

# EVALUACION EN CAMPO DE UN INMUNOGENO DE *Pasteurella haemolytica* EN CORDEROS <sup>a</sup>

José Francisco Morales Alvarez <sup>b</sup>

Laura Jaramillo Meza <sup>c</sup>

Jorge L. Tórtora Pérez <sup>d</sup>

Francisco J. Trigo Tavera <sup>e</sup>

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la eficacia e inocuidad en campo de un inmunógeno a base de bacterias vivas de *Pasteurella haemolytica* en corderos. Esta evaluación se realizó en cinco explotaciones de la zona del Ajusco, México D.F. Se inmunizaron 96 corderos con un cultivo vivo de *P. haemolytica* por vía subcutánea y quedaron 81 corderos sin inmunizar como grupo control. Antes y después de la inmunización se determinaron anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de *P. haemolytica*. También se realizó un estudio clínico patológico en los corderos hasta el destete. Los corderos inmunizados desarrollaron títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina ( $p < 0.05$ ). En el grupo control enfermaron de neumonía clínica cuatro animales (4.9%) y del grupo vacunado un animal (1.0%). Al momento que se detectaron los corderos con neumonía clínica y 15 días después, se tomó muestra de suero para análisis seriológico. Los datos de este análisis revelaron que los corderos al momento de detectarse clínicamente enfermos eran negativos a la presencia de anticuerpos anticitotoxina y 15 días después mostraban una seroconversión aún más alta que en animales vacunados. Estos resultados indican, por un lado que la infección era causada por *P. haemolytica* y por otro lado que la citotoxina de esta bacteria está jugando un papel determinante en la patogénesis de la enfermedad. También se podría considerar que la protección conferida por la inmunización con *P. haemolytica* es capaz de reducir los cuadros neumónicos en corderos, aunque se requieren más estudios al respecto. Por último, se demostró la inocuidad del inmunógeno por la ausencia de reacciones posvacunales.

Palabras Clave: *Pasteurella Haemolytica*, Evaluación de Inmunógeno, Corderos.  
Téc. Pecu. Méx. Vol. 31 No. 3, (1993)

Las neumonías son consideradas de suma importancia en los animales domésticos debido a que afectan directamente al proceso productivo de las explotaciones, ocasionando pérdidas económicas cuantiosas (1, 2). Se ha determinado que la muerte de corde-

ros asociada a neumonías puede rebasar el 20%; el mayor porcentaje de mortalidad por problemas neumónicos se acentúa entre los dos y tres meses de edad de los corderos (3,4,5,6).

*Pasteurella haemolytica* es un agente que comúnmente se asocia a problemas neumónicos de rumiantes (7). Se han reconocido, por hemoaglutinación indirecta, 15 serotipos de esta bacteria de acuerdo a antígenos capsulares solubles (8, 9). Además esta bacteria produce en fase logarítmica de crecimiento una sustancia soluble que es tóxi-

<sup>a</sup> Recibido para su publicación el 15 de marzo de 1993.

<sup>b</sup> Laboratorio de Fisiopatología. CENID-Microbiología, INIFAP-SARH. Carretera México-Toluca Km. 15.5, Palo Alto, México D.F. C.P. 05110.

<sup>c</sup> Proyecto Complejo Neumónico. CENID-Microbiología INIFAP-SARH.

<sup>d</sup> Facultad de Estudios Superiores Cuatitlán,

ca para macrófagos y leucocitos en general (10, 11). Esta leucotoxina o citotoxina es producida por los diferentes serotipos capsulares de *P. haemolytica*, presenta las mismas características en todos ellos, por lo cual, se ha considerado que la inmunización con ésta, puede conferir protección contra la actividad tóxica, independientemente del serotipo que se encuentre involucrado en la neumonía (12).

La citotoxina puede jugar un papel determinante en la patogénesis de la enfermedad por el efecto negativo que ejerce sobre los principales mecanismos de defensa del pulmón, especialmente sobre los macrófagos alveolares y neutrófilos, ocasionando inhibición de su capacidad fagocítica, de la respuesta inmune subsecuente y de la inducción de inflamación como consecuencia de la lisis de estas células (10, 13, 14, 15).

En la actualidad se han desarrollado en otros países, una diversidad de inmunógenos para prevenir la neumonía causada por *P. haemolytica* con resultados satisfactorios en algunos casos. Estos inmunógenos varían en cuanto a la vía de inoculación, adyuvantes utilizados, tipo de antígenos (vivos, muertos, extractos) y masa antigénica (16, 17, 18, 19). En estos estudios se han obtenido malos resultados con las bacterinas, debido a que no han tenido efecto en la prevención del problema, y evidencias clínicas muestran que animales bacterinizados han desarrollado una neumonía más severa al desafío comparado con los animales no bacterinizados (17).

Los inmunógenos a base de bacterias vivas de cultivos de 6 horas son los que han dado resultados más satisfactorios, argumentándose que este tipo de biológicos son eficaces debido a que los cultivos jóvenes producen más material inmunogénico entre el que se encuentra material capsular, proteínas de membrana, citotoxina y otros carbohidratos no muy bien definidos. También la

replicación del agente en el sitio de la inoculación favorece la estimulación de los mecanismos inmunológicos mediados por células (16).

En México, a pesar de los malos resultados que se han obtenido con las bacterinas, se siguen utilizando con mucha frecuencia, sin saber a ciencia cierta su eficacia, los serotipos contenidos en las mismas o si son los adecuados para su utilización en la región geográfica donde van a ser aplicados.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar a nivel campo, la efectividad e inocuidad de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica*, así como el comportamiento de los títulos séricos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de *P. haemolytica* a la inmunización y el efecto de esta sobre la presentación de neumonías en animales inmunizados y no inmunizados hasta el destete.

Para elaborar el inmunógeno se cultivó por 6 horas *Pasteurella haemolytica* serotipo A1 aislado de pulmón neumónico de ovino en medio líquido de infusión cerebro corazón (BHI) a 37°C. Después de este período las bacterias se cosecharon después de ser lavadas tres veces por centrifugación a 3000 xg y el paquete celular fue resuspendido en solución salina amortiguada (SSA) a una concentración de  $1 \times 10^9$  unidades formadoras de colonia de paquete celular libre de citotoxina por ml.

Para la evaluación del inmunógeno se requirió de productores voluntarios que permitiesen la inmunización de sus animales con el inmunógeno. Se trabajó con cinco explotaciones ovinas localizadas en la zona del Ajusco, México D.F. El total de corderos en los cinco rebaños fue de 177, los cuales se distribuyeron al azar en dos grupos: inmunizados 91 y sin inmunizar 86. Cabe hacer mención que en cada rebaño existían aproximadamente la mitad de corderos inmunizados y la otra mitad sin inmunizar. Se apli-

caron 2.0 ml del inmunógeno por vía subcutánea a corderos entre 1 y 2 meses de edad. Se realizaron visitas diarias por la mañana hasta el destete para detectar animales con neumonía clínica.

Antes y 15 días después de la aplicación del inmunógeno se tomaron muestras de suero para determinar títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de *P. haemolytica*, utilizando las técnicas de hemoaglutinación indirecta y una prueba de inhibición de la citotoxina denominada ensayo visual simple. También se tomaron muestras de los corderos que clínicamente manifestaron cuadro neumónico.

Se realizó una prueba visual simple para determinar anticuerpos anticitotoxina de *P. haemolytica*. Esta prueba se fundamenta en la capacidad que tiene el suero para neutralizar la citotoxina de *P. haemolytica*, utilizando como células "blanco" leucocitos de sangre periférica de bovino obtenidas mediante choque hipotónico de sangre completa (20). La prueba consistió en hacer diluciones al doble de 50  $\mu$ l de cada uno de los sueros a probar con SSA en una placa de microtitulación de 96 pozos. Realizada la dilución de suero, se agregaron 50  $\mu$ l de la citotoxina de *P. haemolytica* obtenida en fase logarítmica de crecimiento bacteriano previa titulación (14) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente, enseguida se añadieron 100  $\mu$ l de la suspensión de leucocitos a una concentración de  $1 \times 10^7$  y se incubó una hora a 37C. al finalizar este período, las placas se centrifugaron a 500 xg por 5 minutos, a cada pozo se le adicionó formalina amortiguada al 10%, y fue incubada 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, fueron teñidas las placas con una solución de cristal violeta al 1.0% durante 5 minutos, lavándose finalmente estas con agua corriente (21). Si era observado un fondo azul en los pozos indicaba la presencia de células teñidas y por lo tanto un resultado positivo a la existencia de anticuerpos que fueron capa-

ces de neutralizar la citotoxina de *P. haemolytica*. Un fondo claro indicaba ausencia de anticuerpos, por lo que la citotoxina quedaba libre ejerciendo su efecto de lisis sobre las células "blanco", eliminando el substrato celular a teñir. Para cada ensayo se utilizaron sueros controles positivos y negativos como referencia.

Se realizó una prueba de hemoaglutinación indirecta para determinar la presencia en suero de anticuerpos anticápsula de *P. haemolytica*. Se realizaron diluciones al doble de cada uno de los sueros a probar con SSA en placas de microtitulación de fondo en "U" de 96 pozos. Se adicionaron eritrocitos "sensibilizados" con *P. haemolytica* y se incubó por dos horas a 37C. Al finalizar este período se realizó una primera lectura y se incubaron las placas durante toda la noche a temperatura ambiente para realizar posteriormente una segunda lectura de las placas para la ratificación de los resultados (8). La sensibilización de los eritrocitos se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Frank y Wessman (8).

Se realizaron visitas diarias a las explotaciones, con el fin de detectar animales que presentaran cuadro clínico de neumonía. En esta evaluación se detectaban signos de disnea, frecuencia respiratoria, anorexia y se complementaba la observación cuando se observaba alguno de estos signos, con la toma de temperatura por vía rectal y la frecuencia cardíaca.

La diferencia entre medias de los estudios serológicos se llevó a cabo mediante una prueba de t de Student y las diferencias de animales enfermos entre ambos grupos fueron analizadas mediante una prueba de  $\chi^2$ .

Durante este periodo que comprendió desde la aplicación del inmunógeno (aproximadamente a los 2 meses de edad de los corderos) hasta el destete, enfermaron de neumonía clínica cinco animales. Estos anima-

les pertenecían a una sola explotación. Por tratarse de explotaciones comerciales los animales detectados enfermos recibían tratamiento a base de quimioterapéuticos. De los cinco animales que enfermaron, cuatro pertenecían al grupo control (4/86) y uno al grupo inmunizado (1/91) no existiendo diferencia estadística entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ). Todos los corderos se recuperaron por lo que fue imposible realizar estudios complementarios de patología y bacteriología, pero si se realizaron pruebas serológicas.

En el Cuadro 1, se muestran los promedios de los títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina de *P. haemolytica* encontrados en animales de los grupos inmunizados, enfermos y controles. Como puede observarse, los animales inmunizados mostraron seroconversión en ambos títulos comparados con el grupo control ( $P < 0.05$ ). El valor obtenido en el segundo muestreo para el grupo inmunizado fue de  $3.24 \pm 1.2$  y de  $3.74 \pm 1.35$  para anticuerpos anticápsula y anticitotoxina respectivamente y para el grupo control de  $1.36 \pm 1.11$  y  $2.4 \pm 1.18$ .

En el grupo de animales enfermos, el título de anticuerpos anticápsula fue de  $2.0 \pm 0.02$  al momento de detectarse la neumonía clínica. Este título se mantuvo en el segundo

muestreo realizado 15 días después. Estos animales fueron negativos a la presencia de anticuerpos anticitotoxina en el primer muestreo y 15 días después presentaron seroconversión ( $P < 0.05$ ). Los títulos de anticuerpos anticitotoxina alcanzados por este grupo en este momento, fueron superiores a los registrados en el grupo inmunizado.

El inmunógeno evaluado fue inocuo, debido a la ausencia de reacciones clínicas postvacunales. Es importante señalar que el año en que se llevó a cabo la evaluación del inmunógeno (1990) fue considerado por algunos clínicos de la zona como muy benéfico, dada la escasa mortalidad que se presentó en la mayoría de los rebaños (comunicación personal). En estudios colaterales sobre mortalidad en corderos, que se realizaron en la zona (resultados aún sin publicar), se menciona también baja mortalidad en los rebaños evaluados (comunicación personal). A esto se atribuye la escasa presentación de cuadros neumónicos y mortalidad en las explotaciones donde se evaluó el inmunógeno y quizá a esto también se pueda atribuir la ausencia de diferencias en animales enfermos entre grupos. En un trabajo realizado por Pedroso (22) en terneros, donde se evaluó un inmunógeno de *P. multocida* a nivel campo, enfermaron de neumonía el 8%.

Cuadro 1. Títulos de anticuerpos ( $\log_2$ ) anticápsula y anticitotoxina contra *Pasteurella haemolytica* en la evaluación en campo de un inmunógeno en corderos.

Días	Anticápsula		Anticitotoxina	
	0*	15	0*	15
Sin Inmunizar	1.10 <sup>a</sup>	1.36 <sup>a</sup>	1.10 <sup>a</sup>	2.40 <sup>b</sup>
Inmunizados	1.30 <sup>a</sup>	3.74 <sup>b</sup>	1.60 <sup>a</sup>	3.24 <sup>b</sup>
Enfermos*	2.00 <sup>a</sup>	2.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	4.50 <sup>b</sup>

\* El día 0 corresponde al día de la inmunización, excepto para el grupo de enfermos, en los cuales corresponde al día en que se detectaron con neumonía clínica.  
a,b: Literales diferentes en renglones y tipo de anticuerpos indican diferencia significativa ( $P < 0.05$ ).

Los animales que presentaron neumonía clínica en el presente trabajo, pertenecían a un sólo rebaño. Este rebaño era el que mayor grado de hacinamiento mostraba (1.2 animales por metro cuadrado) con el clásico manejo de la zona, de pastoreo diurno con encierro nocturno de traspatio, en instalaciones parcialmente techadas. Las otras cuatro explotaciones llevaban a cabo el otro sistema característico de la zona, pastoreo diurno con encierro nocturno en el monte en instalaciones rústicas, sin techo y con cierto grado de hacinamiento (aproximadamente 1.5 animales por metro cuadrado).

En un trabajo realizado en México (3), en el que se evaluaron un número mayor de explotaciones en la misma zona, se observó un comportamiento similar, donde los problemas respiratorios se presentaron con mayor frecuencia en explotaciones en las que se llevaba a cabo el pastoreo diurno con encierro nocturno de traspatio. Con respecto a los títulos de anticuerpos anticitotoxina en animales que mostraron neumonía clínica, destaca un detalle interesante y que se refiere a la ausencia de estos anticuerpos al momento de ser detectada la neumonía y la seroconversión marcada al segundo muestreo; este hecho apoya en primer lugar la teoría de que la neumonía era causada por *P. haemolytica* y en segundo lugar la importancia que podría estar jugando la citotoxina en la patogénesis de la enfermedad, debido a que en algunos trabajos se ha demostrado que los títulos bajos contra la leucotoxina se traducen como baja resistencia al daño pulmonar (23, 24, 25). En otro trabajo, realizado por Jericho (26) se observó una protección aceptable al inocular un sobrenadante de cultivo rico en citotoxina en forma combinada con *P. haemolytica* inactivada con formalina sin el uso de adyuvantes. El efecto protector observado, quizás no se debe a la citotoxina de *P. haemolytica* exclusivamente, ya que en el sobrenadante utilizado, por su proceso de elaboración, están contenidos otros antígenos solubles que

podrían estar jugando un papel importante en la protección conferida a los animales. Entre estos antígenos se encuentran extractos solubles capsulares, la citotoxina y otros productos del metabolismo de la bacteria (17, 27, 28).

Por otro lado, también es evidente una seroconversión a la citotoxina en animales no inmunizados, lo que podría sugerir el contacto de los animales con otros serotipos de campo de *P. haemolytica*; esta hipótesis se basa en que no existe seroconversión en los títulos de anticuerpos anticápsula específicos para el serotipo A1 y que todos los serotipos de ésta bacteria producen leucotoxina de características similares.

La vacunación con bacterias vivas por diversas vías, ha demostrado su eficacia al desafío con *P. haemolytica* y aún contra la exposición viral y desafío bacteriano en forma combinada (16, 29, 30).

Los títulos de anticuerpos anticápsula altos no siempre han sido sinónimo de protección. En algunos trabajos (31, 32) se ha observado este fenómeno. En este aspecto cabe señalar que los mecanismos inmunes contra *P. haemolytica* son complejos e incluyen entre otros: la inmunidad mediada por células (33, 34), la presencia de IgA en secreciones que impide la multiplicación y colonización de la bacteria en las mucosas (23, 35), la opsonización por anticuerpos específicos conferida por IgG e IgM, las cuales pueden estar en concentraciones altas en los alveolos (35, 36). Otro mecanismo importante es el sistema del complemento que se encuentra a nivel sérico y local (34). El último mecanismo de importancia es la presencia de anticuerpos neutralizantes de la citotoxina en suero y secreciones bronquioalveolares, lo que confiere cierta protección a las células fagocíticas (23, 34).

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran por un lado la inmunogenicidad de *P. haemolytica*, ya que se observa después de su inoculación seroconversión con títulos de anticuerpos anticápsula y anticitotoxina. Por otro lado, su inoculación en animales sanos resulta inocuo basado en la ausencia de reacciones postvacunales.

Por último la citotoxina de *P. haemolytica* podría participar de manera determinante en la patogénesis y en la prevención de la enfermedad. Este argumento se basa en la relación encontrada entre la ausencia de anticuerpos contra esta leucotoxina en animales enfermos y la seroconversión importante en animales expuestos al desafío natural; sin embargo, se requiere de hacer más estudios al respecto.

## SUMMARY

The purpose of this work was to evaluate the efficacy and inocuity of a live *Pasteurella haemolytica* immunogen in sheep in the field. The study was conducted in five farms located in the Ajusco area, D.F. Ninety six lambs were subcutaneously immunized with a live culture of *P. haemolytica*. Eighty one lambs were sham-inoculated and remained as the control group. Before and after immunization anticapsule and anticytotoxin antibodies to *P. haemolytica* were evaluated. Clinicopathological follow up was also conducted with the lambs until weaning. Anticapsule and anticytotoxin antibody titers showed seroconversion to the immunization ( $p < 0.05$ ). When five animals developed pneumonia, 4 in the control group (4.9% and only one (1%) in the vaccinated group.

Serum samples were taken for serological analysis when the animals presented clinical pneumonia and 15 days later results revealed that pneumonic animals were seronegative to anticytotoxin antibodies and that 15 days later presented a titer higher than in the vaccinated animals. These results suggest that the infection was caused by *P. haemolytica* and that its cytotoxin played an important role in the disease. It can also be considered that the protection induced by the *P. haemolytica* immunization was capable of reducing pneumonia in lambs. Lastly, the inocuity of the immunogen was demonstrated by the absence of post-vaccination reactions.

Key Words: *Pasteurella haemolytica*, Immunogen Evaluation, Lambs.

## REFERENCIAS

1. Ayala M A. Incidencia y prevalencia de neumonías en becerros Holstein Friesian en etapa de lactancia y destete durante un año en un centro de cría. Tesis de Licenciatura, Fac. Med. Vet. y Zoot. UNAM, México, D.f. 1977.
2. Martin S W, Meek A H, Davis D G, Thomson R G, Johnson J A, López A, Stephe L, Curtis R A. Factors associated with mortality in feedlot cattle. The Bruce county beef project. Can J. Comp. Med. 1980; 44:1.
3. Aguilar T C, Tórtora P J. Mortalidad de corderos en dos sistemas de producción ovina en Milpa Alta, D.F. Memoria del II Congreso Nacional de Producción Ovina. 1989:146.
4. Martínez A, Cuéllar O J, Hernández J, Pijoan A P, Tórtora P J. Estudio sobre situaciones que determinan la mortalidad en corderos, en ranchos del Estado de México, Memorias del 1er Congreso Nacional de Producción Ovina. AMTEO México, 1988: 173.
5. Murguía O L. Mortalidad en corderos de razas tropicales del nacimiento al destete. Memorias del 1er. Congreso Nacional de Producción Ovina. México 1988:173.
6. Velázquez O V, Navarrete A P, Vera C H E. Frecuencia de aislamiento de *Pasteurella haemolytica* y sensibilidad *in vitro* en cepas obtenidas de corderos de 0 - 90 días de edad en el valle de Toluca. Memorias del 1er Congreso Nacional de Producción Ovina. México, 1987:180.
7. Aley M R, Clarke J L. The influence of microorganism on the severity of lesions in chronic ovine pneumonia. N.Z.Vet. J. 1977; 25:200.
8. Frank G H, Wessman G E. Rapid plate agglutination procedure for serotyping *Pasteurella haemolytica*. J. Clin. Microbiol. 1978; 7:142.
9. Sutherland A D, Donachie W. Cytotoxic effect of serotypes of *Pasteurella haemolytica* on sheep bronchoalveolar macrophages. Vet. Microbiol. 1986; 11:331.
10. Berggren K A, Baluyut C S, Simonson R R, Bemrick W J, Maheswaran S K. Cytotoxic effect of *Pasteurella haemolytica* on ovine neutrophils. Am. J. Vet. Res. 1981; 42:1383.
11. Shewen P E, Wilkie B N. Evidence for the *Pasteurella haemolytica* cytotoxin as a product of growing bacteria. Am.J. Vet. Res. 1985; 46:1212.
12. Confer A W, Panciera R J, Mosier D A. Immunity to *Pasteurella haemolytica*. J. Am. Vet. Med. Ass. 1985; 193: 1308.
13. Davies D H, Penwarden-Rosemary A. The phagocytic cell responses of the ovine lung to *Pasteurella haemolytica*. Vet. Microbiol. 1981; 6:183.
14. Shewen P e, Wilkie B N. *Pasteurella haemolytica* cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by typespecific rabbit antisera. Am. J. Vet. Res. 1983; 44:715.

15. Sutherland A D, Gray E, Wells P W. Cytotoxic effect of *Pasteurella haemolytica* on ovine bronchoalveolar macrophages in vitro. *Vet. Microbiol.* 1983; 8:3.
16. Confer A W, Panciera R J, Corsvet R E, Rummage J A, Fulton R W. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of culture age of *Pasteurella haemolytica* used as a live vaccine. *Am J. Vet. Res.* 1984; 45: 2543.
17. Confer A W, Panciera R J, Fulton R W, Gentry M J, Rummage J A. Effect of vaccination with live or killed *Pasteurella haemolytica* used as a live vaccine. *Am. J. Vet. Res.* 1985; 46:342.
18. Durham J A, Confer A W. Comparison of the antigens associated with saline solution, potassium thiocyanate, and sodium salicylate extracts. *Vet. Res.* 1986; 47:1946.
19. Gentry M L, Richard E. Extraction of capsular material from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 1981; 43: 2070.
20. Mishell B B, Shiigi M S. Selected methods in cellular immunology. 1st ed. W.H. Freeman and Co., San Francisco, USA. 1980:22.
21. Gentry M L, Confer A W, Kreps J A. Simple visual assay for determination of *Pasteurella haemolytica* cytotoxin neutralizing antibody titres in cattle sera. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22:968.
22. Pedroso M, Fuentes E D, Fuentes O, Muñoz M C, Abeledo M A. Vacuna contra *Pasteurella multocida* Tipo A para terneros: Evaluación de tres vías de administración local. *Rev. Salud. Anim.* 1988; 10:93.
23. Cho H J, Bohac J C, Yates W D G, Oimann H B. Anticytotoxin activity of bovine sera and body fluids against *Pasteurella haemolytica* A1 cytotoxin. *Can. J. Comp. Med.* 1984 48:151.
24. Moor R N, Walker R D, Shaw G A, Hopkins F M, Shull E P. Antileucotoxin antibody produced in the bovine lung after aerosol exposure to viable *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 1985; 46: 1949.
25. Shewen P E, Wilkie B N. Vaccination of calves with leucotoxic culture supernatant from *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Vet. Res.* 1988; 52:30.
26. Jericho K W F, Cho H J, Kozub G C. Protective effect of inactivated *Pasteurella haemolytica* bacterin challenged in bovine herpesvirus-1 experimentally infected calves. *Vaccine.* 1990; 8:315.
27. Rimsay R L, Coyle-Dennis J E, Lauerman L H. Purification and biological characterization of endotoxin fractions from *Pasteurella haemolytica*. *Am. J. Vet. Res.* 1981; 42: 2134.
28. Squire P G, Smiley D W, Croskell R B. Identification and extraction of *Pasteurella haemolytica* membrane proteins. *Infect. Immun.* 1984; 45: 667.
29. Cardella M A, Adviento M A, Nerving R M. Vaccination studies against bovine *Pasteurella pneumonia*. *Can. J. Vet. Res.* 1987; 51:204.
30. Panciera R J, Corstvet R E, Confer A W, Gresham C N. Bovine Pneumonic pasteurellosis: Effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *Am J. Vet. Res.* 1984; 45:2538.
31. Friend S C E, Wilkie B N, Thomson R G, Barnum D A. Bovine pneumonic pasteurellosis: Experimental induction in vaccinated and nonvaccinated calves. *Can. J. Comp. Med.* 1977; 41:77.
32. Wilkie B N, Markham R J F, Shewen P E. Response of calves to lung challenge exposure with *Pasteurella haemolytica* after parenteral or pulmonary immunization. *Am.J. Vet. Res.* 1980; 41:1773.
33. Maheswaran S K, Berggren K A, Simonson R R, Ward G E, Muscoplat C C. Kinetics of interaction and fate of *Pasteurella haemolytica* in bovine alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 1980; 30:254.
34. Wilkie B N. Respiratory tract immune response to microbial pathogens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1982; 181:1074.
35. Walker R D, Corsvet R E, Lessley B A, Panciera R J. Study of bovine pulmonary response to *Pasteurella haemolytica*: Specificity of immunoglobulins isolated from the bovine lung. *Am. J. Vet. Res.* 1980;41:1015.
36. Gershwin L J, Friebergs H K. Demonstration of *Pasteurella haemolytica* specific immunoglobulin E in bovine serum. *Am. J. Vet. Res.* 1987; 48:16.