobre la reactividad de los monocitos (Nino Arias *et al.*, 2016). El grupo control y el tiempo control de todos los grupos (día cero) presentaron también niveles muy altos de anticuerpos a diferencia de otros estudios (Wei *et al.*, 2017, Okay *et al.*, 2012; Shivachandra *et al.*, 2014) debido a que probablemente, *P. multocida* presente en la microbiota, estimuló la producción de anticuerpos anti rP6-like y anti-proteína total de *P. multocida* (De Steenhuijsen *et al.*, 2015). Esto representa una limitante de las pruebas serológicas en agentes que forman parte de la microbiota; sin embargo eso no ha sido un impedimento para comprobar la eficacia vacunal, tal es el caso de la vacuna contra la enterotoxemia en alpacas.

En todos los grupos se percibe una disminución en los niveles de anticuerpos en el día cinco con respecto al día cero, debido a que probablemente al tiempo hostil, con abundantes precipitaciones, de 6-8 L/m², cifra que superó a la del año 2016 (La República, 2017), además según las referencias se registraron temperaturas máximas día de 17°C, y nocturnas mínimas de 3°C (SENHAMI,2018), los cuales se comportaron probablemente como factor estresante, especialmente en las alpacas jóvenes (Arias *et al.*, 2016).

Debido a la disponibilidad de animales en el fundo y a la poca disponibilidad de horario de trabajo, por la alimentación de los animales, se tuvo limitaciones en la conformación del tamaño de muestra por cada grupo. Esta limitante reduce el poder estadístico; sin embargo se encontraron diferencias, las que también se hubieran encontrado al usar muestras más numerosas (Triola, 2009). La variable sexo fue

controlada mediante restricción (se usó sólo hembras) debido a que estudios previos señalan la diferencias probablemente de origen genético en la producción de anticuerpos e inuidad celular de machos y hembras (Lisse *et al.*, 1997; Amadori *et al.*, 1995).Es necesario entonces, realizar estudios que permitan establecer diferencias por sexo del animal a fin de conocer el comportamiento de la inmunidad en ambas categorías (Sun, 2009).

El procesamiento de las muestras de animales inoculados con la bacterina y la bacterina + rP6-like con un ELISA anti-proteína total de PM, y la evaluación del grupo control y del grupo inoculado con la rP6.like mediante una prueba de ELISA anti-rP6-like impidieron realizar comparaciones estadísticas entre grupos y sólo se realizaron en gran parte, comparaciones dentro del mismo grupo con el día cero (tiempo control o control interno). Otra dificultad encontrada al realizar este estudio,fue el no contar con una prueba de ELISA comercial o adecuadamente validada para cuantificarlos antígenos que se deseaban evaluar, esta limitación fue manejada mediante el desarrollo de una prueba de ELISA *in house*, la cual fue estandarizada en el presente estudio. Se recomienda para estudios posteriores,establecer una correlación estadística entre diluciones seriadas de anticuerpos anti rP6-like de referencia y anticuerpos de alpacas inmunizadas y no inmunizadas con rP6-like, para validación de la prueba (Ghosh *et al.*, 2015).

Adicionalmente se comprobó que la inoculación de los tres productos biológicos no produjeron ningún efecto adverso visible en animales jóvenes, lo cual contribuye a los estudios de inocuidad de los tres productos biológicos y corrobora los resultados de Moreno *et al.* (2016) en el caso de la bacterina y los resultados de de Shivachandra *et al.* (2017) en el caso de la proteína recombinante.

Estos primeros ensayos empleando una proteína recombinante han permitido conocer la capacidad inmunogénica de esta proteína, pues se ha logrado establecer que rP6-like es capaz de generar anticuerpos específicos de manera significativa y la respuesta generada en estos primeros ensayos indican que, de manera preliminar,podría actuar mejor sola que en combinación con una bacterina. Serán necesarios mas estudios para conocer el nivel mínimo de anticuerpos que se debe llegar para conferir protección contra la enfermedad.

VI. CONCLUSIONES

- 1.** Los productos evaluados, rP6-like y bacterina poseen efecto inmunogénico en alpacas.
- 2.** La inoculación de la rP6-like estimula tempranamente, desde el día 7, la elevación de anticuerpos.
- 3.** La rP6-like estimula la producción de anticuerpos de manera sostenida, hasta el día 15.

VII. RECOMENDACIONES

- Se sugiere replicar el estudio usando las dos técnicas de ELISA, tanto para evaluar anticuerpos anti- P6-like y anti-proteína total de *Pasteurella multocida*.
- Se sugiere continuar con estudios de eficacia, de mayor duración, con mayor número de animales y tomando la mayor cantidad de variables que se pueda.
- Se recomienda emplear la misma técnica de ELISA para evaluar umbral de protección de anticuerpos y título de anticuerpos neutralizantes contra la Pasteurelisis.
- Se recomienda evaluar niveles de anticuerpos en brotes de enfermedad respiratoria para determinar causalidad del brote.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2005.** Situación actual de los camélidos sudamericanos en el Perú: Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina. Proyecto de Cooperación Técnica. 62 p.
2. **[FAO] Food and Agriculture Organization. 2009.** High Level Expert Forum – How to Feed the World in 2050: Global agriculture towards 2050. Roma: FAO [Internet], [13 octubre 2009]. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf
3. **[FAO] Food and Agriculture Organization. 2010.** *Brucella melitensis* in Eurasia and the Middle East, Animal Production and Health Proceedings No. 10. [Internet] Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf. Oct, 2009.
4. **[INEI] Instituto Nacional de Estadística e Informática. 2013.** IV Resultados Definitivos. Censo Nacional Agropecuario 2012. Lima: INEI. 62 p.
5. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2015a.** Principios de Producción de Vacunas Veterinarias. París: OIE. Manual de animales terrestres. 13 p.
6. **[OIE] Organización Mundial de Sanidad Animal. 2015b.** Cólera aviar. París: OIE. Manual de animales terrestres. 13 p.
7. **Abbas KA, Lichtman HA, Pillai S. 2011.** Inmunología celular y molecular. 7ª ed. Barcelona: ElSevier. 566 p.
8. **Abdullahi MZ, Gilmour NJ, Poxton IR. 1990.** Outer membrane proteins of bovine strains of *Pasteurella multocida* type A and their doubtful role as protective antigens. Journal of Medical Microbiology 32: 55–61.
9. **Ackermann MR, Cheville NF, Gallager JE. 1991.** Colonization of the pharyngeal tonsil and respiratory tract of the gnotobiotic pig by a toxigenic strain of *Pasteurella multocida* type D. Vet Pathol 28:267.

10. **Adler B, Bulach D, Chung J, Doughty S, Hunt M, Rajakumar K, Serrano M, Van Zanden A, Zhang Y, Ruffolo C. 1999.** Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *Journal of Biotechnology* 73: 83–90.
11. **Afzal M, Muneer R, Akhtar S. 1989.** *Serological evaluation of Pasteurella multocida antigens associated with protection in buffalo calves*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 11 (3), 917-923
12. **Ahmad TA, Rammah SS, Sheweita SA, Haroun M, El-Sayedc LH. 2014.** Development of immunization trials against *Pasteurella multocida*. *T.A. Ahmad et al. / Vaccine* 32. 909– 917.
13. **Ahmed OAR, Olson LD, Mc Cune EL. 1974.** Tissue irritation in turkey by fowl cholera bacterins. *Avian Dis* 18: 590-602.
14. **Al-Hasani K, Boyce J, McCarl VP, Bottomley S, Wilkie I, Adler B. 2007.** Identification of novel immunogens in *Pasteurella multocida*. *Microb. Cell Fact.* 6, 3.
15. **Amadori A, Zamarchi R, de Silvestro G, Forza G, Cavatton C, Danieli GA. 1995.** Genetic control of the CD4/CD8 T cell ratio in humans. *Nat. Med* 1: 1279–1283.
16. **Ameghino E, Calle S. 1989.** Aislamiento de *Pasteurella multocida* de procesos neumónicos en crías de alpaca. En: XII Reunión Científica Anual APPA. Lima: Asociación Peruana de Producción Animal.
17. **Ameghino E, De Martini J. 1991.** Mortalidad en crías de alpacas. Lima: Rerumen. 128 p.
18. **Ames TR, Patterson EB. 1985.** Oxytetracycline concentrations in plasma and lung of healthy and pneumonic calves, using two oxytetracycline preparations. *Am J Vet Res.* 46(12):2471-3.
19. **Ames TR. 1997.** Dairy calf pneumonia. The disease and its impact. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 13: 379–391. *Animal frontiers* April 5: 44-55.
20. **Arias N, Velapatinoa B, Hunga A, Cokb J. 2016.** Cytokines expression in alpacas and llamas exposed to cold stress. *Small Ruminant Research* 141. 135-140.

21. **Arratia V, Herrera JP. 1992.**Agentes etiológicos de las neumonías en alpacas de la Cat. Santa Lucía N° 179. En: XI Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias del Perú. Puno.
22. **Autio T, Pohjanvirta T, Holopainen R, Rikula U, Penttinen J, Huovilainen A, Rusanen H, Soveri T, Sihvonon L, Pelkonen S. 2007.**Etiology of respiratory disease in nonvaccinated, non-medicated calves in rearing herds. *Veterinary Microbiology* 119: 256–265.
23. **Babu MM, Priya ML, Selvan AT, Madera M, Gough J, Aravind L, Sankaran K. 2006.**A database of bacterial lipoproteins (DOLOP) with functional assignments to predicted lipoproteins. *J Bacteriol* 188:2761–2773.
24. **Barquet N, Domingo P. 1997.**Smallpox: the triumph over the most terrible of the ministers of death. *Ann Intern Med.* Oct 15;127(8 Pt 1):635-42.
25. **Barsallo J. 1985.**Agentes bacterianos encontrados en el aparato en el aparato respiratorio de alpacas adultas aparentemente normales. *Anales de la V conven. internac. sobre camélidos sudamericanos.* 36 p.
26. **Basu S, Fenton MJ. 2004.** Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286: 887-92.
27. **Basurto F. 2010.** Generalidades de vacunología. En: Gutierrez J, *Inmunología Veterinaria*, México DF: Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. p 231 – 234.
28. **Black L, Francis MJ, Nicholls MJ. 1985.** Protecting Youngdomesticated animals from infectious disease. *Vet. Ann.* 25: 46–61.
29. **Boerlin P, I HH, Burnens AP, Kuhnert P, Mendez P, Prétat G, Lienhard R, Nicolet J. 2000.** Molecular identification and epidemiological tracing of *Pasteurella multocida* meningitis in a baby. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 1235–1237.
30. **Booker CW, Abutarbush SM, Morley PS, Jim GK, Pittman TJ, Schunicht OC, Perrett T, Wildman BK, Fenton RK, Guichon PT,Janzen ED. 2008.**Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in Western Canada. *Can. Vet. J.* 49:473-481.
31. **Bording A, Nymark K, Smidt E. 1994.** Field trials with a new genetically engineeredvaccine for protection against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Acta VetScand.*35:155-63.

32. **Boyce JD, Adler B. 2000.** The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* 1404 (B:2). *Infection and Immunity* 68: 3463–3468.
33. **Boyce JD, Cullen PA, Nguyen V, Wilkie I, Adler B. 2006.** Analysis of the *Pasteurella multocida* outer membrane sub-proteome and its response to the in vivo environment of the natural host. *Proteomics* 6, 870–880.
34. **Boyce JD, Harper M, Wilkie IW, Adler B. 2010.** En: Gyles C.L., Prescott J.F., Songer J.G., Thoen C.O. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 1^a ed. USA: Blackwell Publishing. p 325-446.
35. **Brinkley M. 1992.** A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens, and cross-linking reagents. *BioconjugChem* 3:2–13
36. **Bryson D, McFerran J, Ball H, Neill S. 1978.** Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves epidemiological, clinical and microbiological findings. *Veterinary Record* 103: 485–489.
37. **Bustinza AV, Burfening PJ, Blackwell RL. 1988.** Factors affecting survival in young alpacas (*Lama pacos*). *J Anim Sci*. 66(5):1139-43.
38. **Calcagni, E., Elenkov, I., 2006.** Stress system activity, innate and T helper cytokines and susceptibility to immune-related diseases. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*. Blackwell Publishing Inc, pp. 62–76.
39. **Campbell J. 2016.** Enzootic pneumonia of calves and shipping fever pneumonia. *Merck Manual*. [Internet], [21 noviembre 2016]. Disponible en: <http://www.merckvetmanual.com/respiratory-system/respiratory-diseases-of-cattle/enzootic-pneumonia-of-calves-and-shipping-fever-pneumonia>.
40. **Cardella MA, Adviento MA, Nervig RM. 1978.** Vaccination studies against experimental bovine *Pasteurella pneumonia*. *Can J Vet Res* 51:204–11.
41. **Carpenter T, Khalid S, Sansom MS, 2007.** A multidomain outer membrane protein from *Pasteurella multocida*: modelling and simulation studies of PmOmpA. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 2831–2840.
42. **Carter GR, Chengappa MM. 1980.** Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia. *Journal of Clinical Microbiology* 11: 94–96.
43. **Carter GR. 1952.** The type specific capsular antigen of *Pasteurella multocida*. *Can J Med Sci* 30: 48-53.

44. **Caswell JL, Middleton DM, Sorden SD, Gordon JR. 1998.** Expression of the Neutrophil Chemoattractant interleukin-8 in the lesions of bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet Pathol* 35: 124-131.
45. **Cebra C, Anderson DE, Tibary A, Van SR, Jhonson L. 2013.** Llama and Alpaca Care, Medicine, Surgery, Reproduction, Nutrition, and Herd Health. 1st ed. USA: Elsevier. 789 p.
46. **Chandrasekaran S, Kennett L, Yeap PC, Muniandy N, Rani B, Mukkur TKS. 1994.** Characterization of immune response and duration of protection in buffaloes immunized with hemorrhagic septicemia vaccines. *Vet. Microbiol.*, 41:213–219.
47. **Chang A, Kaur R, Michel LV, Casey JR, Pichichero M. 2011.** Haemophilus influenzae vaccine candidate outer membrane protein P6 is not conserved in all strains. *Human Vaccine* 7:102–105.
48. **Chanter N, Ruther IM. 1989.** Pasteurellosis in pigs and determinants of virulence of Toxigenic *Pasteurella multocida*. En: Adam & Rutter. *Pasteurella and Pasteurellosis*. London: Academic Press. p 161 – 195.
49. **Chengappa MM, McLaughlin BG, Kadel WL, Maddux RL, Greer SC. 1989.** Efficacy of a live *Pasteurella multocida* vaccine for the prevention of experimentally induced bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet Microbiol.* 21:147–54.
50. **Cho YS, Lee HS, Lim SK, Joo YS, Kim JM, Kim JH. 2008.** Safety and efficacy testing of a novel multivalent bovine bacterial respiratory vaccine composed of five bacterins and two immunogens. *J Vet Med Sci* 2008;70:959–64.
51. **Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. 1999.** Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem.* 274:10689-92.
52. **Christensen, H., Bisgaard, M., Angen, O., Frederiksen, W., Olsen, J.E., 2005.** Characterization of sucrose-negative *Pasteurella multocida* variants, including isolates from large-cat bite wounds. *J Clin Microbiol* 43, 259–270.
53. **Chung JY, Wilkie I, Boyce J, Townsend K, Frost A, Ghoddusi M, Adler B. 2001.** Role of capsule in the pathogenesis of fowl cholera caused by *Pasteurella multocida* serogroup A. *Infection and Immunity* 69: 2487–2492.

54. **Cid-Vásquez MD. 2010.** Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. 1ªed. España: Edit. Complutense. 151 p.
55. **Cirilo CE, Manchego SA, Rivera HH, Rosadio AR.2012.** Coexistencia de virus y bacterias en Neumonías agudas en alpacas neonatas. Rev Inv Vet, Peru 23(3): 317-335.
56. **Confer AW, Nutt SH, Dabo SM, Panciera RJ, Murphy GL. 1996.** Antibody responses of cattle to outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* A:3. American Journal of Veterinary Research 57: 1453–1457.
57. **Confer AW. 1993.** Immunogens of *Pasteurella*. Veterinary Microbiology 37: 353–368.
58. **Crossley BM, Barr BC, Magdesian KG, Ing M, Mora D, Jensen D, Loretto AP. 2010.** Identification of a novel coronavirus possibly associated with acute respiratory syndrome in alpacas (*Vicugna pacos*) in California. J Vet Diagn Invest 22: 94-97.
59. **Crotty S, Felgner P, Davies H. 2003.** Cutting edge: long-term B cell memory in humans after smallpox vaccination. J Immunol 171:4969–4973.
60. **Crotty S. 2011.** Follicular helper CD4 T cells (T(FH)). Annu Rev Immunol. 29:621-663.
61. **Crowther JR. 2009.** Methods in Molecular Biology: The ELISA Guidebook. 2a ed.. Austria: Humana Press. 564 p.
62. **Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. 2008a.***Pasteurellamultocida* and bovine respiratory disease. Anim Health Res. Rev. 8, 129–150.
63. **Dabo SM, Confer A, Montelongo M., York P, Wyckoff III JH, 2008b.** Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but nonprotectiveand deleterious Th2-type immune response in mice. Vaccine 26: 4345–4351.
64. **Davies RL, MacCorquodale, Baillie S, Caffrey B 2003.**Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rinitis. Journal of Medical Microbiology. 52. 59 – 67.
65. **De Alwis MC, Wijewardana TG, Gomis AI, Vipulasiri AA. 1990.**Persistence of the carrier status in haemorrhagic septicaemia (*Pasteurella multocida* serotype 6:B infection) in buffaloes. Trop. Anim. Health Prod. 22: 185-94.

66. **De Alwis MC. 1992.**Haemorrhagic septicaemia- a general review. Br. Vet. J. 148: 99-112.
67. **De la Cruz FN Jr, Li L, Delwart E, Pesavento PA. 2017.** A novel pulmonary polyomavirus in alpacas (*Vicugna pacos*). Veterinary Microbiology. Vol. 201, p 49-55.
68. **De Lalla F, Rinaldi F, Santoro D. 1988.**Immune response to hepatitis B vaccine given at different injection sites and by different routes: controlled randomized study. Eur J Epidemiol. 4: 256-258.
69. **De Steenhuijsen PW, Sanders EA, Bogaert D. 2015.** The role of the local microbial ecosystem in respiratory health and disease. Series B, Biological sciences vol. 370,1675 20140294.
70. **De Steenhuijsen P, WA, Huijskens EG, Wyllie AL, Biesbroek G, Van Den Bergh MR, Veenhoven RH, Wang X, Trzcinski K, Bonten MJ, Rossen JW, Sanders EA, Bogaert D. 2016.** Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients. ISME J. 10:97-108.
71. **DeAngelis PL, Jing W, Drake RR, Achyuthan AM. 1998.** Identification and molecular cloning of a unique hyaluronan synthase from *Pasteurella multocida*. J Biol Chem 273:8454–8458.
72. **DeAngelis PL, Gunay NS, Toida T, W. Mao-J, R. J. Linhardt. 2002.** Identification of the capsular polysaccharides of Type D and F *Pasteurella multocida* as unmodified heparin and chondroitin, respectively. Carbohydr. Res. 337: 1547-1552.
73. **Derieux WT. 1978.** Response of young chickens and turkeys to virulent and avirulent *Pasteurella multocida* administered by various routes. Avian Dis.22: 131-39.
74. **Detmer A, Glenting J. 2006.** Live bacterial vaccines – a review and identification of potential hazards. Microb Cell Fact 5: 23.
75. **DiGiacomo RF, Deeb BJ, Giddens WE, Bernard BL, Chengappa MM. 1989.** Atrophic rhinitis in New Zealand white rabbits infected with *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res 50:1460–1465
76. **DiGiacomo RF, Xu YM, Allen V, Hunter MH, Pearson GR. 1991.**Naturally-acquired *Pasteurella multocida* infection in rabbits: clinicopathological aspects. Can J Vet Res 55:234–238.

77. **Dillehay DL, Paul KS, DiGiacomo RF, Chengappa MM. 1991.** Pathogenicity of *Pasteurella multocida* A3 in Flemish Giant and New Zealand White rabbits. *Lab Anim Sci* 25:337–341.
78. **Dowling, A, Hodgson, JC, Schock A, Donachie W, Eckersall PD, McKendrick IJ. 2002.** Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A:3. *Res. Vet. Sci.* 73, 37–44.
79. **Dowling A, Hodgson JC, Dagleish MP, Eckersall PD, Sales J. 2004.** Pathophysiological and immune cell responses in calves prior to and following lung challenge with formalinkilled *Pasteurella multocida* biotype A:3 and protection studies involving subsequent homologous live challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 100:197–207.
80. **Dziva F, Muhairwa AP, Bisgaard M, Christensen H. 2008.** “Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*,” *Veterinary Microbiology*, vol. 128, no. 1-2. 1–22.
81. **Eamens GJ, Kirkland PD, Turner MJ, Gardner IA, White MP y Hornitzky CL. 1988.** Identification of toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs by in vitro characterisation. *Aust Vet J* 65, 120–123.
82. **Edwards TA. 2010.** Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 26, 273–284.
83. **Eisenbarth SC, Colegio OR, O’Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. 2008.** Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. June 19; 453(7198): 1122–1126.
84. **Engvall E, Perlmann P. 1972.** Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes. *The Journal of Immunology*. Vol. 109 N°1: 129 – 135.
85. **Espada CE, Pinto JC, Cid Vázquez, DM. 2010.** Camélidos sudamericanos: Estado sanitario de sus crías. *Rev complutense de ciencias vet* 4(1): 37-50.
86. **Fenwick BW, Cullor JS, Osburn BI, Olander HJ. 1986.** Mechanisms involved in protection provided by immunization against core lipopolysaccharides of *Escherichia coli* J5 from lethal *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in swine. *Infect Immun* 1986, 53:298-304.

87. **Fisch A, Marchioro B, Klazer C, Galli V, Rodrigues N, Simionatto S, Odir Dellagostin A, Mendonça M, Nunes A, Rochedo F. 2016.** Commercial bacterins did not induce detectable levels of antibodies in mice against *Mycoplasma hyopneumoniae* antigens strongly recognized by swine immune system. *Trials in Vaccinology* 5: 32–37.
88. **Foged N, Pedersen K, Elling F. 1987.** Characterization and biological effects of the *Pasteurella multocida* toxin. *FEMS Microbiol Lett* 43:45–51
89. **Frank GH, Smith PC. 1983.** Prevalence of *Pasteurella haemolytica* in transported calves. *Am. J. Vet. Res.* 44:981–985.
90. **Frank GH. 1989.** Pasteurellosis of cattle. En: Adlam C & Rutter JM (eds) *Pasteurella and Pasteurellosis*. London: Academic Press. p 161-19
91. **Frey J, Bosse JT, Chang YF, Cullen JM, Fenwick B, Gerlach GF, Gygi D, Haesebrouck F, Inzana TJ, Jansen R, Kamp EM, Macdonald J, MacInnes JI, Mittal KR, Nicolet J, Rycroft AN, Segers RPAM, Smits MA, Stenbaek E, Struck DK, Van den Bosch JF, Wilson PJ, Young R. 1993.** *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytolysins, Pleurotoxin and their genes. *J Gen Microbiol* 1993, 139:1723-1728.
92. **Fuller TE, Kennedy MJ, Lowery DE. 2000.** Identification of *Pasteurella multocida* virulence genes in a septicemic mouse model using signature-tagged mutagenesis. *Microb. Pathog.* 29, 25–38.
93. **Fulton RW, Briggs RE, Payton ME, Confer AW, Saliki JT, Ridpath JF, Burge LJ, Duff GC. 2004.** Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1a, BVDV1b, BVDV2, bovine Herpesvirus-1, parainfluenza-3 virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine* 22: 643–649.
94. **Gagea MI, Bateman KG, van Dreumel T, McEwen BJ, Carman S, Archambault M, Shanahan RA, Caswell JL. 2006.** Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 18: 18–28.
95. **Garrido ME, Bosch M, Bigas A, Badiola I, Barbé J, Llagostera M. 2008.** Heterologous protective immunization elicited in mice by *Pasteurella multocida* fur OmpH. *Int Microbiol.* 11(1):17-24.

96. **Gibbs J. 2001.** ELISA Tehcnical Bulletin - No 3. Corning Inc., Life Sciences. Effective Blocking Procedures. 7p.
97. **Godlewska R, Wis'niewska K, Pietras Z, Jagusztyn-Krynicka E. 2009.** Peptidoglycan-associated lipoprotein(Pal)of Gram-negative bacteria: function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis. FEMS Microbiol Lett 298 (2009) 1–11.
98. **Gresham CN, Confer AW, Bush LJ, Rummage JA. 1984.** Serum and colostrum antibody to *Pasteurella* species in dairy cattle. American Journal of Veterinary Research 45: 2227–2230.
99. **Griffin D, Chengappa MM, KuszakJ, McVey DS. 2010.** Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 26:381-394.
100. **Gupta RK, Chang AC, Griffin P, Rivera R,Siber GR. 1996.***In vivo* distribution of radioactivity in mice after injection of biodegradable polymer microspheres containing 14C-labeled tetanus toxoid. *Vaccine* 14: 1412–1416.
101. **Guzmán K, Rosadio AR, Maturrano HL, Manchego SA. 2013.** Asociación de agentes virales y bacterianos en cuadros de Neumonías agudas en alpacas tuis. Rev de Inv Vet, Peru24(4): 524-336.
102. **Guzmán KP. 2011.**Identificación de polimorfismos del gen tlr4 en crías de alpacas con cuadros de neumonías por *Pasteurella multocida*. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 70 p.
103. **Haesebrouck F, Chiers K, Van Overbeke I, Ducatelle R. 1997.***Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. Vet Microbiol 1997, 58:239-249
104. **Hamdy AH, Pouden WD, Bell DS. 1963.**Effect of *Pasteurella* bacterin on mortality and pneumonia in lambs. J Am Vet Med Assoc. 15;142:379-81.
105. **Hanekom WA. 2005.** The immune response to BCG vaccination of Newborns. Ann N Y Acad Sci.1062,69-78.
106. **Hansen MS, Pors SE, Jensen HE, Bille-Jensen V, Bisgaard M, Flachs EM, Nielsen OL. 2010.** An investigation of the pathology and pathogens associated with porcine respiratory disease complex in Denmark. J Comp Path 143:120–131.

107. **Harmon BG, Glisson, JR, Latimer KS, Steffens WL, y Nunnally, JC. 1991.** Resistance of *Pasteurella multocida* A:3,4 to phagocytosis by turkey macrophages and heterophils. Am.J.Vet.Res. 52, 1507-1511.
108. **Harper M, Boyce JD, Wilkie IW, Adler B. 2003.**Signature-tagged mutagenesis of *Pasteurella multocida* identifies mutants displaying differential virulence characteristics in mice and chickens. Infect. Immun. 71, 5440–5446.
109. **Harper M, Cox AD, St. Michael F, Wilkie IW, Boyce JD, Adler B. 2004.** A heptosyltransferase mutant of *Pasteurella multocida* produces a truncated lipopolysaccharide structure and is attenuated in virulence. Infect Immun. 72:3436-3443.
110. **Harper M, Boyce JD, Adler B. 2006.***Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur FEMS Microbiol. Lett. **265**:1–10.
111. **Harper M, Boyce JD, Adler B. 2012.** The key surface components of *Pasteurella multocida*: capsule and lipopolysaccharide. Curr Top Microb Immunol 361: 39-51.
112. **Harper M, John M, Turni IC, Edmunds M, Michael FST, Adler B, Blackall PJ, Cox AD, Boyce JD. 2015.** Development of a rapid multiplex PCR to genotype *Pasteurella multocida* strains using the lipopolysaccharide outer core biosynthesis locus. J. Clin. Microbiol. 53 (3). 477–485.
113. **Hatfaludi, Keith Al-Hasani, John D. Boyce, Ben Adler. 2010.** Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology 144: 1–17.
114. **Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. 1970.** Fowl cholera: immune response in turkeys. Avian Dis 14:626–35.
115. **Heddleston KL, Hall WJ. 1958.** Studies on pasteurellosis. II. Comparative efficiency of killed vaccines against fowl cholera in chickens. Avian Dis 2:322–35.
116. **Heddleston KL, Gallagher JE, Rebers PA. 1972.** Fowl cholera: Gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis. 16, 925–936.
117. **Heddleston KL, Rebers PA. 1974.** Fowl cholera bacterins: host-specific cross-immunity induced in turkeys with *Pasteurella multocida* propagated in embryonating turkey eggs. Avian Dis 1974;18:231–9.
118. **HogenEsch H. 2012.**Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. Frontier in immunology. Vol.3: N° 406. 1-13.

119. **Holman DB, McAllister TA, Topp E, Wright AD, Alexander TW. 2015.** The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle that develop bovine respiratory disease. *Vet. Microbiol.* 180:90–95.
120. **Holt John G, Krieg NR, Peter HA, James TS, Stanley TW. 1994.** Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9^a ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins. 775 p.
121. **Horadagoda N, Hodgson J, Moon G, Wijewardana T, Eckersall P. 2002.** Development of a clinical syndrome resembling haemorrhagic septicaemia in the buffalo following intravenous inoculation of *Pasteurella multocida* serotype B:2 endotoxin and the role of tumour necrosis factor alpha. *Res Vet Sci* 72: 194-200.
122. **Hsuan SL, Liao CM, Huang C, Winton JR, Chen ZW, Lee WC. 2009.** Efficacy of a novel *Pasteurella multocida* vaccine against progressive atrophic rhinitis of swine. *Vaccine.* 27:2923-9.
123. **Hsueh K, Cheng L, Lee J, Chung Y, Chung W, Chu C. 2017.** Immunization with *Streptococcus suis* bacterin plus recombinant Sao protein in sows conveys passive immunity to their piglets. *BMC Veterinary Research* 13: 1-9
124. **Hung A, López T, Perales R, Noé N. 1988.** Mycoplasmosis en camélidos sudamericanos. En: XI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Lima, Perú.
125. **Hurtado RE, Aburjaile F, Mariano D, Canário MV, Benevides Leandro, Fernandez DA, Allasi NO, Rímac R, Juscamayta JE, Maximiliano JE, Rosadio RH, Azevedo V, Maturrano L. 2017.** Draft Genome Sequence of a Virulent Strain of *Pasteurella Multocida* Isolated From Alpaca. *Journal of Genomics* 2017, Vol. 5.
126. **Jakeen K, Samah S, Soumaya A, Ashgan M, Abdullah A, Moussa I. 2016.** Comparative studies for serodiagnosis of haemorrhagic septicaemia in cattle sera Saudi Journal of Biological Sciences, Volume 23, Issue 1: 48–53.
127. **Jaramillo AC, Trigo TF, Suárez-Güernes F. 2009.** Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Vet. Mex.* 40, 293–314.
128. **Johnson L. 2016.** Overview of Llamas and Alpacas - Exotic and Laboratory Animals - Merck Veterinary Manual. [Internet], [6 de octubre 2018]. Disponible en: <https://www.merckvetmanual.com/exotic-and-laboratory-animals/llamas-and-alpacas/overview-of-llamas-and-alpacas>

129. **Jordan MB, Mills DM, Kappler J, Marrack P, Cambier JC. 2004.** Promotion of B cell immune responses via an alum-induced myeloid cell population. *Science*. 304:1808–1810.
130. **Joshi S, Tewari K, Singh R. 2013.** Comparative immunogenicity and protective efficacy of different preparations of outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* (B:2) in a mouse model. *veterinarski arhiv* 83 (6), 665-676.
131. **Juscamayta E, Maturrano L, Fernández D, Hurtado R, Allasi N, Rosadio R. 2014.** Whole genome analysis of *Pasteurella multocida* strain UNMSM to identify potential vaccine candidates against acute pneumonia. En: SCB-Latin American Meeting on Bioinformatics with BSB. Sao Paulo: SoiBio.
132. **Kadel WL, Chengappa MM, Herren CE. 1985.** Field-trial evaluation of a *Pasteurella* vaccine in preconditioned and nonpreconditioned lightweight calves. *American Journal of Veterinary Research* 46: 1944–1948.
133. **Kawai T, Akira S. 2010.** The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11:373–384.
134. **Khalid S, Bond PJ, Carpenter T, Sansom MS. 2008.** OmpA: gating and dynamics via molecular dynamics simulations. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 1871–1880.
135. **Klima CL, Alexander TW, Read RR, Gow SP, Booker CW, Hannon S, Sheedy C, McAllister TA, Selinger LB. 2011.** Genetic characterization and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolated from the nasopharynx of feedlot cattle. *Vet. Microbiol.* 149: 390-398.
136. **Koebnik, R., Locher, K.P., Van Gelder, P., 2000.** Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* 37, 239–253.
137. **Kool M, Soullié T, VanNimwegen M, Willart MAM, Muskens F, Jung S. 2008.** Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 205, 869–882.
138. **Korczak B, Kuhnert P. 2008.** Phylogeny of *Pasteurellaceae*. In *Pasteurellaceae: biology, genomics and molecular aspects*. En: P. Kuhnert and H. Christensen (eds.). Norwich, UK: Horizon Scientific Press. pp. 27 – 52
139. **Kovacs-Simon A, Titball RW, Michell SL. 2011.** Lipoproteins of Bacterial Pathogens. *infection and immunity*. 2011, p. 548–561.

140. **Kuhnert P, Boerlin P, Emler S, Krawinkler M, Frey J. 2000.** Phylogenetic analysis of *Pasteurella multocida* subspecies and molecular identification of feline *P. multocida* subsp. *septica* by 16S rRNA gene sequencing. *Int J Med Microbiol* 290, 599–604.
141. **Kuhnert P, Korczak BM. 2006.** Prediction of whole-genome DNA–DNA similarity, determination of G+C content and phylogenetic analysis within the family Pasteurellaceae by multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiology* 152, 2537–2548.
142. **Kumar A, Nalini MN, Chacko N, Yogisharadhya R, Shivachandra BS. 2015.** Structural Features of a Highly Conserved Omp16 Protein of *Pasteurella multocida* Strains and Comparison with Related Peptidoglycan-associated Lipoproteins (PAL). *Indian J Microbiol.* 55(1):50–56.
143. **Kumar B, Rawat M, Chaturvedi VK, Somrajan SR, Kumar P, Kaushik P. 2012.** Immunological studies on a modified water-in-oil-in-water (w/o/w) haemorrhagic septicaemia vaccine incorporated with *Pasteurella multocida* A:1 in the external aqueous phase. *Indian J. Anim. Sci.* 82: 286-289.
144. **Kwon M, Kim YB, Leel J. 2007.** Protective antibodies and immunity elicited by immunization with outer membrane protein H of *Pasteurella multocida* in mice. *Korean J Microbiol.* 43:7–13.
145. **La República. 2017.** Lima: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENHAMI). [Internet], [18 de julio 2018]. Disponible en: <https://larepublica.pe/sociedad/1009750-senamhi-pronostica-lluvias-intensas-en-el-sur-hasta-el-viernes>.
146. **Lacerda HM, Lax AJ, Rozengurt E. 1996.** *Pasteurella multocida* toxin, a potent intracellularly acting mitogen, induces p125FAK and paxillin tyrosine phosphorylation, actin stress fiber formation, and focal contact assembly in Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* 271. 439-445.
147. **Larson RL, Step DL. 2012.** Evidence-based effectiveness of vaccination against *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, and *Histophilus somni* in feedlot cattle for mitigating the incidence and effect of bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract* 28: 97-106.

148. **Laufer AS, Metlay JP, Gent JF, Fennie KP, Kong Y, Pettigrew MM. 2011.** Microbial communities of the upper respiratory tract and otitis media in children. *Applied and Environmental Microbiology*. vol 78(17): 6262–6270.
149. **Ledesma MM, Díaz AM, Barberis C, Vay C, Manghi MA, Leoni J, Castro MS, Ferrari A. 2016.** Identification of *Lama glama* as reservoirs for *Acinetobacter lwoffii*. *Frontiers in Microbiology* Vol 8 (Art 278): 1-7.
150. **León CI. 2012.** Identificación de bacterias de la familia Pasteurellaceae causantes de procesos neumónicos en crías de alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 59p.
151. **Li H, Nookala S, Re F. 2007.** Aluminum hydroxide adjuvants activate caspase-1 and induce IL-1 β and IL-18 release. *J. Immunol.* 178:5271–5276.
152. **Li YZ, Ho YP, Chen ST, Chiou TW, Li ZS, Shiuan D. 2009.** Proteomic comparative analysis of pathogenic strain 232 and avirulent strain J of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Biochemistry* 74 (2009) 215–220.
153. **Liao CM, Huang C, Hsuan SL, Chen ZW, Lee WC, Liu CI. 2006.** Immunogenicity and efficacy of three recombinant subunit *Pasteurella multocida* toxin vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Vaccine* 24(1):27–35.
154. **Lin AV. 2013.** Indirect ELISA. En: ELISA. Robert Hnasko. *ELISA Methods and Protocols*. 1ª edición. New York: Humana Press Link. p 51- 60.
155. **Lindblad EB. 2004.** Aluminium adjuvants: in retrospect and prospect. *Vaccine* 22: 3658–3668.
156. **Lisse IM, Aaby P, Whittle H, Jensen H, Engelmann M, Christensen LB. 1997.** T-lymphocyte subsets in West African children: impact of age, sex and season. *J Pediatr* 130: 77–81.
157. **Lo M, Boyce JD, Wilkie IW, Adler B. 2004.** Characterization of two lipoproteins in *Pasteurella multocida*. *Microbes Infect.* 6, 58–67.
158. **Lopez A. 2007.** Respiratory system. In: McGarvin MD, Zachary JF. *Pathological Basis of Veterinary Disease USA*: Mosby Elsevier. 522–523 p.
159. **Luna L, Brandão PE, Maturrano L, Rosadio R, Silva FDF, Soares RM, Gregori F. 2015.** Betacoronavirus 1 in alpacas (*Vicugna pacos*) in the High Peruvian Andes. *Small Ruminant Research* 133. 7–9.
160. **MacLennan IC, Toeller KM, Cunningham AF. 2003.** Extrafollicular antibody responses. *Immunol Rev* 194:8-18.

161. **Mamani PJ, Condemayta CZ, Calle CL 2009.** Causas de mortalidad de alpacas en tres principales centros de producción ubicados en puna seca y húmeda del departamento de Puno. *Rev Elec de Vet*10 (8): 1–13.
162. **Manchego A, Rivera H, Rosadio R. 1998.** Seroprevalencia de agentes virales en rebaño mixto de una comunidad andina peruana. *Rev Inv Pec, IVITA* 9(2): 1-10.
163. **Marandi MV, Mittal KR 1997.** Role of outer membrane protein H (OmpH)-and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infect Immun.* 1997 Nov; 65(11): 4502–4508.
164. **Maturrano L, Hurtado R, Aleman, Carhuaricra D, Rosadio. 2017.** Genomic Characterization of *Pasteurella multocida* Strain UNMSM, Isolated from Cases of Pneumonia in Alpacas. En: *ASM Microbe*. New Orleans: American Society of Microbiology
165. **Maximiliano J.2017.** Evaluación in vitro de la actividad inmunogénica de una proteína recombinante de *Pasteurella multocida* aislada de casos de neumonías en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis de Magíster en Medicina Veterinaria. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 127 p.
166. **May BJ, Zhang Q, Li LL, Paustian ML, Whittam TS, Kapur V. 2001.** Complete genomic sequence of *Pasteurella multocida*, Pm70. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 3460–3465.
167. **McGregor BA, Ramos HE, Quispe EC, 2012.** Variation of fibre characteristics among sampling sites for Huacaya alpaca fleeces from the High Andes. *Small Rumin. Res.* 102, 191–196.
168. **Mckercher PD. 1986.** Oil adjuvants: their use in veterinary biologics. In *Advances in carriers and adjuvants for veterinary biologics*. En: Robert NM, Patricia GM, Merlin L and Cecelia WA: p 115-119.
169. **Meeusen Els NT, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. 2007.** Current Status of Veterinary Vaccines. *Clinical Microb Reviews.* p. 489–510.
170. **Mesulam MM. 1978.** Tetramethyl benzidine For horseradish per- Oxidase neurohistochemistry: A non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* 26:106.
171. **Michael GB, Kadlec K, Sweeney MT, Brzuszkiewicz E, Liesegang H, Daniel R, Murray RW, Watts JL, Schwarz S. 2012.** ICEPmu1, an integrative

- conjugative element (ICE) of *Pasteurella multocida*: structure and transfer. J Antimicrob Chemother 67:91–100.
172. **Morck DW, Merrill JK, Gard MS, Olson ME, Nation PN. 1997.** Treatment of experimentally induced pneumonic pasteurellosis of young calves with tilmicosin. Can J Vet Res. 1997 Jul;61(3):187-92.
173. **Moreno G, Maximiliano J, Medina G, Rosadio R, Maturrano L. 2016.** Evaluación de la inocuidad de una bacterina de *Pasteurella multocida* para la prevención de neumonía aguda en crías de alpaca. En: XXII Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias. Huánuco: Colegio Médico Veterinario departamental de Huánuco.
174. **Morton DB, Abbot D, Barclay R, Close BS, Ewbank R, Gask D, Heath M, Mattic S, Poole T, Seamer J, Southee J, Thompson A, Trussel B, West C, Jennings M. 1993.** Extracción de sagre en los mamíferos y aves de laboratorio. 1993. Laboratory Animals (1993) 27: 1-22
175. **Mosier DA, Panciera RJ, Rogers DP, Uhlich GA, Butine, MD, Confer, AW, Basaraba, RJ, 1998.** Comparison of serologic and protective responses induced by two *Pasteurella* vaccines. Can. J. Vet. Res 62, 178–182.
176. **Muhairwa AP, Christensen JP, Bisgaard M. 2000.** Investigations on the carrier rate of *Pasteurella multocida* in healthy commercial poultry flocks and flocks affected by fowl cholera. Avian Pathol. 29: 133 – 142.
177. **Mullen LM, Bosse JT, Nair SP, Ward JM, Rycroft AN, Robertson G. 2008a.** *Pasteurellaceae* ComE1 proteins combine the properties of fibronectin adhesins and DNA binding competence proteins. PLoS ONE 3: e3991.
178. **Mullen LM, Nair SP, Ward JM, Rycroft AN, Williams RJ, Robertson G. 2008b.** Novel adhesin from *Pasteurella multocida* that binds to the integrin-binding fibronectin FnIII9 - 10 repeats. Infect. Immun. 76. 1093 – 1104.
179. **Muneer R, Afzal M. 1989.** Preliminary studies on improved oil-adjuvant. vaccine for haemorrhagic septicaemia in buffalo calves. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 8 (4), 999-1004.
180. **Muniandy N, Mukkur TKS. 1993.** Protective potential of purified lipopolysaccharide viru conjugated oligosaccharide of *Pasteurella multocida* type B in mice. In: Pasteurellosis in Production Animals: ACIAR Proceedings, Brisbane, pp. 149–155.

181. **Mutters R, Christensen H, Bisgaard M. 2015.** En: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 2nd edition Bergey's Manual Trust. This article is © 2005 Bergey's Manual Trust. 2^a ed. New York: Springer-Verlag. p 1-23.
182. **Mutters R, Ihm P, Pohl S, Frederiksen W, Mannheim W. 1985.** Reclassification of the genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the basis of DNA homology with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. Int. J. Syst. Bacteriol. 35:309–322.
183. **Narayan SL, Priyadarshini A, Kumar S, Thomas P, Kumar GS, Konasagara NV, Vijendra PS. 2014.** Virulence Genotyping of *Pasteurella multocida* Isolated from Multiple Hosts from India. The scientific world journal. Vol. 1-10.
184. **Nassar SA, Mohamed AH, Soufy H, Nasr SM, Mahran KM. 2012.** Immunostimulant effect of Egyptian propolis in rabbits. Sci World J 2012: 901516.
185. **Naz S, Hanif A, Maqbool A, Ahmed S, Muhammad K. 2012.** Isolation, characterization and monitoring of antibiotic resistance in *Pasteurella multocida* isolates from buffalo (*Bubalus bubalis*) herds around Lahore. The journal of animal and plant sciences, 22 (3 suppl.): 2012. 242-245.
186. **Nelson, MB, Apicella MA, Murphy TF, Vankeulen H, Spotila LD, Rekosh D. 1988.** Cloning and sequencing of Haemophilus outer membrane protein P6. Infect. Immun. 56:128–134.
187. **Ni L, Chokhawala HA, Cao H, Henning R, Ng L, Huang S. 2007.** Crystal structures of *Pasteurella multocida* sialyltransferase complexes with acceptor and donor analogues reveal substrate binding sites and catalytic mechanism. Biochemistry 46: 6288 - 6298.
188. **Oehler RL, Velez AP, Mizrachi M, Lamarche J, Gompf S. 2009.** Bite-related and septic syndromes caused by cats and dogs. Lancet Infect. Dis. 9:439–447.
189. **Okay S, Özcengiz E, Gürsel I, Özcengiz G. 2012.** Immunogenicity and protective efficacy of the recombinant *Pasteurella* lipoprotein E and outer membrane protein H from *Pasteurella multocida* A:3 in mice. Research in Veterinary Science 93: 1261–1265.

190. **Okerman L, Spanoghje L. 1980.** Immunity induced in mice by *Pasteurella multocida* strains isolated from rabbits. *Zbl. Vet. Med. B* 27: 759.
191. **Okerman L, Spanoghe L. 1981.** Protective effects of inactivated *Pasteurella* vaccines in specific pathogen free rabbits. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1981;4:223–8.
192. **Okerman L, Devriese LA. 1987.** Failure of oil adjuvants to enhance immunity induced in mice by an inactivated rabbit *Pasteurella multocida* vaccine. *Vaccine* 5: 315–318.
193. **Parsons LM, Lin F, Orban J. 2006.** Peptidoglycan recognition by PAL, an outer membrane lipoprotein. *Biochem* 45:2122–2128.
194. **Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. 2005.** Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med.* 11. S63-S68.
195. **Pastoret PP, Brochier B. 1996.** The development and use of a vaccinia-rabies recombinant oral vaccine for the control of wildlife rabies; a link between Jenner and Pasteur. *Epidemiology and Infection* 116: 235-240.
196. **Petersen KD, Christensen H, Bisgaard M, Olsen JE. 2001.** Genetic diversity of *Pasteurella multocida* fowl cholera isolates as demonstrated by ribotyping and 16S rRNA and partial *atpD* sequence comparisons. *Microbiology* 147: 2739–2748.
197. **Pettigrew MM, Laufer AS, Gent JF, Kong Y, Fennie KP, Metlay JP. 2012.** Upper respiratory tract microbial communities, acute otitis media pathogens, and antibiotic use in healthy and sick children. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:6262–6270.
198. **Pettit RK, Ackermann MR, Rimler RB. 1993.** Receptor - mediated binding of *Pasteurella multocida* dermonecrotic toxin to canine osteosarcoma and monkey kidney (vero) cells. *Lab. Invest.* 69: 94-100.
199. **Plotkin SA. 2008.** Correlates of vaccine-induced immunity en: *Vaccines.* *Clin. Infect. Dis.* 47:401-409.
200. **Prado ME, Prado TM, Payton M, Confer AW. 2006.** Maternally and naturally acquired antibodies to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 111: 301-307.
201. **Pulendran B, Ahmed R. 2011.** Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol* 12(6):509–517.

202. **Pulendran B, Tang H, Manicassamy S. 2010.** Programming dendritic cells to induce TH2 and tolerogenic responses. *Nat. Immunol* 11:647–655.
203. **Pullinger GD, Bevir T and Lax AJ. 2004.** The *Pasteurella multocida* toxin is encoded within a lysogenic bacteriophage. *Mol. Microbiol.* 51: 255-69.
204. **Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. 2010.** *Veterinary Medicine.* 10a ed. Londres: Saunders ElSevier. 2156 p.
205. **Raetz CR, Whitfield C. 2002.** Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 635-700.
206. **Ramírez A. 1989.** Enfermedades infecciosas en camélidos sudamericanos. En: XII Reunión científica anual APPA. Lima: Asociación Peruana de Producción Animal.
207. **Ramírez, A. 1991.** Enfermedades infecciosas. En: S.Fernández-Baca, ed. *Avances y Perspectivas del Conocimiento de los Camélidos Sudamericanos.* FAO/RLA, Santiago (Chile).
208. **Ramon G. 1924.** Sur la toxine et surranatoxine diphtheriques. *Ann. Inst. Pasteur* 38, 1.
209. **Reif K, Ekland EH, Ohl L. 2002.** Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* 416:94–99.
210. **Rickie W. Kasten, Lori M. Hansen, Julian Hinojoza, Bieber D., Ruehl William W. and Dwight C. Hirsh. 1995.** *Pasteurella multocida* Produces a Protein with Homology to the P6 Outer Membrane Protein of *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity.* Mar 1995. 989–993.
211. **Rímac R, Luna L, Hurtado R, Rosadio R, Maturrano Lenin. 2017.** Detection and genetic characterization of *Pasteurella multocida* from alpaca (*Vicugna pacos*) pneumonia cases. *Trop Anim Health Prod.* 49(6):1325-1328.
212. **Rimler RB , Rhoades KR. 1989.** *Pasteurella multocida*. In: Adlam C and Rutter JM (eds) *Pasteurella and Pasteurellosis.* London: Academic Press, pp. 37–73.
213. **Rimler RB. 1994.** Presumptive identification of *Pasteurella multocida* serogroups A, D and F by capsule depolymerisation with mucopolysaccharides. *Vet Rec* 134: 191–192.
214. **Rivera H, Madewell B, Ameghino E. 1987.** Serological survey of viral antibodies in peruvian alpacas (*Lama pacos*). *Am. J. Vet. Res.* (48), 2: 189-191.

215. **Rosadio R, Ameghino E, Ramírez A. 1990.**Diagnosis and control of diseases in sheep and alpaca in Peru. En: McCorkle CM. Improving Andean sheep and alpaca production. USA: University of Missouri - Columbia. 141- 220.
216. **Rosadio AR, Cirilo CE, Manchego SA, Rivera HH. 2011.**Respiratory syncytial and Parainfluenza type 3 viruses coexisting with *Pasteurella multocida* and *Mannheimia hemolytica* in acute pneumonias of neonatal alpacas. Small Rumin Res 97 (1-3):110-116.
217. **Rosenbusch CT, Merchant IA. 1939.**A study of the hemorrhagic septicemia *Pasteurellae*. J. Bacteriol. 37: 69 – 89.
218. **Rosner H. , Grimmecke HD, Knirel YA , and Shashkov AS. 1992.** Hyaluronic acid and a (1 - 4) - xylan, extracelular polysaccharides of *Pasteurella multocida* (Carter type A) strain 880. Carbohydr. Res. 223: 329 – 333.
219. **Roth JA. 2010.**Veterinary vaccines and their importance to animal health and public health. Procedia in vaccinology 5 (2011). 125 -131.
220. **Ruffolo CG, Tennent JM, Michalski WP, Adler B. 1997.** Identifi cation, purifi cation, and characterization of the type 4 fi mbriae of *Pasteurella multocida*.Infect. Immun. 65: 339 – 343.
221. **Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR. 2008.** Diseases of poultry. 12th Revised edition: Wiley-Blackwell. 1322 p.
222. **Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. 2010.** From vaccines to memory and back. Immunity. 33:451–463.
223. **San Millan A., Escudero JA, Gutierrez B, Hidalgo B, Garcia N, Llagostera M, Dominguez L, Gonzalez-Zorn B. 2009.**Multiresistance in *Pasteurella multocida* Is Mediated by Coexistence of Small Plasmids. Antimicrobial agents and chemotherapy, Aug (2009): 3399–3404.
224. **Scott PR, McGowan M, Sargison ND, Penny CD, Lowman BG. 1996.** Use of tilmicosin in a severe outbreak of respiratory disease in weaned beef calves. Aust Vet J73(2):62–64.
225. **SENHAMI. 2018.** Lima: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú (SENHAMI). [Internet], [18 de julio 2018]. Disponible en: <https://senamhi.gob.pe/?p=pronostico-detalle-turistico&localidad=0020>

226. **Shah NH, de Graaf FK. 1997.** Protection against haemorrhagic septicaemia induced by vaccination of buffalo calves with an improved oil adjuvant vaccine. *FEMS Microbiol Lett* 155:203–7.
227. **Shah NH, Jacobs AA, de Graaf FK. 2001.** Safety and efficacy of an oil-adjuvant vaccine against haemorrhagic septicaemia in buffalo calves: cross-protection between the serotypes B:2,5 and E:2,5. *Vet Rec* 149:583–7.
228. **Shao M, Wang Y, Wang C, Yang Guo, Peng Y, Liu J, Li G. 2010.** Evaluation of multicomponent recombinant vaccines against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Acta Veterinaria Scandinavica* 52: 1-8.
229. **Shayegh J, Atashpaz S, Hejazi MS. 2008.** Virulence genes profile and typing of ovine *Pasteurella multocida*. *Asian Journal of Animal and Advances* 3(4). 206-213.
230. **Shivachandra SB, Kumar A, Yogisharadhya R. 2014.** Immunogenicity of highly conserved recombinant VacJ outer membrane lipoprotein of *Pasteurella multocida*. *Vaccine* 32: 290– 296.
231. **Shivachandra SB, Kumar A, Mohanty NN, Yogisharadhya R. 2017.** Immunogenicity of recombinant Omp16 protein of *Pasteurella multocida* B:2 in mouse model. *Indian Journal of Animal Sciences* 87 (1): 29–34
232. **Siegrist C. 2008.** Correlates of vaccine-induced immunity En: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA. 5a ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier. p 17-36.
233. **Singer RS, Finch R, Wegener HC, Bywater R, Walters J, Lipsitch M. 2003.** Antibiotic Resistance the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The Lancet Infectious Diseases*; 3:47-51.
234. **Singh M, O’Hagan DT. 2003.** Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *International Journal for Parasitology* 33 (2003) 469–478.
235. **Dabo SM, Confer AW, Quijano-Blas RA. 2003.** Molecular and immunological characterization of *Pasteurella multocida* serotype A:3 OmpA: evidence of its role in *P. multocida* interaction with extracellular matrix molecules. *Microb. Pathog.* 35, 147–157.
236. **Smith DR. 2014.** Vaccination of Cattle against *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol Spectr.* 2(6), 1 - 11.

237. **Sokolovska A, Hem S, HogenEsch H. 2007.** Activation of dendritic cells and induction of CD4+ T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants. *Vaccine* 25 (2007) 4575–4585.
238. **Southers J, Deane S, Ashton L. 2004.** Effects of prior polysaccharide vaccination on magnitude, duration, and equality of immune responses to a and safety profile of a meningococcal serogroup C tetanus toxoid conjugated vaccine in adults. *Clin Diag Lab Immunol.* 11:1100-1104.
239. **Steenbergen SM, Lichtensteiger CA, Caughlan RJ, Nkle G, Fuller TE, Vimr ER. 2005.** Sialic Acid metabolism and systemic pasteurellosis. *Infect. Immun.* 73: 1284 – 1294.
240. **Step DL, Confer A, Kirkpatrick J, Richards J, Fulton RW. 2005.** Respiratory tract infections in dairy calves from birth to breeding age: detection by laboratory isolations and seroconversions. *Bovine Practitioners* 39: 44–53.
241. **Storz J, Lin X, Purdy CW, Chouljenko VN, Kousoulas KG, Enright FM, Gilmore WC, Briggs RE, Loan RW. 2000.** Coronavirus and *Pasteurella* infections in bovine shipping fever pneumonia and Evans' criteria for causation. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3291–3298.
242. **Subhash K. 2015.** Development of ELISA techniques for haemorrhagic septicaemia. *International Journal of Bioassays* 4.11: 457-4577.
243. **Sun T. 2009.** Evaluation of a vaccine of vaccine against *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in sheep. Tesis de licenciatura. Universidad de Cornell. 47 p.
244. **Tabatabaei M, Liu Z, Finucane A, Parton R, Coote J. 2002.** Protective immunity conferred by attenuated *aroA* derivatives of *Pasteurella multocida* B:2 strains in a mouse model of hemorrhagic septicemia. *Infect Immun* 70:3355–62.
245. **Takeda K, Akira S. 2003.** Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* 5(3): 143-153.
246. **Tan HY, Nagoor NH, Sekaran SD. 2012.** Cloning, expression and protective capacity of 37 kDa outer membrane protein gene (OmpH) of *Pasteurella multocida* serotype B:2. *Trop Biomed.* 27(3):430-41.
247. **Tatum FM, Yersin AG, Briggs RE. 2005.** Construction and virulence of a *Pasteurella multocida* *fhaB2* mutant in turkeys. *Microb. Pathog.* 39, 9–17.

248. **Timsit E, Holman D, Hallewell J, Alexander T. 2016.** The nasopharyngeal microbiota in feedlot cattle and its role in respiratory health. *Animal Frontiers* vol 6 (2): 45-50.
249. **Titball RW. 2009.** *Clostridium perfringens* vaccines. Volume 27, Supplement 4, 5 November 2009, Pages D44-D47.
250. **Tizard IR, Shubor R. 2002.** *Inmunología Veterinaria*. 6ª ed. México: MacGraw-Hill. 516 p.
251. **Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler b. 2001.** Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.*, 39 (3), 924–929. Erratum in: *J. Clin. Microbiol.* 39 (6), 2378.
252. **Triola.2009.** *Estadística*. 10ª ed: México. Pearson Educación. 904 p.
253. **Vadillo MS, Píriz DS, Mateos YE. 2003.** *Manual de microbiología veterinaria*. Madrid: MacGraw Hill Interamericana. 853 p.
254. **Van den Bosch H, Frey J. 2003.** Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs. *Vaccine* 2003, 21:3601-3607.
255. **Van Donkersgoed J, Ribble CS, Boyer LG, Townsend HG. 1993.** Epidemiological study of enzootic pneumonia in dairy calves in Saskatchewan. *Canadian Journal of Veterinary Research* 57: 247–254.
256. **Veitch NC.2004.** Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* 65:249–259
257. **Vinuesa CG, Tangye SC, Moser B. 2005.** Follicular B helper T cells in antibody responses autoimmunity. *Nat review Immunol* 5: 853-865.
258. **Virtala A-M, Mechor GD, Grohn YT, Erb HN, Dubovi EJ. 1996.** Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 208: 2035–2042.
259. **Virtala A-MK, Grohn YT, Mechor GD, Erb HN, Dubovi EJ. 2000.** Association of seroconversion with isolation of agents in transtracheal wash fluids collected from pneumonic calves less than three months of age. *Bovine Practitioners* 34: 77–80.

260. **Waltner-Toews D, Martin S, Meek A. 1986.** Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. II. Age and seasonal patterns. *Preventive Veterinary Medicine* (4). 125- 135.
261. **Watt JM, Swiatlo E, Wade MM, Champlin FR. 2003.** Regulation of capsule biosynthesis in serotype A strains of *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol. Lett.* 225: 9-14.
262. **Webster M, JI, Glaser R. 2008.** Stress hormones and immune function. *Cell. Immunol.* 252, 16–26
263. **Wei X, Wang Y, Luo R., Qian W, Sizhu S, Zhou H. 2017.** Identification and characterization of a protective antigen, PlpB of bovine *Pasteurella multocida* strain LZ-PM. *Developmental and Comparative Immunology*, 71, 1–7.
264. **Weintraub A. 2003.** Immunology of bacterial polysaccharide antigens. *Carbohydr Res* 338:2539–2547.
265. **Weissburg RP, Berman PW, Cleland JL, Eastman D, Farina F, Frie S, Lim A, Mordenti J, Nguyen TT, Peterson MR. 1995.** Characterization of the MN gp120 HIV-1 vaccine: antigen binding to alum. *Pharm. Res.* 12: 1439–1446.
266. **Wetzler LM. 2010.** Innate immune function of the neisserial porins and the relationship to vaccine adjuvant activity. *Future Microbiol* 5:749–758
267. **Wheeler R. 2009.** Outer membrane proteomics of *Pasteurella multocida* isolates to identify putative host-specificity determinants. *Bioscience Horizons* 2: 1–12.
268. **Wijewardana TG, Wilson CF, Gilmour NJ y Poxton IR. 1990.** Production of mouse monoclonal antibodies to *Pasteurella multocida* type A and the immunological properties of a protective antilipoplysaccharide antibody. *J Med Microbiol* 33: 217–222.
269. **Wilkie IW, Harper M, Boyce JD, Adler B. 2012.** *Pasteurella multocida*: Diseases and Pathogenesis. En: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 361. p 1–22.
270. **Wilkie, BN. 1982.** Respiratory tract immune response to microbial pathogens. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 181:1074-1079.
271. **Winterhalder, BP, Thomas, RB. 1978.** Geoecology of Southern Highland Peru. Occasional Paper No. 27. Institute of Artic and Alpine Research. University of Colorado, Boulder, p. 91.

272. **Wu JR, Shien JH, HK Shieh, Chen CF, Chang PC. 2007.** Protective immunity conferred by recombinant *Pasteurella multocida* lipoprotein E (PlpE). *Vaccine* 25: 4140 – 4148.
273. **Yaya LK y Rosadio AR. 2005.** Ensayo de tres programas de vacunación anticlostridial en alpacas. *Rev. investig. vet. Perú* 16 (1): 49-55.
274. **Yu R, Fang T, Liu S, Song X, Yu C, Li J, Fu L, Hou L, Xu J, Chen W. 2016.** Comparative immunogenicity of the tetanus toxoid and recombinant tetanus vaccines in mice, rats, and cynomolgus monkeys. *Toxins* 8, 194: 1-12.
275. **Zheng X, Xiaoyan Yang, Xiaohua Li, Guo-Hua Qiu, Ailing Dai, Qichun Huang, Cuiqin Huang, Xiaofeng Guo. 2017.** Omp16-based vaccine encapsulated by alginate-chitosan microspheres provides significant protection against *Haemophilus parasuis* in mice. *Vaccine* 35:1417–1423.

IX. ANEXOS

Cuadro anexo 1. Listado de animales usados en el experimento. Registro de seguimiento donde se observan los 4 grupos de animales, de los cuales, se registró, el sexo, salud (mediante la temperatura), número de arete y se prosiguió a tomar muestra los días 0, 5, 7, 9, 12 y 15.

Grupo	N°	Identif	Sexo	T° (c°)	Evaluación					
					Día 0	Día 5	Día 7	Día 9	Día 12	Día 15
GRUPO 4 CONTROL	3	16H619F	H	38,1	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	6	16H733F	H	38,0	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	12	16H697F	H	37,9	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	15	16W020E	H	37,6	OK	OK	OK	OK	OK	OK
GRUPO 1 (BACTERINA)	18	16H919F	H	37,7	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	23	16H211E	H	37,5	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	26	16H480E	H	37,8	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	29	10S050E	H	37,1	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	32	16H448E	H	38,1	OK	OK	OK	OK	OK	OK
GRUPO 3 (BACTERINA + P6)	35	16H122E	H	37,9	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	43	16H727F	H	38,0	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	46	16S037E	H	37,9	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	49	16H270E	H	37,5	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	52	16H311E	H	38,5	OK	OK	OK	OK	OK	OK
GRUPO 2 (P6)	55	16H670F	H	38,2	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	63	16H212E	H	37,8	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	66	16S199F	H	38,1	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	69	16H469E	H	38,3	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	72	16H457E	H	38,0	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	75	16H463E	H	37,8	OK	OK	OK	OK	OK	OK