



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**Facultad de Estudios Superiores
' ' Cuautitlán ' '**

**"Localización del Gene Responsable de la
Producción de la Exotoxina de Pasteurella
multocida tipo D"**

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

QUE PRESENTA :

SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA

Director de Tesis: M. en C. JOSE CAMACHO MACHIN

Asesor: de Tesis: M. en C. ABEL CIPRIAN CARRASCO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

INDICE GENERAL

Página

RESUMEN	1
I.- ANTECEDENTES	3
1.0 Historia de <u>Pasteurella multocida</u>	3
1.1 Características Generales	3
1.2 Características Antigénicas	4
1.3 Patología	6
1.4 Profilaxis, Control y Tratamiento	9
1.5 Importancia en Nuestro País	10
2.0 Toxinas Bacterianas	11
2.1 Obtención y Caracterización de Endotoxinas Exotoxinas y otros compuestos	12
2.2 Electroforesis en geles SDS-PAGE	14
3.0 Plásmidos	15
3.1 Plásmido "R"	16
3.2 Replicación de Plásmidos	17
3.3 Plásmidos que confieren patogenicidad a Mamíferos	18
3.4 Plásmidos en Ingeniería Genética	19
4.0 Compuestos Químicos que Permiten "CURAR" Plásmidos	19
4.1 Naranja de Acridina	20
4.2 Otros Compuestos	21
4.3 Electroforesis en Geles de Agarosa.....	23
II.- OBJETIVOS.....	24
Lista de Fabricantes (Material y Reactivos)....	25
III.- MATERIAL Y METODOS.....	26
A.- Identificación por Pruebas Bioquímicas	26
B.- Curva de Crecimiento	27
C.- Tratamiento para Concentrar la Exotoxina ...	27
D.- Determinación de Proteínas	28

E.- Tratamiento con Tripsina, Pepsina y Temperatura a la Exotoxina.....	29
F.- Electroforesis en Gel SDS-PAGE.....	29
G.- Producción de la Dermonecrotóxina	37
H.- Antiblogramas	38
I.- "CURA" del Plásmido con Naranja de Acridina	38
J.- Extracción del Plásmido	40
K.- Cuenta Viable con Diferentes Diluciones y Antibióticos	41
 IV.- RESULTADOS	 42
 V.- DISCUSION	 70
 VI.- CONCLUSIONES	 74
 VII.-REFERENCIAS	 75

Abreviaturas Empleadas

Abs	:	Absorbencia
AICC	:	Agar de Infusión Cerebro Corazón
Anth	:	Antibiótico
CICC	:	Caldo de Infusión Cerebro Corazón
d	:	Daltons
Hrs.	:	Horas
Lts.	:	Litros
MIC	:	Concentración Mínima Inhibitoria
AMH	:	Agar de Mueller Hilton
mM	:	Milimolar
mm	:	Milímetros
MR	:	Movilidad Relativa
NA	:	Naranja de Acridina
PAGE	:	Electroforesis en geles de SDS- Poliacrilamida
PBS	:	Solución Salina Tamponada pH= 7.2
PM	:	Peso Molecular
SDS	:	Dodecil Sulfato de Sodio
SSF	:	Solución Salina Fisiológica
TEMED	:	N,N,N',N'- Tetrametil etilen-diamina
UFC	:	Unidades Formadoras de Colonias
ug	:	Microgramos
Ø	:	Diámetro de Inhibición
ul	:	Microlitros.
Antb.	:	
Amika.	:	Amikacina (10 mcg)
Ampi	:	Ampicilina (10 mcg)
CB	:	Carbenicilina (50 mcg)
CC-2	:	Clindamycin (20 mcg)

Cefa : Cefalosporinas (30 mcg)
Clora : Cloranfenicol (30 mcg)
Cloxa : Cloxacilina (1 mcg)
Coli : Colimixina (10 mcg)
CTX : Cefotaxima (30 mcg)
Eritro : Eritromicina (15 mcg)
Fura : Furadantina (30 mcg)
Genta : Gentamicina (10 mcg)
Linco : Lincomicina (20 mcg)
Nali : Ac. Nalidixico (30 mcg)
N-30 : Neomicina (30 mcg)
OX : Ac. Oxolinico
PB-300 : Polymixina (300 U)
Peni : Penicilina (10 U)
STX : Sulfametoxazol Trimetropin (25 mcg)
Tetra : Tetraciclina (30 mcg)

RESUMEN

Las enfermedades respiratorias del cerdo han mostrado estar asociados a una gran variedad de agentes etiológicos, sin embargo el Virus de la Influenza Porcina y Haemophilus influenzae han mostrado una patogenicidad definida para el pulmón. Además Pasteurella multocida actúa como oportunista en las infecciones del tracto inferior siendo incluso más patógena, que al agente iniciador del cuadro neumónico.

Las cepas de Pasteurella multocida tipo "D" productoras de la dermonecrotina probablemente causan neumonías y tienen una estrecha relación con la rinitis atrófica.

Actualmente la atención, se ha centrado sobre el estudio de la hipótesis, de si la producción de la dermonecrotina de la cepa estudiada, está asociada al material genético de un plásmido, pero actualmente la información al respecto era nula.

Por lo que el objetivo principal de esta investigación fue demostrar que la dermonecrotina estaba codificada dentro del material genético de un plásmido y aportar una información sobre la caracterización de la dermonecrotina de la Pasteurella multocida tipo "D".

En la cepa control de esta bacteria, se logró extraer un plásmido detectados en geles de agarosa. Este plásmido mostró dos bandas presentes en un rango de 6500 y 4300 pares de bases. La cepa "Curada" con NA a 400 ug/ml, no presentó ninguna banda en los mismos geles de agarosa.

Se utilizó un método relativamente largo para concentrar la Exotoxina llegando hasta 790 ug/ml, y por medio de geles SDS-PAGE. con tinción de Nitrato de Plata, se encontraron 10 bandas con diferentes pesos moleculares, de las cuales una de las más abundantes fue la que presentó aproximadamente un PM de 22 000 d, y con la tinción de Azul de Cumasina, sólo presentó esta banda. Esta banda ya no aparece en la cepa que ya no tiene plásmido.

Los sobrenadantes de la cepa "Curada" con NA, y la cepa control tratada con Tripsina. Pepsina y Temperatura, perdieron la actividad de la reacción dermonecrotóxica en piel de cuyes comparadas con la cepa control, dando la lesión característica de un halo de induración y necrosis de aproximadamente de 1.1 cm de diámetro.

De los 20 antibióticos evaluados en ambas cepas detectados por el halo de inhibición de crecimiento bacteriano y por el Método de Viabilidad (UFC), se pudo apreciar que la cepa presentó resistencia a 6 antibióticos, que después del tratamiento con la NA, la cepa adquirió mediana sensibilidad para 2 antibióticos (Colimixina y Cloranfenicol), dado por un estudio estadístico, por la prueba de t student, que presentó razón estadística suficiente ($p < 0.01$) y alta sensibilidad para los otros 4 antibióticos (Polimixina, Amikacina, Estreptomicina y Lincomicina), dado por otro estudio estadístico Análisis de Covarianza, con razón estadística suficiente --- ($p < 0.01$), observándose que la Amikacina fue el antibiótico más efectivo a menos concentración que los otros antibióticos para la cepa curada.

Los antibióticos, se tomaron como marcadores genéticos, ya que se encuentran en el material genético de Plásmidos R, por lo que a la "CURA" con NA, se perdió la resistencia a 6 antibióticos y la pérdida de la capacidad de producir la dermonecrotóxina.

Estos hallazgos corroboran la hipótesis planteada. "La producción de la dermonecrotóxina esta codificada en el material genético de un Plásmido R".

I.- ANTECEDENTES

1.0 Historia de Pasteurella multocida

Las bacterias del género *Pasteurella* han sido asociadas a una gran variedad de procesos infecciosos en las distintas especies animales. En México en el cerdo la *Pasteurella* más comunmente aislada es *Pasteurella multocida*, aunque no se le considera agente primario de la enfermedad sino como oportunista en procesos neumónicos y rinitis atrófica.

El nombre de *Pasteurella* fué introducido en homenaje a -- Louis Pasteur, por sus observaciones sobre cólera aviar. *Pasteurella multocida* fué aislada por M. Tossaint de una gallina (1879). El nombre actual de la *P. multocida* fué acuñado por Rosenbusch y Merchant en 1939.

1.1 Características Generales

Las cepas de *P. multocida* aisladas de animales que han pe recido de la infección, a la tinción de Gram, se observa su morfología como : cocobacilos, gram positivos, ovoides cortos, capsulados y una bipolaridad clásica: midiendo aproximadamente $1 \times 0.5-0.8 \text{ um}$.

Aunque la morfología y características tintoriales pueden variar, particularmente cuando se aíslan del tracto respiratorio superior y después de cultivos repetidos en medios artificiales ; en esas circunstancias deja de observarse la bi polaridad y pueden tomar forma de bacilos alargados, de $5 \times 1 \text{ um}$, con pérdida de cápsula (Buxton y Fraser, 1977; Carter - 1978).

Las colonias bacterianas, en medios sólidos como: Agar - BHI, Agar Sangre y Agar Soya Tripticasa. Estas son de tamaño mediano, redondas, brillantes, grisáceas. Se han observado --

variantes coloniales lisas- iridiscentes, mucosas y rugosas - azules (Carter. 1975).

Estos microorganismos son inmóviles, no esporulados, anaerobios facultativos y crecen bien en medios sintéticos, enriquecidos con suero o sangre. Para el aislamiento primario pueden inocularse directamente placas de agar sangre, pero con la -- inoculación a ratón se mejorarán los aislamientos (Carter, 1978).

En 1982, Pedersen, obtiene 18 aislamientos por cultivo directo frente a 74, tras la inoculación en ratón de casos de rinitis atrófica. En 1984 Cowart y Backström, También de muestras nasales encuentran 16.6% de P. multocida en agar sangre contra un 35.2% de aislamientos en la inoculación paralela a ratón, se aumenta la proporción de bacterias con tipo capsular "D". En pulmones neumónicos se han detectado hasta 49.6% de aislamiento por cultivo directo y 58.4% de aislamientos en ratón (Pijoan y cols., 1984).

1.2 Caracterización Antigénica

Los antígenos capsulares han sido estudiados por distintos autores. En 1947, Roberts, definió 4 grupos ; I, II, III, IV, mediante pruebas de protección cruzada. En otros estudios, por hemaglutinación indirecta, procedimiento en el cual se absorben los polisacáridos a globulos rojos, se ratificó la existencia de 4 tipos de cápsula: A, B, C, D : más tarde el serogrupo C se descartó para establecer un nuevo tipo E (Carter, 1961 y 1963). La clasificación de Carter se corresponde con la de Roberts del siguiente modo: B/I, A/II, E/III, D/IV.

Posteriormente se encontraron dos métodos no serológicos - y rápidos para la determinación de los tipos capsulares A y D. Un método de aglutinación rápida con acriflavina, para diferenciar las tipo D (Carter y Subronto, 1973). Y otro donde se demuestra la sensibilidad de las bacterias tipo A a la decapsulación con hialuronidasa estafilococcica (Carter y Run-

dell,1975; Carter,1972).

Además de los antígenos capsulares se han estudiado los antígenos somáticos de pared celular. En 1961, Namioka y Murata, utilizando un método de aglutinación en tubo con bacterias decapsuladas con tratamiento ácido, observaron 14 tipos antigénicos. Mediante una técnica de inmunodifusión en gel, para la detección de antígenos termoestables de la pared celular, reconocieron 16 diferentes antígenos, sin relación al tipo capsular (Heddleston y cols.,1972). Los dos métodos para caracterizar antígenos somáticos producen resultados similares y se considera que el mayor componente de la especificidad del antígeno somático reside en el lipopolisacárido (Brogden y Rebers,1978; Shigidi y Mustafa,1980).

Por otro lado en un estudio comparativo de los métodos de tipificación para antígenos capsulares y somáticos se observó una falta de correlación entre los distintos sistemas (Brogden y Packer,1979).

Con inmunolectroforésis cruzada se han evidenciado 55 antígenos citoplasmáticos y 19 de la envoltura celular. Al comparar los distintos métodos de extracción de antígenos capsulares y somáticos, se observaron que cada sistema de extracción poseía un cierto número de proteínas diferentes - esto explicaría la falta de coincidencia de los métodos de tipificación (Bhasin y Lapointe-Shaw,1980a y 1980b).

La complejidad antigénica de la bacteria permitiría explicar la débil inmunidad cruzada que se ha observado por inmunización experimental al ratón (Rimler y Boycott,1979; Van der Marel y cols.,1984); así como la poca utilidad de la vacunación en cerdo (Pijoan y cols., 1982).

Se han realizado estudios acerca de los tipos antigénicos más comunes en cerdos para fines epidemiológicos y de vacunación.

En 1967, Carter publicó, datos de 297 aislamientos, en distintas partes del mundo, a partir de diversos cuadros clí

nicos en cerdos: 157 se clasificaron como tipo A, 118 tipo D, 3 tipo B y 19 no fueron clasificables. Las bacterias tipo B procedían de cuadros sépticémicos.

Otros autores señalan que los tipos capsulares, en combinación con los somáticos más frecuentes en cerdos son: A:1-A:3, A:5, D:1, D:4 y D:10, aunque los autores no comentan el origen nasal o pulmonar del aislamiento (Buxton y Fraser, 1977).

En 1983, Pijoan y cols., encontraron 22 Pasteurella multocida en pulmones neumónicos de rastro., de las cuáles el 97.3 % fueron del tipo capsular A y el resto del tipo D. La combinación del tipo capsular y somático: A:3(5) en el 39.1%, A:3(4,5,12) en el 12.2%, A:3(4,5) en el 11.2%, A:3(5,12) en el 10.4 %, A:3(6) en el 8%, A:5(6) en el 8%, D:5 en el 33% y D:3(5) en el 33%.

Estudios realizados en 1977, por Van Meyering y cols., aislaron de cavidad nasal un 27% de tipo A, un 71% tipo D y un 2 % de tipo B; la proporción de los tipos A y D fue similar tanto en explotaciones afectadas de rinitis atrófica como en aquellas que no presentaron el problema.

Los resultados del número de Pasteurellas tipo A y D, aisladas por nosotros son similares a las obtenidas en estudios sobre rinitis atrófica a partir de muestras del rastro de Cuautitlán de Romero Rubio, Edo. de Méx., encontramos los siguientes resultados: 18.42% tipo A, 42% del tipo D, 18.42% tipo D/N y un 13.45% de no clasificadas, de un total de 38 Pasteurellas, observándose una falta de correlación entre el tipo capsular y la patogenicidad para ratón por vía intraperitoneal (Pujols y cols., 1984).

1.3 Patología

La P. multocida es un comensal frecuente en la nasofaringe y puede persistir allí, sin daño aparente para el huésped (Collins, 1978).

Aunque la adherencia a epitelios no parece ser una característica de esta bacteria. En 1968 Harris y Switzer, observaron que la colonización nasal se vió favorecida después de la inoculación de Bordetella bronchiseptica. En 1984 Pederesen y Elling, solo produjeron la colonización nasal después del tratamiento con una solución de ácido acético al 1% sobre la mucosa. En 1983 Gois y cols., obtuvieron la colonización nasal a corto y largo plazo en cerdos obtenidos por cesárea y privados de calostro, estos resultados sugieren que la bacteria solo coloniza la mucosa de la nariz bajo determinadas situaciones predisponentes como: stress, acinamiento, cambios de alimentación o temperatura etc..

La colonización nasal podría explicar el que las bacterias pueden descender hasta el tracto respiratorio inferior del mismo animal o de animales cercanos libres que se infectarían por inhalación de los aerosoles liberados de los cerdos portadores.

En 1982, Pijoan y cols., en un experimento con P. multocida inoculada a cerdos, se observaron que los animales control que no estuvieron en contacto directo con los inoculados desarrollaron anticuerpos una semana después que los demás, por lo tanto concluyeron que P. multocida es capaz de difundirse rápidamente en las explotaciones.

La inoculación experimental no reproduce los síntomas y lesiones de la enfermedad respiratoria (Carter, 1975; Gois y cols., 1983; Pijoan y cols., 1982), sin embargo la P. multocida es uno de los agentes aislados con mayor frecuencia de pulmones neumónicos (Gois y cols., 1980; Kielstein y cols., 1977; Ochoa, 1978; Yamamoto y Ogata 1982). Además esta bacteria puede producir patología solo cuando es inoculada en combinación con otros agentes que disminuyen los mecanismos de defensa pulmonares (Kilestein y cols., 1977; Pijoan y Ochoa 1978b; Raynaud y cols., 1977; Litle y Harding, 1980). En 1980 Bentley y Farrington, fueron los únicos en producir neumonías

experimental ,por inoculación intratraqueal de P. multocida unicamente,pero la bacteria usada en este caso fué una tipo B,está reportado que son causantes de septicemia aguda en cerdos (Murty y Kaushik,1965) y son extremadamente raros (- Carter,1975).

Las P. multocida tipo A, causan rinitis supurativa. -- otitis media, neumonías enzootica, conjutivitis,piometría,- abscesos subcutáneos,orquitis y septicemia aguda en conejos (Shoung Lu y Pakes,1981).

Los mecanismos de patogenicidad en la infección por Pasteurella multocida, tipo B , ha sido descrita una tóxima.de composición proteica, a la que se ha hecho reaponsable del cuadro sépticemico (Carter,1978).

La endotoxina de P. multocida, se ha relacionado con la virulencia (Rebers y Heddleston,1974;Rebers y cols.,1980).

Por inoculación experimental en ratón se ha observado - que los tipos capsulados son más virulentos que los no capsulados (Carter y Bigland,1953) y se ha observado resistencia a la fagocitosis de las cepas capsuladas (Maheswaran y Thies,1979): además la cápsula podría proteger a la bacteria de la acción del complemento y de la opsonización (- Carter y Bigland,1953).

La disminución de la eficiencia de las células fagocitarias se ha tratado de explicar por un mecanismo similar al utilizado por P. haemolytica según el cual la bacteria - produciria un factor citotoxico para macrofagos y neutrófilos (Benson y cols., 1978;Kaehler y cols., 1980;Markham y Wilkie,1980).

Recientemente se detectó la producción de una dermonecro toxina por P. multocida tipo "D" . Estas bacterias productoras de exotoxina han sido asociadas junto con B. bronchiseptica como agentes capaces de producir lesiones severas en cornetes nasales (De Jong y cols.,1980;Pedersen y Barford,1981 ;Schöts y Thiel, 1984).La inoculación intranasal de la tóxima a cerdos gnotobióticos,provoca atrofia marcada de --

cornetes (Martineau y cols., 1982),

Las P. multocida tipo "D" productoras de toxina colonizan la nariz de cerdos inoculados con B. bronchiseptica, por tiempos prolongados, que cualquier otro tipo de P. multocida (Rutter, 1983).

La tóxima presenta las siguientes características físico-químicas: Es inactivada a 56°C durante 30 min., sensible a proteasas K y a una solución de formalina al 0.2% durante 18 hrs. a 37°C, parece ser sensible a tripsina en soluciones del 30- 40 % de sulfato de amonio permanece en el sobrenadante tras centrifugación a 150 000 g y tiene aproximadamente un PM de 20 000 d (Rutter, 1983; Van der Heyden y cols., 1984).

Los antisueros obtenidos por inoculación de la tóxima o de la bacteria a animales neutraliza los efectos de la toxina (Rutter, 1983; Rutter y cols., 1984; Pennings y cols., 1984).

Los cambios patológicos observados en Pasteurellosis pulmonar son parecidos a los descritos en casos de infección por Mycoplasma, complicados por agentes secundarios (Carter, 1975).

Macroscopicamente se aprecia una consolidación rojiza a gris dependiendo de la antigüedad de la lesión, la extensión es variable, encontrándose generalmente afectados los lóbulos apicales y cardiaco; aunque también pueden estar afectados los lóbulos intermedios y la porción anterior de los diafragmáticos. Es frecuente observar una pleuritis serofibrinosa con o sin adherencias (Pijoan, 1982a).

Microscopicamente se aprecia una bronconeumonía exudativa con distribución lobular. Inicialmente se encuentra una infiltración leucositaria perivascular y peribronquiolar, engrosamiento del septo alveolar e invasión de neutrofilos, células mononucleares y exudado mucopurulento en alveolos y bronquiolos, acompañados generalmente de una reacción pleural fibrinopurulenta (Schofield, 1956).

1.4 Profilaxis, Control y Tratamiento para P. multocida

Aunque es posible encontrar bacterinas comerciales contra Pasteurellosis porcina, estas usualmente son pobres debido por un lado a la naturaleza multietiológica de la enfermedad y por el otro lado al uso de serotipos diferentes a los pre-valescentes en la zona que desea proteger.

~~Las medidas de control incluyen la prevención de anemia-~~ en lechones, adecuada alimentación y evitar el exceso de humedad y cambios bruscos de temperatura. Las investigaciones dentro del campo inmunogénico de P. multocida en los últimos años han llegado a desarrollar una variedad de agentes inmunoprofilácticos, otro aspecto de prevención implicaría el evitar la vacunación contra el cólera porcino al mismo tiempo que se realice el destete ya que esto promueve la invasión de P. multocida (Pijoan y Trigo,1982).

P. multocida es altamente sensible a la oxitetraciclina y a la clorotetraciclina, sensible a cloranfenicol, dehidroestreptomicina y penicilina; es resistente a bacitracina y sulfatiazol triple. El tratamiento solo es eficaz al inicio, se recomienda el uso de sulfamerazina y/o sulfatiazol para cepas resistentes (Murty y Kausshik,1965;Pijoan y Trigo,1982).

1.5 Importancia en Nuestro País

Uno de los problemas limitantes en la producción porcina son las pérdidas económicas ocasionadas por la alta incidencia de enfermedades respiratorias, las cuales se traducen en desnutrición, abortos y muertes. Anualmente México pierde gran cantidad de carne porcina debido a este tipo de enfermedades, en la mayoría de los casos no son diagnosticadas con exactitud sin embargo son varios los agentes involucrados en estas afecciones pulmonares entre los más importantes se han aislado algunos virus respiratorios, Mycoplasma y P. multocidas.- (Pijoan y Trigo,1982).

2.0 Toxinas Bacterianas

Las bacterias dan lugar a procesos patológicos através de tres mecanismos:

- 1.-La invasividad, que es la capacidad de entrar en los tejidos del huésped, multiplicarse ahí y diseminarse.
- 2.-La toxigenicidad, la capacidad de producir toxinas.
- 3.-Inducción de respuestas inmunes a antígenos bacterianos o sus toxinas.

(Bier,1977;Dulbecco y cols.,1980;Robert,1981).

Las toxinas bacterianas suelen clasificarse como Exotoxinas y Endotoxinas :

Exotoxinas :

- 1.- Son proteínas excretadas por los microorganismos que las producen al medio circundante en que crecen.
- 2.- Su concentración en la mayoría de los casos, parece ser paralela al crecimiento bacteriano.
- 3.- Son polipéptidos de 10 000 a 900 000 d de PM.
- 4.- Son producidas por ciertas bacterias gram positivas y ocasionalmente por gram negativas .
- 5.- Producen efectos tóxicos altamente específicos en ciertos tejidos, tales efectos son característicos y sirven para identificarla.
- 6.- No producen fiebre en el huésped
- 7.- Son poco estables.
- 8.- Pierden rápidamente su toxicidad por calor a 60°C .
- 9.- Se alteran rápido a la temperatura ordinaria o por exposición a la luz ultravioleta.
- 10.- Son fuertemente antigénicas inyectadas en animales.
- 11.- Estimulan la producción de grandes cantidades de antitoxina neutralizante.
- 12.- Pueden ser convertidas a toxoides atóxicos antigénicos, con tratamiento de aldehído fórmico, enzimas proteolíticas, calor y otros.

Endotoxinas:

- 1.- Son complejos de lipopolisacárido (LPS), de la pared celular de las bacterias.
 - 2.- Se liberán al medio solo cuando el microorganismo se autólisis o es artificialmente fragmentado por métodos mecánicos o químicos.
 - 3.- Son macromoléculas complejas que contienen LPS y fosfolípidos.
 - 4.- Son liberadas principalmente y si no de manera exclusiva por bacterias gram negativas, entre ellas P. multocida (Srivastava y Foster, 1976).
 - 5.- Son poco tóxicas.
 - 6.- Producen fiebre con frecuencia.
 - 7.- Son relativamente estables.
 - 8.- Conservan su toxicidad después de calentamiento a 60°C.
 - 9.- No se alterán cuando se guardan a la temperatura ordinaria, ni con la exposición a la luz ultravioleta.
 - 10.- Son débilmente antigénicas.
 - 11.- No estimulan la formación de antitoxina.
 - 12.- Estimulan la formación de anticuerpos al residuo del polisacárido.
 - 13.- No son convertidas a toxoides.
- (Bier, 1977; Dulbecco y cols., 1980; Robert y cols., 1981; Sanford 1982)..

2.1 Obtención y Caracterización de Endotoxinas, Exotoxinas y Otros Compuestos.

En 1977 Kunwar y cols., obtuvieron de una cepa de P. multocida, fracciones inmunogénicas que fueron separadas de filtrados de cultivo en una columna de Sephadex; una parte fue extraída con éter la llamada glicopolisacárido (GLP), una parte no tratada (IF); y la última extraída con fenol llamada lipopolisacárido (LPS); estas fracciones resultaron ser protectoras en un 61%, 41%, y 19% para ratón respectivamente contra los cambios letales de P. multocida.

Un grupo de investigadores, aislaron endotoxina de bacterias gram negativas, que en forma de complejo usualmente se han infiltraciones perivasculares mononucleares en un periodo de 3 a 6 hrs., cuando el inóculo de la dosis dan una inflamación mínima (Greisman y Hornick, 1972).

En otro estudio encontraron que un efecto de las endotoxinas puede ser mediada como una acción citotóxica, sobre linfocitos pequeños a partir de extractos con fenol (Han y cols., 1973).

En 1976, Ehler y su grupo lograron caracterizar un LPS de algunas cepas de P. multocida detectando la presencia de lipopolisacárido como: glucosamina, L. glicero-D-monoheptosa, D-glicero heptosa, glucosa y galactosa, como principales compuestos y en ninguna forma equivalió a los serotipos.

Otro aislamiento de LPS fue aislado a partir de un sobrenadante de H. influenzae tipo b, se precipitó con un detergente catiónico. La endotoxina residual se extrajo con fenol-frío y ultracentrifugación (Anderson y Smith, 1977). También se encontro que este sobrenadante, tiene un complejo lipoproteico además de polisacáridos capsulares (Anderson e Insel 1981a y b)

En 1981, Baluyut y su grupo encontraron en los sobrenadantes de cultivo de P. multocida, una toxina con actividad citotóxica. detectandola con liberación de cromo, previamente tratada. Ellos determinan una correlación de la producción de la citotoxina, con la edad de cultivo (Fase logarítmica) mayor producción y declina en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. La citotoxina fue concentrada y parcialmente purificada. por ultrafiltración secuencial por Diaflo, quedando está en membranas de PM de 300 000, fue altamente lábil y estable al oxígeno, susceptible a cambios extremos de pH y su actividad fue inactivada con tripsina.

Un trabajo reciente demuestra que aislaron de sobrenadantes de cultivos de H. pleuropneumoniae, una exotoxina que purifi-

ficarón por ultrafiltración con Membranas de Amicon, detectandola en geles SDS-PAGE de un PM aproximadamente de 14 000d (De Regules y Noguera,1984).

Recientemente detectaron de P. multocida tipo "D" que la toxina que produce, presente las siguientes características - fisicoquímicas: Es inactivada a 56°C, durante 30 min., sensibilidad a proteasas y a una solución de formalina al 0.2% durante 8 hrs. a 37°C, parece ser sensible a tripsina, precipita en soluciones al 30-40% de sulfato de amonio. permanece en el sobrenadante tras la centrifugación, a 15 000 g y tiene un PM aproximado de 20 000 d (Rutter,1983;Van der Heyden y cols.,1984).

La toxina puede obtenerse del sobrenadante del cultivo bacteriano (De Jong y cols.,1980), o por sonicación del medio -- con bacterias y posterior clarificación por centrifugación -- (Rutter,1983).

Para la detección de la toxina se han usado diversos sistemas biológicos: inoculación intradérmica en cuyes (De Jong y cols.,1980), estudio de letalidad para ratón por vía intraperitoneal (Rutter , 1983), toxicidad para cultivos celulares(Rutter y cols.,1984; Pennings y cols.,1980), y medición de la atrofia de los cornetes nasales en cerdo (Martineau y cols., -1982).

Algunos autores encontraron que P. multocida tipo A produce una necrotoxina pero no ha sido bien comprobada (Söderling y Bergström, 1984).

Por métodos de ultrafiltración se pudieron detectar de células de P. haemolytica, dos antígenos que al caracterizarlos dieron uno de 100 000 y otro de 300 000 d de PM (Donachie y cols.,1984).

Otros trabajos dicen que la concentración preliminar de los productos extracelulares, presentes en el sobrenadante del cultivo bacteriano, es necesario concentrar ya que se presentan con bajas concentraciones, no permitiendo su purificación

y su caracterización, por lo que demuestran que uno de los métodos que permiten una buena concentración de los productos extracelulares es el de la Ultrafiltración, con la ayuda de geles de SDS-PAGE (Blatt,1968;Bixler y cols.,1969;Williams y cols.,1967).

2.2 Electroforesis en Geles de SDS-PAGE

Trabajos importante demuestran que la electroforesis en geles de SDS-PAGE, es un análisis que ha permitido caracterizar y observar la pureza de proteínas. En 1981 Baluyut y cols, encontraron una citotoxina de PM aproximado de 300 000 d en P. haemolytica.

En otro estudio demostraron que por esta técnica, se encontraron 10 serotipos diferentes en la misma bacteria (Thompson y Mould ,1975).

En 1980. Nicolet y cols., encontraron que las proteínas de sus muestras se comportaron igual a los patrones de proteína de sobrenadantes de cultivo de H. pleuropneumoniae, por lo que concluyen que la técnica de electroforesis con geles SDS-PAGE es importante y permite tenerla como una herramienta taxonómica.

Otros autores demostraron similitudes con un género o con una especie de proteínas electroforeticas, pero no entre el mismo género, debido a que los patrones de proteína son especie-especifico(Morris,1973; Nicolet y cols,1980).

3.0 Plásmidos

El término de plásmido fué primeramente usado por Thompson en 1931. Los plásmidos son moléculas circulares de DNA de doble cadena , los cuales se encuentran en el citoplasma de la célula bacteriana idependientemente del cromosoma. Estos plásmidos son replicados y heredados a las células hijas durante la división celular. Los plásmidos pueden ser reconocidos co

constituyentes esenciales de la célula. Estos pueden existir en dos estados alternativos, autónomos ó integrados. En el estado autónomo ellos se replican independientemente del cromosoma -hospedador y usualmente con un paso rápido. El estado integrado se refiere al estado de enlace del episoma al cromosoma del -hospedador (Hahn, 1976; Hayes, 1968; Watanabe, 1963).

3.1 Plásmidos "R"

Muchas de las bacterias resistentes a antibióticos, que se encuentran en el material genético de un plásmido son denominados Plásmidos "R" y el mecanismo de resistencia es completamente diferente al de una mutante cromosómica resistente al mismo antibiótico.

Estos plásmidos causan considerables problemas médicos y veterinarios, por la múltiple resistencia antibiótica (Hahn ; - 1976; Bouanchaud y cols., 1969; Albritton y cols., 1982; Watanabe, - 1963).

Además muchos de estos plásmidos son conjugativos y pueden ser transferidos particularmente entre diferentes géneros de - Enterobacterias y porqué muchos de ellos poseen resistencia específica a uno o más que pueden llegar hasta 6 ó 7 drogas no relacionadas entre sí (Cluzel y Joly, 1978).

El primer aislamiento de resistencia múltiple a drogas fué reportado por Kitamoto, encontrando resistencia a 4 drogas : estreptomycin, tetraciclina, cloramfenicol y sulfas (citado en - Bouanchaud y cols., 1969).

La multiresistencia bacteriana de la quimioterapia de drogas por el descubrimiento del Plásmido "R", es un factor extracromosomal, el cuál es genéticamente responsable de este fenómeno, dando las primeras observaciones de la transferencia del Plásmido "R", entre bacterias gram negativas (Watanabe, 1963).

Los Plásmidos "R", son materiales de autonomía extracromosomal, que llevan la herencia bacteriana, genes de resistencia a diferentes antibióticos (Duck y cols., 1978; Hahn, 1976).

Los antibióticos actúan de tres formas para ayudar a esta transferencia:

- 1) Proveen un medio ambiente en el cual únicamente las bacterias resistentes a la droga pueden crecer.
- 2) Las bacterias de la flora intestinal normal que están más adaptadas a un medio ambiente, que generalmente compiten en contra de los microorganismos patógenos son destruidos por el antibiótico.
- 3) Como resultado de este desorden en la población microbiana se produce un cambio de condiciones de pH, oxigenación, fuerza iónica, etc., que aumentan la transferencia de plásmidos conjugantes.

(Cluzel y Joly, 1978).

3.2 Replicación de Plásmidos

La replicación de los plásmidos se llevan a cabo en dos formas diferentes: La replicación Conjugativa, que ocurre durante la conjugación, en la cual una sola cadena de DNA queda en la célula donadora y la cadena complementaria se transfiere a la receptora y es replicada para formar un duplicado del plásmido en las dos células; y la replicación Vegetativa, que ocurre durante el ciclo normal de la bacteria, asegurando que las células hijas hereden el plásmido durante la división celular. Los dos procesos de replicación son muy similares y no dependen de los mecanismos de replicación de la célula (Cluzel y Joly, 1978; Sinha y Srivastava, 1978).

Estudios hechos han permitido observar que la resistencia a la ampicilina pasa por transformación a E. coli, pudiendo ocurrir esta "in vivo". El Plásmido "R" que da resistencia a antibióticos puede ser mediado por genes llevados por elementos extracromosomales, estos pueden ser transferidos de una célula bacteriana a otra célula bacteriana, dando como resultado, promover un efecto quimioterapéutico para enfermedades-

infecciosas (Rotimi, 1981; Zimmerman y cols., 1979),

En 1963 Watanabe, toma como fundamento que la múltiple resistencia a antibióticos, son llevadas y transferidas por un Plásmido, por lo que podría ser un ejemplo de una herencia infecciosa. Otro trabajo demostró que efectuaron una transducción de resistencia múltiple de antibióticos en Salmonella typhimurium LT-2 con un fago P-22 (Watanabe y Fukasawa, 1961).

3.3 Plásmidos que Confieren Patogenicidad a Mamíferos.

Tres tipos de plásmidos se han encontrado en las cepas aisladas de infecciones de humanos, bovinos y porcinos, los cuales no se encuentran en cepas no patógenas.

- 1) Los plásmidos "Ent" que codifican simultáneamente para la síntesis de dos tipos de enterotoxinas, una termoestable y la otra termolábil en E. coli.
- 2) Los plásmidos "Hly", que especifican la producción de α -hemolisinas, que causan la lisis de los eritrocitos.
- 3) Los plásmidos "K", que son los responsables de la producción de los antígenos sobre la superficie celular de E. coli. (Hda y cols., 1981; Hayes y cols., 1968).

En 1976, Hahn, encontró un plásmido que lleva el Plásmido "R", además de la producción de α -hemolisinas y antígenos de superficie bacteriana o enterotoxinas.

Investigadores encontraron cepas epidermolíticas, productoras de toxinas en S. aureus, obtenidas en diferentes fuentes y fueron presentadas en un plásmido. Además de producir una toxina produce una bacteriocina, que cuando se pierde el plásmido estas dos sustancias se pierden. Muchas Enterobacterias son productoras de bacteriocinas, están determinadas por plásmidos, esto puede ser un rasgo común, para otro género de bacterias. La creciente prevalescencia del plásmido transferible lleva resistencia a antibióticos y esta asociada a factores de patogenicidad, que llevan a serias implicaciones (Hirsch, 1978; Ishiguro, 1981; Rotimi, 1981).

En un trabajo, no llegaron a ninguna comprobación de que -- existiera alguna correlación entre la producción de una tóxi- na en Pseudomona spyngae y la presencia de un plásmido, solo - existió la baja espontánea de la habilidad de producirla, por - lo que no se puede asociar con la baja de plásmidos especifi - cos, pero de alguna manera sugirieron una cierta correlación de la producción de la tóxima y la pérdida del plásmido en otro - estudio (Jamieson y cols., 1979; Jamieson, 1981).

3.4 Plásmidos en Ingeniería Genética.

La ingeniería genética puede ser de considerable importan- cia científica y tecnológica, ya que a través de su tecnolo- gía, es posible producir genes obtenidos a partir de diversas - fuentes dentro de Plásmidos bacterianos "in vitro". Estos ge- nes pueden ser obtenidos a partir de otros microorganismos - en particular a partir de Eucariotes, con el objetivo de obte- ner proteínas o enzimas de interés científico o tecnológico.

Los métodos experimentales, para introducir nuevos genes -- dentro de plásmidos requieren básicamente de dos clases de -- enzimas: Las endonucleasas de restricción las cuales dividen mediante hidrólisis el DNA en sitios específicos y las DNA li- gasas con las que se podrán unir posteriormente los fragmentos hidrolizados (Dulbecco y cols., 1980; Haves, 1968; Watanabe, 1963).

4.0 Compuestos Químicos que Permiten "CURAR" los Plásmidos.

Estudios considerables han sido dedicados a compuestos quí- micos los cuáles permiten, "CURAR", las cepas de ciertas bacte- rias por inhibición o pérdida de : El factor F, El factor R - Resistencia a Penicilinas, entre los más importantes (Hirota, 1957).

Estas drogas antimicrobianas parecen tener la función de -- combinarse con el DNA, distorcionando la estructura y su fun-:

ción, esto es generalizado, ya que para cada compuesto solo -- se especulá en su mecanismo de acción.

El uso terapéutico de drogas antimicrobiales selectivas tóxicas, han conducido a una erradicación de muchas enfermedades infecciosas, por lo que representa un gran triunfo de la Ciencia Médica en el Siglo XX.

Estos agentes son de importancia considerable como herramienta bioquímica en investigaciones experimentales de procesos vivos. Paul Ehrlich, el padre de la quimioterapia, refiere que se les pueden llamar a las drogas tóxicas selectivas como "Ballas Mágicas" ya que actúan directamente en el sitio específico hasta el final (Citado en Waring, 1968).

En 1970 Hohn y Korn; dicen que las drogas pueden inhibir directamente la replicación del episoma, bloqueando la iniciación o polimerización, o pueden prevenir el enlace de replicas del plásmido a los sitios de segregación.

4.1 Naranja de Acridina

Este compuesto pertenece al grupo de las acridinas que son sintetizados químicamente. Estos fueron usados como agentes antibacteriales por algún tiempo.

Las acridinas tienen la habilidad de combinarse con los ácidos nucleicos. Estudios importantes demostraron que ocurren -- cambios en las propiedades físicas del DNA por unión de esta droga. hay un incremento en la viscosidad y una caída del coeficiente de sedimentación y cambios en la difracción de rayos X.

Se han podido obtener resultados "in vitro", se observa un complejo metacromático con DNA y RNA y se plantea, que probablemente la unión de la droga a los pares de bases sea por la estructura secundaria de los ácidos nucleicos.

Estas observaciones llevaron a Lerman a tomar como propósito un modelo de intercalación, para la unión de las acridinas al -- DNA (entre pares de bases adyacentes de la doble hélice), forman una molécula más larga y más delgada, de aquí el cambio de sus propiedades físicas ya mencionadas anteriormente. Lo esencial de esta teoría es que ocurren mutaciones de inserción y -

pueden ser generados por un evento semejante a una recombinación por apareamiento entre moléculas homólogas de DNA, una de las cadenas contiene una acridina intercalada, lo cual es crucial para la explicación de la mutagénesis de inserción que es la separación de las pares de bases, en una distancia exactamente equivalente a la que sería ocupada por cualquier par de bases. La intercalación de compuesto ocurre aunque el DNA no se encuentre en replicación, pero para que se provoque la mutación es necesario la recombinación. (Waring, 1968).

La naranja de acridina (NA), convierte las células F^+ a F^- en E. coli, en este estudio encuentran que el grado de conversión es directamente proporcional a la concentración de la acridina (Hirota, 1960; Hahn, 1976).

Otro estudio importante realizado por varios autores, encontraron que la NA elimina de E. coli el factor F, totalmente. sus resultados indicaron que existía una inhibición inmediata de replicación del episoma, a la adición de la NA (Hohn y Korn, 1969; Yamagata y Uchida, 1969).

En 1981, Rotimi y cols., encuentran que concentraciones subinhibitorias de NA, fué eliminado el Plásmido "R" en Bacteroides spp.

Los factores de resistencia son eliminados por naranja de acridina (Watanabe y Fukasawa, 1961), estos resultados sugieren que la NA fué más efectiva que la acriflavina para esta eliminación, dando como contraste con los datos de Hirota en 1960, que dice que la acriflavina es más efectiva en el sistema de cada uno.

4.2 Otros Compuestos.

Estudios considerables, han sido dedicados a otros compuestos mutagénicos, los cuales de alguna manera, inhiben la replicación del DNA del plásmido, no permitiéndole que esta cumpla con su determinada función.

Algunos investigadores encontraron que los factores citoplásmicos, por la acriflavina se transforman, dando también cambios en el tamaño de las colonias en E. coli cepas F^+ a F^- , o la eliminación de este totalmente, también la resistencia a antibióticos (Hahn, 1976; Mitsuhashi y cols., 1961; Watanabe y Fukasawa, 1960; Watanabe, 1963). Se han planteado importantes parámetros para la eliminación del plásmido con la acriflavina, los cuales son: límite angosto de actividad del pH, inóculo pequeño, medio de crecimiento orgánico, período de crecimiento de aproximadamente 6 horas, incubación fisiológica que soporta el crecimiento de la bacteria (E. coli). (Hahn, 1976).

Otros compuesto que también tienen alguna función semejante a los anteriores son la rifampicina y la novobiocina; estos compuestos permiten la "CURA" del episoma F y el factor R, con dosis subinhibitorias (Johnston y Richmond, 1970; Mc Hugh y Swartz, 1977; Riva y cols., 1973).

Un detergente iónico (SDS), después de crecer con la bacteria, dió como resultado la baja de la habilidad de la producción de la penicilinas, y la "CURA" total del plásmido. Este agente es uno de los más "curativos" para plásmidos (Inuzuka y cols., 1969; Ishiguro, 1981; Lehrbach y cols., 1977; Sostein y Baldwin, 1972).

Se ha visto que la temperatura también es importante para la eliminación de los plásmidos. En un estudio demostraron que hubo pérdida del factor R, con una temperatura de 43°C a 44°C. perdiendo la resistencia a tetraciclina y penicilina. Se cree que la temperatura no permite la replicación del DNA del plásmido en algunas cepas (Asheshow, 1965; Ishiguro y cols. 1980; Setlow, 1977; Smith y cols., 1970).

4.3 Electroforesis en Geles de Agarosa.

Un método importante para caracterizar, comprobar y reconocer la presencia de un plásmido, es la electroforesis en geles de agarosa (EGA), (Arska y cols., 1984; Bouanchaud, 1969).

En 1977, Meyers y cols., describieron que el método de EGA, era un método rápido para la detección e identificación de plásmidos, logrando esto en extractos crudos de DNA de una bacteria.

En otro estudio encontraron tres bandas diferentes de un plásmido que modula la producción de una bacteriocina de Rhizobium leguminosarium, mostradas en EGA y también plásmidos largos de alto PM en Agrobacterium tumefaciens (Brewin y cols., 1980; Casse y cols., 1979).

La demostración de que existía DNA de plásmido, para confirmar la resistencia a antibióticos, se mostró en EGA en una cepa de Bacteroides (MacCarthy y cols., 1984; Rotimi, 1981).

II.- OBJETIVOS

El objetivo principal de ésta investigación fué la de estudiar la relación que podría existir entre el material genético, contenido en un plásmido y la producción de una exotoxina de una cepa tipo "D" , causante de la reacción dermonecrotóxica.

Los hallazgos nos han demostrado que la cepa causante de rinitis atrófica y una probable relación con neumonías son las cepas tipo "D" (Badiola y cols.,1984).

Para el estudio se dividieron en varios objetivos :

- 1.- Aislar y caracterizar, la exotoxina producida por una cepa de P. multocida tipo "D", tomando como modelo experimental el cuve para comprobar su producción.
- 2.- "CURAR" , la cepa control por medio del compuesto de Naranja de Acridina.
- 3.- Comprobar la hipótesis de que la producción de la dermonecrotóxina, esta asociada con el material genético de un plásmido.
- 4.- Determinar cuales son los probables antibióticos a los que confiere resistencia el plásmido.

Lista de Fabricantes (Material y Reactivos)

- 1.- BBL, Beckton Dickinson & Co. Cockeysville, Maryland (USA).
 - 2.- Beckton Dickinson de México. México D.F.
 - 3.- Biolab. Bervelli Massachussets (USA).
 - 4.- Bioclin Laboratorio, Sinaloa. México D.F.
 - 5.- Bioxón de México, Oaxaca (México).
 - 6.- Bio Rad Laboratories. Richmond, California.
 - 7.- Buchler 3-1500, Isco Modelo 494 (USA).
 - 8.- Damon/IEC Division. Modelo DPR 6000 (USA).
 - 9.- Difco Laboratories, Detroit Michigan (USA).
 - 10.- E. Merck, Darmstadt (R.F. de Alemania).
 - 11.- Eppendorff Brinkmann Instrument, Westbury (USA).
 - 12.- Forma Scientific, Modelo 3151, Marieta Ohio (USA).
 - 13.- Grand Island Biological Company N.Y. (USA).
 - 14.- J.T. Backer de México, México D.F.
 - 15.- Labconco Freeze Drv-5. S. Court, Dublin Calif. (USA).
 - 16.- LKB. Stocholm (Sweden).
 - 17.- Mead Johnson de México, México D.F.
 - 18.- Metler, Modelo PC 2000 Zurich, Switzerland.
 - 19.- Microfiltración Systems. D, Court, Dublin Calif, (USA).
 - 20.- Millipore Corporation. Bedford. Massachussets (USA).
 - 21.- New Brunswic Scientific Co. Inc. Edison. N.Y. (USA).
 - 22.- Química Hoechst de México, México, D.F.
 - 23.- Sigma Chemical Company. Saint Louis, Missouri (USA).
 - 24.- Sorvall Suspeed Centrifuge. Connecticut (USA).
 - 25.- Spectronic 88 Bauch & Lomb Illinois, (USA).
 - 26.- Transluminator U.V. (USA).
 - 27.- Ultra-Low Revco Freezer, California (USA)
 - 28.- Unjohn de México, México D.F.
- a).- Cuyes Blancos, donados por el Dr. Roberto Cervantes, de SURESA (Sta. Ana Tecamac Edo. de México). Cepa Hareley-

III.- MATERIALES Y METODOS

A.- Identificación Bacteriana por Pruebas Bioquímicas.

Tras el estudio comparado de los publicados por diversos autores (Mc Allister y Carter, 1974; Cowan y Steel, 1974; Carter 1975; Simmons y Simpson, 1977; Thigpen y cols., 1978), se llegó a la conclusión que el número mínimo de pruebas para la identificación, hasta especie de Pasteurella debía incluir lo siguiente: tinción de Gram, oxidasa, catalasa, oxidación/fermentación, motilidad, crecimiento en agar Mc Conkey, hemólisis en agar sangre 3%, indol, ureasa, producción de SH_2 , producción de ácido a partir de glucosa, sacarosa, manitol, rafinosa, trehalosa y arabinosa¹. Dando también importancia, a características menos objetivas como morfología colonial y olor de cultivo. Todas las pruebas anteriores se realizaron según las técnicas descritas según Cowan y Steel, 1974.

La clasificación hasta especie, de las bacterias del género de Pasteurella, se hizo teniendo cuenta, lo publicado por los autores anteriores resumido en el cuadro siguiente:

	<u>P. multocida</u>	<u>P. pneumotropica</u>	<u>P. ureae</u>	<u>P. haemolytica</u>
Hemólisis	-	-	-	+
Mc Conkey	-	-	-	+
Indol	+	+	-	-
Ureasa	-	+	+	-
Ac. de :				
Glucosa	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+
Manitol	+	-	+	+
Rafinosa	-	+	-	+
Arabinosa	V	V	-	V
Trehalosa	V	+	-	V

Nos. 1, 2, 3, Observar la hoja # 25

B.-Curva de Crecimiento

En un volúmen de 50 ml de CICC⁵, se sembraron inoculos de la bacteria, durante 18 hrs. a 37°C, transcurrido este tiempo se hizo una dilución de esta cosecha (1:10), este inóculo se sembró nuevamente en matraces nefelométricos de 250 ml, equipados con un tubo lateral de 19 mm de diámetro, con 50 ml de CICC fresco y esteril. Las bacterias se incubaron toda la noche en aerobiosis a 37°C en una estufa¹², en un agitador orbital²¹, a una velocidad aproximada de 130 rpm. El crecimiento se determinó cada hora midiendo, la densidad optica a 660 nm en un espectrofotometro²⁵. Como blanco se utilizó CICC -- fresco y esteril, en otro matraz nefelométrico. Se tomo 1 ml de crecimiento bacteriano a la primera y octava hora para -- hacer cuenta viable, en placas con AICC⁵ (Dulbecco y cols., 1980).

C.- Tratamiento para Concentrar la Exotoxina

1.-Crecimiento Masivo de la Bacteria (*)

Con un crecimiento de 18 hrs., se inocularon 4 lts. de MEM Eagle (con sales de Earle¹³ + 3% de CO₂ y 1% de L-glutamina, con agitación constante a 130 rpm a 37°C, durante toda la noche, se procedió a centrifugar⁸, bajo las siguientes condiciones: 45 min., 4°C, a 3000 g.

2.-Filtración (*)

El sobrenadante obtenido por decantación de la centrifugación anterior, se paso por filtros millipore²⁰ de 0.22 um - 0.45 um, 0.65 um y 1.22 um de diámetro de poro de mayor a menor no esteriles, lo obtenido se paso por filtro de 0.22 um -- esteril. Todo se efectuó a una temperatura de 4°C.

3.-Microfiltración(*)

Se tienen datos por investigadores (Rutter, 1983; Van der Heyden y cols., 1984), que la toxina dermonecrotóxica, esta en-

un PM aproximado de 20 000 d, por lo que fué necesario concentrar el sobrenadante filtrado, y para esto se pone en un Sistema de Microfiltración¹⁹, utilizando membranas tipo F que retienen de PM 100 000 y 10 000 d, aplicándoles una presión positiva de 4Kg/cm² generada por una compresora de aire²⁰. Todo el sobrenadante se pasó primero por la membrana de 100 000 d de PM, lo que se obtuvo, se pasó por la membrana de 10 000 d de PM, de aquí se concentró de un volumen inicial de 4 lts, a un volumen final de 150 ml, este proceso se llevó a cabo en un cuarto frío(4°C).

4.- Liofilización(*).

Finalizada la microfiltración, con el objeto de concentrar más la muestra, se prosiguió a liofilizar, los solutos de PM mayores de 10 000, presentes en los 150 ml del volumen final, se repartieron en matraces de 125ml erlenmeyer. Estos se congelaron en un refrigerador²⁷ a -70°C, en un nivel homogéneo, después se colocaron en el interior de la cámara de liofilización¹⁵, se le aplicó vacío, a una temperatura aparente de -50°C, hasta que la liofilización fué del 100% (aproximadamente 4 días). Los liofilizados se almacenaron en refrigeración(4°C).

NOTA: En los pasos de crecimiento masivo, filtración, microfiltración y liofilización, se les determinó la cantidad de proteínas por el Método de Lowry.

(*).-Blatt,1968 y 1969; De Regules y Noguera.1985;Srivastava y Foster,1977;Williams y cols.,1967.

Todo esto se procesó se le efectuó a la cepa normal y a la cepa curada con NA.

D.- Determinación de Proteínas por el Método de Lowry.

Con el fin de determinar la cantidad de proteína que se tenía en cada muestra, se optó por este método que es uno de los más sensibles (Lowry y cols.,1951).

Reactivos:

Solución A ¹³	: Na ₂ CO ₃ 2% en NaOH 0.1N
Solución B ¹³	: CuSO ₄ al 0.5% y C ₆ H ₇ O ₇ Na 1%
Solución C ¹³	: 50 ml de la Sol. A y 1 ml de B.

Técnica :

A 20 µl de la muestra se le agregó 3 ml de la solución C se dejó reposar 10 min, y se le adiciono 0.1 ml del reactivo de fenol sigma, se agitó y se dejó reposar nuevamente 20 min. después se realizó la lectura a una longitud de onda de 750 nm. en un espectrofotómetro.

E.- Tratamiento con Tripsina, Pepsina y Temperatura a la Exotoxina.

Por medio de la técnica de (Rutter, 1983; Van der Heyden y cols., 1984), se prosiguió a tratar la exotoxina con tripsina y pepsina¹⁰. De un cultivo de 18 hrs. de crecimiento, se centrifugó, se prefiltró y se filtró con filtros millipore de 0.22 µm de diámetro de poro, este sobrenadante estéril se le trató con estos dos compuestos llevando a una concentración final de 1 mg/ml, tomando en cuenta la concentración de la muestra de proteína, esto se reposó por 15 min., y prosiguió a inocular intradérmicamente la piel de cuyes^a, para comprobar si se había perdido la actividad de la exotoxina. El tratamiento con temperatura, se trató el sobrenadante igual al anterior hasta tenerlo estéril, entonces se dejó 3 min. a ebullición, y también se inoculó a cuyes. Esto se determinó para la cepa normal y Liofilizado crudo).

F.- Electroforesis en Gel SDS- Poliacrilamida.

Para determinar su PM de liofilizado crudo concentrado final, la microfiltración, de la cepa sin tratamiento y para ver si había perdido la toxina en la cepa curada con NA, ju

to ton los controles, se prosiguió a hacer la técnica de - (LKB¹⁶; Nicolety y cols., 1980), también se metió la muestra del medio de cultivo fresco y estéril, una muestra de filtrado excluido en el proceso de microfiltración, para descartar el hecho de que pudiera tener protefinas menores de 10 000 d. Se usarón dos tipos de tinciones; con Nitrato de Plata y Azul de Coomassie.

Reactivos:

Solución A : Solución Stock de Buffer de Fosfatos

(0.2M, pH=7.1)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ¹³	23.4 g
Na_2HPO_4 ¹³	61.32g
SDS ⁵	6.0 g
H_2O (destilada)	3.0 lts.

Solución B : Buffer de Electrodo

Solución stock de buffer de fosfatos..	1 parte
H_2O (destilada)	1 parte

Solución C : Buffer de Fosfatos para la Muestra

(0.01M, pH=7.1)

Solución de stock de buffer de fosfatos..	5 ml
2-mercaptoetanol ⁹	1 ml
SDS	1 g
H_2O (destilada)	100 ml

Solución D : Solución de Acrilamida-Bis Acrilamida

Acrilamida ⁵	22 g
Bis-acrilamida ⁵	0.6g
H_2O (destilada)	100 ml

Se filtro la solución con papel filtro Whatman No.1 y se guardo en botella oscura a 4°C.

Solución E : Solución de Persulfato de Amonio
 Persulfato de amonio⁵ 0.15 g
 H₂O(destilada) 10.0 ml

Se guardó esta solución en botella oscura a 4°C.

Solución F : Solución de Azul de Bromofenol
 Azul de Bromofenol⁹ 0.03 g
 H₂O(destilada) 12.0 ml

Solución G : Solución Detergente
 Triton X-100⁹ 0.1 ml
 H₂O(destilada).....100.0 ml

Solución H : Solución Fijadora
 Acido Tricloroacético 57.0 g
 Acido Sulfosalicílico 17.0 g
 Metanol⁹150.0 ml
 H₂O(destilada)350.0 ml

Se añaden los ácidos a la mezcla de reacción metanol-agua - destilada.

Solución I : Solución Teñidora (Azul de Coomassie)
 Azul de Coomassie brillante r-250²² ..1.25g
 Metanol227.0 ml
 H₂O227.0 ml
 Acido acético glacial⁹ 46.0 ml

Se disolvió el colorante en la solución de metanol- agua. -
 Se añadió el ácido acético y se eliminó el material insoluble, por filtración con papel filtro Whatman No.1 ;esta solución se guardó en botella oscura.

Solución I' : Solución Teñidora (Nitrato de Plata).
 solución I-1 : Disolver 0.8 g de AgNO₃ en 4 ml de H₂O - destilada.

- solución I-2 : Mezclar 21 ml de una solución al 0.3% de NaOH y 1.4 ml de NH_4OH 14.8 M.
- solución I-3 : Adicionar la solución A gota a gota en la solución B y llevar a un volumen final de 100 ml. Usarse en 5 min.

Solución J : Solución Desteñidora

Etanol ⁹	1500 ml
Acido acético	500 ml
H ₂ O(destilada)	500 ml

Solución K : Solución Conservadora

Etanol	300 ml
Acido acético	100 ml
Glicerol ²⁰	100 ml
H ₂ O(destilada)	500 ml

Desarrollo del Método :

1.- Preparación de los geles SDS-Poliacrilamida.

Se lavará las placas de vidrio con detergente de laboratorio y se acalararán con agua destilada, se montó el equipo para la fabricación de los geles de acuerdo a :

Tipo de Gel : 5%(2×10^4 a 3.5×10^5 d) 10%(1×10^4 a 1×10^5 d)

H ₂ O (destilada)	14.9 ml	-
Solución A	33.0 ml	33.0 ml
Solución D	14.8 ml	29.7 ml
Solución E	1.8 a 2 ml	1.8 a 2 ml
TEMED	0.6 ml	0.6 ml

Se mezcló el agua destilada, la solución A y D en un ma -

traz de vacío. Se eliminó el aire de esta mezcla durante 10-min. y se le añadió la solución E y el TEMED, mezclándose con precaución para evitar la entrada de aire a la mezcla de -- reacción, se vertió inmediatamente la solución en el molde ya preparado, agregándose los últimos mililitros de ésta solución con una pipeta Pasteur. Se cerró la banda de plástico que tiene el molde sin atrapar aire. La polimerización después de una hora de iniciada la reacción.

Terminada la polimerización, se coloca el molde sin las pinzas en un refrigerador a 4°C durante 15 min. , se quita la banda de plástico y se desprenden las placas de vidrio, teniendo cuidado de no romper el gel. Se eliminó la acrilamida no polimerizada con papel filtro y se almacenó el gel a temperatura ambiente durante 12 hrs.. Los geles se utilizaron después de transcurridas 12 hrs. de su preparación, pero no después de 4 días.

2.- Preparación de las Muestras de Proteínas.

Se necesita una relación mínima de SDS-proteína en cada una de las muestras problemas y patrones de PM, es de 0.2 a 2.0 mg/ml .

Las soluciones muestra (Problemas y Patrones), se incuban durante 2 min. a ebullición. Se añadieron 10 ul de azul de bromofenol y 10 ul de 2-mercaptoetanol, a 250 ul de cada una de las soluciones muestras.

3.- Preelectroforesis

Para detectar el frente del marcador de migración de las proteínas problemas y patrones de PM durante la electroforesis se colocó un papel blanco bajo la placa enfriadora del aparato. Se llenó la cámara de electrodos con 1.2 Lts. de -- Buffer de Electrodos.

Se pusieron unos mililitros de solución detergente en la placa de enfriamiento para conseguir un buen contacto térmico con el gel. Se colocó el gel sobre la placa de enfriamiento con cuidado de no dejar aire entre ambas .

Como contacto entre el gel y la solución de electrodos, se emplearon de 8 a 10 papeles filtros Whatman No. 1 por cámara previamente empapados con el buffer de electrodos, asegurándose que los bordes de los papeles quedara paralelos. Se conectó el enfriador de agua hasta tener una temperatura de 5°C. Se colocó la placa anticondensadora y se inició la pre-electroforesis a una corriente constante de 150 mA durante 30 min..

4.- Aplicación de las Muestras

Se aplicaron 10 μ l de cada una de las muestras ya preparadas en sus pozos correspondientes (cerca del polo negativo). Esto se realizó lo más rápidamente posible ya que el azul de bromofenol difunde rápidamente.

5.- Electroforesis

Una vez aplicadas las muestras en el gel, se ajustó la corriente a 20 mA y se mantuvo así durante los primeros 10 min. de la corrida, después de los cuales se ajustó a las siguientes condiciones :

Concentración de Gel	5%	10%
Corriente(mA)	200	190
Voltaje(V)	5	6
Vel. de Migración del frente del colorante(cm/hr)	1.5	1.2
Tiempo total de corrida(hrs)	4	5

La corrida electroforética de las muestras problemas y patrones de PM . se realizó manteniendo constante la corriente. Terminada la electroforesis se midieron las distancias de migración del colorante de cada una de las muestras del centro de las bandas al lugar de aplicación del colorante.

6.- Fijación, Tinción y Conservación de los Geles.

Después de la electroforesis, los geles se fijaron inmediatamente con la solución fijadora, durante 1 hr. a temperatura ambiente.

Una vez fijados los geles se desprendieron de la placa del vidrio de soporte y se prosiguió a teñir. Con azul de Coomassie, se pone el gel en la solución teñidora (I) durante 2 hrs. a temperatura ambiente. Con Nitrato de Plata: Se sumerge el gel en metanol al 50%, durante 1 hr. se tiñe el gel con la solución (I-3), durante 15 min., manteniéndose en agitación, se lava el gel con agua desionizada (5 min.) . Se revela el gel por 15 min., en una solución de 0.25 ml de formaldehído al 38 % y 2.6 ml de ácido cítrico al 10% en 500 ml de agua destilada. Finalmente se lava con metanol al 50% .

Para la Tinción con Azul de Coomassie, se secaron los geles ya teñidos y se sometieron a la solución desteñidora, el tiempo suficiente para remover los restos del colorante en las partes de los geles que no contenían proteínas (aproximadamente 24 hrs.).

Para evitar que los geles se destruyan al secarse, se colocaron en la solución conservadora, durante 1 hr., a temperatura ambiente después de desteñirlos.

El secado de los geles se hizo a temperatura ambiente.

7.- Cálculo de Peso Molecular. (Para la Tinción con Azul de Coomassie).

Se determinó la movilidad relativa de cada una de las proteínas ensayadas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$M.R. = \frac{\text{Distancia de la Migración X Tamaño del gel antes de secar}}{\text{Tamaño del gel después de secarlo} \times \text{Distancia de migración X del frente del colorante.}}$$

Los pesos moleculares de las muestras problemas, se determinaron por interpolación de su movilidad relativa en una gráfica construida con el Log_{10} del PM de cada proteína patrón contra la movilidad relativa de los mismos.

Los patrones de PM (SCHWARZ/ MANN Orangeburg, N.Y. BD), utilizados fueron los siguientes para azul de coomassie:

Patrón	PM(d)
Citocromo C	13 370
Mioglobina	16 900
Quimiotripsinogéno	23 240
Ovoalbúmina	45 000
Albúmina Bóvina	69 000
Gamma- globulina	160 000

7.- Cálculo de Peso Molecular (Para la tinción con Nitrato de Plata).

Se determinó el Rf de cada una de las proteínas ensayadas de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Corrimiento de la Muestra}}{\text{Corrimiento del Colorante}} = R_f$$

Los PM de las muestras problemas, se determinaron por interpolación de sus Rf, en una gráfica construida con el Log₁₀ del PM de cada proteína en el juego o Kit, contra los Rf de los mismos.

Las proteínas contenidas en el Kit y su PM (Pharmacie Fine Chemicals, USA.) utilizados fueron los siguientes:

Patrón	PM (d)
Fosforilasa B	94 000
Albúmina Sérica Bóvina	67 000
Ovoalbúmina	43 000
Anhidrasa Carbónica	30 000
Inhibidor de Tripsina	20 100
Alfa Lacto Albúmina	14 400

G.- Producción de la Dermonecrotina

Para la detección de P. multocida tipo "D" productora de la dermonecrotina se siguió la técnica descrita por De Jong (De Jong y cols., 1980).

Se cultivaron las bacterias en CICC durante 18 hrs., a -- 37°C. El líquido sobrenadante, obtenido por centrifugación a 3000 g durante 45 min., se pasó por un filtro millipore de 0.45 um esteril.

Los cuyes a inocular se "raparon" del lomo y se dividió en 6 áreas a estas se les inocularon 0.1 ml de sobrenadante a probar, con una jeringa¹ por vía intradérmica.

A las 24 y 48 hrs, se realizó la lectura con la aparición

de la reacción cutánea(eritema, edema, induración y necrosis).

Esta prueba se les efectuó a la cepa curada y sin curar - y a el filtrado tratado con Tripsina, Pepsina y Temperatura.

Nota: Las reacciones eritematosas con induración de 1 cm de diámetro se considerarán positivas.

H.- Antibiogramas

Esta prueba se hizo por el Método de Kirby-Bauer(Kirby--Bauer.1966.).Esté método correlaciona el tamaño de zona de inhibición con la suceptibilidad clínica del microorganismo frente a un antibiótico.

Se tomó de un cultivo grueso de toda la noche(18 hrs.)1 ml ,centrifugado 15 min. a 2000 g, se descartó el sobrenadante, se le adiciono SSF o PBS de 5 a 10 ml, se resuspendió homogéneamente, y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones,y se descartó el sobrenadante y se resuspendió de - la misma manera, ya homogéneo , se tomo de 0.1 ml a 0.3 ml- colocandose en el centro de la placa con AMNH⁹ y se extendió con una asa de Dragsky y antes de que seicara fuerón colocados los antibiogramas y los sensidiscos.Se incubaron durante 24- a 48 hrs. a 37°C. La lectura se realizó midiendo los diáme- tros producidos.

I.- "CURA" del Plásmido con Naranja de Acridina (Hahn.1976;- Waring.1968).

Se partió de una concentración de 2000 ug/ml de Naranja - de Acridina (NA)²³, se disolvió en un mínimo de etanol, afo- rándose con agua destilada, se guarda en un frasco amabar a - 4°C. Después de tener la solución preparada se prosiguió a - determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

Se creció la bacteria durante 18 hrs a 37°C y a 130 rpm,- de esté cultivo, se tomó 1 ml para cada tubo(10 tubos), ca-

Técnica

- 1.- De un cultivo de toda la noche(5ml), se centrifugó²⁴ a 3000 g y se cosecharon las bacterias (aproximadamente a 30 min.).
- 2.- Se resuspendieron en la Sol. A con 200 ul. de 5 a 10 min. agitando suavemente.
- 3.- Se agregó 400 ul de la Sol. B y se dejó reposar durante 10 min.
- 4.- Agregar 300 ul de la Sol. C e inmediatamente que se formó el coágulo, se agitó muy lentamente, evitando romperlo y la formación de emulsión.
- 5.- Se congeló en hielo seco-etanol de 1 a 5 min.
- 6.- Se descongeló y se tomó el sobrenadante, pasándolo a tubos Eppendorf¹¹ esteriles
- 7.- Se centrifugó¹¹ a 12 000 g, durante 15 min.
- 8.- El sobrenadante se pasó a tubos nuevos y se agregó 500 ul de etanol absoluto del mejor (-70°C).
- 9.- Se congeló de 5 a 15 min. en la mezcla etanol-hielo seco
- 10.-Se descongeló y se lavó 3 veces con etanol al 90% frío (20°C), con su previa centrifugación.
- 11.-Se dejó secar la pastilla.
- 12.-Se resuspendió la pastilla en Tris-EDTA (20 ul).
- 13.-Se tomó 7 ul de la muestra resuspendida y se le agregó de 1 a 2 ul de colorante (mezcla de xilencianol y azul de bromofenol 1:1), en glicerol al 20%.
- 14.-En un gel de agarosa al 0.7% con 10 pocillos se colocaron las muestras en c/u de ellos. Uno de ellos fué el genoma de Fago restringido con la endonucleasa Hind III.
- 15.-Se corrió el gel con una fuente de poder :45 min, a 85-volts.
- 16.-Después de terminada la corrida,se reveló con bromuro de etidio²³ a una concentración de 0.5 mg/ml.
- 17.-Se lavó con agua destilada el gel y se observó en un transluminador de UV²⁶.

da uno de ellos llevó diferentes concentraciones de NA de (10 a 100 ug/ml como concentración final), después del aforo- constante con CICC, se mezclaron con suavidad, se incubó de- 18 a 24 hr⁵. a 37°C, con agitación constante de 130 rpm. en - obscuridad, después de cada tubo se tomo 1 ml y se llevó - a 10 ml con SSF, se tomó de 0.1 ml a 0.3 ml depositandose en el centro de la caja con AICC, se extendió con la asa de Dragsky y se incubó nuevamente durante 18 a 24 hrs. Se hizo el conteo de colonias que crecieron y se sembraron por se- parado, haciendo un chequeo de pruebas bioquímicas y mi- croscópicas, para comprobar si se trataba de la bacteria es- tudiada. A estas se les hizo antibiogramas.

J.- Extracción del Plásmido.

Para comprobar si la cepa control de P. multocida tipo "D" productora de la dermonecrotina tenía plásmido y éste la - producción de la misma, además de comprobar si la cepa cura- da había perdido el plásmido, se prosiguió a extraerlo por - la técnica de Birnboim (Birnboim y cols., 1979).

Solución A : Glucosa⁹ 50 mM
EDTA²² 1 mM
Tris²³ 10 mM pH= 8

Tris-EDTA se ajustó el pH a 8.2, se esterilizó 15 min./15 lb y se agregó la glucosa, en el momento se le adiciona la li- sozima (5 mg/ml).

Solución B : SDS⁵ 1% P/V en NaOH 0.2N

Solución C : Acetato de Sodio 3M pH=4.8. Es 3M con res- pecto al sodio y 5M con respecto al ace- tato, se esteriliza bajo las mismas condi- ciones de A, se guarda a 4°C.

K.- Cuenta Viable con Diferentes Diluciones y Antibióticos.

Para esta prueba se siguió la técnica de Tilton y Newberg (Tilton y Newberg, 1976).

Las cepas curada y la cepa no curada, se pusieron a crecer toda la noche a 37°C a 130 rpm y se tomó 0.5 ml de estas, por separado en 10 tubos para cada cepa, cada uno llevó diferente concentración (de 10 ug a 100 ug), de los siguientes antibióticos: Lincomicina²⁸, Estreptomina²² y Amikacina¹⁷ aforándose con CICC constante, se incubó durante 18 hrs. con las mismas condiciones. Después de cada tubo con diferente cepa y diferente antibiótico, se tomó 0.1 ml y se llevó a 6 ml con SSF. Se agitó hasta homogenizar y se tomó de cada uno de 0.1 a 0.3 ml, colocándose en el centro de la caja que tiene AMMH, con el asa de Dragsky se distribuye y se incuban las cajas a 37°C, durante 24 a 48 hrs., al cabo de este tiempo se contarán las colonias en cada caja (UFC).

IV. - RESULTADOS

La cepa control de P. multocida tipo "D" que se estudió, -- presentó un plásmido en geles de agarosa, extraído, por la técnica ya descrita, detectándose 2 bandas que se encuentran en un rango de aproximadamente 6557 y 4371 pares de bases, observar (Lámina# 1 y Cuadro # 1).

Además la cepa control se trató con diferentes concentraciones de NA, midiéndose el % de mortalidad (Figura #1), que nos muestra que a 500 ug de NA se encuentra su MIC de la bacteria. De cada concentración además de la de 500 ug, en su respectiva caja se tomaron colonias y se les llevó a cabo la técnica de extracción de plásmido ya descrita, mostrando en los mismos geles de agarosa en que se corrió la cepa control, que la concentración de NA que había permitido "CURAR" el plásmido era la de 400 ug (Lámina #1).

A la cepa control y a la cepa "CURADA" se les llevó a cabo la identificación de pruebas bioquímicas y morfológicas (Cuadro # 2), estos resultados demuestran que las 2 cepas pertenecían al género y especie de Pasteurella multocida.

Partiendo de que la cepa control y la cepa "CURADA" con NA son cepas de P. multocida, se les efectuó un estudio sobre la Curva de Crecimiento Bacteriano, para comparación de estas y al mismo tiempo observar si la "CURA" había afectado en algo su crecimiento, los datos se pueden observar en la (Tabla# 1), donde examinando y comparando, observamos que no hay alguna diferencia importante, solo que la fase estacionaria en la cepa "CURADA" empieza aproximadamente una hora antes, sin embargo los datos son muy semejantes (Figura # 2 y # 3), aquí también podemos observar que la fase logarítmica empieza entre la primera y segunda hora de incubación, prolongándose por seis horas más, antes de llegar a la fase estacionaria.

Electroforesis en Gel de Agarosa

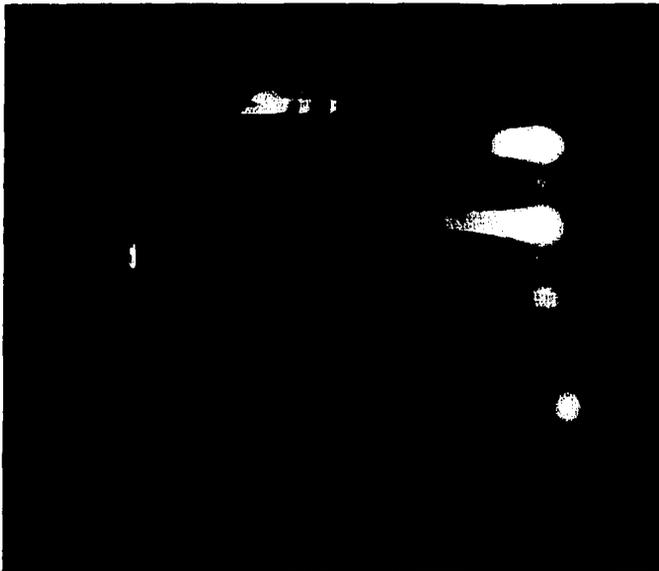


Lámina # 1 .- Corrimiento de muestras patrones y problemas en gel de agarosa al 0.7%.

No. de Pozo.	Muestras
1	Control de Plásmidos (*)
2	-
3	-
4	-
5	-
6	-
7	-
8	Cepa Curada (400 ug de NA)
9	Cepa no Curada(300 ug de NA)
10	Cepa Control

(*) Observar Cuadro # 1.

Datos de pares de bases para un patrón
y muestra problema.

Genoma restringido con la endonucleasa Hind III	
No. de Bandas	Pares de Bases
1a.	23 130
2a.	9419
3a.	6557
4a.	4371
5a.	2322
6a.	2028
7a.	564
8a.	125
Cena de Pasteurella multocida tipo 'D' sin tratamiento	
3a.	6557
Entre	
4a.	4371

Cuadro # 1.-Corrimiento de muestras problemas y patrón en geles de agarosa.

Reacción Dermonecrotóxica

Cepa	Diámetro
Control	1.1 cm
Cepa Curada	0
Cepa -Tripsina	0
Cepa - Pepsina	0
Cepa -Temperatura	0
Cuadro # 2.- Prueba de la - dermonecrotóxica en cuyes vía intradérmica.	

Pruebas Bioquímicas y Morfológicas

Pbas.	Control	Curada
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
O/F	F	F
H ₂ S	-	-
Motilidad	-	-
Indol	+	+
Acido de :		
Glucosa	+	+
Sacarosa	+	+
Trehalosa	+	+
Xylosa	+	+
Rafinosa	-	-
Arabinosa	+	+
Otras caracterís ticas :	Olor característico colonias amarillentas mucos sas cocobacilos gram negativos, bipolares.	

Cuadro # 2.' Comparación de las principales -
pruebas en la cepa control y "Curada"

Concentración Mínima Inhibitoria para la cepa control.

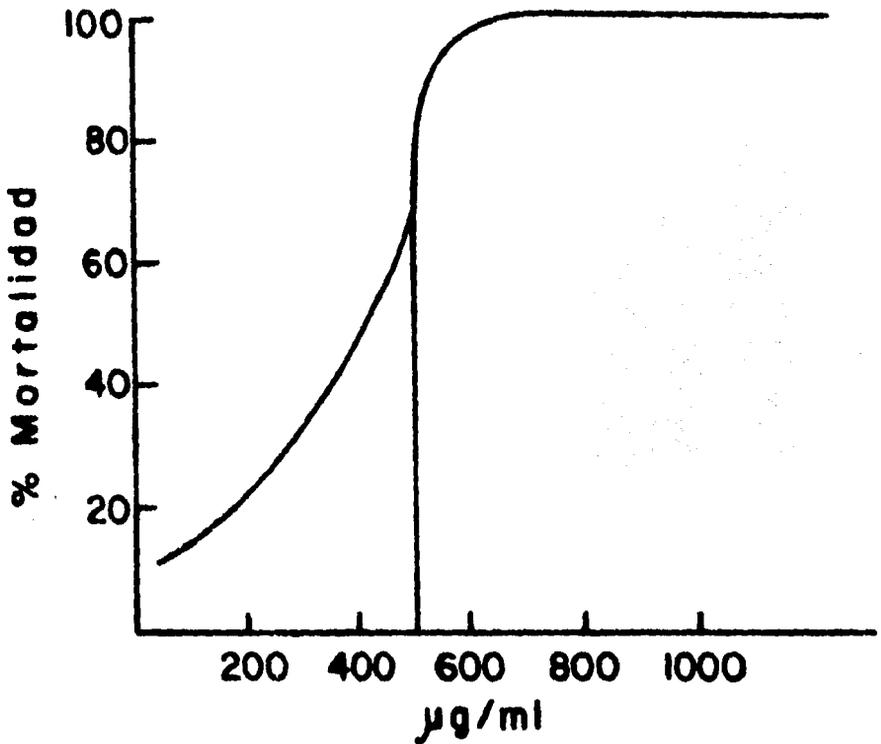


Figura # 1.- Crecimiento de la cepa control, con diferentes -
Concentraciones de NA.

Datos de la Cepa Control Y CURADA para las Curvas de
Crecimiento

Tiempo		Absorbencia		log ₁₀ de la Concentración bacteriana		UFC/ml	
Control	Curada	Control	Curada	Control	Curada	Control	Curada
0	0	0.020	0.019	8.959	8.95	9.1x10 ⁸	9.04x10 ⁸
1	1	0.085	0.085	9.170	9.17	14.8x10 ⁸	14.8 x10 ⁸
2	2	0.370	0.390	9.320	9.38	20.5x10 ⁸	24.5 x10 ⁸
3	3	0.860	0.910	9.500	9.51	31.9x10 ⁸	32.1 x10 ⁸
4	4	1.340	1.300	9.690	9.68	49.0x10 ⁸	48.3 x10 ⁸
5	5	1.530	1.530	10.180	10.18	15.3x10 ⁹	15.3 x10 ⁹
6	6	1.660	1.670	10.650	10.07	45.3x10 ⁹	47.2 x10 ⁹
7	7	1.690	1.690	10.910	10.91	82.3x10 ⁹	82.5 x10 ⁹
8	8	1.780	1.780	10.970	10.97	94.8x10 ⁹	94.8 x10 ⁹
9	9	1.800		11.020		10.5x10 ¹⁰	
10	10						

Tabla # 1 .- Datos obtenidos de la Curva de Crecimiento para la Cepa Control y la Cepa Curada.

Curva de Crecimiento para *P. multocida*
(V_C-Cop)

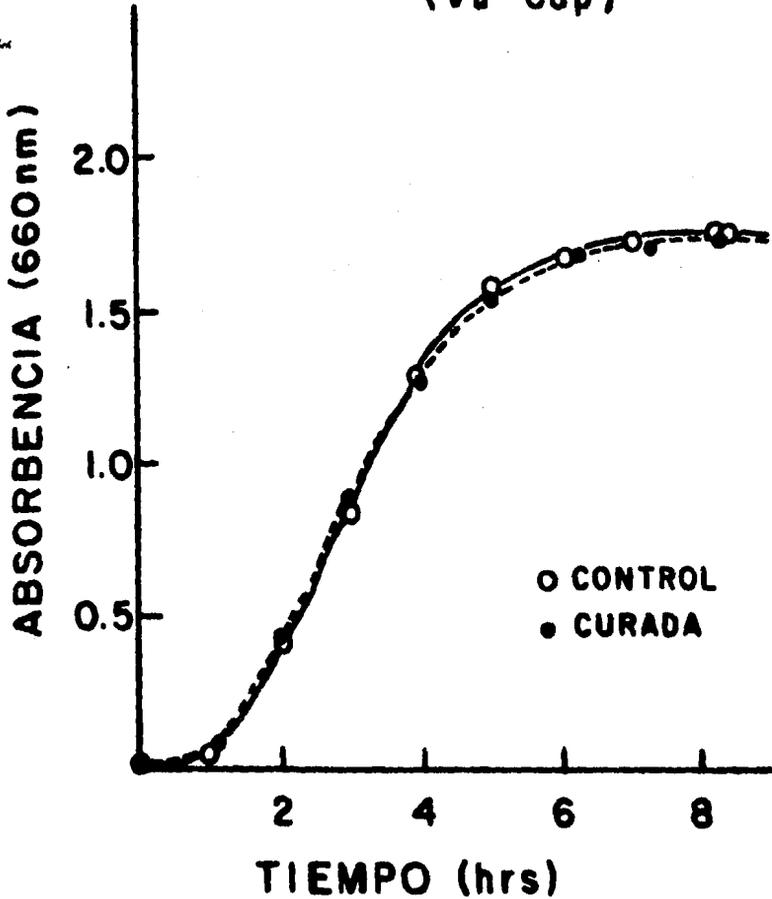


Figura #2,- Crecimientos de las cepas control y "curada durante 8 horas.

Curva de Crecimiento para *P. multocida*

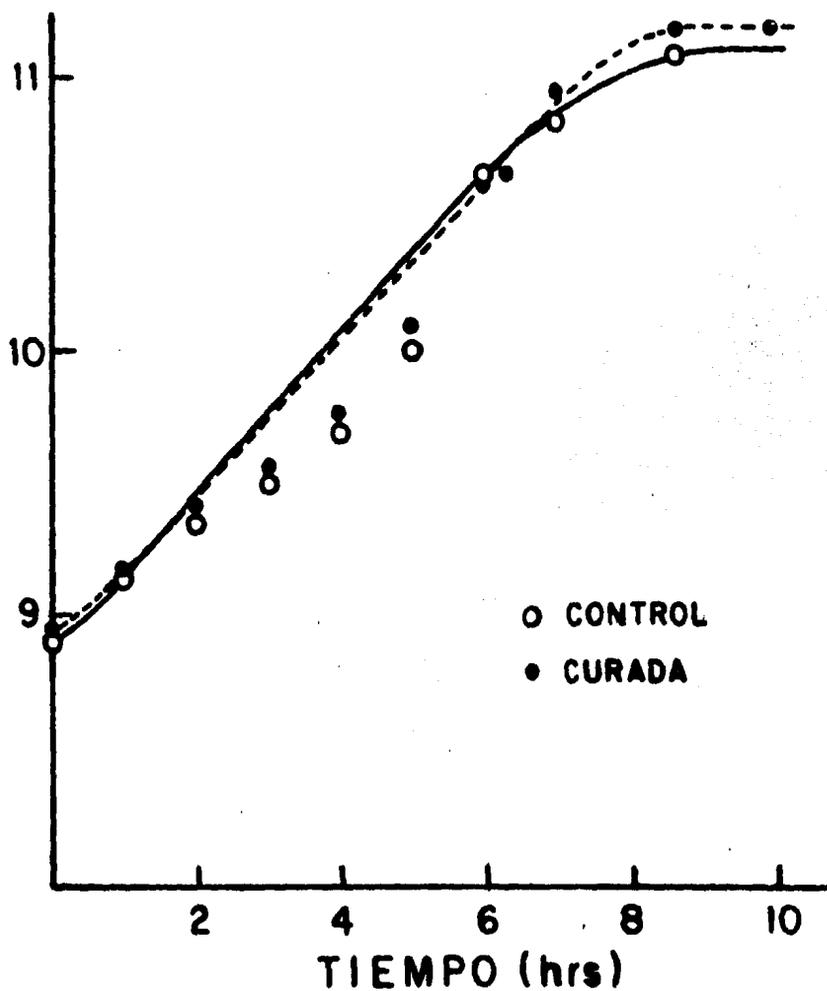


Figura # 3.- Gráfica construida con Log₁₀ de UFC, para ambas cepas.

Por otro lado, la importancia de conocer la concentración de proteína en el sobrenadante de la cepa control, era indispensable; por lo que se optó por un método sensible para la determinación de proteínas (Lowry), que nos permite interpolar los datos en la Curva Patrón, que fué preparada con diferentes concentraciones de albúmina bovina. (Figura # 4).

Como primer paso se determinó la concentración del medio de cultivo sólo y después del crecimiento con la bacteria, mostrando que la concentración aumentaba visiblemente (Tabla # 2), por lo que de alguna manera sugería que se trataba de una Exotoxina. Pero ésta concentración aún no era suficiente, para poder caracterizarla, por lo que se prosiguió a concentrarla mucho mas, por las técnicas ya descritas.

Este método resultó ser relativamente largo, pero dió buenos resultados y se pudo observar que a medida que se concentraba mas la muestra, disminuía el volumen en que se encontraba, llegando por último a obtener una concentración final de: 790 ug/ml (Tabla # 2). La cepa "CURADA" se trató de la misma forma, cuando el proceso llego al final la concentración de proteína era baja en un mismo volumen de la control (Tabla # 2).

Gracias a la concentración final obtenida del sobrenadante de la cepa control previamente tratado, se pudo caracterizar la Exotoxina, llevandose a cabo por Electroforésis con geles de SDS-PAGE, con dos tinciones diferentes, con Nitrato de Plata se corrió la muestra con un KIT de controles de PM, sirviendo para construir la Curva Patrón (Figura # 5), ésta nos permitió interpolar nuestros problemas y así obtener el PM correspondiente. Para la tinción con Azul de Cumasina, se utilizaron otros controles, tomando como datos el \log_{10} del PM y su movilidad relativa, de cada uno de éstos se construyó otra Curva Patrón (Figura # 5), que también interpolando se obtuvieron el PM de la muestra. (Tabla # 4).

Curva patrón de proteínas (Metodo de Lowry)

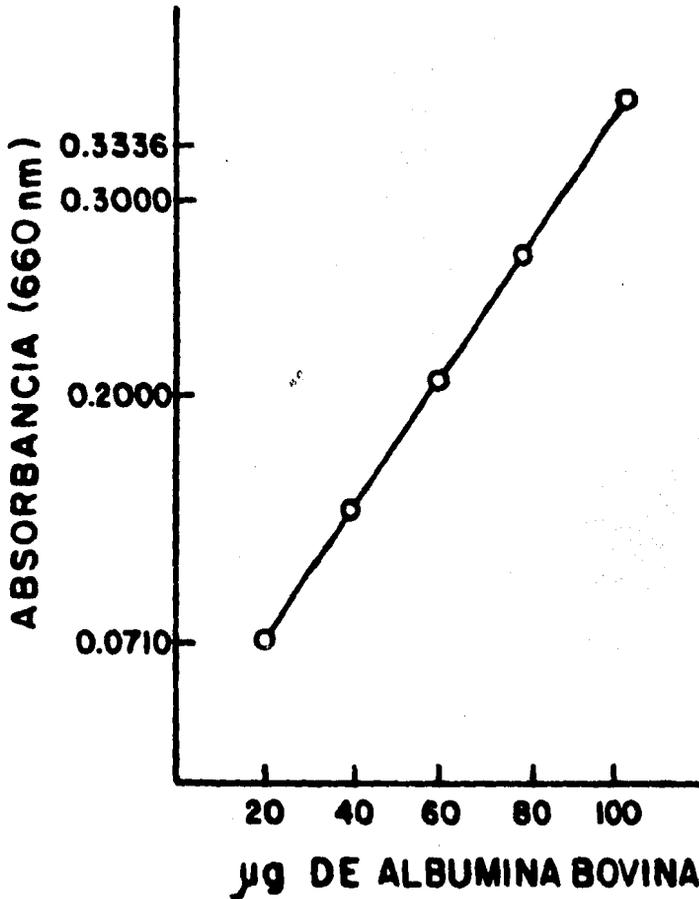


Figura # 4.- Construcción de la Curva Patrón de proteínas con diferentes concentraciones de Albúmina Bovina.

Concentración de Proteínas (Lowry), Cepa Control
y 'CURADA'

Muestra	Concentración de Proteínas ug/ml	Vt. Lts.
Antes del tratamiento		
a) MEM EARLE +3% de- CO ₃ ⁼ + 1% de L-Glu- tamina.	59.31	4.5
b) Sobrenadante de Cul- tivo de 18 hrs.	93.68	4.0
Muestra		
Diferentes Pasos del Tratamiento		
c) Filtrado excluido- en el proceso de - microfiltración.	60.12	2.5
d) Liofilizado del con- centrado final de - la cepa curada.	59.31	0.005
e) Concentrado final de la microfiltración.	616.00	0.150
f) Liofilizado del Con- centrado final de la microfiltración	790.00	0.005
Tabla # 2.- Concentración de Proteínas Antes y Después del Tratamiento Para la Exotoxina		

Datos de la Electroforesis en geles de Agarosa
para la tinción de Nitrato de Plata

Patrones	PM	Log PM	Rf
Fosfolirasa B	94000	4.92	0.192
Albumina Serica bovina	67000	4.83	0.231
Ovalbumina	43000	4.63	0.372
Anhidrasa Carbónica	30000	4.48	0.675
Inhibidor de Trinsi na	20100	4.30	0.846
Alfa Lacto Albumina	14400	4.96	0.847
Muestra Problema			
1	108606	5.04	0.054
2	81283	4.91	0.176
3	74131	4.87	0.216
4	66069	4.82	0.270
5	54954	4.74	0.351
6	33884	4.53	0.554
7	31662	4.50	0.586
8	22387	4.35	0.743
9	17782	4.25	0.838
10	15840	4.20	0.892

Tabla # 3.- Pesos Moleculares .Log de PM y Rf, para la Electroforesis en geles de SDS- PAGE. con tinción de nitrato de plata, para la Cepa Control. y La Cepa Curada.

Curva patrón para la determinación de peso molecular

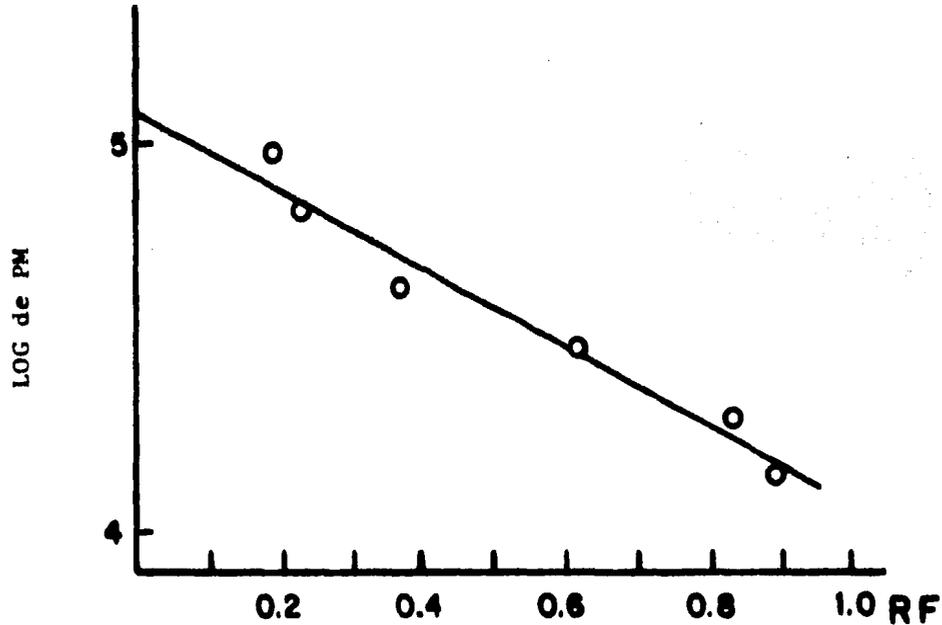
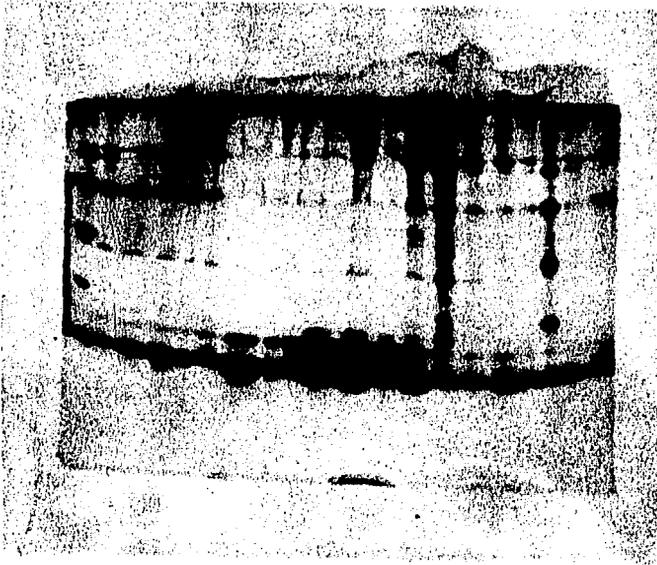


Figura # 5.- Construcción de la Curva Patrón con el KIT de PM para interpolar , y determinar el PM de la muestra.

Electroforesis en Gel de SDS- PAGE



Lámina# 2.- Corrimiento del KIT y la muestra problema -
en geles de SDS-PAGE(cepa control y "curada).

No. de Pozo.	Muestra
1	Cepa sin curar
2	Cepa sin curar
3	KIT* de Calibración
4	KIT* de Calibración

(*) Observar la Tabla #3.

El liofilizado crudo presentó 10 bandas por tinción con Nitrato de Plata, con diferentes PM (Tabla # 3) y Lámina # 2) siendo la banda de aproximadamente de PM 22 000 d, una de las más marcadas en el gel. Este mismo liofilizado se corrió también en otro gel de SDS-PAGE, pero con tinción de Azul de Cu₂masina, donde se detectó una sola banda marcada de aproximadamente 22 000 d de PM. La cepa "CURADA" también se corrió en los mismos geles y tinciones, no presentando ninguna banda (Tabla # 4 y Lámina # 3).

Con el fin de comprobar que el sobrenadante de la cepa control producía la reacción dermonecrotóxica en piel de cuyes, se prosiguió a obtenerla como se describió en Metodología. La cepa control, produjo la lesión característica de un halo de induración y necrosis de aproximadamente 1.1 cm. de diámetro en piel de cuyes (Cuadro # 2°). Por lo que a los sobrenadantes de la cepa "CURADA" con NA y a los tratados con Tripsina, Pepsina y Temperatura se les efectuó la misma prueba, dando como resultado la pérdida de la actividad de la reacción dermonecrotóxica en piel de cuyes (Cuadro # 2°).

De los 20 antibióticos evaluados para ambas cepas por el halo de inhibición de crecimiento bacteriano, la cepa control presentó resistencia a 6 antibióticos (Tabla # 5). De los cuales a dos de ellos se les hizo un estudio estadístico (Prueba t Student), a otros tres se les realizó otro estudio (Análisis de Covarianza) y uno que no se estudió.

Los dos antibióticos a los que se les efectuó el primer estudio estadístico, fueron: cloranfenicol y colimixina, de los cuales la cepa control presentó diámetro de inhibición a igual que la cepa "CURADA" dando en éstos resultados mayores que la cepa control (Tabla # 5), por lo cual se observa que con el tratamiento adquirió la cepa más sensibilidad a estos antibióticos. A partir de dichos resultados se obtuvieron medias, desviaciones estándar y t calculada, para los 20 antibióticos y las dos cepas, esto permitió calcular los in -

Datos de la Electroforesis en geles de Agarosa
para la tinción de Azul de Cumarina,

Muestra Problema	Movilidad	PM
a) MEM EARLE		-
b) Liofilizado Crudo	0.8663	21377
c) Liofilizado Crudo (NA)	-	-
Patrones		
d) Citocromo C	1.0439	13370
e) Mioglobina	0.9892	16900
f) Quimiotripsinogéno	0.8916	25240
g) Ovoalbúmina	0.6086	45000
h) Albúmina Bóvina	0.5204	69000
<p>Tabla# 4.- Movilidades Relativas y Pesos Moleculares. para la Electroforesis en geles SDS PAGE. con tinción de azul de coomassie, para ambas cepas.</p>		

Curva patrón para la determinación de P.M.

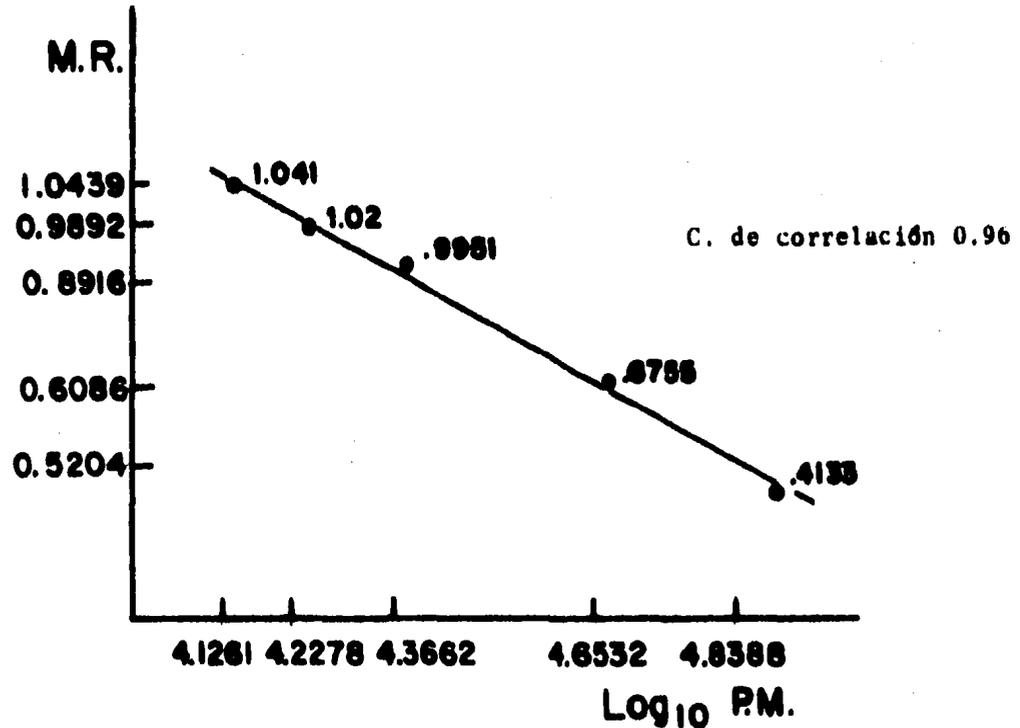


Figura #6.-En está gráfica se representan la movilidades relativas dadas en los patrones de PM, contra el Log₁₀ de suPM.

Electroforesis en Gel SDS- PAGE

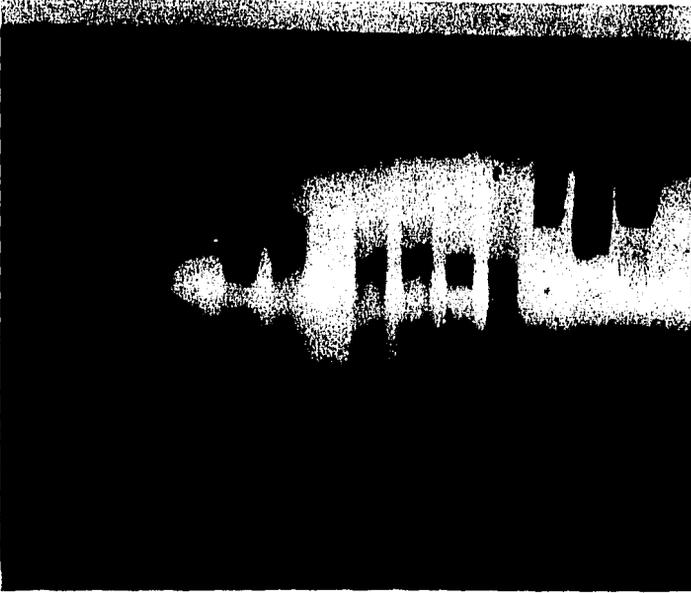


Lámina # 3.- Corrimiento de los preparados de la protef
nas problemas y las proteínas patrones.

No. de Pozo	Muestra
1	Citocromo "C"
2	Mioglobina
3	Qumiotripsinógeno
4	Ovoalbúmina
5	Albúmina Bóvina
12	Liofilizado Crudo
13	Liofilizado Crudo
14	Liofilizado de la Ceba Curada
15	MEM EARLE

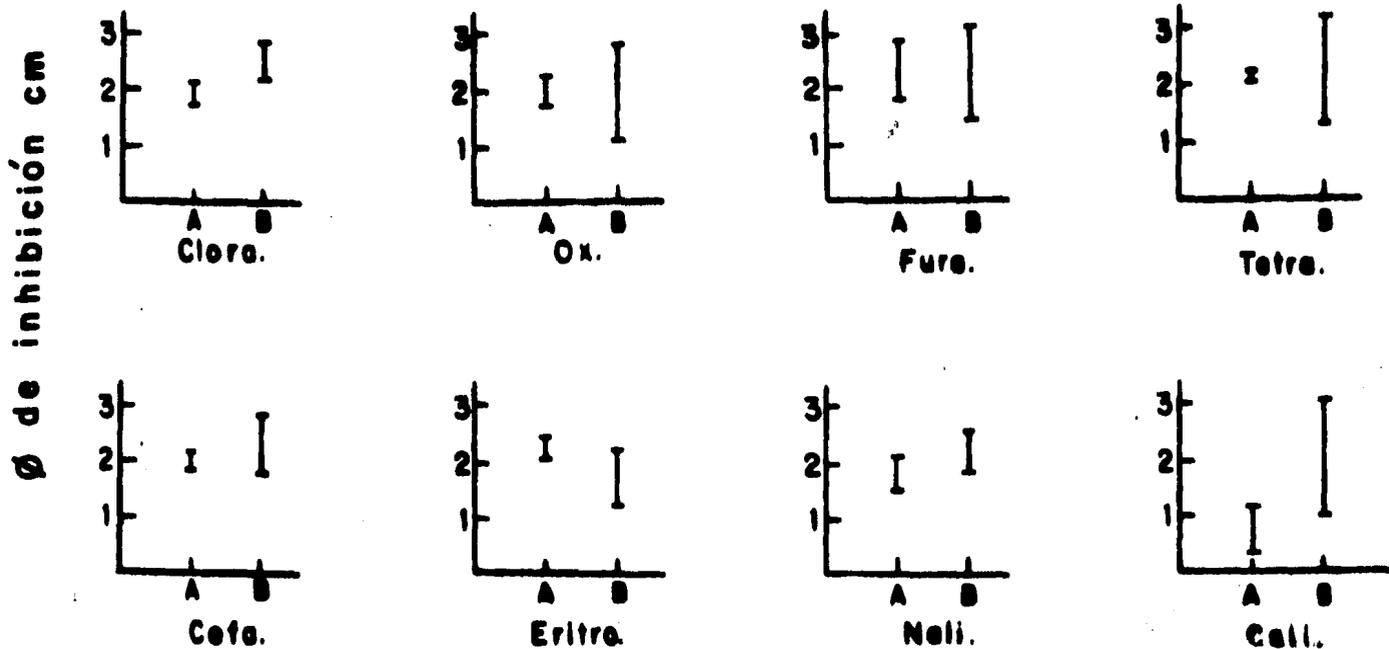
Diferentes Antibióticos para Cepaccontrol y "Curada"

Antib.	Control		Curada		t	Intervalos de Confianza	
	\bar{x}_1	s_1	\bar{x}_2	s_2		Control	Curada
CB	1.55	0.463	2.02	0.759	-1.26	1.06, 2.03	1.07, 2.96
Petra	2.46	0.408	2.22	0.672	0.75	2.03, 2.89	1.30, 3.05
Contra	2.25	0.801	1.80	0.200	11.21	1.40, 3.09	1.55, 3.09
Nall	2.25	0.339	2.24	0.472	0.40	1.55, 2.04	1.89, 2.06
Coli	0.75	0.367	1.87	0.646	-3.58*	0.36, 1.13	1.15, 2.66
Clora	2.55	0.266	2.00	0.187	3.87*	1.76, 2.23	2.27, 2.82
Pura	2.30	1.918	2.22	1.450	0.26	1.91, 2.68	1.45, 2.98
Ox	2.00	0.278	2.02	0.605	-0.12	1.72, 2.30	1.26, 2.77
Cofu	1.95	0.137	2.29	0.408	-1.87	1.90, 2.00	1.77, 2.78
Britro	2.26	0.216	1.84	0.522	1.83	2.03, 2.49	1.24, 2.23
Stx	2.56	0.799	2.12	0.683	0.983	1.72, 3.40	1.27, 2.96
Poni	1.55	0.327	1.42	0.438	0.564	1.20, 1.89	0.87, 1.96
Amol	1.60	0.328	1.46	0.832	0.381	1.25, 1.94	0.42, 2.49
N-30	1.4	0.421	1.48	0.228	0.015	1.05, 1.67	1.19, 1.76
NB-30	1.51	0.803	1.76	0.963	-0.457	0.98, 1.74	0.81, 2.94
CC-2	1.25	0.383	0.94	0.719	0.916	0.83, 1.63	0.82, 1.75
Lanco			1.18	0.521			
PB-30			1.12	0.190			
Strep			1.36	0.410			
Amika			1.92	0.752			
*(Diferencia Significativa)							

Tabla # 5.- Medias, Desviaciones estandar, t calculada e Intervalos de Confianza.

Intervalos de Confianza para la Cepa Control y Curada

61



A = Control

B = Curada

Figura # 7.- Contrucción de gráficas con los diferentes antibióticos para ambas cepas , por medio del diámetro de inhibición.

Intervalos de Confianza para la Cepa Control y Curada

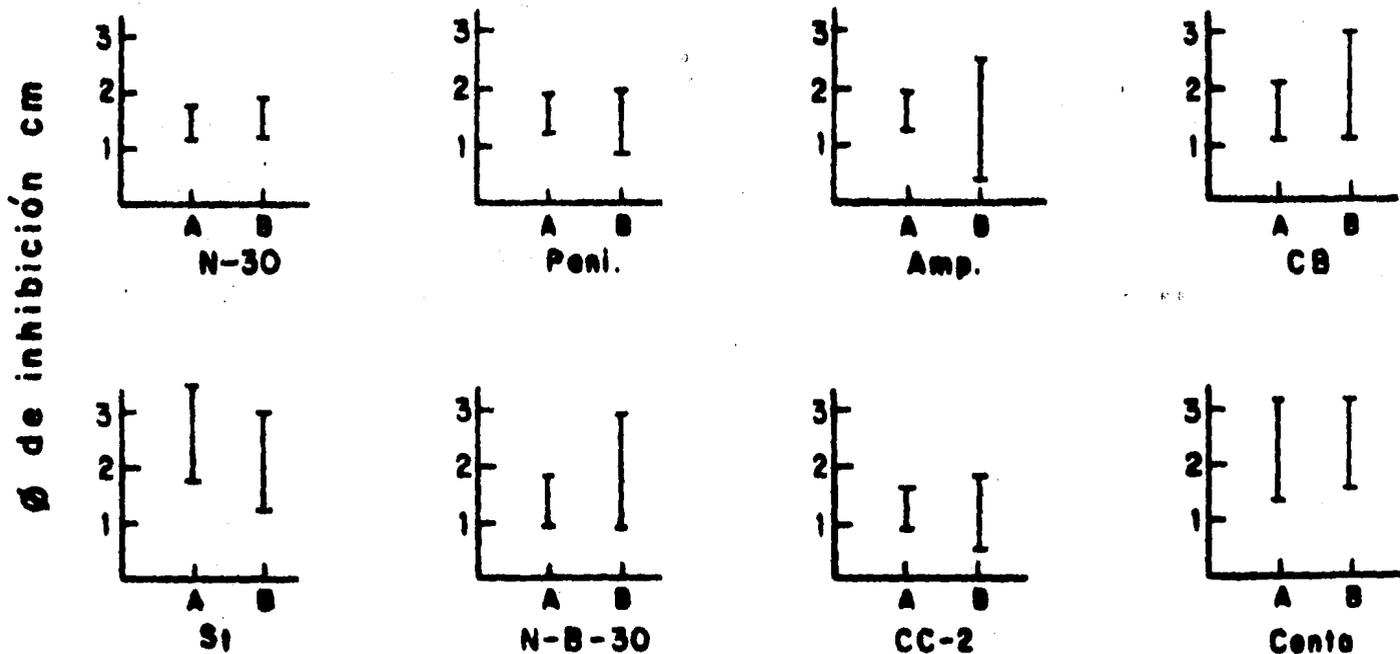


Figura # 7.-Construcción de graficas con los diferentes antibióticos para ambas cepas, por medio del diámetro de inhibición.

tervalos de confianza, que al gráficarlos se observan mejor los resultados (Figura # 7 y # 7'), donde se observa que hubo diferencia significativa, con una razón estadística suficiente ($p < 0.01$), para estos dos antibióticos para dicha prueba.

El segundo estudio se realizó para otros tres antibióticos de los 6 iniciales, donde la cepa control no presentó ningún diámetro y la cepa "CURADA" presentó un diámetro visible, por lo cuál la sensibilidad que adquirió la cepa curada fué muy obvia. A estos se les realizó el segundo estudio estadístico (Análisis de Covarianza), los antibióticos con que se trabajo fuéron Lincomicina, Amikacina y Estreptomocina.

Los datos experimentales ajustados que se obtuvieron de trabajar UFC contra diferentes concentraciones de antibióticos, se muestran en la (Tabla # 6), tanto para la cepa control como la cepa "CURADA" con NA. El estudio de la regresión lineal para los tres antibióticos se muestran en el (Cuadro # 3). Tomando estos datos, se pudo hacer el Análisis de Covarianza (Cuadros # 4. # 5. # 6), para cada antibióticos dando la comparación de rectas. Podemos observar que en las (Figuras # 8. # 9. # 10), existe una diferencia significativa entre las rectas de la cepa control y las rectas de la cepa "CURADA", esto nos indica que una concentración mayor de 45 ug de Estreptomocina, 46.5 ug de Lincomicina y 14.5 ug para Amikacina, las bacterias de la cepa "CURADA" son más suceptibles que las bacterias de la cepa control . Por lo que se puede observar muy claramente que el antibiótico a que la cepa "CURADA" es más suceptible a menor concentración es el antibiótico Amikacina.

Del antibiótico Polimixina no se realizó ningún estudio pero la sensibilidad que adquirió la cepa al "CURARSE" fué obvia.

Comparación de Tres antibióticos en diferentes concentraciones
para la cepa control y "Curada"

Concentración del Anth.	Lincomicina		Amikacina		Estreptomucina	
	Control	Curada	Control	Curada	Control	Curada
10	260, 240	250, 275	200, 220	210 190	255 368	285 290
20	244, 216	220, 220	200, 196	196, 170	257 272	277 265
30	255, 200	210, 215	185, 176	100, 135	222 160	256 200
40	154, 160	170, 183	170, 140	72 55	214 179	199 187
50	100, 110	100, 75	100, 100	35 38	192 158	120 126
60	90, 98	20 34	94, 96	20 16	174 132	55 75
70	76 59	2 0	82, 84	0 0	143 63	18 38
80	22 12	0 0	22 42	0 0	132 52	8 12
90	0 6	0 0	10 12	0 0	35 32	0 0
100	0 0	0 0	0 0	0 0	1 3	0 0

Tabla # 6.- Datos ajustados de la Cepa Control y la Cepa Curada para los tres Antibióticos

Regresión Lineal para Cepa control y cepa "CURADA"

	Estreptomicina		Lincomicina		Amikacina	
	Control	Curada	Control	Curada	Control	Curada
m	-2.88	-4.101	-3.09	-4.25	-2.52	-3.628
b	309.46	339.00	283.5	314.33	3254.2	234.21
C	-0.95	-0.97	-0.98	-0.97	-0.98	-0.97
r ²	0.91	0.95	0.96	0.94	0.97	0.94

Cuadro # 3.- Análisis de Regresión Lineal para las dos Cepas.

Análisis de Covarianza para la Cepa Control y "Curada"

	X ²	XY	Y ²	CR	gl	Sc	Cm
Control	22000	-65420	199247.5	-2.88	20	16424.9	821.15
Curada	12000	-49220	210346.9	-4.10	16	8462.9	528.93
Suma					36	24887.8	691.33
Global	34000	-112640	409594.4	-3.31	37	36424.7	984.45
Total	34990	-112387	409650.1	-3.21	38	48674.8	

Cuadro# 4.- Análisis de Covarianza, para comparar las curvas de regresión de la cepa control y la curada. Fcp = 16.68. gl (1,36). p < 0.01. Para Estreptomicina.

Análisis de Covarianza para la Cepa Control y "CURADA"

66

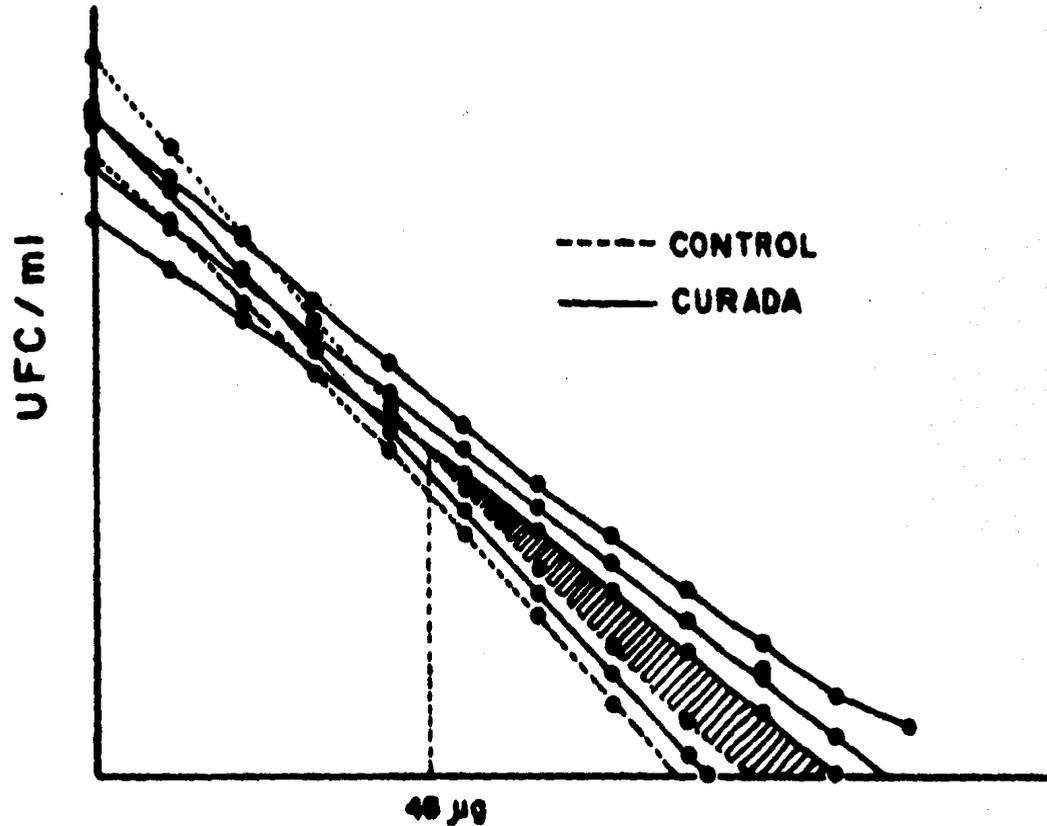
	X ²	XY	Y ²	CR	gl	Sc	Cm
Control	16500	-50960	162958.8	-3.08	18	5569.61	309.42
Curada	8400	-35750	160388.9	-4.25	14	8621.43	615.81
Suma					32	14191.04	443.47
Global	24900	-86665	323347.7	-3.48	33	21708.29	657.82
Total	25788.8	-87506.1	324143.6	-3.39	34	27270.43	

Cuadro # 5.-Análisis de Covarianza para comparar las curvas de regresión de la cepa control y la cepa curada. Fcn=16.95, gl (1,32), p<0.05 Para Lincomicina.

	X ²	XY	Y ²	CR	gl	Sc	Cm
Control	16500	-41625	108208.9	-2.52	18	3200.42	177.80
Curada	5600	-20320	78302.9	-3.62	12	4570.35	380.86
Suma					30	7770.78	259.02
Global	22100	-61945	186511.8	-2.80	31	12883.68	415.60
Total	23952.9	-59798	188999.0	-2.49	32	39713.46	

Cuadro # 6.- Análisis de Covarianza , para comparar las curvas de Regresión de la Cepa Control y la cepa curada. Fcn= 19.73, gl(1,30) , p<0.01. Para Amikacina.

Curvas de Regresión Lineal Antibiótico Estreptomina.



Figura# 8.- Crecimiento de bacterias para la cepa control y la cepa "curada" con diferentes concentraciones del antibiótico.

Curvas de Regresión lineal Antibiótico Lincomicina.

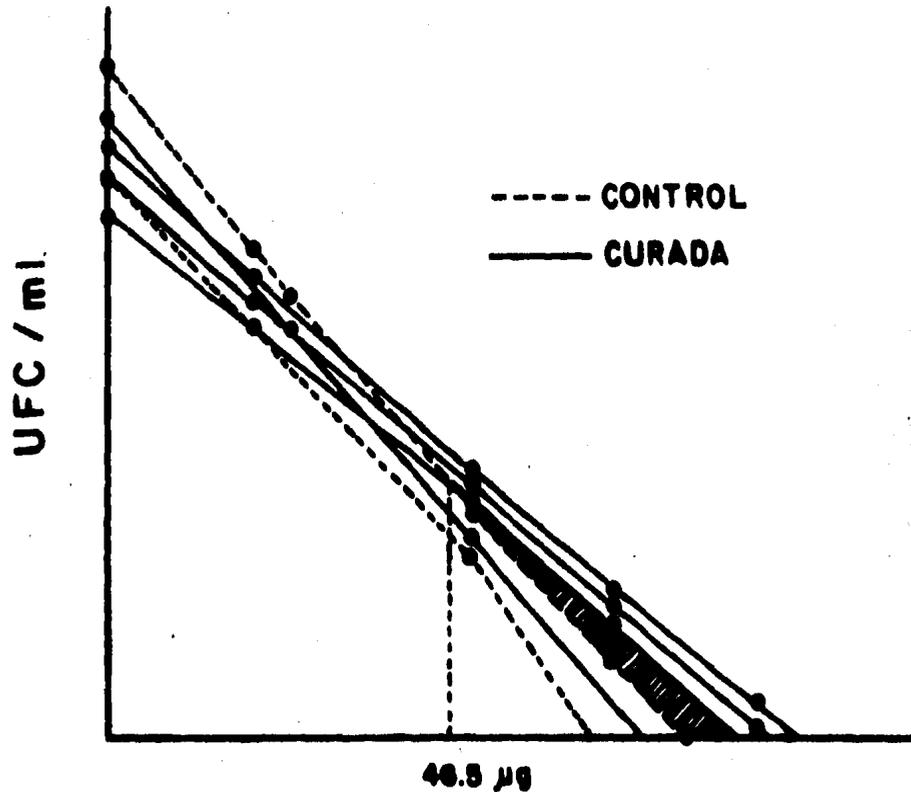


Figura # 9.- Crecimiento de bacterias para la cepa control y la cepa "curada" con diferentes concentraciones del antibiótico.

Curvas de Regresión lineal Antibiótico Amikacina

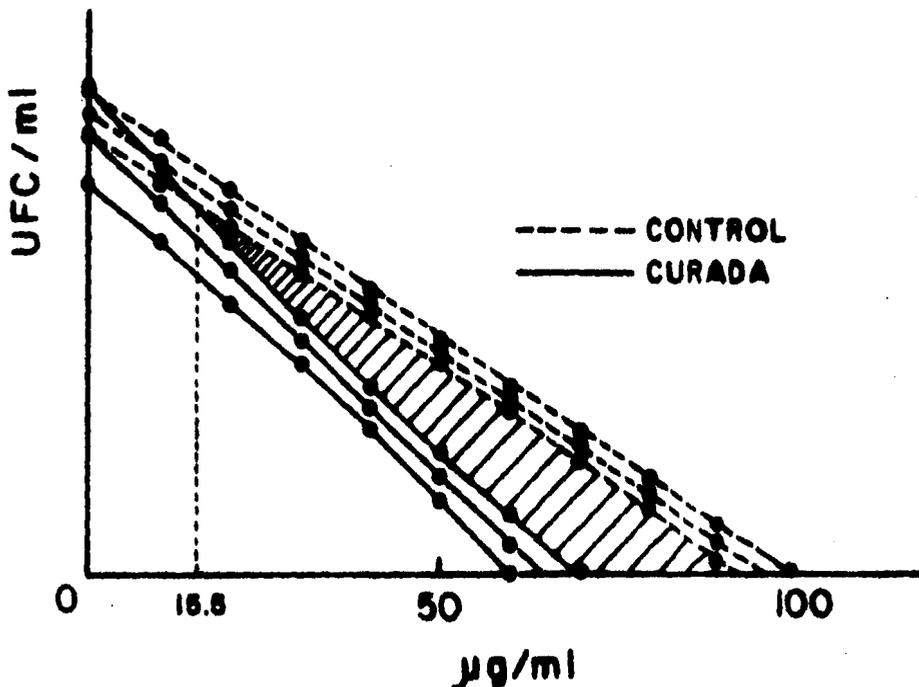


Figura # 10.- Crecimiento de bacterias para la cepa control y la cepa "Curada" con diferentes concentraciones del antibiótico.

V.- DISCUSION

En México la P. multocida es uno de los agentes bacterianos aislados con mayor frecuencia a partir de pulmones neumónicos de cerdos de engorda. Sus mecanismos de patogenicidad no han sido bien aclarados, sin embargo se han propuesto diversas teorías, una de las más consistentes es que la Exotoxina producida por P. multocida tipo "D", es capaz junto con B. bronchiseptica de producir severas lesiones a nivel de cornetes nasales y quizá tener un papel en la patogenia de los cuadros respiratorios del cerdo. En ratón estas cepas mostraron tener mediana patogenicidad en ellos, pero no existe correlación con la dermonecrotina (Pujols y cols., 1984).

En este trabajo la cepa control de la cepa de P. multocida tipo "D" mostró tener después de aplicar la técnica de extracción de plásmidos; dos bandas en geles de agarosa, que se encuentran en un rango de 6557 y 4371 pares de bases (Lámina # 1) siendo ésta cepa productora de la reacción dermonecrotóxica en la piel de cuyes (Cuadro 2°).

La cepa "CURADA" resultó ser la cepa que se trató con 400 ug de NA (Lámina # 1), no se obtuvieron bandas en los mismos geles de agarosa (Lámina # 1), ni la reacción dermonecrotóxica en la piel de cuyes (Cuadro # 2°), lo cual nos hace pensar que la producción de la toxina está íntimamente relacionada con la presencia de un plásmido. Un dato más a favor de que la cepa tratada con NA, a pérdida del plásmido, es el hecho de que ésta cepa perdió con dicho tratamiento la resistencia a 6 antibióticos (Tabla # 5), cuya resistencia se localiza en el material genético extracromosomal. Sobre esto los resultados que se observaron después de la "CURA" fueron estudiados por estadística. La prueba t, permitió observar que la cepa "CURADA", fué medianamente sensible a los antibióticos cloranfenicol y colimixina, con respecto al

al control que presentaba baja sensibilidad para estos antibióticos. Teniendo una razón estadística suficiente ($p < 0,01$) (Figura # 7. # 7'),

El otro estudio estadístico fué el Análisis de Covarianza (Cuadro # 4, # 5, # 6), los resultados sugirieron que en la comparación de rectas, existió diferencia significativa de la cepa control y la cepa "CURADA", como ya se observó (Figuras #8, #9, #10), el antibiótico a que resultaron ser más sensible; las bacterias de la cepa "CURADA" fué la Amikacina, sin embargo los otros dos antibióticos (Lincomicina y Estreptomicina), la concentración disminuyó considerablemente en la cepa "CURADA", con respecto a la control.

El hecho de relacionar la producción de una Exotoxina con la presencia de un Plásmido ha sido ampliamente demostrado por otros autores (Hirsch, 1978; Ishiguro, 1981; Jamieson y cols., 1979; Jamieson, 1981; Rotimi, 1981), en otras bacterias como E. coli, S. typhimurium, sin embargo nuestro hallazgo es el primero en la literatura, en correlación con la producción de la dermonecrotina de P. multocida, con la presencia de un plásmido con ésta bacteria. Esto además sugiere que la técnica utilizada para "CURAR" los plásmidos es adecuado y aplicable a bacterias con requerimientos altos para su crecimiento, esto se correlaciona con otros autores (O'reilly, 1981; Waring, 1968; Watanabe, 1961), que muestran que a concentraciones subinhibitorias de NA se "CURAN" plásmidos "R" y ciertas toxinas codificadas en los mismos.

Por otro lado intentamos purificar ésta toxina con el fin de corroborar los hallazgos ya mencionados por medio de Electroforesis con geles de poliacrilamida- SDS. La cepa control excretó al medio de cultivo proteínas que fueron caracterizadas con dichos geles y teñidas con experimentos por separado con Nitrato de Plata y Azul de Cumasina. En la tinción con Nitrato de Plata se pudieron distinguir 10 bandas, de las cuales, la más abundante es una con PM aproximado de 22 000 d (Lámina # 2). Ahora bien con la técnica de Azul-deCumasina -

se observa solo esta banda, la cuál no aparece cuando analizamos la cepa sin plásmido (Lámina #3), Aunque este hecho no demuestra que dicha banda sea la correspondiente a la Exotoxina. Algunos datos en la literatura (Van der Heyden y cols.,1984- y Rutter y cols.,1983), nos hacen pensar que por la similitud en el PM observado dicha banda podría ser asociada a la actividad dermonecrotóxica de P. multocida tipo "D".

Los datos obtenidos con los tratamientos, Tripsina, Pepsina- y Temperatura sobre los sobrenadantes tratados, de los crecimiento bacterianos de la cepa control (Cuadro #2°), nos demuestran que esta Exotóxina es sensible a dichos tratamientos lo cuál sugiere que sea una proteína. Hasta el momento todas las Exotoxinas bacterianas encontradas han resultado ser proteínas, son excretadas por los microorganismos que las producen al medio circundante en que crecen; su concentración en la mayoría de los casos parece ser paralela al crecimiento bacteriano; son polipéptidos de 10 000 a 900 000 d, producidas por algunas bacterias gram negativas; producen efectos tóxicos altamente específicos en ciertos tejidos; no producen fiebre en el huésped; son poco estables; pierden rápidamente su toxicidad por calor a 60°C y se alteran rápido a la temperatura ordinaria o por exposición a la luz ultravioleta; pueden ser convertidas a toxoides atóxicos antígenicos (Robert y cols.,1981; Sanford,1982).

El tratamiento con NA, no parece generar cambios sustanciales en la fisiología de la bacteria ya que ambas cepas tienen curvas de crecimiento similares (Figura # 2, #3), las pruebas bioquímicas utilizadas en el presente estudio dieron resultados idénticos. Es más, la cepa "CURADA" reúne los requisitos para pertenecer al grupo de P. multocida tipo "D" (Cuadro #2). Incluyendo entre éstas la prueba de acriflavina característica de este tipo bacteriano (Pujols y cols.,1984).

En base a lo mencionado anteriormente podemos suponer que la información genética para la producción de la dermonecrotóxina de P. multocida tipo "D", se encuentra localizada en un plásmido tipo "R" y la cepa que no contiene dicho plásmido mantiene sus características Bioquímicas-Morfológicas, similares al grupo que pertenecen.

Estos hallazgos abren la posibilidad de generar nuevas líneas de trabajos de investigación para poder esclarecer el papel preponderante de ésta toxina en la aparición de rinitis atrófica y/o neumonía enzootica en cerdos.

Se desconoce hasta el momento si la vacunación con un toxoide fabricado a partir de ésta tóxina pudiera conferir protección en contra de dichas enfermedades, sin embargo sería sumamente atractivo el poder evaluar en un futuro esta posibilidad. Otro hecho importante es la posibilidad de que dicho plásmido pudiera pasar por conjugación a otras bacterias como B. bronchiseptica y hacer que dicha bacteria produjera también ésta toxina, ya que algunos datos de la literatura sugieren que algunas cepas de B. bronchiseptica pueden tener una actividad exotóxica parecida a la de P. multocida tipo "D" (Elias B. Comunicación Personal).

VI. - CONCLUSIONES

- 1.- La Exotoxina se aisló de sobrenadantes de cultivo de crecimiento de 18 horas, después de un tratamiento relativamente largo.
- 2.- Los hallazgos obtenidos nos hacen pensar que la fracción de PM aproximado de 22 000 d, sea la causante de la reacción dermonecrotóxica en piel de cuye.
- 3.- La actividad de la dermonecrotóxina se perdió con el tratamiento con Tripsina, Pepsina y Temperatura.
- 4.- Nuestros resultados sugieren que la cepa control contiene un plásmido mostrado en geles de agarosa, siendo el responsable de la producción de la dermonecrotóxina y de la resistencia a antibióticos.
- 5.- La "CURACION" del plásmido permite la desaparición de la actividad dermonecrotóxina.
- 6.¹ La curva de crecimiento no mostró tener ninguna diferencia con la cepa control y la cepa "CURADA".
- 7.- Se encontraron diferencias significativas en las rectas de la cepa "CURADA" con respecto a la cepa control, con varios antibióticos.

VII.- REFERENCIAS

- Albritton, W.; Setlow, J. and Slaney, L. (1982) : Transfer of - Haemophilus influenzae chromosomal genes by cell-to-cell contact. J. Bact. 152 : 1066-1070.
- Anderson, P. and Smith, D. (1977): Isolation of the capsular - polysaccharide from culture supernatant of Haemophilus influenzae tipe b. Infect. and Immunity. 15: 472-477.
- Anderson, P. and Insel, R. (1981a): A polisaccharide protein -- complex from Haemophilus influenzae tipe b. I Activi- ty in weaning rabbits and human T lymphocytes . J. - Infect. Dis. 144 : 530-538.
- Anderson, P.; Insel, R.; Smith, D.; Cate, R. and Glezen W. (1981b) : A polisaccharide protein complex from Haemophilus influenzae tipe b. III.-Vaxinetrial in human adults.- J. Infect. Dis. 144 : 509-519.
- Arcka R. Salters, F. and Strip, V (1984): Degradation of - Echerichia coli chromosomal and plasmid DNA in serum J. Gen. Microbiol. 130 : 217-222.
- Asheshov, E. (1966) : Loss of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus resulting from growth at high tempera- ture. J. Microbiol 42: 403-410.
- Baluyut, C.; Bergeren, K.; Simonson, R.; Bemrick J. and Maheswaran (1981): Interaction of Pasteurella haemolytica with - bovine neutrophils: Identification partial characteri- zation of a cytotoxin. Am. Nat. Rev. 42 : 1920-1942.

- Badiola, S.J.I.; Pujols, R.J.; Ponce, H.C. y Camacho, M.J. (1984): Patrón de remoción Pasteurella multocida D/Necrotóxica y efecto del sobrenadante de un cultivo sobre la remoción pulmonar. Memorias del XIX AMVEC, FES-C (UNAM).
- Bauer, A.; Kirby, W.; Sherrir, J.; Turck, M. (1966) : Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc. - method. Am. J. Clin. Path. 45: 493-496.
- Benacerraf, B. and Unanue, R. (1979) : Textboock of immunology. - The williams;wilkins company, USA. p 1-76.
- Benson, M.; Thomson, R. and Valli, V. (1978): The bovine alveolar-macrophage. II in vitro studies with Pasteurella haemolytica. Can. J. Med. 42(3); 368-369.
- Bentley, E. and Farrington, D. (1980): Evaluation of an induced - Pasteurella multocida swun pneumonie model. Am. J. Vet.-Res. 41(11): 1870-1873.
- Bhasin, J.L. and Lapointe-Shaw, L. (1980a) : Antigenic analysis - of Pasteurella multocida serotype I by crossed immunoelectrophoresis: Characterixation of whole cell associated antigens. Can. J. Microbiol. 26 : 676-689.
- Bhasin, J. and Lapointe-Shaw (1980b) : Antigenic analysis of - Pasteurella multocida serotype I by crossed immunoelectrophoresis: Characterization of whole cell associated-antigens.. Can. J. Microbiol. 26: 1392-1402.
- Bier, O. (1977): Bacteriología e Inmonología. Editorial Melhoramentos Brasil. Cap. 16.

- Birnboim, A.C. (1979) : A rapid alkaline extraction procedure for secreening recombinats plasmid DNA. *Nucleic. Acids. Res.* 7 : 1513.
- Bixler, H.; Huasslein, R. and Nelsen, L. (1969): Separation and purification of biological materials by ultrafiltration *Nat. Meet. Am. Inst. Chem.* 46.
- Blatt, W.F. (1968): The application of selective ultrafiltratio to protein chemistry, *Tech. Report. No. 68* p 40 USA. - *Army. Res. Inst. Enviromental. Med. Natscha. Mass.*
- Blatt, W.F. (1969) : Ultrafiltration a preparative procedure for protein chemistry. *Am. Laboratory.* p 21-30.
- Boat, T. and Cheng, P. (1980): Biochemistry of airway mucus se-cretions. *Fed. Proc.* 39(13): 3067-3075.
- Bouanchaud, D.; Scavizzi, M. and Chabbert, V. : Elimination by -- ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobae-terias and Staphylococci. *J. Gen. Microbiol.* 54 : 417 - 425(1969).
- Bradley, D. (1977) : Characterization of pili determined by --- drug resistance plasmid. *J. Gral. Microbiol.* 102: 349-363
- Brewin, N.; Beringer, J. and Johnston, W. (1980): Plasmid mediated transfer of host-range specificity between two strains- of Rhizobium leguminosarum. *J. Gral. Microbiol.* 120 - :413-420.
- Brogden, K. and Rebers, P. (1978) : Serological examination of -- the westphal type LPP of *Pasteurella multocida*. *Am. J. Vet. Res.* 39: 1680-1682.

- Brogden, K. and Packer, R. (1979) : Comparison of Pasteurella multocida serotyping systems. Am. J. Vet. Res. 40(9): 1332-1335.
- Buxton, A. and Fraser, G. (1977) : Animal microbiology . Blackwell. Sci. Publ. Oxford. 77: 178.
- Casse, P. Boucher, C.; Julliot, J.; Michael, M. and Dé nariés, J.- (1979): Identification and characterization of large plasmids in Rhizobium meliloti using agarosa gel electrophoresis. J. Gral. Microbiol. 113:229-242.
- Carter, G.R. and Bigland, C. (1953) : Dissociation and virulence in strains of Pasteurella multocida isolated from a variety of lesions. Can. J. Comp. Med. 18:473-478.
- Carter, G.R. (1955): Studies on Pasteurella multocida. I.- A hemagglutination test for the identification of serological types. Am. J. Vet. Res. 16 :481-484.
- Carter, G.R. (1957): Studies on Pasteurella multocida. II.- A serological survey of bovine and porcine strains from various parts of the world. Am. J. Vet. Res. 18:437-440.
- Carter, G.R. (1961): A new serological type 1 of Pasteurella multocida from Central Africa Vet. Rec. 73:1052.
- Carter, G.R. (1963): Proposed modification of the serological classification of Pasteurella multocida Vet. Res. 75: 1264.
- Carter, G.R. (1967): Pasteurella multocida and Pasteurella haemolytica. In advances in Vet. Sci. Vol II. C.A. Barndley and C.A. Cornelius(eds) Acad. Press. New York.

- Carter, G.R. (1972): Simplified identification of somatic varieties of Pasteurella multocida causing fowl cholera. -- Avian. Dis. 16:1109-1114.
- Carter, G.R. ; and Subronto, P. (1973): Identification of type D strain of Pasteurella multocida with acriflavina. Am. J. Vet. Res. 34:293-294.
- Carter, G.R. and Rundell, S.W. (1975): Identification of type A strains Pasteurella multocida using Staphylococcal hyaluronidase. Vet. Rec. 12: 343.
- Carter, G.R. (1978): Pasteurella, Yersinia and Francisella. In : Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 3Th. CH.C. Thomas Publisher Illinois p 99-107
- Chen, H. ; Johnson, A. and Kasai, N. (1973): Heterogenicity and Biological activity of endotoxic glycolip from Salmonella minnesota R595. J. Infect. Dis. 128:543-550.
- Chrumbach, A. ; Reisfeld, R.A. ; Wickoff, M. and Zazzari, J. (1967): A procedure for rapid and sensitive staining of proteins fractionated by polyacrilamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 20:150-154.
- Cluzel, R. and Joly, B. (1978): Etude de la résistance au mercure D entérobactéries d'origine hospitalière: Aspects génétique et épidémiologique. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 129 : 167-176.
- Collins, F.M. (1978) Mechanisms of acquired resistance to Pasteurella multocida Infections. A Rev. Cornell Vet. 67: -- 103-108.

- Cowan, S.T. and Steels, K.J. (1974) : Manual for the identification of medical bacteria. 2Th. Cambridge Univ. Press. p 137-142.
- Cowart, R.P. and Backström, L. (1984): Prevalence of dermonecrotic toxin producing Pasteurella multocida swin herds - with varying levels of atrophic rhinitis and pneumonie. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.
- De Jong, M.F.; Oci, H.L. and Tetenbourg, G.L. (1980): AR-pathogenicity test for Pasteurella multocida isolates. Proc. - Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Copenhagen p211.
- De Regules, L.J. and Noguera, M. (1984); Reproducción "in vivo" del cuadro neumónico fibrinonecrotico por una tóxima de Haemophilus pleuropneumoniae serotipo 5. Tesis de Licenciatura. FES-C (UNAM).
- Donachie, W.; Gilmaun, N.; Mouldi, L. and Poxton, R. (1984): Comparison of cell surface antigen extract from two serotypes of Pasteurella haemolytica J. Gral. Microbiol. 130 1209-1216.
- Duck, D.; Dillon, R.; Lior, H. and Eidus, L. (1978): Antibiotic resistance among predominant in Canada. Can. J. Microbiol. 24: 1358-1365.
- Dulbecco, D. and Girnsberg, W.E. (1980): Tratado de Microbiología .2a Edición Cap 22 p 652-664: Salvat S.A. Barcelona España.
- Ehler, W.; Feist, H.; Flossmann, K. and Jacob, B. (1977): Charakterisierung der lipopolysaccharide einiger Pasteurella multocida. Stramme . Arch. Vet. Med. 31 :139-144.

- Gois, M.; Kuska, F. and Sisak, F. (1980): Microbiological findings in the lungs of slaughter pigs. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Copenhagen p 214.
- Gois, M.; Barnes, H. and Ross, R. (1983) : Potentiation of turbinate atrophy in pigs by long term nasal colonization with Pasteurella multocida. Am. J. Vet. Res. 44(3): 372-378.
- Greisman, S. and Hornick, R. (1972) : Cellular inflammatory responses of man to bacterial endotoxemia; A comparison with LPP and other bacterial antigens. J. Immunology 109:---1210-1220.
- Hafstra, H.; Vantal, D. and Dunkert, J. (1980) : Cross reactivity of major membrane proteins of Enterobacteriaceae, studied by crossed immunoelectrophoresis. J. Bacter. 148 : 328-337.
- Hahn, F. (1979): Experimental elimination of R factors. Antib. Chem. 20: 196-226.
- Hampton, C.; Barenkam, S. and Granoff, D. (1983): Comparison of outer membrane protein subtypes of Haemophilus influenzae type b isolates from healthy children in General population and from diseased patients. J. Clin. Microbiol. 596-600.
- Han, I.; Johnson, G.; Coock, J. and Han, S. (1973): Comparative biological activity of endotoxin and synthetic polyribonucleotides. J. Infect. Dis. 128:5232-5236.
- Harris, D. and Switzer, W. (1968) : Turbinate in young pigs exposed to Bordetella bronchiseptica , Pasteurella multocida and combined inoculum. Am. J. Vet. Res. 29:777-785.

- Hayes, W. (1968): The genetics of bacteriophages and their viruses - 2nd Edition, Blackwell Scientific Publications, Oxford. Grant. Britain Cap:10,15,20 y 24.
- Hda, S.; Hanni, C.; Echart, C. and Arber, W. (1981): Is the ISI-flanked *r* determinant of the R plasmid NRI a transposon? J. Gen. Microbiol. 126:413-425.
- Heddleston, K. and Wessman, G. (1972): Characteristics of *Pasteurella multocida* of human origin. J. Clin. Microbiol. 1: 377-383.
- Hirota, Y. (1957): Artificial elimination of the factor F in *Bact. Echerichia coli* K-12. Nature 178: 92
- Hirota, Y. (1960): Elimination of transmissible drug-resistance by treatment with acriflavin. Nature 18:947.
- Hirota, Y. (1961): The effect of acridine dyes on mating type factors in *Echerichia coli*. Genetics. 46:57-64.
- Hirsch, R.P. (1979): Plasmid-determined bacteria on production by *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 113: 219-228.
- Hohn, B. and Korn, D. (1969): Congregation of a sex factor with the *Echerichia coli* chromosome during curing by acridine orange. J. Mol. Biol. 45: 385-395.
- Inusuka, N.; Nakamura, S.; Inusuka, M. and Tomoeda, M. (1969): Specific action of SDS on the factor sex of *Echerichia coli* K-12. Hfr strains. J. Bacter. 100: 827-835.

- Ishiguro, N.; Hirose, N.; Asagi, M. and Sato, S. (1981): Incompatibility of citrate utilization plasmid isolated from Echerichia coli. J. Gen. Microbiol. 123: 193-196.
- Jamieson, A.F.; Bremner, D.A. and Lane, H. (1979): Characterization of plasmids from antibiotic resistant Shigella - is isolates by agarose gel electrophoresis. J. Gen. Microbiol. 113: 73-81.
- Jamieson, A.; Bielecki, R. and Mitchell, R. (1981): Plasmids and phaseolotoxin production in Pseudomonas syringae pv. - phaseolicola 122: 161-165.
- Johnston, J. and Richmond, M. (1970) : The increased rate of Penicillinase plasmids from Staphylococcus aureus in the presence of rifampicin. J. Gen. Microbiol. 60: 137-139.
- Kaehler, K.L.; Markam, R. and Muscoplat, A. (1980): Evidence of cytotoxic effects of Pasteurella haemolytica on bovine peripheral blood mononuclear leukocytes. Am. J. Vet. Res. 41(10): 1690-1693.
- Kass, E.; Porter, P.; McGill, M. and Vivaldi, E. (1973): Clinical and experimental observations on the significance of endotoxemia. J. Infect. Dis. 128: 5299-5302.
- Kielstein, P.; Martin, J. and Janetschke, D. (1977).: Experimental Pasteurella multocida infection of swine a contribution to the etiology of enzootic porcine pneumonia. Arch. Exp. Vet. Med. Leipzig 31: 609-610.
- Kunwar, K.; Srivastava, M. and Foster, J.M. (1977): Characterization of an immunogenic fraction of Pasteurella multocida cultures filtrates. Can. J. Microbiol. 23: 197-201.

- Lehrbach, P. and Kung, H. (1977): Plasmid modification of radiation and chemical mutagen sensitivity in Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Microbiol. 98:167-176.
- Linde, K. (1977): Experimentelle Untersuchungen am mause model mitattenuierten mutanten eines kalberpathogenen Pasteurella multocida stams. Arch. Vet. Med. 31:503-512.
- Little, T. and Harding, D. (1980): The interaction of Haemophilus parahaemolyticus and Pasteurella multocida in the respiratory tract of the pig. Br. Vet. J. 136:371-383.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J. and Farr, L.A. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent J. Biol. Chem. 193: 266-275.
- Markham, R.J. and Wilkie, B.N. (1980): Interaction between Pasteurella haemolytica and bovine alveolare macrophages. cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. Am. J. Vet. Res. 41(1):18-22.
- Martineau, G.R.; Broes, A. and De Jong, M.F. (1982): Experimental reproductions of atrophic rhinitis with Pasteurella multocida on gnotobiotic and conventional piglets. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Congr. México p 88.
- Mc Allister, H.A. and Carter, G.R. (1974): An aerogenic Pasteurella like organism recovered from swine. Am. J. Vet. Res. 35(7):917-922.
- McCarthy, D.; Griffink and Setlow, J. (1984): Plasmid containing DNA ligasa gene from Haemophilus influenzae. J. Bact. 158:730-732.

- Mc Hugh, G.L. and Swartz, N. (19) : Elimination of plasmids from several bacterial species by novobiocin. *Antimicrobial. Agent. Chem.* 12(3): 423-426.
- Maheswaran, S.K. and Thies, E.S. (1979) : Influenzae of encapsulation on phagocytosis of Pasteurella multocida by neutrophils. *Infect. and Immunity.* 26(1):76-81.
- Mitsuhashi, S.; Harada, K. and Kameda, M. (1961) : Elimination of transmissible drug resistance by treatment with acriflavin 189:947.
- Moriss, J.P. (1978): Infection pulmonaire expérimentales à Pasteurella multocida. Influence d'un facteur irritant (NH₃) sur la réceptivité du lapin. *Rec. Med. Vet.* 154(10): 859-863.
- Morrison, J.B.; Pijoan, C.; Hillev, H.D.; Lerman, A.D. and Rapo, V.A. (1984): An etiological investigation into pneumonias in slaughter weight swine. *Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.*
- Muyrty, D.K. and Kaushik, R.K. (1965): Studies on an outbreak of acute swine Pasteurellosis due to Pasteurella multocida type b (Carter 1955). *Vet. Rec.* 77(15):411-416.
- Namioka, S. and Murata, M. (1961): Serological studies on Pasteurella multocida. II. - Characteristics of somatic(O) antigen of the organism. *Cornell. Vet.* 51: 507-521.
- Nicolety, J. and Krawindler, M. (1980): Polyacrilamide gel electrophoresis of whole cell proteins of porcine strains of Haemophilus. *Inter. J. Syst. Bacter.* 30: 69-76.

- Nugent, M. (1981): A conjugative Plasmid lacking autonomous re-
 plications. J. Gen. Microbiol. 126: 305-310.
- Ochoa, G. (1978): Aislamiento y caracterización de agentes ba-
 bacterianos de pulmones neumónicos del cerdo. Tesis-
 de Licenciatura FMVZ-UNAM, México.
- Oréilly, M.; Dougan, G.; Foster, J. and Arbuthnott P. (1981): -
 Plasmids in epidermolytic strains of Staphylococcus-
aureus. J. Gen. Microbiol. 124: 99-107.
- Pedersen, K.D. and Barford, K. (1981): The aetiological signi-
 ficance of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella
multocida in atrophic rhinitis of swine. Nord Vet. 33
 : 513-522.
- Pedersen, K.B. (1982): The occurrence of toxin producing stra-
 ins of Pasteurella multocida in SPF herds. Proc. Int.
 Pigs. Vet. Cong. México. p 82.
- Pedersen, K.B. and Elling, Q. (1984): Persistente atrophic rhi-
 nitis induced by dermonecrotic Pasteurella multocida
 Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.
- Pennings, A.M., Storm P.K. and Bears, J.C. (1984). Porcine a-
 trophic rhinitis: Use of vero cell line monolayer for
 demonstration of termolabile toxins and toxin neutra-
 lizine capacity antisera. Proc. Int. Pig. Vet. Cong. B-
 Belgium.
- Pestf and Lukács, K. (1981) : Staining Technique for peptides
 of Echerichia coli heat stable enterotoxin. Infect. -
 and Immunity 33: 944-947

- Pijoan, C. and Ochoa, G. (1978a) : A bactericidal substance against Pasteurella multocida produced by pig embryo tracheal explant Rev. Lat. Amer. Microbiol. 20:1-3
- Pijoan, C. and Ochoa, G. (1978b) : Interaction between a hog cholera vaccine and Pasteurella multocida in the production of porcine pneumonia. J. Comp. Path. 88:167-170.
- Pijoan, C.; Larios, F.; Iglesias, G. and Monroy, J. (1984): Epidemiology and immunity in locally infected pigs with Pasteurella multocida. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium p 83.
- Pijoan, C. and Trigo, E. (1982) : Pasteurellosis, en: Diagnóstico de enfermedades del cerdo Ed. RR. Necochea y C. Pijoan, México. p 511-514.
- Pijoan, C.; Morrison, R.B. and Hillev, H.D. (1983): Serotyping Pasteurella multocida isolated from swine lungs collected at slaughter. J. Clin. Microbiol. 17:1074-1076.
- Pijoan, C.; Lastra, A. and Ramirez, C. (1984): Preliminary observations on the presence and role of toxigenic Pasteurella multocida in swine pneumonia. Proc. Int. Vet. Soc. Cong. Belgium.
- Pujols, R.J.; Badiola, S.I.; Mendoza, E.S. y Caprián, C.A. (1984): Tipificación capsular de Pasteurella multocida aislada en rastro y patogenicidad para ratón. Memorias del XIX Congreso de AMVEC FES-C (UNAM).

- Raynaud, J.P.; Braunault, G. Maire, V. and Renault L. (1977): Pouvoir pathogene de Pasteurella multocida pour jeune porc. Essai de relisation d'un modele de pneumonie ague experimentale. J. Arch. Porcine France. 165-169.
- Rebers P.A.; Phillips, M. and Rimler, R. (1979): Immunizing properties of lipopolisaccharide from an avian strain of Pasteurella multocida. Am. J. Vet. Res. 41:1650-1654.
- Riva, S.; Fietta, M. and Silvestry G. (1973): Relations shins between curing of the F episome by rifampicin and by acridine orange in Echerichia coli. Lat. Microbiol. Chem. 3: 456-462.
- Rimmler, R.B.: and Bovcott, R.B. (1979): Cross protection between avian porcine and bovine strains of Pasteurella multocida in the mouse. J. Comp. Path. 89:89-98.
- Roberts, R.S. (1947): An inmonology study of Pasteurella septica. J. Comp. Path. 57:261-278.
- Rosembusch, C.T. and Merchant, I.A. (1939) Citado por: Iglesias G. en Estudio sobre sustancias bactericidas presentes en secreción traqueal de cerdo embrionario. Tesis de Maestría, FES-C (UNAM) México. (1981).
- Rotimi, V.: Kuerden and Hafiz S? (1981): Transferable plasmid-mediated antibiotic reistance in Bacteroides. J. Med. Microbiol. 14:359-370.
- Rutter, J.M. (1983): Virulence of Pasteurella multocida in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with Bordetella bronchiseptica. Res. Vet. Sci. 34: 287-295.

- Rutter, J.M. (1984): The toxigenicity of Pasteurella multocida in atrophic rhinitis . Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.
- Sanford, E. (1982): Porcine Haemophilus pleuropneumoniae: Pathology, diagnosis and possible pathogenesis. Am. Ass. of swine. Pract. Annu. Meet. Iowa USA. p 88-94.
- Schöls P. and Thiel, L.P. (1984): Occurrence of toxin producing strains of Pasteurella multocida and Bordetella bronchiseptica in pigs herds with atrophic rhinitis and - in unaffected. herds. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.
- Setlow, J. (1977): Heat sensitivity of Haemophilus influenzae-containing defective profage. J. Bact. 132:1048-1049.
- Shigidi, M.T.A. and Mustafa, A.A. (1980): Serological relationships between strains of Pasteurella multocida. Cornell Vet. 70: 27-36.
- Shoung, Y. and Pakes, S. (1981): Protection of rabbits against - experimental Pasteurellosis by a streptomycin-dependent. Pasteurella multocida serotype 3:A live mutant vaccine Infect. and Immunity 34:1018-1024.
- Simmons, D.A. and Simpson, W. (1977) : The biochemical and cultural characteristics of Pasteurella pneumotropica. Med. Lab. Sci. 34:145-148.
- Sinha, V. and Srivastava, S. (1978): Suppression of pathogenicity by P. and V. plasmid in Vibrio cholerae. J. Gen. --- Microbiol. 104: 251-255.

- Smith,W.; Parsell,Z. and Green.P. (1978a): Thermosensitive an antibiotic resistance plasmid in Enterobacteria. J. -- Gen. Microbiol. 109:337-347.
- SØderlinø,O. and Bergdtrøm,G. (1984) : Bacteriological investigations as a background for vaccination in herds.Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.
- Sostein.S. and Baldwin J. (1972): Nature of the elimination of the Penicillinase plasmid from Staphylococcus aureus- by surface active agents. J. Bact. 111:152-155.
- Srivastava,K. and Foster,J.(1977): Characterization of an immunogenic fraction of Pasteurella multocida of cultures - filtrates . Can. J. Microbiol. 23:197-201.
- Thigpen.E.J. and Clements, E.M. (1978): Isolation of Pasteurella aerogenes from the uters of a rabbit following - aborti on. Lab. Anim. Sci. 28(4):444-447.
- Tilton.R. and Newberg.L. (1976): Diluciones con antibioticos. Técnicas Actualizadas Ed. Panamericana p 88-94.
- Thompson.A. and Mould,D. (1975): Protein electrophoretic pattern of Pasteurella haemolytica. Research. Vet. Sci. 18:342-343.
- Thomson.R.G. (1974): Pathology and Pathogenesis of the common diseases of the respiratory tract. of cattle. Can. Vet. J. 15: 249-251.

- Van der Heyden, P.; Kamp, E.M.; Pals, J.W. and Tetenbourg, G.H. (-1984): Isolation and characterization of a heat labile dermonecrototoxic from Pasteurella multocida. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.
- Van der Marel, G.M.; De Wachter, J.V. and Van Dam, R.H. (1984): Mousse potency test of an experimental Pasteurella multocida vaccine. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.
- Van der Meyering, H.; Dircks, C. and Schooc, P. (1977): Untersuchungen zur Ätiologie der rhinitis atropicans des Schweines. Dtscha. Tierärztl. Wschr. 84: 226-268.
- Waring, M. (1968): Drugs which affect the structure and function of DNA. Nature 219: 1320-1325.
- Watanabe, T. and Fukasawa, T. (1961): Episome mediated transfer of drug resistance of Enterobacteriaceae. J. Bacter. - 81: 619-683.
- Watanabe, T. (1963): Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacter. Rev. 27: 87-115.
- Williams, C.A. and Chase, M.E. (1967): Methods in immunology and immunochemistry. Ed. Academic. Press. New York 1: 65-75-
- Yamagata, H. and Uchida, H. (1969): Effect of acridine orange on sex factor multiplication in Escherichia coli. J. Mol. Microbiol. 46: 73-84.
- Yamamoto, K. and Ogata, M. (1982): Mycoplasma and bacterial flora in the lungs of pigs. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.

- Zimmermann, W.; Rosselet, A. and Knusel, F. (1979): Effect of rifampicin and selective rifamycin derivatives on *Staphylococcal B-Lactamase Plasmids*. *Ann. Acad. Sci.* 182: 329-341.
- Zimmermann, M. and Hirsch, P. (1981): Demonstration of an R - plasmid in a strain of *Pasteurella haemolytica* isolated from feedlot cattle. *Am. J. Vet. Res.* 41: 166-169.
- Zylber, E. and Penman, S. (1969): Mitochondrial associated RNA synthesis inhibition by ethidium bromide. *J. Mol. Biol.* 46: 201-204.