

283
12



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Cuautitlán

"ESTUDIO DE LA INTERACCION ENTRE EL VIRUS DEL COLERA PORCINO Y Pasteurella multocida EN EX-PLANTES TRAQUEALES DE CERDO EMBRIONARIO".

T E S I S

Para obtener el título de:
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Que Presenta:

JUAN GERARDO IGLESIAS SAHAGUN

Director de Tesis: MVZ Dip. Bact. Ph D. Carlos Pijoan A.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

- I. **Introducción.**
 - Generalidades
 - Características de la bacteria
 - Patogenicidad
 - Lesiones
 - Serotipos comunmente asociados con cerdos
 - Pasteurella como agente infeccioso oportunista
 - Interacción con el virus del Cólera porcino
 - Mecanismo de defensa del aparato respiratorio
 - Explantes traqueales como modelo experimental en el estudio de infecciones mixtas.

- II. **Objetivo.**

- III. **Material y métodos.**

- IV. **Resultados.**

- V. **Discusión.**

- VI. **Conclusiones.**

- VII. **Referencias.**

INTRODUCCION

Generalidades

Las infecciones respiratorias de los animales domésticos representan en la actualidad uno de los mayores renglones de pérdidas económicas de la industria pecuaria de México. Las enfermedades respiratorias pulmonares de los cerdos son de gran importancia en México. Maqueda (1977) indica que aproximadamente entre el 30% y el 50% de los cerdos de abasto que llegan a los rastros de nuestro País, presentan lesiones neuromónicas.

Estas infecciones son de carácter agudo o crónico, siendo las últimas de gran importancia por su difícil diagnóstico y tratamiento. Con gran frecuencia dichas infecciones son debidas a varios microorganismos que actúan en forma mixta y secuencial. Comúnmente se estructuran con la secuencia: Factores ambientales - Virus - Organismos intermedios - Bacterias. En este tipo de secuencia el "Organismo intermedio" está representado por una Chlamydia o un Mycoplasma. Generalmente, la infección solo se desencadena cuando los factores ambientales son adversos. (Pijoan 1978).

En un estudio realizado por Pijoan, Ochoa y Trigo (1976) se reportó que la bacteria aislada con mayor frecuencia de pulmones neumónicos de cerdos sacrificados en el rastro de Ferrería fué Pasteurella multocida. Esta bacteria fué además la única que se relaciono estadísticamente con las lesiones severas.

La Pasteurella multocida se considera en cerdos un invasor secundario, comúnmente involucrada en los procesos denominados: Virus Pig Neumonía, Neumonía Enzootica Viral, y Neumo-

nfa Enzootica Porcina. Sin embargo, el agente etiológico principal de estas enfermedades es un micoplasma. Por otro lado, la Neumonía Pasteurelósica como tal, ha sido descrita por Blood y Henderson (1961) como una enfermedad de tipo crónico con una distribución geográfica mundial. Tanto la incidencia como la severidad de las lesiones son mayores en las zonas frías o templadas que en las tropicales; sin embargo en estas últimas se presenta un aumento considerable de brotes de la enfermedad con cuadros agudos o sub-agudos posterior a una perturbación climatológica (tal como un "nor-te").

Por su carácter de enfermedad crónica la Pasteurelisis Pulmonar en cerdos afecta la conversión alimenticia, constituyendo así uno de los problemas más serios a tomar en cuenta en la rentabilidad de las explotaciones porcinas (Young 1956).

Características de la bacteria

En el género Pasteurella han sido clasificadas varias especies, algunas de las cuales posteriormente han sido cambiadas de género o de nombre. El nombre de Pasteurella multocida que ahora es mundialmente aceptado fué propuesto por Rosenbuch y Merchant en 1939. Sin embargo no es raro encontrarla referida como Pasteurella séptica y anteriormente Lignieres, en 1901, la llamo Pasteurella suiséptica.

Actualmente se describe como pequeño baston Gram negativo in móvil que crece bien en medios sólidos enriquecidos con suero o sangre. Es anaerobio facultativo y en medios líquidos puede crecer en caldo nutritivo con suero o en Todd-Hewitt fresco. A la tinción de Gram presenta una bipolaridad característica. Sus colonias son usualmente redondas, brillantes y grisáceas, algunas cepas produciendo colonias mucoides

por sus cápsulas que tienen gran cantidad de Ac. hialurónico (Carter y Annau 1953).

Bioquímicamente es oxidasa y catalasa positiva, incapaz de descarboxilar la lisina, hidrolisar la arginina y oxidar el gluconato, así como también para utilizar el malonato y el citrato. Es positiva a la prueba de descarboxilación de la ornitina (Cowan y Steel 1974).

Existe un medio simplificado "SIM modificado" (Pijoan y Ochoa 1978b) que nos permite, con la inoculación de un solo tubo, diferenciarla de los otros microorganismos del mismo género basada en su capacidad para producir Indol, aunada a su incapacidad para acidificar la raffinosa y para producir H_2S en SIM.

La Pasteurella multocida ha sido objeto de una gran cantidad de estudios serológicos. Roberts, desde 1947, definió 4 serogrupos de esta bacteria llamandolos I, II, III, IV. Posteriormente Carter ratificó que existían 4 grupos serológicos pero los designó A, B, C, y D. Correspondiendo en cuanto a la anterior clasificación en el siguiente orden B, A, C D. Más tarde del serogrupo C se descartó y se descubrió un nuevo serogrupo E.

Se han realizado varios trabajos con la intención de hallar si existe alguna correlación entre el serogrupo y la patogenicidad para un huésped específico. Desgraciadamente estos trabajos no han llegado a conclusiones definitivas.

Namioka y Murata (1961) continuando con los estudios serológicos concluyeron que si bien las clasificaciones de Roberts y Carter mencionadas se basan en la detección o manifestación del antígeno capsular, debe también tomarse en cuenta la existencia del antígeno somático (O). Este determina que existan subgrupos dentro de cada uno de los serogrupos ya mencionados. Los subgrupos se designan con números arábigos.

Patogenicidad

La Pasteurella multocida es un comensal frecuente en el tracto respiratorio superior de los animales domésticos. Smith (1955) cita una incidencia de 51% en tonsilas, nariz y ganglios linfáticos de los cerdos. Es un patógeno potencial u oportunista que invade los tejidos cuando las resistencias del huésped se ven disminuidas.

Por ello se clasificará como patógeno secundario (Pijoan 1977). Estos se definen como aquellos que no pueden establecer la enfermedad por sí solos en condiciones normales, pues no resisten los mecanismos de defensa del huésped. Solo logran colonizar cuando estos mecanismos son deprimidos por varias causas entre las que se encuentran agentes físicos como la temperatura, la humedad, el transporte brusco, los agentes químicos como los corticosteroides y las infecciones por un patógeno primario como un micoplasma o un virus.

Sin embargo en el caso de los conejos, aparentemente se comporta como patógeno primario (Suarez, 1979). Esto sugiere que los mecanismos de defensa varían de especie a especie.

Lesiones

La neumonía causada por Pasteurella multocida presentará un cuadro de bronconeumonía crónica que puede extenderse a una pericarditis y pleuritis (Jubb y Kennedy 1970 Dunne 1975).

La extensión de las lesiones pulmonares varía de acuerdo con la severidad de la infección; Por lo tanto en casos ligeros únicamente porciones de los lobulillos anteriores están involu-

cradas; Mientras que en casos severos tanto los lóbulos anteriores como los diafragmáticos están involucrados. Microscópicamente se observa consolidación con una coloración grisácea en casos crónicos y rojiza en casos recientes y en ocasiones lóbulos atelectásicos. Sobre la pleura se nota una inflamación serofibrinosa, con la cuál se desarrollan adherencias, siendo ésta la lesión más característica de Pasteurellosis Pulmonar en nuestro país, aún que no es patognomónica, ya que también se presenta en otras enfermedades como hemofiliosis.

Microscópicamente se aprecia una bronconeumonía de tipo exudativo con una distribución lobular. Los cambios histológicos iniciales incluyen una infiltración de linfocitos y macrófagos alrededor de bronquiolos y vasos sanguíneos, junto con invasión de los espacios alveolares por éste tipo de células y algunos neutrófilos. Conforme la enfermedad avanza, los cambios histológicos se tornan más severos y están representados por bronconeumonía severa y una hiperplasia linfoide peribronquiolar. La presencia de abundantes neutrófilos, células no nucleares y exudado mucopurulento en alveolos y bronquiolos en este tipo de infección es característica.

Comunmente como estadio terminal de la neumonía se observa la presencia de abscesos y áreas necróticas distribuidas en todos los lóbulos.

Si la infección adquiere la forma septicémica se observan hemorragias equimóticas y petequiales en membranas serosas y mucosas así como en la piel. También se aprecia una faringitis aguda con acúmulo de fluido amarillento en el tejido subcutáneo adyacente; los pulmones se muestran edematosos y congestionados (Murty 1965).

En los casos crónicos o subclínicos las lesiones características serán consolidación rojo-grisácea, con una tendencia mayor hacia el gris que la que se encuentra en micoplasmosis

además de la presencia de adherencias. (Pijoan y Trigo 19-78).

Serotipos Comunmente Asociados con Cerdos

Carter, en 1967, publicó los datos obtenidos a lo largo de varios años en el estudio de 297 cultivos obtenidos de cerdos; 157 fueron de serogrupo A, 3 del serogrupo B, 118 del D y 19 no fueron tipificables. Es interesante que los 3 cultivos del grupo B, el cuál causa septicemia epizootica en búfalo y bisonte, fueron aisladas de cerdos en Malaya, Australia y Francia.

De 32 cultivos de cerdo tipificados por Perrau y col. (1962), 20 fueron del tipo A y 12 del tipo D.

Namioka y Bruner (1963) recobraron los siguientes serotipos de cerdos.

Serotipo	No. de Cepas
1:A	1
1:?	1
4:?	1
3:A	2
5:A	3
1:D	1
2:D	12
4:D	1

Buxton y Frazer (1977) reportan como los serotipos mas frecuentes aislados de cerdo los siguientes: A1; 3A; 5A; 1D; 4D-10D.

En la ENEP Cuautitlán se está realizando una encuesta con la finalidad de conocer los serogrupos mas frecuentes en nuestro

medio y los resultados obtenidos hasta ahora indican que las cepas aisladas de cerdos pertenecen a los serotipos A y D en cantidades aproximadamente iguales (González comunicación personal).

Pasteurella multocida como agente infeccioso oportunista

La Pasteurella multocida se considera un invasor secundario clásico ya que sólo es capaz de producir la enfermedad cuando las defensas del huésped se ven disminuidas ya sea por factores ambientales o la primoinfección por un patógeno primario.

La asociación con virus fué mencionada desde 1938 por Hutyrá Marek y Manninger; considerandola un agente productor de lesiones a posteriori en cerdos infectados con virus de la peste porcina hoy Cólera porcino.

Su asociación con micoplasma en la producción del cuadro llamado Neumonía Enzootica Porcina quedo perfectamente demostrado por Smith (1970).

Los trabajos de Hetrik y Chang (1973) demostraron que los animales inoculados experimentalmente con Pasteurella multocida y Myxovirus Parainfluenza-3 mostraron una elevación de la temperatura y una debilidad respiratoria de severidad variable; alteraciones que no se presentaron en los animales inoculados unicamente con uno de los agentes. Es de hacer notar que la presentación de los signos, así como su severidad, fué en menor tiempo y más alta en los animales cuya secuencia de infección fué virus - bacteria (lapso de 48 hrs.) que en aquellos que se realizo en forma inversa o bien simultánea.

En 1973 Betts y col. tomando como base la alta ocurrencia --

de Pasteurella multocida, (predominantemente serogrupos A y D, en neumonía, serositis torácica y otras lesiones en cerdos -- Carter y Bain 1960), aún cuando se le consideraba agente invasor secundario, estudiaron los efectos de infecciones mixtas de P. multocida serogrupo A y Adeno o Enterovirus experimentalmente producidas en cerdos gnotobióticos. Encontraron que los cerdos inoculados con Adenovirus mas Pasteurella presentaban lesiones neumónicas similares a las encontradas en los animales inoculados exclusivamente con virus, pero éstas eran significativamente mayores que las existentes en cerdos inoculados solo con bacterias. Lo más notable fué la amplia distribución que presentó la bacteria al ser aislada de varios órganos luego de la muerte de los animales, diseminación que no ocurrió en los inoculados exclusivamente con pasteurellas. En cuanto a los animales inoculados con Enterovirus y Pasteurella, las lesiones pulmonares fueron mayores en los animales inoculados con la mezcla que con un solo agente pero la mayor diseminación bacteriana ocurrió en los cerdos que solo recibieron Pasteurella. Se hace notar en este trabajo -- que las lesiones pulmonares tanto macroscópicas como microscópicas fueron semejantes a las observadas en la enfermedad llamada Plaga Porcina; éste es uno de los nombres con los que anteriormente se designaba a los procesos infecciosos de índole respiratorio en los que se hallaba implicada Pasteurella multocida en asociación con el virus del Cólera.

Interacciones de la Pasteurella multocida con el virus del Cólera Porcino.

Existen varios antecedentes de la interacción que existe entre el virus del cólera porcino y la Pasteurella multocida, además del ya mencionado de Hutyrá y Marek donde aparentemente estaban involucradas cepas virales de baja virulencia.

En 1970, en un estudio realizado en Cuba sobre incidencia de Pasteurelisis en bovinos y cerdos y sus asociaciones a otros procesos, Martínez y Verdura (1970) reportan que el 34.6% de los casos de Pasteurelisis pulmonar en cerdos estaban asociados con Cólera porcino.

La interacción que existe entre estos 2 agentes quedó suficientemente demostrada por los trabajos de Pijoan y Ochoa (1978a). En estos se encuentra que las lesiones pulmonares (áreas neumónicas) producidas en cerdos vacunados experimentalmente con vacuna de virus vivo lapinizado de alto pasaje por la vía y a las dosis recomendadas por el fabricante, y Pasteurella multocida (inoculada intratraquealmente a una dosis de 3 ml. de una suspensión conteniendo 5.6×10^9 organismos vivos por ml.), fueron más amplias y más severas comparadas con las de los cerdos que recibieron solamente un agente en igual dosis. Esto sugiere que cualquier virus vivo, aún cuando sea apatógeno en condiciones naturales presenta sinergismo con la Pasteurella multocida en la producción de un cuadro neumónico. Es de hacer notar que en dicho trabajo se muestra además que el efecto de sinergismo tiene un lapso óptimo de secuencia, ya que el más alto valor calificativo de las lesiones neumónicas aparece en los cerdos donde el intervalo entre la vacunación viral y la infección bacteriana es de 3 a 5 días comparandolas con las producidas cuando el lapso entre una y otra infecciones fué de 15 días.

El mismo grupo de investigadores ha continuado con sus trabajos tendientes a conocer mejor los mecanismos por lo que ocurre este efecto de sinergismo. Pijoan y Campos (1977), descubrieron que la vacunación con el virus ya descrito (Cepa - China) realizada bajo las indicaciones correspondientes disminuye la fagocitosis de parte de los macrófagos alveolares. Mas recientemente Pijoan, Hernández y Ochoa (1979) - - demostraron que el efecto del virus sobre la fagocitosis fué

más evidente en los 2 primeros días y después a partir del día 11 postvacunal. Estos autores sugieren que el primer efecto se debió a la leucopenia postvacunal y el segundo a la replicación viral y la aparición de macrófagos jóvenes, aparentemente menos activos. Sin embargo, tomando en cuenta que la Pasteurella multocida es un habitante frecuente del tracto respiratorio superior de los animales domésticos quizá no sea el efecto del virus sobre los macrófagos el mecanismo más significativo en cuanto a la producción de la infección mixta in vivo.

Mecanismos de defensa del Aparato Respiratorio a la P. multocida

La Pasteurella multocida es un habitante normal del tracto respiratorio superior de los animales domésticos presentando en los cerdos una alta incidencia (Smith 1955). Clásicamente está involucrada en la producción de infecciones mixtas, "patógeno potencial". Sin embargo su forma de habitar e infectar presenta ciertas peculiaridades: El ser una bacteria capsulada le proporciona resistencia a la fagocitosis siendo ésta una característica de los patógenos primarios (Pijoan 1978). Sin embargo no presenta adherencia al epitelio traqueobronquial quizás sea esta la razón por la que no causa daño a este nivel (Pijoan y Ochoa datos sin publicar).

Por otro lado el tamaño de la bacteria, que es de 2 a 3 micras de largo por 0.15 a 0.25 micras de diámetro sugiere que se depositará a nivel bronquial donde será objeto de remoción por parte del aparato mucociliar (Green 1970). Este aparato mucociliar constituye el mecanismo de defensa más importante del tracto respiratorio superior y está integrado por el moco y los cilios.

El moco traqueobronquial es una mezcla de secreciones produci

das por: (A) Las células caliciformes que están a lo largo -- del epitelio traqueobronquial intercaladas entre las células ciliadas en una proporción aproximada de 1 secretora por 5 ciliadas. (B) Las glándulas de secreción mixta o acines glandulares ubicados en la submucosa de traquea y bronquios; sus productos de secreción son vertidos a la luz de traquea y -- bronquios por los conductillos glandulares y (C) La secreción de las células de Clara que existen en el epitelio de los -- bronquiolos, aún que aparentemente en cerdos no están muy desarrolladas (Appendini comunicación personal).

En conjunto, el moco presenta una composición de agua, sales, mucina y enzimas como lisozima, ferritina, lactoferrina y beta-lisina. La mucina es una larga cadena de polisacáridos -- conectados a una cadena de polipeptidos o corazón. La composición tamaño y número de carbohidratos (grupo de cadenas prostéticas) varía en las distintas especies, pero en todas son -- heterosacáridos conteniendo hexosaminas (glucosamina y galactosamina) galactosa, fucosa y frecuentemente una unidad terminal de ácido sialico. Todos los grupos prostéticos de carbohidratos están unidos covalentemente a los aminoácidos residuales formando así un sialomucopolisacárido el cuál constituye el recubrimiento epitelial y es de características ácidas (Kilburn 1967).

En cuanto a la defensa contra *Pasteurella* particularmente, se debe tomar en cuenta la existencia de una fuerte actividad -- bactericida por parte de la traquea. Esto fué ampliamente -- demostrado por los trabajos de Pijoan y Ochoa (1978c). Estos tenían la finalidad de conocer cuales eran los daños que la -- *Pasteurella multocida* era capaz de realizar en explantes traqueales de embrión de cerdo inoculados experimentalmente. -- Sin embargo lo que se observó es que las traqueas contaban -- con una substancia bactericida la cuál era capaz de bajar el título de bacterias desde 10^9 a 0 en aprox. 18 - 24 hrs. Esta actividad fué igualmente manifiesta al probar cultivos de

bacterias en el sobrenadante de un cultivo de traqueas de 72 hrs. y no se presentó cuando se colocaron bacterias en presencia de un homogenizado de traqueas; por lo cuál ellos concluyen que la actividad bactericida reside en alguna substancia sintetizada por la traquea. La naturaleza química de esta substancia es aún desconocida, el hecho de que su poder bactericida se halla visto disminuido luego de haber sido tratada con tripsina sugiere que es de naturaleza proteica. Estudios realizados posteriormente han revelado que no se trata de lisozima (Pijoan comunicación personal).

La producción de moco varia mucho dependiendo de las condiciones ambientales y fisiológicas, se ha estimado que un individuo normal en condiciones ambientales no agresivas produce de .1 a .3 ml. por Kg. de peso en 24 Hrs. (Ebert 1978). El moco traqueobronquial esta dispuesto en 2 capas, una adhesiva pegada a la pared la cuál posee una elevada tensión superficial y es espesa y dura y otra capa más fluida y móvil la cual es más interna y es en la que los cilios presentan su movimiento mas libre.

Los cilios son protuberancias finas de las células del epitelio traqueobronquial el cuál es de tipo cilindrico ciliado pseudoestratificado en las regiones mas anteriores del árbol respiratorio y se va perdiendo lo cilindrico a medida que avanza, quedando un epitelio plano ciliado tipo pavimentoso en las regiones más internas. Cada una de las células ciliadas presentan aproximadamente 200 cilios y una gran cantidad de elongaciones mas pequeñas llamadas microvilli de las cuales se sugiere pueden ser cilios en desarrollo (Kilburn 1967) Los cilios son de mayor tamaño en las células cilindricas que en las columnares o cuboidales asi que en los bronquiolos ya son muy pequeños o no existen. Los cilios traqueales miden aproximadamente 6 micras de largo por 0.3 micras de diámetro. Su movimiento presenta 2 fases que son: Hacia adelante en for

ma súbita y enérgica y hacia atrás (regreso hacia su posición original), despacio y un poco inclinados sobre su propio eje, esto crea 2 corrientes aparentes, la funcional hacia adelante y otra de menor velocidad que sucede en la zona proximal a las células.

La velocidad de flujo varia de acuerdo con la región y está en función a la velocidad y tamaño de los cilios. La remoción más lenta es en bronquiolos, y en humanos se ha estimado que es de .4 a 1.6 mm./min. (Ebert R. 1978), mientras que la velocidad en traquea es de 10 a 20 mm./min. (Toigo A. 1963). En la bifurcación traqueal de perros se ha calculado que es de aproximadamente 12.6 mm./min. (Asmundsson T. 1970).

Por el hecho que no presenta citoadherencia y que además es un gram negativo y por ello no es susceptible a la acción de la lisozima, se sugiere que el mecanismo de defensa más importante con el que cuenta el cerdo contra esta bacteria es: La substancia bactericida inespecífica anteriormente referida.

En conclusión, un probable mecanismo de ayuda del que serán responsables algunos virus sería la inhibición o disminución en la síntesis de ésta substancia.

Explantos traqueales como modelo experimental en el estudio de infecciones mixtas.

El cultivo de explantes traqueales fué descrito desde 1965 como un medio idóneo para el cultivo de virus que afectan el tracto respiratorio del hombre (Tyrrell y Hoorn 1965). Posteriormente se han utilizado como un excelente modelo in vitro de la respuesta del aparato mucociliar ante diversos microorganismos causantes de problemas respiratorios.

Ha sido con la utilización de estos como Pijoan y cols. han

estudiado entre varias cosas el efecto de los micoplasmas en su papel de patógeno primario en las infecciones mixtas (1972) y fué así mismo con la utilización de este modelo experimental el hallazgo de la substancia bactericida a la que anteriormente se hizo referencia.

O B J E T I V O

El objetivo de este trabajo es demostrar si el virus vacunal de Cólera Porcino, virus vivo lapinizado de alto pasaje "Cepa China" presenta algún efecto sobre la síntesis o acción de la substancia bactericida contra P. multocida, utilizando como modelo experimental explantes traqueales de embrión de cerdo.

MATERIAL Y METODOS

1. Explantos traqueales.

Se obtuvieron traqueas de embrión de cerdo colectadas en el rastro de Tlalnepantla, Edo. de Méx., siguiendo para tal fin la técnica de necropsias en suino de Jericho (1976). Se transportaron al laboratorio de bacteriología de ENEP C. en el medio para cultivos celulares F-16 sin suero y adicionado de antibioticos en una concentración de 1,000 000 U.I. de penicilina y 1 gr. de streptomycin por litro. Al llegar al laboratorio se incubaron durante 30 min. a 37°C. con la finalidad de obtener una optima acción de los antibióticos. Posteriormente se retiró todo el tejido adyacente (restos de esfago, timo, laringe, etc.) y se cortaron en anillos de aproximadamente 2 a 4 mm. de espesor siguiendo la técnica de corte con navaja de rasurar sugerida por Lastra (1978). Los anillos ya cortados son sometidos a una segunda incubación a 37°C. durante 30 min. en medio con antibióticos para evitar toda posible proliferación de germen ambientales que hayan infectado las traqueas durante el proceso de corte.

A continuación de esta incubación y aún en medio con antibióticos se revisó la viabilidad de cada uno de los anillos observando el movimiento ciliar, valiendose de un microscopio estereoscópico marca Olympus, o un microscopio compuesto de luz invertida marca American Optical, desechandose en este paso todos los anillos que no presenten un movimiento ciliar convincente.

Los anillos seleccionados se lavaron con medio F-16 sin suero y sin antibioticos a un volumen calculado de 3 ml. por anillo en botellas de dilución de leche, agitando suavemente durante 1 min. Esto se hizo 3 veces, cambiando la totalidad del me-

dio cada vez, evitando así que pueda permanecer en los anillos traqueales cualquier residuo de antibióticos el cuál propiciaría variaciones indeseables en el desarrollo del experimento.

Posteriormente se formaron lotes de 10 anillos c/u en botellas de dilución de leche y se cultivan en medio F-16 completo.

2. Medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado en todos los pasos del experimento fué el F-16 el cuál consiste en: Medio mínimo esencial de Eagle con sales de Hank, glutamina y aminoácidos no esenciales. Lo que se describe como medio completo es este mismo con la adición de suero fetal de ternera a una concentración del 10%. Este medio resultó ser el mejor para tales fines en un estudio comparativo de 7 medios de cultivo realizado por Lastra (1978).

3. Infección viral.

Consistió en agregar una solución de virus vivo de Cólera porcino lapinizado de alto pasaje "Cepa China" (Lab. Norden) en una concentración de 5 dosis vacunales a cada lote de anillos traqueales, a los que antes se les retiró todo el medio de cultivo. Se usó como diluyente el mismo medio sin suero y fue en este mismo medio que se mantuvieron las traqueas que no tendrían contacto con el virus. Todos los lotes se incubaron a 37°C. 60 min. Transcurrido este lapso se retiró el inóculo y el medio simple de todos los lotes, y se agregó medio completo a un volumen final de 1 ml. por anillo.

Se realizó prueba de esterilidad sembrando una gota de cada lote en agar sangre.

En estas condiciones todos los lotes se colocaron a incubación en estufa bacteriológica a 37° C.

4. Infección bacteriana.

Consistió en agregar una suspensión de Pasteurella multocida en caldo nutritivo a una dosis de 0.05 ml. por traquea. La bacteria se obtuvo de lotes liofilizados existentes en el mismo laboratorio y se hizo crecer en agar sangre.

Cada pareja de lotes antes de la infección bacteriana fué sometida a examen de todas las traqueas y prueba de esterilidad usando los métodos ya descritos.

Tanto para checar la viabilidad del germen como para conocer el número de organismos infectantes se realizó una cuenta viable a cada uno de los inóculos por el método de Miles y Misra (1938). Los resultados se evaluaron por cuentas viables a las 2 y a las 24 hrs. post-infección siguiendo el método anteriormente citado. Antes de realizar cada una de las cuentas bacterianas se revisó la viabilidad de las traqueas así como la esterilidad de cada uno de los lotes.

Tanto al inicio del experimento como al terminar el lapso de infección viral y al final del tiempo de infección mixta se tomaron muestras que fueron fijadas en formol al 10% y enviadas posteriormente al laboratorio de Ciencias Morfológicas -- del mismo departamento de Ciencias Biológicas de ENEP C. para su procesamiento de corte y tinción con Hematoxilina-Eosina, con la finalidad de observar posteriormente sus cambios histopatológicos.

Todo el material de vidriería usado como fueron las cajas de Petri en el corte y las botellas de dilución de leche en el lavado y el cultivo, se prepararon siguiendo el método de lavado de material para cultivo celulares, se esterilizaron por -

autoclave (121°C.-15 min.) y se secaron con horno Pasteur -- (130°C.-30 min.)

El material quirurgico usado durante la recolección y el corte se esterilizó por autoclave antes del experimento y durante éste se sometió a los procedimientos rutinarios de esterilización.

5. Diseño experimental.

El experimento principal consistió en evaluar la capacidad de disminuir la cantidad de bacterias inoculadas, o bien de contrarestar su crecimiento, por parte de explantes traqueales previamente infectados con el virus del cólera porcino. Como control existía en cada caso otro lote de traqueas semejante, tratado de la misma manera en el cultivo pero que no había tenido contacto alguno con el virus.

La evaluación del crecimiento bacteriano se llevo a cabo realizando a todos los lotes una cuenta viable a las 2 hrs. y otra a las 24 hrs. considerando el momento de la infección bacteriana como 0 hrs. Estas cuentas viables se efectuaron utilizando el método descrito por Miles y Mira (1938).

La secuencia de infección se describe en el cuadro 1. Siguiendo este esquema de infección se realizaron 3 repeticiones del experimento luego de 2 ensayos preliminares.

CUADRO I

BOTELLA NUM.	INFECCION VIRAL	INFECCION BACTERIANA
1	0 Hrs.	12 Hrs.
2	-----	12 Hrs.
3	0 Hrs.	24 Hrs.
4	-----	24 Hrs.
5	0 Hrs.	48 Hrs.
6	-----	48 Hrs.
7 *	-----	24 Hrs.

(*) La botella número 7 contenía solamente medio constituyendo así el control de crecimiento bacteriano.

6. Estimación estadística.

Con la finalidad de evaluar estadísticamente los resultados del experimento, se comparó la eficiencia de actividad de las traqueas infectadas con virus con respecto a las no infectadas, cuando el lapso entre las 2 infecciones fué de 24 hrs.

Se considera que los resultados de las cuentas realizadas a las 2 hrs. después de la infección bacteriana nos reportan la medida de la actividad bactericida que presentan los explantes luego de 24 hrs. de exposición al virus. Las cuentas viables realizadas 24 hrs. posterior a la infección bacteriana nos indicarán la actividad bactericida desarrollada por ex plantes traqueales sometidos a 48 hrs. de exposición viral. Es por ésto que la evaluación de los datos se realizó por separado, obteniendo en cada caso un rango de eficiencia diferente.

La eficiencia se determinó como el cociente de la relación: Cantidad de bacterias en los lotes sin virus, entre la cantidad de bacterias en los lotes con virus. El promedio de estos índices se consideró "Eficiencia estimada".

La evaluación estadística de este valor se obtuvo aplicando la fórmula de t de student según el método de Snedecor y Cochran (1967).

RE S U L T A D O S

A. Crecimiento bacteriano.

En todos los experimentos se observó que los lotes que habían sido previamente infectados con el virus vacunal del Cólera porcino, contaban con una menor capacidad tanto para disminuir la cantidad de bacterias adicionadas como para evitar su multiplicación en el medio.

Los resultados del experimento en el que el lapso entre la infección viral y la infección bacteriana fué de 12 hrs., aparecen en el cuadro No. 2., así como en la fig. No. 1. En ellos se puede observar que tanto las traqueas infectadas como las no infectadas, manifestaron su actividad bactericida ya que las cantidades de bacterias detectadas a las 2 hrs., eran menores con respecto a la cantidad de bacterias inoculadas. Sin embargo es evidente que existió una mayor actividad bactericida en el lote que no fué infectado con virus, esto se manifestó más claramente en la lectura de las 24 hrs., ya que el lote no infectado quedó estéril, mientras que en el otro el número de bacterias aumentó.

Los resultados del experimento cuyo lapso entre las infecciones fué de 24 hrs., se muestran en el cuadro No. 3., así como en la fig. No. 2; aquí se observa que lote control de medio, el cuál no contenía traqueas, presenta un crecimiento bacteriano considerable, permitiéndonos comprobar de esta forma que el medio por sí solo no tiene relación con la disminución o crecimiento escaso de la bacteria. En cuanto a la comparación entre el lote infectado y el no infectado observamos que tanto a las 2 como a las 24 hrs. posteriores a la infección bacteriana, el número de bacterias disminuye en el lote no infectado, mientras que aumenta en el infectado; cuando en el segundo hay 310×10^6 bacterias en el primero solo existen 7×10^6 bacterias.

El cuadro No. 4 y la fig. No. 3, nos presentan los resultados de los lotes que fueron infectados con P. multocida después de 48 hrs. de la infección viral. Se puede observar que la actividad bactericida ya no es tan manifiesta en ninguno de los lotes, sin embargo se presenta evidente el efecto de la infección viral en el hecho de que en el lote no infectado observamos una leve baja en la cantidad de bacterias, mientras que en el infectado aumentan y resulta aún más claro si se toma en cuenta que a las 24 hrs., el lote no infectado presenta un ligero crecimiento bacteriano que va solo de 2×10^4 a 4×10^4 cuando en el lote infectado el aumento es bastante elevado ya que se dispara de 9×10^4 a 40×10^4 .

B. Histopatología.

Las traqueas obtenidas al inicio del experimento mostraban un epitelio ciliado perfectamente definido. Se observaron además una gran cantidad de fibras indiferenciadas a nivel de las capas muscular y muscularis mucosae, algunos espacios sugestivos de vasos en formación conteniendo dentro unas cuantas células, aparentemente eritrocitos inmaduros.

Las traqueas observadas luego de 12, 24 y 48 hrs. de cultivo sin haber sido infectadas, presentaron pérdida gradual de los cilios y una leve desorganización de la arquitectura tisular del epitelio. Este mismo tipo de daño fué el que presentaron las traqueas que solo fueron infectadas con bacterias, aumentando gradualmente en relación directa con el tiempo de cultivo la pérdida de organización en el epitelio.

Las traqueas que fueron infectadas con virus mostraban zonas de desprendimiento epitelial alternadas con zonas donde el epitelio aparece íntegro; el tamaño y número de zonas de desprendimiento epitelial aumenta conforme el tiempo de incubación con el virus, de tal manera que en aquellas que permane-

cieron 48 hrs., con el virus, el epitelio aparece desprendido casi en su totalidad y las pocas zonas en las que aún no se ha desprendido aparecen sin cilios.

Las traqueas observadas después de la infección mixta presentan una desaparición total del epitelio; solo aparecen fibras las cuales muestran una desorganización completa en la parte más interna de la traquea. Aparecen además zonas de necrosis a nivel de submucosa y mucosa, las cuales aumentan en tamaño y número de acuerdo al menor o mayor tiempo que estuvieron sometidas a la infección mixta. Las zonas de necrosis aparecen como una masa heterogénea y disforme en la que se aprecian restos celulares endoteliales principalmente, ya que están ubicadas en los espacios sugestivos de vasos en formación, las células de alrededor muestran una necrosis de tipo coagulativa con manifiesto estado de pycnosis. El daño celular es más severo en las zonas de necrosis de mayor tamaño. Así tenemos que las traqueas que permanecieron 48 hrs., con la infección mixta no presentan en general más zonas de necrosis que las que permanecieron solo 24 hrs., pero si de mayor tamaño y por lo tanto con mayor severidad.

C. Estimación estadística.

El cálculo de la eficiencia bactericida de las traqueas infectadas, en base a los resultados de las cuentas realizadas a las 2 hrs., reportó los siguientes valores .62, .36, .49 y .21 el promedio de éstos fué .42, mismo que se considero como la eficiencia estimada. $\bar{E} = .42$ con una desviación standard de .09 .

La estimación estadística con un 90% de confianza da como resultado un rango de eficiencia bactericida en las traqueas infectadas que va del 21% al 63%.

Aplicando la fórmula de t de student, obtenemos como resultado 6.44***, lo cuál es estadísticamente significativo.

$$***p < 0.005$$

El mismo cálculo efectuado en base a los resultados obtenidos en las cuentas realizadas a las 24 hrs., presenta los siguientes resultados.

Indices de eficiencia 0, 0, .4 y .63 .

$$\bar{E} = .17$$

Estimación con 90% de confianza: La eficiencia bactericida en las traqueas infectadas está entre 0% y 52% .

Aplicando la fórmula de t de student obtenemos como resultado 5.53***, lo cuál resulta ser altamente significativo.

$$***p < 0.01$$

C U A D R O 2

Explantos infectados con bacterias 12 hrs., después de la infección Viral.

Inoculo 90×10^6 bacts./ml.

	Lecturas (bacts./ml.)	
	2 hrs.	24 hrs.
Infectado con virus	20×10^6	28×10^6
No infectado con virus	1.1×10^6	0.4×10^6

CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN TRAQUEAS
INFECTADAS CON VIRUS VACUNAL DEL COLERA
PORCINO 12 HORAS ANTES

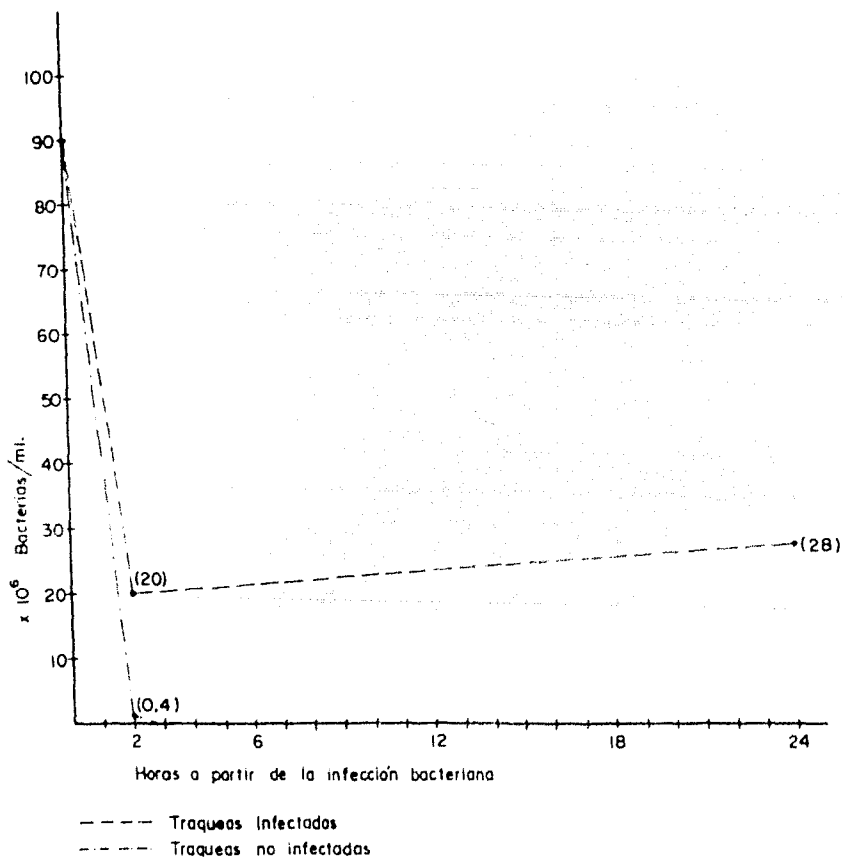


Fig. No. 1

C U A D R O 3

Explantos infectados con bacterias 24 hrs., después de la infección Viral.

Inoculo 10.4×10^6 bacts./ml.

	Lecturas (bacts./ml.)	
	2 hrs.	24 hrs.
Infectado con virus	19×10^6	192×10^6
No infectado con virus	9×10^6	7×10^6
Control (Sin traqueas)	-----	340×10^6

CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN TRAQUEAS
 INFECTADAS CON VIRUS VACUNAL DEL COLERA
 PORCINO 24 HORAS ANTES.

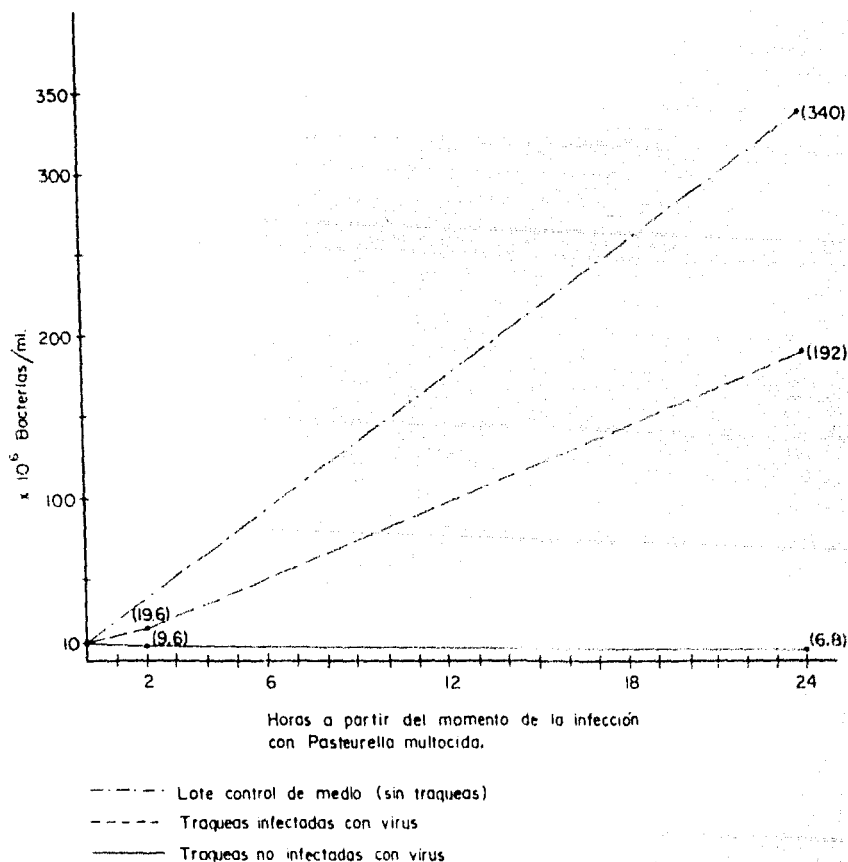


Fig. No. 2

C U A D R O 4

Explantos infectados con bacterias 48 hrs., después de la infección Viral.

Inoculo 3×10^4 bacts./ml.

	Lecturas (bacts./ml.)	
	2 hrs.	24 hrs.
Infectado con virus	9×10^4	40×10^4
No infectado con virus	2×10^4	4×10^4

CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO EN TRAQUEAS
INFECTADAS CON VIRUS VACUNAL DEL COLERA
PORCINO 48 HORAS ANTES

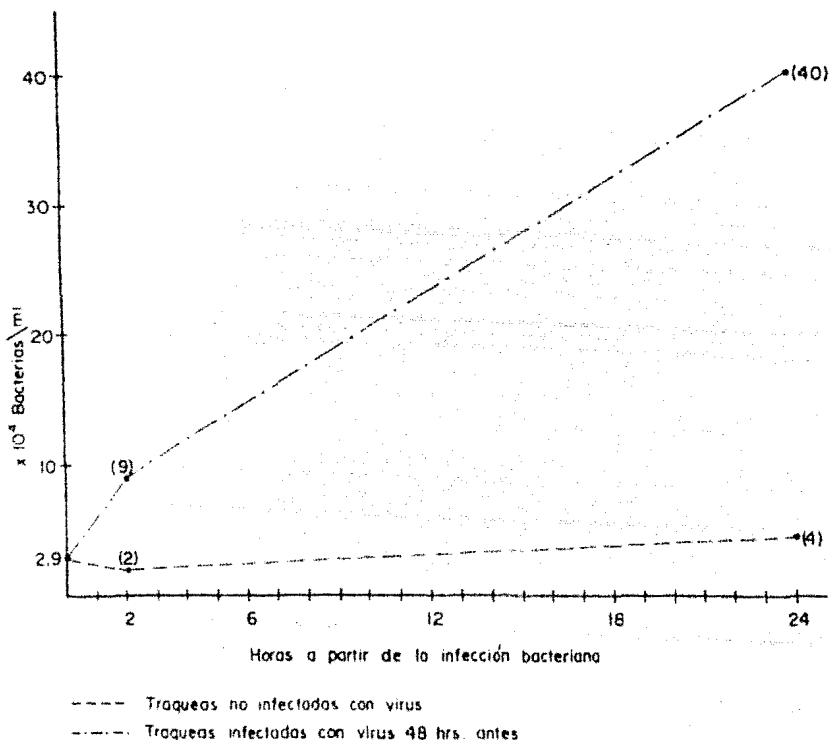


Fig.No. 3

D I S C U S I O N

Se comprobó el hecho reportado por Pijoan y Ochoa (1978), -- que existe en los explantes traqueales de embrión de cerdo -- una fuerte actividad bactericida contra la Pasteurella multocida.

Los resultados de los experimentos realizados sugieren que -- la infección viral a la que los explantes fueron sometidos -- es capaz de hacer disminuir su capacidad bactericida.

La evaluación estadística demuestra que la eficiencia bactericida de los explantes infectados está muy abajo de lo normal o esperado.

No debe pasarse por alto el hecho de que la capacidad de producción de substancia bactericida de parte de las traqueas -- en cultivo, está en relación inversa al tiempo de cultivo. -- Razón por la que los cultivos que tenían 48 hrs. de exposición al virus cuando fueron inoculados con bacterias, no mostraron una marcada actividad bactericida. -- Caso contrario -- constituyen aquellos que solamente fueron inoculados con bacterias luego de 12 hrs., de exposición al virus.

Las lesiones observadas en los cortes histológicos sugieren que el virus no es solamente capaz de abatir la producción -- de substancia bactericida, sino que además al lesionar el -- epitelio permite a la bacteria causar daños en capas más internas del tejido traqueal. -- Esto no es posible que llegara a ocurrir en la traquea intacta por la no adherencia de la -- P. multocida al epitelio (Pijoan y Ochoa datos sin publicar)

Por lo tanto, se puede decir que el virus vivo del Cólera -- porcino es capaz de comportarse como patógeno primario a nivel de aparato respiratorio ejerciendo 2 actividades; -- Principalmente su replicación a nivel de tejidos especializados, -- ésta es la responsable de que exista una disminución estadis

ticamente significativa en la capacidad bactericida de la traquea, propiciando con ésto que la Pasteurella multocida se multiplique y logre llegar a nivel de bronquiolos y alveolos donde se han descrito otros efectos del mismo virus (Pijoan, Ochoa y Hernández, 1979). Su otra actividad consiste en permitir que la bacteria por sí misma dañe el Tejido traqueal -- existiendo así varias complicaciones probables, teniendo todas ellas como resultado final la presentación de problemas neumónicos ya sean estos de tipo agudo o crónico.

La gravedad de este problema reside principalmente en 2 hechos:

a) La abundante y amplia distribución de la Pasteurella multocida en las explotaciones porcinas de nuestro País, misma que es imposible de evitar dadas las condiciones de explotación porcina en México. Estas son de tipo intensivo principalmente, con el consecuente hacinamiento, lo cual aunado al modo de transmisión de la bacteria, que es por contacto directo o al tener contacto con las secreciones o esputos de un cerdo contaminado resulta inevitable.

b) La imposibilidad de suprimir la vacunación contra el Cólera porcino tomando en cuenta su alta incidencia en la República Mexicana, así como las elevadas morbilidad y mortalidad características de esta enfermedad.

Tampoco es posible sugerir la no utilización de la "Cepa China"; ya que tanto la alta inmunidad que confiere, como toda una serie de características superiores a las otras vacunas han sido claramente descritas por Lee y Lin (1976).

Sin embargo no debe olvidarse, que otro factor que puede llegar a tener una influencia significativa en la predisposición de los cerdos vacunados a contraer neumonía es el stress, por lo tanto resulta muy recomendable tratar de evitar éste lo máximo posible, así como aumentar las medidas de sanidad e higiene en los corrales de los cerdos vacunados.

C O N C L U S I O N E S

- I. El virus vivo vacunal lapinizado de alto pasaje "Cepa China" contra el Cólera porcino, es capaz de infectar los explantes traqueales de embrión de cerdo, disminuyendo con ésto su producción de la substancia bactericida inespecífica que es responsable de evitar la multiplicación de la Pasteurella multocida.

- II. La síntesis de substancia bactericida de parte de los explantes traqueales, está en una relación inversa con el tiempo de cultivo.

- III. La infección viral de los explantes traqueales, provoca que la Pasteurella multocida infecte y cause daños en los tejidos internos de la traquea.

REFERENCIAS

- 1.- Asmundsson, T., Kilburn, K.H., (1970): "Mucociliary clearance at various levels in dog's lungs" Am. Rev. Res. Dis. 102 388-397
- 2.- Betts, A.O., Smith, I.M. Watt, R.G. and Hayward, H.S., (1973): "Experimental infections with Pasteurella septica (Serogrup A) and an adenovirus in gnotobiotic piglets " J. Comp. Path. 83 : 1-12
- 3.- Blood, D.C., Henderson J.A., (1974): "Enfermedades causadas por distintas clases de Pasteurella" en Medicina Veterinaria 4a. Ed., Ed. Interamericana 384-385
- 4.- Buxton, A., Fraser, G., (1977) "Pasteurella, Yersinia and Francisella" en: Animal Microbiology. Blackwell Sci. Publ. 1a. Ed. Pags. 121-131
- 5.- Carter, Anau (1953): "Isolation of capsular polysaccharides from colonial variants for Pasteurella multocida" Amer. Jour Vet. Res. 14:475
- 6.- Carter, G.R., (1955): "Studies on Pasteurella multocida 1, A Haemagglutination test for the identification of serological types". Am. J. Vet. Res. 16 : 481
- 7.- Carter, G., Bain, R., (1960): Vet. Rev. Annoto, 6 105 cita do por: Betts, R., Smith, M., Watts, G. and Hayward, S. 1973 en: "Experimental infec-

tions with Pasteurella septica (Sero-group A) and an adeno, or entero-virus in gnotobiotic piglets" J. Comp. Path. 83

- 8.- Carter, G.R., (1975): "Pasteurellosis" Chapter 25 in: - - - Diseases of Swine 4a. Ed. The Iowa State - - - University Press Ames Iowa U.S.A.
- 9.- Cowan and Steel's (1974): "Manual for the identification of medical bacteria" Cambridge Univ. Press 2a. Ed. 93 - 96
- 10.- Dunne, H.W., (1975): "Diseases of Swine" 4a. Ed. Iowa State Univ. Press Ames Iowa U.S.A.
- 11.- Ebert, R.V., (1978): "Small Airways of the lung" Annals of Internal Medicine 88 : 98-103
- 12.- Green, G.M., (1971): "In defense of the lung" Am. Rev. of Res. Dis. 102 : 691
- 13.- Hetrick, F.M., Chang, S.C., Byrne, R.J., and Hansen, P.A., (1963): "The combined effect of Pasteurella multocida and Myxovirus Parainfluenza-3 upon calves" Am. J. Vet. Res. 24 : 102
- 14.- Hutyra, F., Marek J. Manninger, R., (1938): "Pasteurellosis of swine" in: Special Pathology and therapeutics of the diseases of domestic animals 4th Ed.
- 15.- Jericho, K., (1976): "Técnica de necropsias en cerdo" comunicación personal al MVZ Danilo Mendez

- 16.- Jubb, K. V., F. Kennedy P.C., (1974): "Patología de los animales domésticos" Ed. Labor, S.A. Tomo II
- 17.- Kilburn, K.H., (1967): "Cilia and mucus transport as determinants of the response of lung to air - - - pollutants", Arch. Environ. Health (Chicago) 14, 77
- 18.- Lastra, A., (1978): "Estudio sobre diferentes sistemas de cultivo de explantes traqueales de embrión de cerdo" Tesis Fac. de Med. Vet. Zoot. UNAM
- 19.- Lee, y Lin (1976): "A potent and safe strain of lapinized hog cholera virus used for hog cholera - - - control in Taiwan" Memorias de 4º. Congreso Internacional de la Sociedad de Veterinarios expertos en cerdos. Ames Iowa Jun. 1976
- 20.- López, A., Thomson, R.G., and Sivan M., (1976): "The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica in calves infected with bovine parainfluenza 3 virus". Can. J. Comp. Med. 40 (4) 385
- 21.- Maqueda, A.J., (1977): "Incidencia de Neumonía Enzoótica en varios estados productores de cerdos en la Rep. Mexicana" (Estudio preliminar) 1er. Congreso Latinoamericano de Veterinarios especialistas en cerdos, XIII Convención de - - - AMVEC en la UAM unidad Xochimilco
- 22.- Martínez, A., Verdura, T., (1970): "Gérmenes del género Pasteurella en Neumonías de Bovinos y Porcinos" Rev. Cubana de Ciencias Veterinarias 1 (2) 181-187

- 23.- Miles, A.A., and Misra, S.S., (1938): "The estimation of the bactericidal power of the blood". J. Hyg. -- Camb. 38 : 732
- 24.- Murty, D.K., R.K., Kaushik (1965): "Studies on an outbreak - of acute pasteurelosis due to Pasteurella multocida type B (Carter 1955)" Vet. Record 77 : 411
- 25.- Namioka, S. y Murata, M., (1961) "Serological studies of -- Pasteurella multocida". Cornell Vet. - - - 51 : 507
- 26.- Namioka, Murata (1961 a) " Serological studies of Pasteurella multocida II: Characteristics of somatic (O) antigen of the organism". Cornell - Vet. 51 : 507
- 27.- Namioka, Bruner (1962): "Serological studies Pasteurella multocida IV: Type distribution of the - -- organisms in the basis of their capsule and O groups". Cornell Vet. 53 : 41
- 28.- Perrau, P., Vallé V., y Renault L. (1962): "Type serologiques de Pasteurella multocida isoles chez - le porc en France". Bull. Acad. Vet. - - - 35 - 129
- 29.- Pijoan, C., (1978): "Infecciones mixtas en el aparato respiratorio" en: Ciencia Veterinaria Tomo II -- Ed. Moreno C. UNAM México 1978
- 30.- Pijoan, C., Campos, M., Ochoa, G., (1977): "Efecto del virus vacunal de C6lera porcino sobre algunas defensas pulmonares del cerdo" 1er. Congre-

so Latinoamericano de Veterinarios especialistas en cerdos. XIII Convención de AMVEC - UAM Xochimilco Sep. 1977

- 31.- Pijoan, C., Ochoa, G., Trigo, F., (1976): "Aislamiento e - - identificación de bacterias de pulmones neumonicos en cerdos" Tec. Pec. Méx. 30 80 83
- 32.- Pijoan, C., Ochoa, G., (1978a): "Interaction between a hog - cholera vaccine strain and Pasteurella multocida in the production of porcine pneumonia" J. Comp. Path. 88 167-170
- 33.- Pijoan, C., Ochoa, G., (1978b): "SIM-Rafinosa, un nuevo medio para la identificación rápida de Pasteurella multocida". Resúmenes de la Reunión - Bianual de Microbiología Toluca Méx. - - - - - Abril 1978
- 34.- Pijoan, C., Ochoa, G., (1978c): "A bactericidal substance - - against Pasteurella multocida produced by - - pig embryo tracheal explants" Rev. Lat. - - Microbiol. 20 : 1
- 35.- Pijoan, C., Ochoa, G., Hernández, E., (1978): "Estudios sobre la secuencia del efecto del virus vacu - - nal del Cólera porcino sobre la fagocitosis de los macrófagos alveolares del cerdo" Resúmenes del XI Congreso Nacional de Microbiología. Guadalajara, Jal. Febrero 1979
- 36.- Pijoan, C., Roberts, D.H., and Harding J.D.J. (1972): "The effect of porcine mycoplasma on pig tracheal organ cultures" J. Appl. Bact. 35 : 361-365

- 37.- Pijoan, C., Trigo, F., (1978): "Neumonías causadas por Pasteurella" Memorias del 1er. Curso Latinoamericano de enfermedades respiratorias de los cerdos. ALVEC ENEP C. Cuautitlan, - Izcalli. Octubre 1978.
- 38.- Smith, (1955): "Estudies on Pasteurella septica. 1: the occurrence in the nose and tonsils of dogs". Jour. Comp. Path. Therap. 65 : 239
- 39.- Smith, I. M., (1970): "Studies on the role of some microorganisms in the respiratory infection of the pig with special reference to the involvement of Pasteurella septica". Citado por: Pijoan, C., en: "Neumonías causadas por Pasteurella". Memorias del 1er. Curso Latinoamericano de enfermedades respiratorias de los cerdos. ALVEC ENEP C. Cuautitlan, - Izcalli. Octubre 1978.
- 40.- Snedecor, G., Cochran, G., (1967): "Estadistical Methods" 6a. Ed. Iowa State Univ. Press Ames Iowa - U.S.A. Pags. 59-65
- 41.- Suarez, F.G., (1979): "Estudios sobre el papel etiológico de la Pasteurella multocida en la neumonía del conejo." Tesis de maestría. ENEP-C UNAM.
- 42.- Toigo, A., Imarisio, J.J. Murmall, H. and Lepper, M. (1963): "Clearance of large carbon particles from the human tracheobronchial tree" Amer. Rev. Res. Dis. 87-847

43.- Tyrrell, D.A.J. and Hoorn, B., (1965): "The growth of --
some myxoviruses in organ cultures" Br. -
J. Exp. Path. 46 : 514

44.- Young, G. A., (1956): "Is VPP a new swine disease?" - -
Norden News 30 : 6