



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores
"CUAUTITLÁN"

"EFECTO DEL VIRUS DE AUJESZKY SOBRE
LA REMOCION PULMONAR DE Pasteurella
multocida EN CERDOS DE ENGORDA"

T E S I S

Que Presenta:

SAID CABALLERO CABALLERO

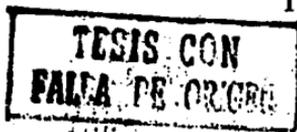
Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Area Microbiología

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1985





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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

I N D I C E

I. RESUMEN	1
II. REVISION DE LA LITERATURA	
ETIOLOGIA DE LA NEUMONIA DEL CERDO	2
1. Consideraciones Económicas	2
2. Clasificación de las Neumonías (descripción general).....	3
3. Agentes etiológicos de las Neumonías Porci- nas	3
4. Interacción entre virus y bacterias en el -- tracto Respiratorio	3
5. <u>Pasteurella multocida</u> como patógeno oportu- nista en los procesos neumónicos del cerdo...	21
III. OBJETIVOS.....	25
IV. MATERIALES Y METODOS	26
MATERIALES	26
1. Animales experimentales	26
2. Bacterias	27
3. Virus	27
4. Aerosolizador	28
METODO	32
Estudio de la Remoción pulmonar de - - - -- <u>Pasteurella multocida</u>	32
1. Preparación del inóculo.....	32
Inoculación de la bacteria por aerosol...	33
Obtención de pulmones	33
Procesamiento de muestras.....	33

2. Remoción pulmonar de <u>Pasteurella</u> - - - <u>multocida</u> a diferentes tiempos posinfec- ción de los cerdos con el virus de la - enfermedad de Aujeszky.....	35
Virus de desaffo	35
Infección de los cerdos con el virus - de la enfermedad de Aujeszky	36
Inoculación de la bacteria a distin- tos tiempos posinoculación de los cer- dos con el virus de la enfermedad de Aujeszky	37
3. Estudio anatomopatológico	37
4. Análisis estadísticos	33
Remoción pulmonar de <u>Pasteurella</u> - - <u>multocida</u>	38
Remoción pulmonar de <u>Pasteurella</u> - - <u>multocida</u> a diferentes posinfección - de los cerdos con el virus de la en- fermedad de Aujeszky	39
IV. RESULTADOS	41
Remoción pulmonar de <u>Pasteurella multocida</u>	41
Efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky so- bre la remoción pulmonar de <u>Pasteurella multocida</u> .	7
Estudio anatomopatológico	
V. DISCUSION	83
VI. BIBLIOGRAFIA	5

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
# 1 : Número de bacterias por gramo de muestra, (BGM) en el experimento de remoción pulmonar de <u>Pasteurella multocida</u>	44
# 2 : Número de bacterias por gramo de muestra, transformación logarítmica (LBGM), medias y desviaciones estandar en el experimento de remoción pulmonar de la <u>Pasteurella multocida</u>	45
# 3 : Medias y desviaciones estandar de los valores de retención bacteriana expresados en LBGM para el pulmón izquierdo, derecho y para el lóbulo intermedio, en el experimento de remoción pulmonar de la <u>Pasteurella multocida</u>	46
# 4 : Medios y desviaciones estandar de los valores de retención bacteriana expresados en LBGM, para los lóbulos craneales, medios y caudales, en el experimento de remoción pulmonar de la <u>Pasteurella multocida</u>	48

Cuadro

- # 5 : Tabla de ANOVA y prueba de Tukey, construídas a partir de LBGM, para detectar diferencias entre el número de bacterias depositadas a la 0 hora y las recuperadas a las 8 y 30 horas tras el aerosol de Pasteurella multocida 50
- # 6 : Tabla de ANOVA construído a partir LBGM, para determinar la existencia o no de un efecto de lóbulos y pulmón sobre la retención bacteriana a la 0 hora tras el aerosol de la Pasteurella multocida 51
- # 7 : Tabla de ANOVA, construído a partir de LBGM, para determinar la existencia o no de un efecto de lóbulo y pulmón, sobre la remoción bacteriana a las 8 horas, posaerosolización de la Pasteurella multocida 52
- # 8 : Tabla de ANOVA, construído a partir de LBGM, para determinar la existencia o no de un efecto de lóbulo y pulmón, sobre la remoción bacteriana a las 30 horas posaerosolización de la Pasteurella multocida 53

Cuadro

# 9 : Comparación de la media de LBGm, de los lóbulos apicales, cardíacos y diafragmáticos (ACD) con la media del lóbulo intermedio (LI), a los 0, 8 y 30 horas, después de la aerosolización de la <u>Pasteurella multocida</u>	54
#10 ; Indices de retención y remoción bacteriana (BGM) estimados a partir de la ecuación de la regresión lineal a diferentes tiempos por aerosolización de la <u>Pasteurella multocida</u>	56
#11 : Medias y desviaciones estandar de los índices de remoción bacteriana (BGM) para los lóbulos craneales, medios, caudales e intermedios, en el experimento de remoción pulmonar de <u>Pasteurella multocida</u>	59
#12 : Medios y desviaciones estandar de los índices de remoción bacteriana (BGM), para el pulmón izquierdo, derecho y para el lóbulo intermedio, en el experimento de remoción pulmonar de la <u>Pasteurella multocida</u>	60

Quadro

- #13 : Resultados individualizados del número de bacterias por gramo de muestra y su transformación logarítmica, al 3^o día posdesafío de los cerdos con el virus de Aujeszky 63
- #14 : Resultados individualizados del número de bacterias por gramo de muestra y su transformación logarítmica al 7^o día posdesafío de los cerdos con el virus de Aujeszky 66
- #15 : Resultados individualizados del número de bacterias por gramo de muestra y su transformación logarítmica, al 15^o día posdesafío de los cerdos con el virus de Aujeszky 67
- #16 : Tabla de ANOVA construído a partir de LBGM, para determinar la existencia o no de un efecto debido a tratamientos sobre el número de bacterias depositadas a la 0 horas en los distintos tiempos posinfección de los cerdos con el virus de Aujeszky 68
- #17 : Tabla de ANOVA y prueba de Tukey, a partir de LBGM, para determinar la existencia o no de un efecto debido a día posinoculación del virus de Aujeszky, sobre el número de bacterias depositadas a las 0 horas en los distintos tiempos posinfección vírica 69

Cuadro

- #18 : Tabla de ANOVA, construido a partir de LBGM, para determinar la existencia o no de un efecto debido a tratamientos, sobre el número recuperadas a las 8 horas en los distintos tiempos posinfección de los cerdos con el virus de Aujeszky 71
- #19 : Tabla de ANOVA y prueba de Tukey a partir de LBGM, para determinar, la existencia o no de un efecto debida a días posinfección del virus de Aujeszky, sobre el número de bacterias eliminados por el pulmón a las 9 horas, a distintos tiempos posinfección vírica 71
- #20 : Medias de los índices de remoción y retención, de la Pasteurella multocida, para los lóbulos craneales, medios y caudales e intermedio, en relación al tiempo transcurrido después del desafío de los cerdos con el virus de Aujeszky 73
- #21 : Medios de los índices de remoción y retención de la Pasteurella multocida para el pulmón izquierdo, derecho y lóbulo intermedio, en relación al tiempo transcurrido después del desafío de los cerdos con el virus de Aujeszky 74

Cuadro

- #22 : Tabla de ANOVA, construido a partir de los índices de la retención bacteriana (BGM), para detectar un efecto debido a día, lóbulo y pulmón a distintos tiempos posinfección de los cerdos con el virus de Aujeszky 75
- #23 : Prueba de Tukey, para detectar diferencias en los índices de retención bacteriana en los lóbulos apicales cardíacos y diafragmáticos, en relación al tiempo transcurrido tras el desafío de los cerdos con el virus de Aujeszky 76
- #24 : Lesiones macroscópicas registradas en el experimento de remoción pulmonar de Pasteurella multocida y en el experimento para detectar el efecto del virus de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de esta bacteria a distintos tiempos posinfección vírica 79
- #25 : Hallazgos histopatológicos en el experimento del efecto del virus de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de Pasteurella multocida, a distintos tiempos posinfección vírica 80

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
# 1 : Medias y desviaciones estandar de los valores de retención bacteriana, expresados en LBGM, para el pulmón izquierdo, derecho y para el lóbulo intermedio en el experimento de remoción pulmonar de la <u>Pasteurella multocida</u>	47
# 2 : Medias y desviaciones estandar de los valores de retención bacteriana, expresados LBGM, para los lóbulos craneales, medios y caudales, en el experimento de remoción pulmonar de la <u>Pasteurella multocida</u>	49
# 3 : Número de bacterias por grano de muestras, transformación logarítmica en relación al tiempo transcurrido tras el aerosol de <u>Pasteurella multocida</u>	55
# 4 : Recta de regresión entre el número de bacterias y el tiempo transcurrido tras la aerosolización de la <u>Pasteurella multocida</u>	57

Figura

# 5	: Indices de remoción bacteriana, transformación logarítmica, en relación al tiempo transcurrido tras la aerosolización de la <u>Pasteurella multocida</u>	58
# 6	: Número de bacterias por gramo de muestra, transformación logarítmica en relación al tiempo transcurrido tras la aerosolización de la <u>Pasteurella multocida</u> , en los diferentes tiempos después del desafío de los cerdos con el virus de Aujeszky	72
Diagrama # 1	109
Diagrama # 2	110
Diagrama # 3	111
Diagrama # 4	29
Diagrama # 5	30
Diagrama # 6	31

ABREVIATURAS EMPLEADAS
EN CUADROS Y FIGURAS (RESULTADOS Y DISCUSION)

- ACD: Lóbulos apicales, cardíacos y diafragmáticos.
- AD: Lóbulo apical derecho.
- ADo: Lóbulo apical derecho en el día cero (control de remoción bacteriana).
- AD3: Lóbulo apical derecho en el día tres posinfección vírica.
- AD7: Lóbulo apical derecho en el día siete posinfección vírica.
- AD15: Lóbulo apical derecho en el día quince posinfección vírica.
- AI: Lóbulo apical izquierdo.
- ANOVA: Análisis de varianza.
- JCC: Infusión de cerebro-corazón.
- BGM: Bacterias (UFC) por gramo de muestra.
- B.M.: Bacterias (UFC) por muestra.
- CD: Lóbulo cardíaco derecho.
- CDo: Lóbulo cardíaco derecho en el día cero (control de remoción bacterianos).
- CD3: Lóbulo cardíaco derecho en el día tres posinfección vírica.
- CD7: Lóbulo cardíaco derecho en el día siete posinfección vírica.
- CD15: Lóbulo cardíaco derecho en el día quince posinfección vírica.
- CI: Lóbulo cardíaco izquierdo.
- C.M.: Cuadrado medio.

- C1 : Cerdo número 1.
- C2 : Cerdo número 2.
- C3 : Cerdo número 3.
- C4 : Cerdo número 4.
- C5 : Cerdo número 5.
- C6 : Cerdo número 6.
- C7 : Cerdo número 7.
- C8 : Cerdo número 8.
- C9 : Cerdo número 9.
- C10: Cerdo número 10.
- C11: Cerdo número 11.
- C12: Cerdo número 12.
- C13: Cerdo número 13.
- C14: Cerdo número 14.
- C15: Cerdo número 15.
- C16: Cerdo número 16.
- C17: Cerdo número 17.
- C18: Cerdo número 18.
- D0 : Día cero (control de remoción bacteriana).
- D3 : Día tres posinfección vírica.
- D7 : Día siete posinfección vírica.
- D15 : Día quince posinfección vírica.
- DD: Lóbulo diafragmático derecho.
- DD0: Lóbulo diafragmático derecho en el día cero (control de remoción bacteriana).
- DD3: Lóbulo diafragmático derecho en el día tres posinfección vírica.

DD7: Lóbulo diafragmático derecho en el día 7 tras la infección vírica.

DD15: Lóbulo diafragmático derecho en el día quince tras la infección vírica.

D.E.: Desviación estandar.

DI: Lóbulo diafragmático izquierdo.

DIP: Días posinoculación del virus (VEA).

ECP: Efecto citopático.

F.: Valor calculado de la "F" de Fisher.

FV: Fuente de variación.

ho: Hora cero tras el aerosol bacteriano.

h8: Hora ocho tras el aerosol bacteriano.

H30: Hora treinta tras el aerosol bacteriano.

G.L.: Grados de libertad.

Kh2: Kiloherz.

L: Lóbulos

LBGM: Transformación logarítmica, base 10 de BGM.

LI: Lóbulo intermedio.

MEM: Medio esencial mínimo.

PBS: Solución salina tamponada, Ph 7.2.

PD: Pulmón derecho.

PI: Pulmón izquierdo.

PMN: Polimorfonucleares neutrófilos.

PSI: Libras por pulgadas cuadradas.

REM: Valores de remoción calculados con los datos UFC expresados en unidades "----".

RET: Valores de remoción calculados con los datos UFC expresados en unidades "----".

S.C.: Suma de cuadrados.

TCID: Dosis infectivas en cultivos de tejidos.

VAC-1: Virus de Aujeszky Cuautitlán #1.

VEA: Virus de la enfermedad de Aujeszky.

\bar{X} : Media aritmética.

1. RESUMEN

La interacción de uno o más agentes etiológicos parece ser la hipótesis más certera para explicar la elevada incidencia y persistencia de las neumonías en las granjas porcícolas. El presente trabajo aportó evidencia de una interacción entre el virus de Aujeszky y Pasteurella multocida en los procesos neumónicos del cerdo, mediante la inoculación de la bacteria por aerosol. En este sentido dos experimentos fueron conducidos secuencialmente: El primero consistió en determinar el patrón de remoción pulmonar de la bacteria bajo condiciones normales de salud del cerdo; el segundo experimento consideró el efecto de la infección de los cerdos con el virus de Aujeszky sobre la eliminación bacteriana del pulmón. La remoción pulmonar de la bacteria se llevó a cabo con patrón progresivo "menos bacterias a mayor tiempo". No se encontró diferencias significativas entre el pulmón izquierdo y el derecho, ni entre lóbulos y sí hubo diferencias entre el número de bacterias depositadas a las 0 horas y las recuperadas a las 8 y 30 horas. En los cerdos infectados previamente con el virus de Aujeszky hubo una marcada disminución de la eliminación bacteriana del pulmón a los 7 días y en menor grado a los 3 y 15 días respectivamente después de la infección viral. También se encontró que la retención bacteriana al 7o. día posinfección viral, fué significativamente mayor en los lóbulos apicales que en los lóbulos cardiacos y diafragmáticos entre los cuales no hubo diferencias. En el experimento de la remoción pulmonar de la bacteria no se observaron lesiones anatomopatológicas en pulmón. Sin embargo, en el segundo experimento se observaron lesiones macroscópicas leves que consistieron en congestión y consolidación en los lóbulos apicales y cardiacos, principalmente el 3o. y 7o. días posinfección vírica. Microscópicamente la lesión más sobresaliente fué una bronconeumonía exudativa con predominio de leucocitos. Por otro lado, estos animales presentaron signos respiratorios leves de corta duración y una respuesta de anticuerpos virus-neutralizantes moderada.

II. REVISION DE LA LITERATURA

ETIOLOGIA DE LA NEUMONIA DEL CERDO

1. Consideraciones Económicas:

Unas de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en las explotaciones porcinas de diversas partes del mundo es atribuida a la alta incidencia y prevalencia de infecciones respiratorias (Jericho, 1968). Este problema se ha visto agravado a partir del establecimiento de sistemas de producción intensivos, los cuales se han caracterizado por un control riguroso de la alimentación, manejo y de la calidad genética de estos animales (Necoechea, 1982; Thomas, 1984).

Dentro de las afecciones respiratorias del cerdo de- en gorda, la neumonía es considerada como una de las causas más importantes de baja productividad (Straw y Cols., 1983). Se considera que el costo de esta enfermedad para las empresas porcinas es elevado, debido a la forma crónica que usualmente presenta, lo que ocasiona pérdidas económicas importantes debidas a deficiente ganancia de peso, retraso en el crecimiento, alto consumo de medicamentos, de vacunas y excesiva permanencia de los cerdos en los corrales de finalización (Pijoan 1985).

En estudios enfocados a determinar el efecto de la neumonía sobre la productividad porcina, han demostrado que el cerdo sufre retraso medido por su ganancia diaria de peso de orden del 5%, cuando este presenta un 10% de tejido pulmonar afectado (Straw 1982). Para otros autores la prevalencia de esta afección en los sistemas de producción porcino ocasiona una reducción del 5.19 al -

7.4% en la conversión alimenticia y una merma del 1.7 al 5.2% en la medida de ganancia diaria de peso (Goodwin, -- 1971).

Desde el punto de vista económico, la patología individual dentro de las explotaciones porcinas extensivas carece de importancia; sin embargo adquiere relevancia cuando se presenta en forma colectiva. Es por esto que las -- neumonías que interesan en esta especie animal son las de tipo infeccioso y especialmente las de alta morbilidad.

En diversas partes del mundo los estudios orientados a determinar la incidencia de neumonías en el cerdo de engorda a nivel de rastro, han mostrado índices variables; -- sin embargo a grosso modo este problema se presenta en forma elevada. En los Estados productores de cerdos en México se ha encontrado un 50% de pulmones neumónicos (Maqueda, 1977). En los Estados Unidos de América se ha reportado -- que entre 30-60% de los cerdos de abasto presentan alguna lesión neumónica (Straw y Cols., 1983). En Brasil se ha -- observado un 17% de pulmones neumónicos en el rastros del Estado de Minas Gerais (Nogueira y Cols., 1982).

Todos los datos presentados aquí revelan la importancia económica que presenta la neumonía para la industria -- porcina de los países productores de proteína animal para consumo humano.

2. Clasificación de las Neumonías (descripción General):

La neumonía se define como el proceso inflamatorio -- del pulmón. Varios autores (Jubb y Kennedy, 1970); Runells y Cols, 1968; Smith y Cols., 1972; King y Cols, 1976), han propuesto diferentes formas para clasificar los diversos - tipos de neumonías y éstos se describirán someramente a -- continuación:

- a) Dependiendo de la vía de entrada del agente al -- pulmón: Vía aerógena, vía hemática, vía linfáti-- ca, solución de continuidad.
- b) Por la extensión morfológica de las lesiones cau-- sadas: Focal o Multifocal (originadas por émbolos bacterianos, abscesos); difusa (reacciones de ana-- filaxia); localmente extensiva (Infecciones por - Mycoplasma y Pasteurella).
- c) De acuerdo a la fase del proceso neumónico: Con-- gestión Inicial (se presenta edema inflamatorio, - capilares distendidos); consolidación roja (hepa-- tización); consolidación gris (hepatización que - ha perdido la coloración rojiza); resolución de - la lesión.
- d) De acuerdo al tipo de exudado; Exudativas, se ob-- servan exudados purulentos (producido por bacte-- rias piogénicas), serosos (Infecciones virales), - mucoso (Infecciones virales y parasitarias), fi-- brinoso (Infecciones por Haemophilus), granuloma-- toso (Infecciones por hongos y micobacterias), - hemorrágicas (producidas por Mycoplasmas y agen-- tes tóxicos); proliferativas (linfocitarias, epi--

telializantes), mixtas (ocurre cuando han infecciones combinadas, como en el caso de la neumonía enzoótica, donde puede haber infecciones por - - Mycoplasma y Pasteurella multocida provocando lesiones proliferativas y exudativas.

- e) De origen Mecánico: Por aspiraciones (cuando llega al pulmón un cuerpo extraño por inhalación); - embólica (formaciones de acumulos de diferente -- origen que obstruyen el pulmón); hipostática - - (cuando el animal se encuentra en decúbito durante períodos prolongados).
- f) Con base al agente infeccioso que la produce: - - Bacterianas (bacterias, Mycoplasmas y Clamidias); Micóticas (hongos miceliados y levaduras); Virales; Parasitarias (fases larvarias o adultos).
- g) Por el curso de la Neumonía: Hiperaguda (se presenta dentro de las 24 horas); Aguda (se presenta entre 24 y 72 horas); Subaguda (3 a 8 días); Crónica (Más de 8 días).

3. Agentes Etiológicos de las Neumonías Porcinas.

Varios agentes microbianos, entre los cuales se incluyen virus, bacterias, Mycoplasma y las condiciones medio-ambientales adversas, pueden ser factores importantes para el establecimiento de la neumonía porcina (Jericho, 1968; Little, 1975; Necoechea, 1982; Thomas, 1984).

Han sido reconocidos como agentes patógenos primarios para el tracto respiratorio del cerdo los siguientes microorganismo: Haemophilus pleuropneumoniae (Kasza y Cols., -- 1969), Virus de la Influenza Porcina (Easterday, 1975, Hernández, 1972), Virus del Cólera Porcino (Pijoan y Ochoa, - 1978), Adenovirus (Kasza y Cols, 1969; Smith y Cols, 1973), Virus de la Enfermedad de Aujeszky (Baskerville, 1971; - - 1972; Alva-Valdés, 1983).

Otros virus tales como los enterovirus, parvovirus, - coronavirus, rotavirus, cytomegalovirus, etc., pueden estar involucrados en las neumonías del cerdo, particularmente - en el lechón. El efecto de estos agentes, sobre el pulmón quizás se deba a una acción secundaria en otros órganos o probablemente estos agentes no sean causantes primarios de neumonías, pero juegan un papel muy importante como desencadenantes de infecciones secundarias por bacterias (Hernández, 1978).

Pasteurella multocida es uno de los agentes bacterianos que colonizan con mayor frecuencia el pulmón del cerdo, cuando estos son sometidos a condiciones medio-ambientales desfavorables o están inmunosuprimidos por el efecto de -- infecciones virales (Carter, 1975; Pijoan, 1978).

Además de la Pasteurella multocida, otros agentes bac

terianos han sido involucrados ocasionalmente en las neumo-
nías porcinas, entre ellos se han mencionado las siguien-
tes bacterias piógenas: Corynebacterium pyogenes, diversos
Streptococcus, Cromobacterium violaceum, Pseudomona pseu-
domallei; Actinobacillus equelli, Staphylococcus sp. Estas
bacterias esporádicamente se encuentran en pulmón que pre-
sentan abscesos diseminados o por lo contrario en pulmones
sin abscesos y sin exudado purulento en bronquios (Necoe-
chea y Cols., 1978); otras características de estos agen-
tes es la baja proporción de aislamientos en animales con-
lesiones neumónicas (Pijoan y Cols., 1976).

Varios hongos, son capaces de causar neumonía en los-
animales, sobre todo en aquellos que por diversas causas -
estén inmunodeprimidos, entre ellos se han citado los si-
guientes: Coccidioides immitis, Histoplasma capsulatum, - -
Blastomyces dermatitidis, Aspergillus sp., Rhinosporilium
sp. Sin embargo, ningún caso de neumonías por estos hon-
gos han sido descritos en México hasta este momento - -
(Necoechea y Cols, 1978; Clark, 1981).

4. Interacción entre Virus y Bacterias en el Tracto Respiratorio

A pesar de la gran cantidad de literatura que existe sobre la neumonía del cerdo, aún este aspecto de la enfermedad no está aclarado totalmente. El problema quizás ha radicado en la dificultad de reproducir experimentalmente la enfermedad y en la identificación exacta de los agentes etiológicos involucrados directa o indirectamente en esta afección, así como la falta de comprensión de los mecanismos de inmuno-supresión de cada agente que conducen a la inflamación pulmonar.

Tradicionalmente, se había aceptado que un sólo factor como ya sean virus o bacterias eran responsables de la mayoría de los cuadros neumónicos del cerdo (Jericho, - - 1968). Sin embargo actualmente se acepta que en la mayoría de los casos las causas de la neumonía se debe a una gran variedad de agentes que interactúan entre sí y que -- provocan cuadro clínicos y lesiones de mayor severidad, - donde la colonización del pulmón es eminente por bacterias que forman parte de la cavidad nasal, (Little, 1975).

El tracto respiratorio de la mayoría de las especies de animales, tiene la capacidad de controlar las bacterias inhaladas, gracias a una amplia variedad de mecanismos de resistencia e inmunidad que pueden actuar independiente o interactuar entre sí (Green y Cols, 1977; Newhouse y Cols., 1976). Entre los mecanismos de defensa que intervienen en la eliminación e inactivación de partículas inhaladas se han mencionado los siguientes: La barrera anatómica, bioquímica, sistemas de células fagocitarias, la inmunidad -- humoral y celular (Cohen y Gold, 1975; Green 1975; Dunnill, 1979).

La eficacia del tracto respiratorio para eliminar -- agentes particulados ha quedado demostrado por la inoculación de una amplia variedad de bacterias suspendidas en -- aerosoles, en distintas especies animales (Lillie y Thomson, 1972; Thomson y Gilka, 1974; Jackson y Cols, 1967). -

Existen varios trabajos que apoyan la gran capacidad del sistema respiratorio para remover bacterias utilizando para ello el modelo de remoción y retención. La inoculación por aerosol de Escherichia Coli no enteropatógena en cerdos de 1, 6, 18 y 26 días de edad, demostró que a las 3 horas después de inoculada la bacteria, los lechones de 1 día eliminaron este agente en un 50%, los de 6 días en 82% y los de 18 y 26 días en un 95% (Curtis y Cols, 1976). En otro trabajo similar en el cual se utilizaron cerdos de engorda, Saunder y Cols., (1983) encontraron que la remoción pulmonar para Bacillus subtilis fue del orden del 54% en dos horas, 77% a las 8 horas y 88% a las 12 horas, después de la inoculación de la bacteria por aerosol.

En becerros en condiciones normales de salud e inoculados con aerosol de Pasteurella haemolytica y Staphulococcus aureus, se encontró índices de remoción pulmonar para P. haemolytica del orden del 75%, 90%, 92% y para S. Aureus de 70%, 90% y 95%, a las 2, 4 y 8 horas respectivamente -- después de la aerolización de ambas bacterias (Lillie y Thomson, 1972). En otros trabajos en esta misma categoría animal se demostró que los patrones de eliminación para -- Serratia marcescens fueron del orden del 97.3 y 99.9% respectivamente a las 4, 24 y 48 horas después de la exposición de los becerros al aerosol bacteriano (Veit y Cols, 1978).

La remoción pulmonar de bacterias a diferentes tiem--

pos después de la inoculación por aerosol, ha sido estudiada por varios autores en ratón. Se ha encontrado que la Pasteurella neumotrópica se elimina en un 64% y 99% a las 4 y 24 horas (Goldstein y Green, 1967); Staphylococcus aureus se remueve con índices de 68%, 82 y 95%, a las 2, 3 y 6 horas (Thomson y Gilka, 1974).

La amplia información existente sobre la eliminación pulmonar de bacterias inoculadas en diferentes especies -- animales bajo condiciones normales de salud, demuestran la gran capacidad del tracto respiratorio para inactivar o -- eliminar agentes bacterianos de manera rápida y predecible; sin embargo se puede deducir que cada género bacteria no puede ser removido con patrones y velocidades distintas (Martínez, 1984).

Los estudios citados antes y los cuales están orientados a determinar a la remoción bacteriana bajo condiciones normales de salud, sirven de base para establecer que condiciones exógenas o endógenas pueden influir adversamente en la eliminación del agente bacteriano y de esta manera -- permitir la multiplicación del microorganismo, con el posible desarrollo del proceso neumónico (Lillie y Thomson, -- 1972):

Se han descrito múltiples factores que alteran los mecanismos de defensa pulmonar encargados de la inactivación o de la eliminación de bacterias, y en consecuencia crean un desbalance en el sistema a favor de la infección respiratoria por agentes bacterianos que forman parte de la flora normal de la cavidad nasal. Entre estos factores se citan los siguientes: Frfo, hipoxia, desnutrición, amoníaco, corticoides, endotoxinas (Green 1970; Thomson y Gilka, -- 1974; Green, 1970) y las primoinfecciones virales (Jakab - 1981 a; Yates, 1982 a).

La interacción entre virus y bacterias en el tracto respiratorio es un fenómeno ampliamente reconocido como -- factor desencadenante de neumonía, tanto en el hombre como en distintas especies animales (Degree, 1971; Yates 1982 a). A partir de las observaciones hechas durante las pandemias de Influenza humana ocurrida en el siglo pasado y durante el presente, se originaron las teorías del sinergismo entre las infecciones virales y bacterianas en la producción de neumonía (Jakab, 1981 a).

Desde entonces se ha aceptado que la enunomía por gérmenes secundarios tales como: Staphylococcus aureus, -- Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae, Neisseria meningitidis etc., son las bacterias más frecuentemente involucradas en la neumonía posinfluenzal (Degree, 1971).

La inoculación de virus y bacterias en el ratón, ha sido uno de los modelos más frecuentemente utilizado para demostrar la interacción de infecciones combinadas de ambos agentes microbiológicos en la producción de afecciones respiratorias. Es por esto que la mayor parte de la información bibliográfica pertinente a este tema se deriva de estudios realizados en esta especie animal. Sin embargo -- existen algunas evidencias concretas que este fenómeno sucede en los animales domésticos. A continuación se describen algunas de las observaciones que demuestran el sinergismo entre virus y bacterias en los procesos neumónicos en -- el ratón, vacuno y en el cerdo.

En estudios realizados en ratones desafiados con -- Haemophilus influenzae distintos tiempos, después de la -- inoculación del virus de la Parainfluenza - 1, se observó un efecto sinérgico entre ambos agentes a los 4 días de la

infección vírica. Este efecto fue medido con base a una reducción de la eliminación bacteriana, y un incremento en la mortalidad, así como en la incidencia y grado de neumonía. Se concluyó que la sobrevivencia y multiplicación de la bacteria en el pulmón se debió al edema inflamatorio y una reducción de la capacidad fagocitaria a nivel pulmonar (Degree y Glasgow, 1968).

Se ha demostrado que en ratones infectados con el virus de la Influenza, presentan una alteración de la remoción pulmonar de Staphylococcus aureus una semana después de la infección viral (Seller y Cols., 1961, citado por -- Kass y Cols, 1966). Este mismo fenómeno también ha sido observado en esta misma especie animal infectados en el -- virus Sendai y desafiados con Stapylococcus aureus (Jakab y Green, 1972); con virus Sendai y Pasteurella pneumotropica (Jakab, 1974). Los cambios patológicos encontrados en estos estudios fueron similares y consistieron de modo general en bronquitis con descamación y degeneración del epitelio ciliar, hiperemia, edema, áreas de consolidación; exudado leucocitario en bronquios y alveolos.

También se ha comprobado utilizando los mismos modelos experimentales citados antes, que el momento de máxima supresión de los mecanismos bactericidas del pulmón (una semana después de la infección viral) se correlaciona con la multiplicación bacteriana, el desarrollo de cambios anatómopatológicos, máxima respuesta inmune local, y la reducción del título viral en el pulmón (Jakab, 1981b, Warr y - Jakab, 1983), además se ha encontrado que tales mecanismos de eliminación bacteriana se logran restablecer hasta las dos semanas después de la infección viral (Jakab y Dick, - 1974).

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la susceptibilidad del pulmón a la multiplicación bacteriana, durante las infecciones virales. Entre estos se han citado los siguientes: Que la descamación masiva del epitelio traqueobronquial altera la eliminación física de gérmenes por el sistema mucociliar, que el edema inflamatorio a nivel alveolar o en las vías respiratorias provee un medio nutritivo para la multiplicación bacteriana y que las funciones del macrófago alveolar y de otras células fagocitarias son afectados por la infección viral (Yates, 1982 a; Thomson y Gilka, 1974). Por otro lado estudios sistemáticos de los procesos de la fagocitosis del macrófago alveolar obtenido en el momento de la máxima supresión bactericida del pulmón inducida por la infección viral, han mostrado una alteración de la fagocitosis en el proceso de la ingestión e inactivación intracelular de la bacteria -- (Jakab y Green, 1976), así como también se ha observado -- supresión inmunológica de la fagocitosis mediada por receptores FC, supresión no específica de los receptores de -- membrana utilizados para la adherencia a la bacteria, alteraciones en la función del fagolisosoma y bajos niveles de enzimas lisosomales (Yates, 1982a, Jakab, 1981a).

En vacunos, varios virus han sido involucrados como patógenos primarios que facilitan la producción de neumonía por bacterias que forman parte de la flora normal del tracto respiratorio superior. Entre estos agentes virales se han mencionado los siguientes: El virus de la Diarrea-viral bovina, virus de la Estomatitis papular bovina, el virus de la Rinotraqueitis infecciosa bovina, el virus de la Para-influenza-3, adenovirus, reovirus, virus respiratorio sincitial (Smith y Cols. 1977). A pesar de la gran -- cantidad de investigación efectuada, muy pocos autores han

podido reproducir experimentalmente la enfermedad respiratoria en bovinos.

Sin embargo algunos estudios han aportado evidencia de la participación de ciertos virus como patógenos primarios que cooperan con pasteurella haemolytica en la producción del proceso neumónico en los bovinos. Así se ha demostrado que en becerros de 6 a 8 semanas de edad al infectarlos con virus de Parainfluenza-3 en forma de aerosol y después a diferentes tiempos con Pasteurella haemolytica, dicho virus interfirió marcadamente con la remoción pulmonar de la bacteria a los días 7 y 11; no encontrándose una correlación entre la retención bacteriana y el desarrollo de cambios patológicos, los cuales consistieron principalmente en edema y atelectasia, asociados a un aumento de neutrofilos y macrófago en bronquios, bronquiales y alveolos (López y Cols., 1976).

En otro estudio en el cual se utilizaron terneros de 2 a 5 meses de edad, a los cuales previamente se infectaron con aerosoles del virus de la Rinotraqueitis infecciosa bovina y posteriormente con Pasteurella haemolytica, se observó que al 40. día después de la infección vírica se desarrollaron lesiones macroscópicas severas, las cuales consistieron en una neumonía lobular con adherencia pleural acompañados de un exudado torácico de color amarillo (Jericho y Langford, 1978). En otro estudio en el cual se utilizó el mismo modelo experimental, pero con animales de mayor edad (6 a 8 meses) y se obtuvieron resultados similares en cuanto al momento de la interferencia con la eliminación de la bacteria y el tipo de lesiones neumónicas (Yates y Cols, 1982b).

Por otro lado en un estudio en que se utilizaron bovinos de 6 meses de edad, inoculados por vía intra-traqueal con el virus de la Diarrea viral bovina y 5 días después desafiaron por la misma vía con Pasteurella haemolytica, se observó una bronconeumonía fibrinopurulenta, severa que afectó entre el 40 y 75% del volumen pulmonar. En contraste el grupo de animales infectados sólo con el virus se afectó del 2 al 7% del área pulmonar y sólo un 15% cuando se inoculó únicamente la bacteria. (Potgieter y Cols, 1984).

A pesar de que se han demostrado tales interacciones entre virus y bacteria en la producción de la neumonía bovina; poco se sabe de los mecanismos de defensa del tracto respiratorio que son más alterados por la infección viral y que permiten la colonización posterior del pulmón por bacterias.

En cerdos convencionales se han descrito dos evidencias concretas que han demostrado la interacción entre virus y bacterias en el establecimiento del proceso neumónico. Shope en 1931, demostró una interacción entre el virus de la Influenza porcina y Haemophilus influenzae suis, en la cual se observó que la infección viral se agravaba considerablemente con la secuela bacteriana.

En otros estudios, Pijoan y Ochoa (1978) observaron en cerdos de engorda un marcado sinergismo entre el virus vacunal del Cólera porcino inoculado por vía intramuscular y Pasteurella multocida administrada por la vía intratraqueal. Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que hubo un aumento en el grado de lesión neumónica (entre los 3 y 5 días) en los animales expuesto a --

ambos agentes. Estas lesiones consistieron en congestión, hemorragia, con infiltración de polimorfonucleares. Posteriormente Pijoan y Cols. (1980) encontraron que el efecto-sinérgico entre el virus y la bacteria en el pulmón se debía a la replicación del virus en el macrófago alveolar, - lo cual conducía a una reducción de la actividad fagocitaria de tales células.

La intervención del virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) como agente primario en el desencadenamiento de la neumonía porcina ha sido poco estudiada. Sin embargo existen observaciones a nivel de campo y experimental de la -- asociación de este virus con agentes bacterianos en el establecimiento del proceso neumónico (Vanier, 1982; Lai y - Cols, 1984; Badiola y Cols, 1984) así como de su patogenicidad para el pulmón (Baskerville, 1972) y de que algunos brotes de la enfermedad en el cerdo de engorda se han caracterizado por problemas respiratorios asociados a signos nerviosos discretos (Pensaert y Cols., 1982; Barrañón y -- Velasco, 1984).

La importancia de la enfermedad de Aujeszky para la - porcicultura nacional se ha puesto de manifiesto por su -- alta incidencia y difusión en los estados de mayor concentración porcícola, así como también su dificultad para - - erradicarla dada la capacidad del virus infectar de forma latente al cerdo y ser reactivado bajo distintas situaciones (Mercado y Cols, 1982; Solorzano y Mercado, 1984). - - Por otro lado, se ha sugerido que la alta difusión del -- VEA en las áreas de mayor concentración porcícola, se debe a los tipos de sistemas de producción porcina y a la comercialización de éstos animales, además a las limitaciones-- en el diagnóstico y a la falta de notificaciones de los -- casos ocurridos (Rosales, 1984).

En una encuesta serológica preliminar realizada en diferentes Estados del país a partir de animales de engorda, así como de cerdos reproductores de granjas con y sin historia clínica de la enfermedad, han mostrado: un 20% de sueros positivos a VEA (579 de 2893), un 30% de granjas -- afectadas (122 a 344) además se encontró que la región más afectada fué la parte central de la República Mexicana don- de se localiza la mayor población de cerdos (Solorzano y - Mercado, 1984). La incidencia de la enfermedad en cerdos- adultos es relativamente alta si se compara con resultados publicados en otros países. En efecto, en Estados Unidos- de América en estudios similares se encontró 3.73% en 1978 y 8.37% de sueros positivos (Schnunenbuyer, 1978, 1981). - En Francia la enfermedad se presentó con 234 casos en 1977 y 95 en 1979 (Toma 1980). En Inglaterra se registraron - únicamente 7 granjas positivas entre 1979 y 1980 (Cartw--- right, 1982). Sin embargo las altas cifras de animales -- y de granjas positivas al VEA en México, quizás se deban - al bajo número de animales muestreados y por otro lado a - la falta de programas de erradicación de la enfermedad.

También se ha observado que en el cerdo de engorda la enfermedad de Aujeszky puede presentarse con un curso be- nigno con o sin manifestaciones clínicas (Thawley y Cols, - 1980). Otros investigadores han indicado que en casos de- campo el trastorno respiratorio puede ser el aspecto más- importante de la enfermedad en esta categoría animal - -- (Toma, 1980; Pensaert y Cols, 1982). Por otro lado tam- -- bién se ha demostrado que en cerdos vacunados, así como en los animales susceptibles desafiados con el VEA por vía -- intranasal, se observan problemas respiratorios acompaña- dos ocasionalmente de signos nerviosos discretos (Gutekunst y Pirtle, 1979; Vanier, 1982; Bran y Cols, 1968).

En Europa se han aislado cepas del virus de la enfermedad de Aujeszky, a partir del cerdo con signos respiratorios y experimentalmente se les han comprobado su tropismo por el pulmón, así como también se han caracterizado a nivel experimental por producir cuadros respiratorios con lesiones pulmonares moderadas (Baskerville, 1971, Baskerville, 1973b). Los cambios patológicos a nivel pulmonar han consistido en áreas de consolidación rojo-oscuro principalmente en los lóbulos apicales y cardiacos, edema bronquitis, bronquiolitis y alveolitis (Baskerville, 1972; Baskerville 1973a; Baskerville 1973b).

Se cree que la infección pulmonar en el cerdo ocurre por el arrastre del virus de la región nasofaríngea, a través de la acción del aire inspirado y posteriormente llega a los alveolos donde inicia la replicación (Baskerville, 1972). En efecto el virus se ha aislado de la mucosa traqueal y del pulmón, después de la primera semana de la inoculación experimental en el cerdo vacunado (Wittman y Cols, 1980). También en la inoculación experimental se ha observado que las cepas del VEA que tienen afinidad por el pulmón, se multiplican en las células del septo alveolar y en los neumocitos tipo I y II (Baskerville, 1973b). Histopatológicamente la secuencia del cambio en el pulmón de los animales infectados por el virus se han dividido en estado agudo (entre 3 y 6 días) y de reparación (entre 5 y 10 días). En ambas fases las lesiones observadas fueron bronqueolitis y alveolitis, además se encontró un exudado inflamatorio de células mononucleares en el proceso agudo y después del 5o. día hubo una infiltración linfocitaria en la periferia de las lesiones (Baskerville, 1971).

Una de las características importantes desde el punto

de vista epizootiológico del virus de la enfermedad de - - Aujeszky, es la capacidad de infectar de forma latente al cerdo vacunado, así como al cerdo susceptible (Gutekunst y Cols, 1980, Thawley y Cols, 1980). En este estado de la infección el virus puede ser reactivado por una inmunosupresión fisiológica (Kojnock, 1965) o medioambiental (Lai y Cols, 1982). La exacerbación del virus puede conducir a la recurrencia de la enfermedad en el animal portador o a la difusión de esta afección entre animales susceptibles (Rouse y Babiu, 1978; Wittman y Cols, 1982). También se ha observado que la reactivación conduce a la excreción del virus a través de exudados nasales hasta por dos semanas y a un cuadro respiratorio acompañado por anorexia, estornudo, salivación y neumonía (Wittman y Cols, 1982). Por otro lado en cerdos previamente infectados y recuperados clínicamente de la enfermedad y tratados posteriormente con corticoides, el virus ha sido detectado en tonsila, ganglio trigemino y del pulmón hasta 8 meses después de la infección vírica (Rziha y Cols, 1982). Estas últimas observaciones podrían también apoyar la hipótesis de la participación del VEA en el problema respiratorio del cerdo de engorda o explicar la forma enzootica de la enfermedad con ciclos de reinfecciones que se manifiestan con características subclínicas o asociadas con problemas respiratorios.

Algunos investigadores han demostrado que en el cerdo de engorda inmunizado con vacunas vivas atenuadas o inactivadas, el virus de desaffo tiene la capacidad de multiplicarse en la cavidad nasal, faríngea, traquea y pulmón - - (Wittman y Cols, 1980). Además que la vacunación no previene el establecimiento de infecciones latentes (Crandell y Cols, 1980) así como tampoco previene el desarrollo de -

lesiones neumónicas (Alva-Valdés y Cols, 1983) aunque si se reduce notablemente la excreción y liberación del virus (De Leew y Cols, 1982; McFerran y Cols, 1982) y evita la enfermedad clínica, produciendo formas discretas de tipo respiratorio (Alva-Valdés y Cols, 1983; Vanier, 1982).

Por otro lado en Francia y en Bélgica el control de la enfermedad a nivel de campo, a través del uso de la vacunación con vacunas inactivadas, ha mostrado una reducción notable en el número de casos anuales; sin embargo se ha observado que el número de Estados afectados ha ido paulatinamente en aumento y favorece la presentación de casos con signos discretos, principalmente de tipo respiratorio (Toma, 1980; Pensaert y Cols, 1982).

Las observaciones citadas anteriormente sugieren que el virus de la enfermedad de Aujeszky puede tener importancia como patógeno primario en el establecimiento del proceso neumónico en el cerdo de engorda, aunque esta no sea la forma alarmante de la enfermedad. La existencia de cepas con tropismo pulmonar, la latencia del virus, la forma enzootica de la enfermedad con manifestaciones discretas en la fase del engorde, y que la vacunación con vacunas inactivadas o atenuadas no reducen significativamente las lesiones pulmonares y si en el resto de los órganos, son las evidencias que llevan a plantear la hipótesis de que este virus (VEA) puede ser un agente primario o desencadenante de la neumonía porcina, aún en los animales vacunados y por lo tanto que pudiera facilitar la colonización pulmonar de un agente bacteriano secundario u oportunista.

5. Pasteurella multocida como patógeno oportunista en los procesos neumónicos del cerdo de engorda.

En la República Mexicana, la Pasteurellosis pulmonar parece ser una de las afecciones respiratorias más frecuentes en el cerdo de engorda. En efecto varios investigadores han mostrado en estudios realizados a nivel de rastro que la bacteria más comunmente relacionada con el pulmón - neumónico es la Pasteurella multocida (Pijoan y cols. - - 1976; Ochoa, 1978; Badiola y cols, 1984).

Se han reconocido 4 serotipos de Pasteurella multocida, denominados A, B, D y E, esta clasificación está basada en los antígenos capsulares, que pueden ser detectados por la técnica de hemoaglutinación indirecta utilizando polisacáridos capsulares adsorbidos a glóbulos rojos (Carter, 1975). Además los antígenos somáticos termoestables (a 100° C/60 minutos) presentes en el lipolisacárido, los cuales fueron determinados por precipitación en gel y bajo este sistema se reconocieron 16 antígenos diferentes sin considerar el tipo capsular al que pertenecen (Heddleston y cols. 1972).

Algunos resultados de estudios realizados en México, particularmente a partir de pulmones neumónicos de cerdos de engorda, han mostrado que la mayoría de las cepas de Pasteurella multocida pertenecen a los serotipos A y D - (Pijoan y Trigo, 1982). Aunque más recientemente otros investigadores en estudios similares han encontrado una alta predominancia de cepas tipo D sobre las A (Pujols y Cols, 1984). Sin embargo, se carece de información acerca de los serotipos somáticos más comunes que son importantes para fines epidemiológicos y control de la enfermedad.

En Estados Unidos de América se ha indicado que los tipos capsulares en combinación con los somáticos más comunes en el cerdo son: A:3(6); A:3(5); A:3(4,5,12); A:3(4,5); A:3(5,12); A:5(6); D:5 y D:3 (Pijoan y Cols, 1983).

Con base a lo anterior se puede deducir que la alta prevalencia del serotipo D en México, no concuerda con la distribución de serotipos aislados a partir de pulmones -- neumónicos de cerdos de Estados Unidos de América, donde han encontrado mayor frecuencia de Pasteurella multocida -- Tipo A aún cuando se utilizan técnicas de cultivos usando la inoculación intraperitoneal en ratón como parte del primoincubamiento de la bacteria, lo que favorece el aislamiento del serotipo D (Pijoan y Cals, 1984); Pijoan y Cols, -- 1983; Cowart y Backstrom, 1984; Pijoan 1985).

Se ha demostrado que Pasteurella multocida no cuenta con la característica de citoadherencia el cual es uno de los mecanismos de patogenicidad importante para producir la infección respiratoria cuando inoculada por sí sola -- (Pijoan, 1978). Sin embargo, se considera un comensal frecuente del tracto respiratorio superior (Carter, 1975) y un patógeno oportunista en los procesos neumónicos del cerdo (Pijoan y Ochoa, 1978; Gois y Cols. 1980; Morrison y -- Cols. 1984).

Por otro lado se ha demostrado en el cerdo que la -- Pasteurella multocida, cuando inoculada por vía intranasal, no produce signos respiratorios, ni lesiones neumónicas -- (Carter, 1975; Gois y Cols. 1983).

Sin embargo, se ha comprobado que esta bacteria sólo puede producir cuadros patológicos, cuando el tracto respiratorio (de modo general) es inmunosuprimido por primoin-

fecciones con agentes virales (Carter, 1973) micoplasmas-- (Pijoan 1982a) o por factores medioambientales adversos -- (Carter, 1975; Pijoan y Trigo, 1982).

Diversas teorías se han propuesto para explicar los - mecanismos de patogenicidad en los casos de invasión pulmo - nar por Pasteurellas, sin embargo, hasta la fecha este pro - blema no ha sido bien aclarado. Entre las teorías que se - han mencionado se encuentran las siguientes: Que las cep - pas capsuladas son más patogénicas y resistentes a la fago - citosis en comparación con las cepas no capsuladas (Carter, 1967).

Que la cápsula protege a la bacteria de la actividad - bacteriolítica del complemento y de la opsonización - - - (Maheswaran y Thies, 1979), además que algunas cepas bacte - rianas producirían sustancias tóxicas que alteran la acti - vidad de las células fagocitarias del tracto respiratorio - (Walker y Cols. 1980; Benson y Cols. 1978; Baluyut y Cols. 1981).

Por otro lado, se ha demostrado que la Pasteurella -- multocida tipo D, produce una dermonecrotóxina cuya produc - ción está asociada a la presencia de un plásmido (Mendoza, 1985). Esta bacteria junto con Bordetella bronchiseptica - o la inoculación solo de la toxina, producen en cerdos - - Rinitis Atrófica (Pedersen y Barford, 1981; Rutter, 1983 y 1984. Sin embargo, el efecto de esta toxina sobre los me - canismos de defensa del pulmón no han sido aclarados.

En la pasteurelisis pulmonar, las lesiones varían de - acuerdo a la severidad de la infección. En casos ligeros, se observa afectación de los lóbulos anteriores; mientras - que en casos severos tanto los lóbulos anteriores como --

los diafragmáticos están comprometidos. Macroscópicamente, se observa consolidación con una coloración grisácea en ca sos crónicos y rojiza en los casos recientes. Además se - puede notar en la plèura una inflamación serofibrinosa con adherencias (Trigo y Pijoan, 1978).

Histopatológicamente se observa una bronconeumonía exu dativa con distribución lobular. En las infecciones recien tes se puede apreciar una infiltración de linfocitos y de macrófagos alrededor de bronquiolos y vasos sanguíneos, inva sión de neutrófilos, linfocitos y macrófagos en los espa -- cios alveolares. En los casos crónicos se encuentra una -- bronconeumonía severa y una hiperplasia linfoide peribron-- quiolar, abundantes neutrófilos, células mononucleares y exudado mucopurulento en alveolos y bronquiolos (Pijoan y - Trigo, 1982).

Los datos citados sobre Pasteurella multocida permiten sugerir que esta bacteria es la más adecuada para plantear- un estudio sobre la posible interacción con el virus de la enfermedad de Aujeszky en el establecimiento de la neumonía del cerdo de engorda.

Estudios recientes en México han demostrado que la pre sencia de lesiones neumónicas se correlaciona con serología positiva al virus de la enfermedad de Aujeszky y con el ais lamiento de Pasteurella multocida, además se observó rela - ción significativa entre serología positiva a este virus y el aislamiento de Pasteurella spp. (Badiola y cols. 1984).

Posteriormente en un modelo en el que se utilizaron ra- tones, se demostró una interacción entre el virus de la en- fermedad de Aujeszky (VEA) y la P. multocida, en el desarro llo de neumonía. Este efecto fue detectado por una altera- ción de la remoción pulmonar de la bacteria a los 11 y 15 -

días después de la infección viral y por un aumento en la mortalidad (a los 3, 7 y 11 días) y desarrollo de lesiones pulmonares (a los 3, 7 y 11 días) (Badiola y Pujols, 1984).

Por todo lo anteriormente mencionado, se puede deducir que el virus de la enfermedad de Aujeszky puede afectar los mecanismos de defensa del tracto respiratorio, aún en cerdos previamente vacunados y por lo tanto permitiría la colonización pulmonar por un agente secundario como Pasteurella multocida la cual sería responsable de las lesiones neumónicas. Con base a tal hipótesis se plantea un experimento en cerdos de engorda inmunizados contra VEA que permita esclarecer el aspecto de la colonización pulmonar por P. multocida, como sería determinar el patrón de remoción pulmonar de esta bacteria, para posteriormente realizar otro experimento con el fin de determinar el efecto de virus sobre la eliminación pulmonar de dicha bacteria, como modelo para demostrar la interacción entre el virus de la Enfermedad de Aujeszky y Pasteurella multocida en el desarrollo de los procesos neumónico del cerdo. Con los resultados obtenidos en tal investigación se espera responder en parte la interrogante, si este virus es un agente etiológico primario en el establecimiento de la neumonía bacteriana, para lo cual se plantearon los siguientes objetivos:

1. Establecer el patrón de remoción pulmonar de Pasteurella multocida bajo condiciones normales de salud del cerdo de engorda.
- 2.- Evaluar la remoción pulmonar de Pasteurella multocida a distintos días posinfección del cerdo con el virus de la enfermedad de Aujeszky.

IV. MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Para cumplir con los objetivos propuestos en este trabajo de tesis, dos experimentos fueron conducidos por separado, aunque los datos obtenidos de ambos estudios se relacionaron. Los dos experimentos desarrollados fueron los siguientes; El estudio de la remoción pulmonar de Pasteurella multocida y el efecto del virus de la enfermedad Aujeszky sobre la remoción pulmonar de Pasteurella multocida, (ver Diagramas 4,5 y 6).

1. Animales experimentales. En los dos experimentos, se emplearon 18 cerdos machos (de 8 a 10 semanas de edad), castrados, raza Yorkshire; adquiridos de la "Granja Porcina San Diego De la Joya", ubicada en Yautepec, Mor. México. Estos animales son producidos especialmente para estudios de investigación, siendo éstos susceptibles al virus de la enfermedad Aujeszky, al virus del Cólera porcino y libres de anticuerpos contra Pasteurella multocida.

Los animales, se alojaron en instalaciones bien ventiladas, en la Unidad de Posgrado de la FES-Cuautitlán-UNAM y se les proporcionó agua permanentemente. También se alimentaron con 3 kgs. de alimento comercial para cerdos en crecimiento*, hasta la finalización de esta investigación, (18-20 semanas de edad). La limpieza consistió en recoger las heces 2 veces diarias, lavar los pisos y paredes con agua a presión.

* Purina, S.A., México, D.F.

Una semana después de la adaptación a las nuevas --- instalaciones, estos animales fueron pesados e inmuniza-- dos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA), - con vacuna inactivada de uso comercial*, (cada animal recibió 2 ml vía intramuscular). A las 4 semanas después de la vacunación el título de anticuerpos contra VEA fue de-- terminado por micro-suero neutralización en cultivos celu-- lares según la técnica sugerida por Hawkes (1979) y utili-- zando sueros de referencia positivos y negativos donados amablemente por el Departamento de Epizootiología del --- INIP.

2. Bacteria. En los dos estudios citados anterior-- mente, se utilizó la Pasteurella multocida VC-Cap, por -- ser el único tipo D de referencia con la que cuenta el la-- boratorio de Bacteriología de la Unidad de Posgrado de la FES-Cuautitlán-UNAM,

3. Virus. Los cerdos del estudio del efecto del VEA, sobre la remoción pulmonar de Pasteurella multocida, se -- desafiaron con la cepa VAC-1** la cual se inoculó por vía intranasal (1 ml con un título de 10^4 TCID₅₀/ml de PBS). Esta cepa fue aislada de conejos inoculados con una mues-- tra procedente de un caso clínico de VEA en cerdo y pasada 7 veces por células PK-15 (Badiola y cols. 1984) y la cual fue elegida para este experimento, debido a que se ha de-- mostrado que afecta la remoción pulmonar de la Pasteurella multocida en ratón (Badiola y Pujols, 1984).

* Zooprofilax, S.A., México, D.F.

** Virus de Aujeszky Cuautitlán-1.

4. Aerosolizador. El sistema de infección por aerosoles bacterianos, (ver Apéndice Diagrama 1, 2 y 3) construido y normalizado en F.E.S.-Cuautitlán-UNAM, estaba constituido por una cámara rectangular de madera (150 x 120 x 100 cm), revestida de formaica y sellada con silicona en las uniones de la madera; 3 nebulizadores (Devilbiss Co, modelo 645, Somerset, P.A. U.S.A.) fueron conectados respectivamente en 3 perforaciones circulares en la parte izquierda de la cámara. El flujo del aire para la producción del aerosol fue generado por una compresora (Bomba compresora, modelo B-131-C Industrias G. Murguía, S.A., Méx., D.F.) ajustada a 10 PSI. De la compresora salía una manguera de 1 cm de diámetro, la cual se unió a un tubo con 3 salidas, donde se conectaron 3 mangueras (0,5 cm de diámetro) y cada una de ellas fueron acopladas a su respectivo nebulizador.

El paso del aire a través de los nebulizadores con la suspensión bacteriana, permite la generación de aerosoles con partículas de 0,5 a 5 micras, según indicaciones de los fabricantes. Estas partículas nebulizadoras fueron extraídas del interior del sistema con la ayuda de una bomba (Bomba productora de vacío, modelo F.E.-1500 Industrias F.B. S.A., Zapopan, Jal., Méx.) de vacío ajustada a 10 PSI, la cual fue acoplada en la parte derecha de la cámara, mediante mangueras (1,5 centímetro de diámetro) adaptada a 3 tubos de salida. Entre la bomba de vacío y los tubos de salidas de la cámara se colocó un matraz Kitasato con Formaldehído al 10% como medida de seguridad.

Una compuerta ubicada en la parte frontal de la cámara servía para introducir y sacar los animales después de la aerosolización respectiva.

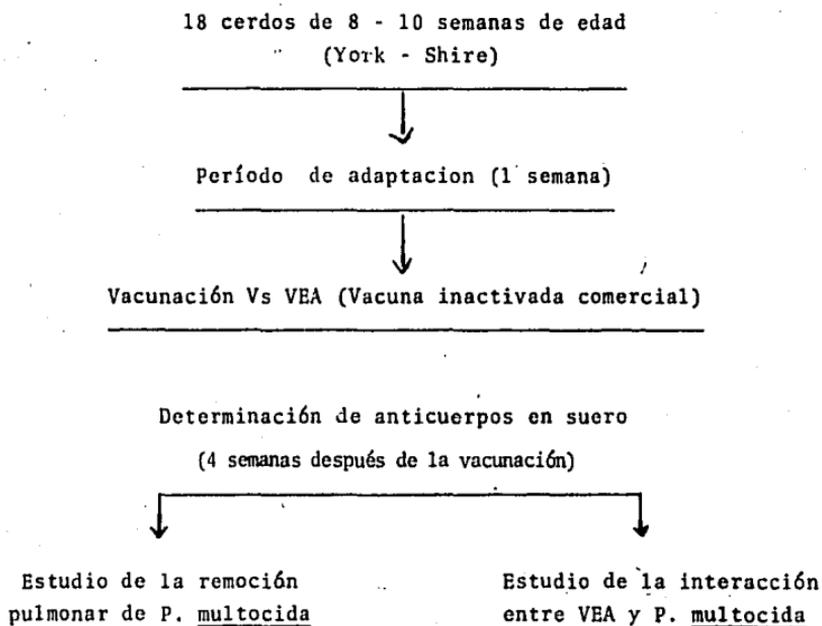


DIAGRAMA #4

Interacción entre el virus de Aujeszky

y Pasteurella multocida

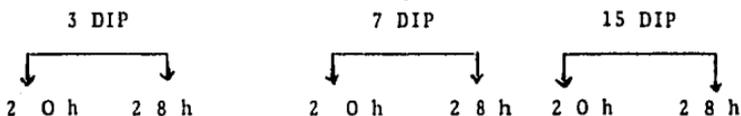
12 cerdos (16 - 18 semanas de edad)

Desafío vía intranasal con VAC-I (10^4 TCID 50/ml)

a la 6 semanas posvacunación Vs VEA

3 grupos de 4 animales cada uno (aleatori)

Aerosolización con P. multocida (20 ml, 10 UFC/ml, 30 min)



Eutanasia: Shock eléctrico + Cortes de arterias branquiales

Sacar el paquete torácico

Separar el pulmón del paquete torácico

Separar los lóbulos del pulmón

Tomar una muestra de 2 gr de cada lóbulo

Homogenizar la muestra en PBS

Diluciones en Base 10 (hasta 10^{-9})

Sembrar 3 gotas de 20 ml/dilución

24 horas de inoculación

Recuento de la UFC - gota

METODOS

1. Estudio de la Remoción pulmonar de *Pasteurella multocida* ---

La cepa de *Pasteurella multocida*, conservada a -70°C, se descongeló e inmediatamente se sembró en agar sangre -- (DIFCO, Michigan, U.S.A.). Posteriormente se incubó durante 24 horas a 37°C. De los crecimientos obtenidos se corroboraron las características bioquímicas y morfológicas de la bacteria, según las técnicas descritas por Cowan y Steel, 1974).

Preparación del Inóculo

Se tomaron 20 colonias de *P. multocida*, crecida en -- agar sangre, para inocular un matraz nefelométrico que contenía ICC* (Infusión Cerebro Corazón), más 5% de extracto de levadura. El inóculo que contenía las 20 colonias de la bacteria se cultivó en agitación a 120 rpm (Junior Orbit - Shaker, Lab. Line Instruments. Inc. Illinois, U.S.A.) hasta el inicio de la fase estacionaria de crecimiento bacteriano, esta se comprobó por medición espectrofotométrica - (Espectronic 88 de Baush & Lomb, U.S.A.). Alcanzada la fase estacionaria, la suspensión bacteriana contenida en el matraz, se centrifugó a 3500 g durante 45 minutos a 4°C. - El sedimento bacteriano fue lavado dos veces con PBS (pH - 7.2) y resuspendido nuevamente en esta misma solución amortiguada para obtener una concentración de aproximadamente 10^{10} unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

* Difco, Michigan, U.S.A.

Inoculación de la bacteria por Aerosol

De la suspensión bacteriana lavada y ajustada a 10^{10} /UFC/ml se tomaron 20 ml, los cuales se repartieron equitativamente entre los 3 nebulizadores de la cámara e inmediatamente se aerosolizaron 6 cerdos seleccionados al azar -- (12 a 14 semanas de edad y con un peso promedio de 16 kgs. de peso vivo) del lote de los 18 cerdos que se poseían para este trabajo, Después de 30 minutos de nebulización, -- los 6 cerdos se sacaron de la cámara y al azar se dividieron en grupo de 2 animales cada uno. Los animales de cada grupo se sacrificaron respectivamente a las horas 0, 8 y 30 después de la aerosolización de la bacteria (ver Diagramas 4 y 5).

Obtención de pulmones

A la hora correspondiente, cada uno de los 2 animales, fueron sacrificados por electrochoque y exanguinados por sección de las arterias braquiales. Al completarse el desangrado se abrió la cavidad torácica y se extrajo el -- paquete cardio-pulmonar, vigilando de no seccionar el esófago. Posteriormente se eliminó el corazón, grandes vasos, tráquea y a la porción extrapulmonar de los grandes bronquios. En los pulmones se examinaron la presencia o ausencia de lesiones anatomopatológicas.

Procesamiento de muestras

De los pulmones se tomó una muestra de 2 gramos de la porción ventral media de cada lóbulo del pulmón y se colocaron las muestras para ser maceradas en morteros TemBroeck,

estériles que contenían 5 ml de PBS (pH 7,2).

Los macerados se diluyeron en base 10, hasta la dilución 10^{-9} . De cada una de las 9 diluciones de las muestras de los lóbulos del pulmón, se sembraron 3 gotas de 20 μ l/gota, en placas de agar soya tripticasa (DIFCO, -- Michigan, U.S.A.), las cuales se incubaron durante 24 horas a 37°C. El conteo del número de unidades formadoras de colonias por gota (UFC/gota) fue efectuado al término de dicho periodo de incubación.

El número de bacteria por muestra de cada lóbulo se determinó por la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\sum_{i=1}^b \sqrt{n \times FD}}{b} \right)^2 \times \frac{5}{0,02} \text{ B.M.} = (\text{bacterias - por muestra})$$

donde: b = números de gotas en las que se efectuó el conteo.

n = número de UFC/gota.

FD = factor de dilución.

5 = ml de Tem-broeck.

0,02 = ml/gota

$\sqrt{\quad}$ = Factor de correlación - poisson - (Little y -- Hills, 1979).

Con las B.M. obtenidas de la forma anterior, se calcularon las bacterias por gramo de muestra (BGM), y su transformación logarítmica en base 10 (LBGM).

Con los datos precedentes se pudo calcular los indi--

ces de retención (Ret) y de remoción (Rem), aplicando las siguientes fórmulas:

$$a) \% \text{ de Retención} = \frac{BLT}{\overline{BL}_0} \times 100$$

$$b) \% \text{ de Remoción} = \frac{\overline{BL}_0 - BLT}{\overline{BL}_0} \times 100$$

donde: BLT = Bacteria por gramo de muestra al tiempo T.

\overline{BL}_0 = Media de bacteria por gramo de muestra a la hora cero.

2. Remoción pulmonar de *Pasteurella multocida* a diferentes tiempos posinfección de los cerdos con el virus de la enfermedad de Aujeszky.

Virus de desaffo. Para propagar el Virus VAC-1, se cultivaron células PK-15 en MEM-Eagle con sales de Hanks (Grand Island Biological Co, N.Y., U.S.A.) en botellas de Roux y se suplementaron con piruvato sódico 1 mM, 10% de suero de ternera, antibióticos (Penicilina 100 UI y estreptomycinina 100 μ g/ml). Una vez obtenido el monoestrato confluyente (aproximadamente en 3 días), se retiró el medio de crecimiento y se lavó dos veces con solución de fosfatos (PBS), pH 7.2. Inmediatamente se infectó el monoestrato celular con 0.1 ml de una suspensión de VAC-1, preservado a -70°C y descongelado inmediatamente en el momento de la infección. Las células inoculadas se incubaron durante una hora a 37°C, para permitir la adherencia viral, Transcurrido el tiempo de la infección, las células se lavaron, 2

veces con PBS y se agregó medio de mantenimiento (MEM --- Eagle con sales de Earle, piruvato sódico 1 mM, antibióticos y 2% de suero de ternera). Las botellas se incubaron a 37°C, durante 5 días y se observaron diariamente -- para ver la aparición del efecto citopático (ECP).

Al quinto día después de la infección (momento en -- que se observó mayor desprendimiento del tapíz celular y células en formas de racimos) las botellas fueron congeladas y descongeladas; este proceso se repitió dos veces y entre cada proceso citado se sonicaron por 15 minutos - a 45 Khz (Branson modelo B. 72. Conn., U.S.A.).

La suspensión vírica libre de células fue obtenida - después de la centrifugación a 3000 g por 45 minutos. Inmediatamente después se procedió a la congelación de la - suspensión vírica en viales de 5 ml y a titular el virus en microplacas según la técnica sugerida por Hawkos -- (1979).

Infección de los cerdos con el virus de Aujeszky

Una vez titulado y ajustado a 10^4 TCID50/ml se desafiaron los 12 cerdos restantes (16-18 semanas de edad, con un peso promedio de 22 kg, de peso vivo) a las 6 semanas después de la vacunación contra el VEA. A los 3 días post infección, se formaron al azar 3 grupos de 4 animales cada uno para ser sometido al aerosol bacteriano a los 3, 7 y 15 días respectivamente, después del desafío con el virus de Aujeszky.

Inoculación de la bacteria a distintos tiempos pos-
infección con el virus de Aujeszky.

El aerosol bacteriano fue preparado, como se describió en el estudio precedente. Los 4 animales de cada grupo fueron aerosolizados simultáneamente, durante 30 minutos con 20 ml de la suspensión bacteriana que contenía -- aproximadamente 10^{10} UFC/ml, en los 3 tiempos respectivos después del desaffo con el VEA (3, 7 y 15 días). Una vez terminado el tiempo de nebulización, de cada grupo, se -- seleccionaron 2 cerdos al azar y fueron sacrificados a la hora cero y los 2 animales restantes a las ocho horas después del aerosol de la Pasteurella multocida (ver Diagrama 6),

El sacrificio de los animales, el procesamiento de las muestras y el cálculo de los parámetros estadísticos, se realizaron como el experimento precedente.

3. Estudio anatomopatológico

Al momento de sacrificio de los animales de cada grupo de los dos experimentos, la presencia o ausencia de las lesiones macroscópicas del pulmón fueron registradas. Inmediatamente después de seleccionar las muestras para el estudio de la remoción o retención bacteriana, se tomaron -- muestras de las áreas de los lóbulos lesionados y se fijaron en formalina al 10% en PBS, posteriormente se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes longitudinales de 2 a 4 μ m. Y estos fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. El tipo de lesiones histopatológicas fueron registradas -- por observación al microscopio,

4. Análisis estadístico

Los resultados de todos los experimentos realizados están expresados en unidades de escala continua por lo -- cual se aplicó análisis de varianza (ANOVA).

Remoción pulmonar de Pasteurella multocida.

En este experimento se utilizó un diseño factorial - de 2 factores;

Factor A = lóbulo con a_1 = apical, a_2 = cardiaco, --- a_3 = diafragmático, Factor B = pulmón con b_1 = pulmón izquierdo, b_2 = pulmón derecho, La variable de respuesta -- fue el número de bacterias por gramo de muestra (BGM) y - se utilizó su transformación logarítmica (LBGM) con el ob- jetivo de homogenizar varianzas.

Las hipótesis planteadas fueron:

Fa Ho : el efecto principal de A = 0
 H1 : el efecto principal de A \neq 0

Fb Ho : el efecto principal de B = 0
 H1 : el efecto principal de B \neq 0

F a x b Ho : no hay interacción
 H1 : hay interacción

Se rechazó Ho cuando la "p" calculada fue menor de - 0.05.

El análisis de regresión fue empleado para determinar la relación entre tiempo (causa) y número de bacterias (efecto). La significancia del coeficiente de correlación (r) se estudió por medio de una prueba "t" de student.

Remoción pulmonar de Pasteurella multocida a diferentes tiempos de posinfección con el virus de Aujeszky.

El diseño estadístico para analizar este experimento fue un factorial con 3 factores:

Factor A = días después de la inoculación del virus - con $a_1 = \text{día } 0$, $a_2 = \text{día } 3$, $a_3 = \text{día } 7$, $a_4 = \text{día } 15$. Factor B = lóbulo con $b_1 = \text{apical}$, $b_2 = \text{cardiaco}$ y $b_3 = \text{diafragmático}$. Factor C = pulmón con $c_1 = \text{pulmón derecho}$ y $c_2 = \text{pulmón izquierdo}$.

El ANOVA se realizó con 3 variables de respuestas: -- LBGm a las cero horas después de la aerosolización, LBGm a las ocho horas, después de la aerosolización con los índices Ret-BGM,

Las hipótesis planteadas para cada factor fueron:

H_0 : el efecto principal del factor es igual a cero.

H_1 : el efecto principal del factor es diferente de cero,

Y para cada interacción:

H_0 : hay interacción

III ; no hay interacción.

Al igual que en el experimento anterior se rechazó -
Ho si la "p" calculada resultaba menor de 0,05.

Se utilizó la prueba de Tukey (diferencia mínima sig-
nificativa honesta) para ver diferencias entre medias ---
posteriormente al análisis de varianza. Esta prueba se --
realizó con $P = 0,05$. Los grupos que no mostraron diferen-
cia se unieron con barras.

El análisis estadístico se realizó según lo publica-
do por Pimentel (1978); Daniel (1980) y Hurley y cols. --
1981.

V. RESULTADOS

Remoción pulmonar de Pasteurella multocida

La suspensión bacteriana, usada para la aerosolización de los 6 cerdos de este experimento, mostró un título de $8,8 \times 10^{10}$ UFC/ml,

En los Cuadros 1 y 2 se muestran los números de bacterias expresadas en BGM y LBGm en los lóbulos pulmonares muestreados tras la aerosolización de los cerdos con la Pasteurella multocida,

Las medias y las desviaciones estandar de los resultados obtenidos del pulmón izquierdo, derecho y lóbulo -- intermedio, expresados en LBGm, con respecto al tiempo -- transcurrido después del aerosol bacteriano se muestran en el Cuadro 3 y en la Figura 1; las de los lóbulos craneales, medios y caudales se encuentran en el Cuadro 4 y en la Figura 2. En estos datos se observa diferencias marcadas en el número de bacterias depositadas a las horas 0 y las encontradas 8 y 30 después del aerosol bacteriano.

El análisis de varianza (Cuadro 5) de los datos expresados en LBGm, mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre el número de bacterias recuperadas a las 0, 8 y 30 -- horas después de la inoculación de la bacteria con el aerosol.

El análisis de los datos por ANOVA Cuadros 6, 7 y 8, no mostró diferencias significativas ($P > 0.05$) entre lóbulos, ni entre pulmón a las 0, 8 y 30 horas después de la -

inoculación de la bacteria, Estos resultados permitieron estimar la media del LBGm de los lóbulos (apicales, cardíacos, diafragmáticos) y compararla con la media del lóbulo intermedio, a cada tiempo después de la aerosolización de la Pasteurella multocida,

Estos resultados se muestran en el Cuadro 9, en los cuales tampoco se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$),

Con los 14 datos de las muestras tomadas respectivamente a las 0, 8 y 30 horas postaerosol bacteriano, se construyó la gráfica que se muestra en la Figura 3, en la cual se observa un comportamiento asintótico del número de bacterias con respecto al tiempo,

Con estos mismos resultados se construyó la recta en base a la regresión lineal entre el número de bacterias expresadas en LBGm y el tiempo transcurrido tras la aerosolización de la bacteria, La ecuación de esta recta fue:

$$\frac{1}{\text{LBGM}} = 0,151 + 9,52 \times 10^{-3} t$$

donde: t = tiempo transcurrido después de la aerosolización, con un coeficiente de correlación de 0.92 altamente significativo pues dió un valor de "t" calculada de 45,60 ($P < 0,01$), El intervalo de confianza al 95% para $\frac{1}{\text{LBGM}}$ fue de $\pm 0,027$,

La representación exponencial de la ecuación anterior es:

$$BGM = \frac{1}{10,0151 + 9,52 \times 10^{-3} t}$$
, Con esta ecuación se

pudo estimar el número y los índices de bacterias depositadas o removidas por el pulmón a cualquier tiempo después de la inoculación de la bacteria, mediante la utilización de las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ retención (\% Ret)} = \frac{BGM}{BGM_{ho}} \times 100$$

$$\% \text{ remoción (\% Rem)} = \frac{BGM_{ho} - BGM}{BGM_{ho}}$$

donde: BGM ho = BGM a la hora cero posaerosolización.

BGM = BGM a diferentes horas posaerosolización.

A manera de ilustración en el Cuadro 10 y en la Figura 5 se ejemplifica los resultados teóricos obtenidos al utilizar estas ecuaciones. Como se puede observar los índices de remoción bacteriana en los Cuadros 1 y 12 y en el construido a partir de la ecuación de la regresión lineal Cuadro 10, los valores obtenidos en los 3 cuadros son similares a las 8 y 30 horas posaerosolización con la bacteria; por otro lado, al utilizar la ecuación para calcular el número de bacterias, los índices de remoción y retención (Cuadro 10 y Figura 15) se obtuvo una remoción pulmonar de bacterias del orden de 50%, 92,09%, 95%, 99,4% y 99,99% a las 0,71, 3, 4, 8 y 30 horas respectivamente después de la inoculación de la Pasteurella multocida por aerosol.

L	Hora cero		Hora ocho		Hora treinta	
	Cerdo #1	Cerdo #2	Cerdo #3	Cerdo #4	Cerdo #5	Cerdo #6
AI	2.263×10^7	9.329×10^6	2.887×10^3	4.455×10^3	2.100×10^2	2.273×10^2
AD	5.928×10^7	1.815×10^8	7.165×10^3	1.990×10^4	1.660×10^2	2.273×10^2
CI	6.683×10^7	2.986×10^7	5.150×10^3	1.400×10^4	1.625×10^2	1.833×10^2
CD	3.212×10^7	2.415×10^7	8.230×10^4	1.216×10^4	1.850×10^2	1.497×10^2
I	3.415×10^6	4.879×10^8	4.650×10^3	1.477×10^4	4.160×10^2	3.027×10^2
DI	1.942×10^7	3.802×10^6	2.225×10^3	9.643×10^3	3.100×10^2	6.170×10^1
DD	2.902×10^7	8.950×10^5	4.627×10^3	2.540×10^4	1.037×10^2	6.50×10^1

CUADRO #1 Resultados individualizados del número de bacterias por gramo de muestra (BGM) de cada lóbulo del pulmón de los cerdos tras la aerolización de la Pasteurella multocida

Ver el significado de las abreviaciones de los cuadros y figuras que se exponen a continuación, en las páginas dedicadas a este aspecto al inicio de este trabajo.

cerdos	LOBULOS PULMONARES (LBGM)						
	AI	AD	GI	CD	I	DI	DD
G1-0h	7.354	7.772	7.824	7.586	6.533	7.288	7.462
C2-0h	6.969	8.258	7.475	7.382	8.688	6.580	5.951
\bar{X}	7.161	8.015	7.649	7.484	7.610	6.934	6.706
D.E	0.272	0.343	0.246	0.144	2.523	0.500	1.068
G3-8h	3.460	3.855	3.711	3.915	3.667	3.347	3.665
C4-8h	3.648	4.298	4.146	4.100	4.169	3.934	4.404
\bar{X}	3.554	4.076	3.928	4.007	3.918	3.665	4.034
D.E	0.132	0.313	0.307	0.130	0.354	0.450	0.522
C5-30h	2.320	2.220	2.210	2.267	2.261	1.49	1.790
C6-30h	2.765	2.356	2.263	2.175	2.481	2.015	1.812
\bar{X}	1.382	2.288	2.236	2.221	2.371	1.007	1.801
D.E	1.955	0.096	0.037	0.065	0.155	1.424	0.015

CUADRO#2 Número de bacterias por gramo de muestra, de cada lóbulo pulmonar, transformación logarítmica (LBGM) con sus respectivos medios (\bar{X}) y desviación estandar (D.E), a diferentes tiempos postaerosolización de la Pasteurella multocida.

H O R A S		Pulmón (LBGM)		
		Izquierdo	Derecho	(I)
0	\bar{X}	7.248	7.401	7.610
	D.E	0.429	0.776	1.523
8	\bar{X}	3.716	4.039	3.918
	D.E	0.304	0.280	0.354
30	\bar{X}	2.177	2.100	2.371
	D.E	0.417	0.240	0.155

CUADRO #3 Retención de la Pasteurella multocida por el pulmón izquierdo (AI, CI, DI), derecho (AD, CD, DD) y en el lóbulo intermedio (I) transformación logarítmica (LBGM) en relación al tiempo transcurrido tras el aerosol bacteriano (media = \bar{X} y desviaciones estandar = ΔE).

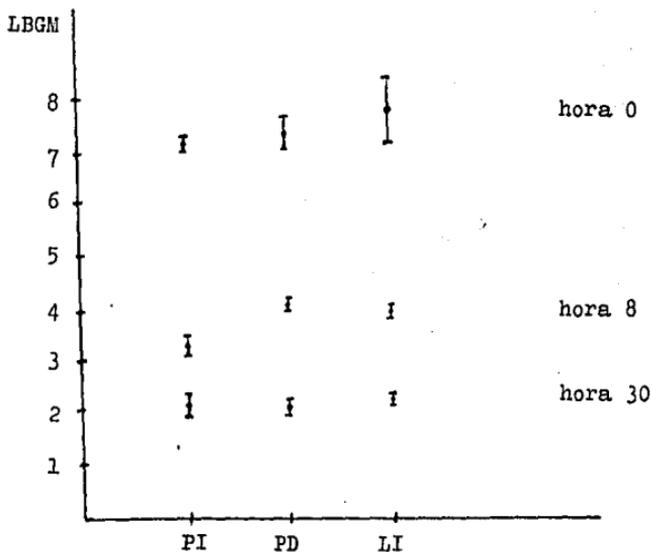


FIGURA #1 Media y desviaciones estandar del número de bacterias para el pulmón izquierdo (AI, CI, DI), pulmón derecho (AD, CD, DD) y en el lóbulo intermedio (LI), transformación al tiempo transcurrido tras el aerosol de la Pasteurella multocida.

Pulmón	Horas posaerosolización (LBGM)		
	0	3	30
Craneales \bar{X}	7.588	3.815	2.415
D.E	0.553	0.360	0.240
Medios \bar{X}	7.566	3.968	2.228
D.E	0.190	0.198	0.044
Caudales \bar{X}	6.820	3.850	1.776
D.E	0.693	0.415	0.216
L. inter- medio \bar{X}	7.61	3.918	2.371
D.E	1.50	0.354	0.155

CUADRO #4 Retención de la Pasteurella multocida en los lóbulos pulmonares craneales (AI, AD), medios (CI, CD), caudales (DI, DD) e intermedio (LI), transformación logarítmica (LBGM) en relación al tiempo transcurrido tras el aerosol bacteriano (media = \bar{X} y desviaciones estándar = D.E).

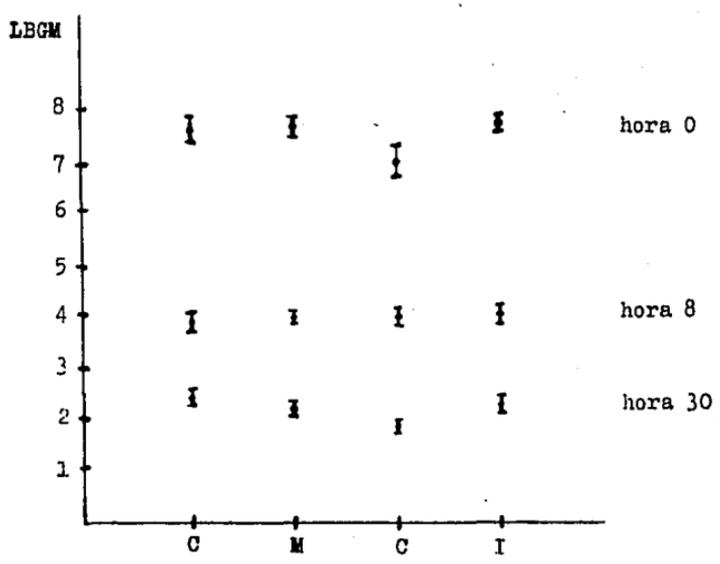
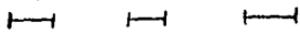


FIGURA #2 Medias (•) y desviaciones estandar (I) del número de bacterias expresadas en LBGM, en los lóbulos craneales (C) medios (M) caudales (C) y el lóbulo intermedio en relación al tiempo transcurrido tras el aerosol de la Pasteurella multocida.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	P.
Tratamientos	2	198.42	99.21	549	< 0.001
Error	39	7.04	0.18		
Total	42	205.46			


 h0 h8 h30

CUADRO #5 Tabla de ANOVA y Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) ---
 construidas a partir de datos expresados en LBGM, para detec-
 tar diferencias entre el número de bacterias recuperadas a -
 los 0, 8 y 30 horas tras el aerosol de la Pasteurella multo-
cida. Las barras díscontinuas indican diferencias estadísti-
 camente significativas.

P.V	G.L	S.C	C.M	Fc	P
Tratamientos	5	2.316	0.463	1.681	> 0.1
Lóbulo	2	1.494	0.747	2.710	> 0.1
Pulmón	1	0.059	0.059	0.215	> 0.25
Lóbulo x Pulmón	2	0.763	0.381	1.384	> 0.25
Error	6	1.653	0.275		
Total	11	3.969			

CUADRO #6 ANOVA construido a partir de los datos expresados en logaritmos de bacterias por gramos de muestras (LBGM) para determinar la existencia o no de un efecto de lóbulo y pulmón, sobre la remoción bacteriana a la 0 hora posaerosolización de la Pasteurella multocida.

F.V	G.L	S.C.	C.M	Fc	P
Tratamientos	5	0.466	0.0933	0.7954	> 0.25
Lóbulo	2	0.704	0.0256	0.2182	> 0.05
Pulmón	1	0.3132	0.3139	2.6751	> 0.1
Lóbulo x Pulmón	2	0.1014	0.0507	0.4323	> 0.1
Error	6	0.7039	0.1173		
Total	11	2.2885			

CUADRO #7 ANOVA, construido a partir de los datos expresados en logaritmos de bacterias por gramo de muestra (LBGM), para determinar la existencia o no de un efecto de lóbulos y pulmón, sobre la remoción bacteriana a las 8 horas posaerolización de la Pasteurella multocida.

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc	P
Tratamiento	5	2.191	0.438	1.543	$\frac{1}{>0.25}$
Lóbulo	2	2.069	1.034	3.642	>0.05
Pulmón	1	0.007	0.007	0.007	>0.52
Lóbulo x Pulmón	2	0.115	0.057	0.203	>0.5
Error	6	1.705	0.284		
Total	11	3.896			

CUADRO #8 ANOVA, construido a partir de los datos expresados en logaritmos de bacterias por gramos de muestra (LBGM) para determinar la existencia o no de un efecto de lóbulo y pulmón, sobre la remoción bacteriana a las 30 horas pose aerosolización de la Pasteurella multocida.

Tiempo (horas)	ACD	I	tc
0	7.536	7.684	0.324 (P > 0.5)
8	4.025	3.939	0.361 (P > 0.5)
30	2.306	2.261	0.279 (P > 0.5)

CUADRO #9 Comparación de la medida de los lóbulos apicales, cardíacos y diafragnáticos (ACD) con la media del lóbulo (I) intermedio (Prueba t) a las 0, 8 y 30 horas después de la aerosolización de la Pasteurella multocida. Los datos están expresados en LGM.

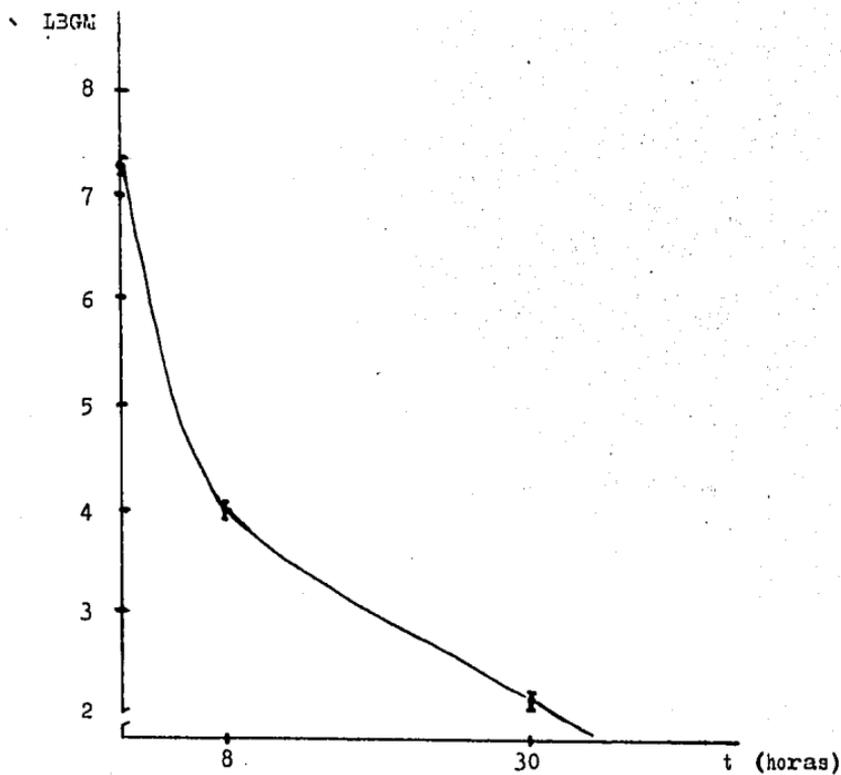


FIGURA #3 Número de bacterias por gramo de muestra, transformación logarítmica (LBGM) en relación al tiempo transcurrido tras el aerosol con Pasteurella multocida (media \pm error estándar).

Tiempo (horas)	BGM	% Ret	% Rem
0	3.244×10^6	100	0
0.71	1.622×10^6	50	50
3	1.565×10^5	7.91	92.09
4	1.395×10^5	4.36	95.64
8	1.635×10^4	0.51	99.49
30	1.39×10^2	0.004	99.99

CUADRO #10 Número de bacterias, % de retención y % de remoción pulmonar (BGM) estimados a partir de la ecuación de la recta de regresión lineal a diferentes tiempos posaerolización de la Pasteurella multocida.

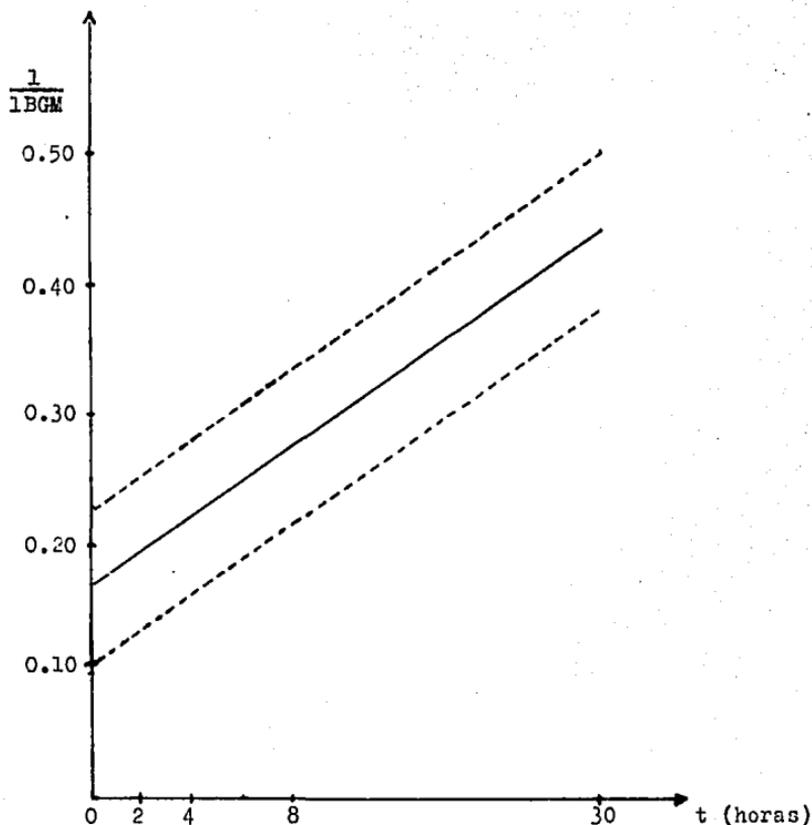


FIGURA #4 Recta de regresión lineal (con un 95% de confianza) en la que se muestra la relación existente entre el número de bacterias expresadas por el recíproco de $\frac{1}{1BGM}$ y el tiempo -- transcurrido tras la aerosolización con la Pasteurella multocida.

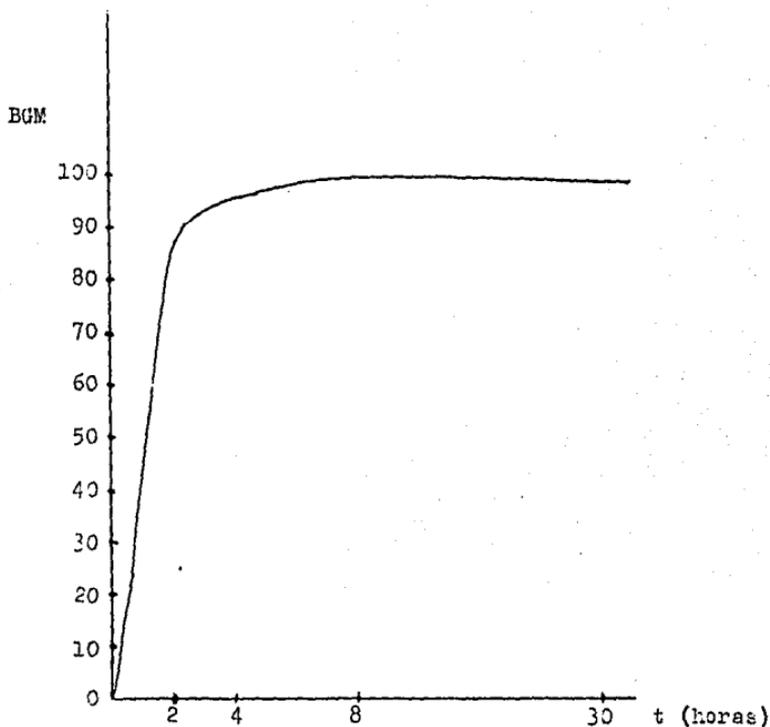


FIGURA #5 Índices de remoción bacteriana con respecto al tiempo transcurrido después de la aerosolización de Pasteurella multocida y calculados a partir de LBGM obtenidos a partir de la ecuación de regresión.

Lóbulos	Horas Posaerosolización(%)	
	8	30
Craneales	\bar{X} 99.87 D.E 0.15	99.97 0.015
Medios	\bar{X} 99.86 D.E 0.14	99.96 0.02
Caudales	\bar{X} 99.85 D.E 0.14	99.98 0.05
L. interme- dio	\bar{X} 99.92 D.E 0.09	99.93 0.09

CUADRO #11 Medias y desviaciones estandar de los índices de remoción por los lóbulos craneales (AI, AD), medios (CI, CD), caudales (DI, DD) y en el lóbulo intermedio (I), calculados a partir de BGM, en el tiempo transcurrido desde aerosol con la Pasteurella multocida.

Tiempo (horas)	Pulmón			
	I	D	L.I	
0	\bar{X}	7.248	7.401	7.610
	D.E	0.429	0.776	1.523
8	\bar{X}	3.716	4.039	3.918
	D.E	0.304	0.280	0.354
30	\bar{X}	2.177	2.100	2.371
	D.E	0.417	0.240	0.155

CUADRO #12 Medias y desviaciones estandar de los índices de remoción bacteriana por el pulmón izquierdo (I), pulmón derecho (D), en el lóbulo intermedio (L.I), calculados a partir de BGM en relación al tiempo transcurrido tras el aerosol de la Pasteurella multocida.

Efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la Remoción pulmonar de Pasteurella multocida.

Respuesta clínica

Cronológicamente, después del desafío con el VEA los cerdos presentaron los siguientes signos clínicos: al tercer día se observó anorexia, postración, fiebre -- (\bar{x} 40.5°C), este cuadro se prolongó hasta el sexto día; 4 días después apareció un cuadro respiratorio leve que consistió en tos y estornudo. A partir del séptimo día hasta décimo quinto día (último día en que los animales fueron observados), los animales se recuperaron y todos los signos citados antes desaparecieron.

A las cuatro semanas después de la vacunación, los cerdos desarrollaron títulos de anticuerpos virus-neutralizantes en un rango que fluctuó entre 1:8 a 1:16. Seis semanas después (momento del desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky) estos títulos se incrementaron en un rango que osciló entre 1:32 a 1:64 (Cuadro 26).

La concentración de Pasteurella multocida en los diferentes inóculos utilizados a lo largo de este experimento dirigido a determinar el efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción pulmonar en cerdos, - mostró un título de 1.9×10^{10} , 1.1×10^{10} , 1.6×10^{10} -- UFC/ml, a los 3, 7 y 15 días respectivamente después del desafío con virus.

En los Cuadros 13, 14 y 15 se muestra el número de bacterias por gramo de muestra (BGM) y sus transformacio-

nes logarítmicas base 10 (LBGM) en los lóbulos pulmonares muestreados a las 0 y 8 horas después de la aerosolización de la Pasteurella multocida y en los diferentes días después del desaffo de los cerdos con el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA).

El ANOVA, realizado con los resultados obtenidos y expresados en LBGM, para detectar efectos de día, lóbulo, pulmón y sus interacciones a la hora cero, (0h) después de la aerosolización de la Pasteurella multocida y a distintos días posinfección viral se muestran en el Cuadro 16. En él se observa un efecto de día altamente significativo ($P < 0.001$).

Los resultados del ANOVA y prueba de Tukey ($P=0,05$) efectuados para detectar diferencias entre días posinfección viral a las cero horas tras la aerosolización con la bacteria, se presentan en el Cuadro 17. Estos análisis indican que la cantidad de bacterias depositadas fue igual para todos los grupos de cerdos, excepto para el grupo del día 7 posdesaffo con el VEA, momento en que se depositaron menor número de bacterias.

En el Cuadro 18 se muestra el ANOVA construido a partir de los datos expresados en LBGM, para detectar efectos de día, lóbulos, pulmón y sus interacciones a la hora ocho (h8) tras el aerosol bacteriano en los distintos días posinfección viral. En él se observó un efecto debido a día estadísticamente significativa ($P < 0,001$).

El ANOVA y la prueba de Tukey ($P < = 0,05$) representadas en el Cuadro 19 indican que el número de bacterias

recuperadas en las muestras pulmonares a la hora 8 tras el aerosol bacteriano fue mayor el día 7 que en el día 0 (control de remoción) y que a los días 3 y 15 posdesafo con virus de Aujeszky; además que entre los días 3 y 15 no hubo diferencias significativas en el número de bacterias. Por otro lado que en el día cero, fue menor que en los demás días posinfección vírica,

En la Figura 6 se muestran en forma gráfica los valores de las medias y desviaciones estandar de los datos expresados en LBG (hora cero = h0 y hora ocho = h8) en relación al tiempo transcurrido tras la infección con el virus de la enfermedad de Aujeszky. Los resultados muestran diferencias entre el número de bacterias depositadas a la hora cero (h0) y las recuperadas a las ocho horas (h8) después de la inoculación de la bacteria,

En los cuadros 20 y 21 se encuentran los índices de remoción (% Rem-BGM) del pulmón izquierdo, derecho y de los lóbulos apicales, cardiacos, diafragmáticos e intermedio, respectivamente, en relación al tiempo transcurrido tras el desafo con el virus de Aujeszky. En ellos se observa una eliminación casi total de la bacteria (superior al 99%) excepto al día 7 después de la infección viral donde se observa valores de eliminación que fluctuaron entre 87 y 90%.

En el Cuadro 22 se encuentran los resultados del ANOVA, construido a partir de los índices de retención (% Ret-BGM) obtenidos a distintos días después de la infección de los cerdos con el virus de Aujeszky. En el se encontró un efecto debido a día y lóbulo; además una interacción -

significativa entre día y lóbulo ($P < 0,001$), en el número de bacterias recuperadas a las 8 horas tras el aerosol bacteriano.

Los resultados de la prueba de Tukey ($P = 0,05$) mostrados en el Cuadro 23, indicaron que los índices de remoción bacteriana a distintos tiempos después de la infección viral fue igual para todos los lóbulos pulmonares, excepto en el día 7 posdesafío con el virus, Por otro lado en éste momento y en el mismo cuadro se muestra que el lóbulo apical presenta mayores índices de retención de la Pasteurella multocida que los lóbulos cardiacos y diafragmáticos entre los cuales no se encontraron diferencias,

L	HORA CERO				HORA OCHO			
	Cerdo # 7		Cerdo # 8		Cerdo # 9		Cerdo # 10	
	BGM	LBGM	BGM	LBGM	BGM	LBGM	BGM	LBGM
AI	2.767×10^7	7.442	2.938×10^7	7.468	3.600×10^4	4.556	3.430×10^4	4.535
AD	7.010×10^6	6.845	7.540×10^6	6.877	1.540×10^4	4.187	1.750×10^4	4.243
CI	2.187×10^7	7.339	1.410×10^7	7.149	3.095×10^4	4.490	1.555×10^4	4.191
CD	2.205×10^7	7.433	1.131×10^7	7.053	6.500×10^4	4.812	1.455×10^4	4.162
I	2.715×10^7	7.507	2.035×10^7	7.308	1.555×10^4	4.191	1.630×10^4	4.212
DI	2.376×10^7	7.375	1.840×10^7	7.264	6.200×10^3	3.792	1.720×10^3	3.827
DD	1.043×10^7	7.018	1.445×10^7	7.160	3.305×10^4	4.519	6.850×10^4	4.835

CUADRO # 15 Resultados indivilizados del número de bacterias por gramo muestra (BGM) y su transformación logarítmica (LBGM) de cada lóbulo del pulmón al día 3 posdesafío del virus de Aujeszky; inmediatamente después del aerosol con Pasteurella multocida (Oh) y -- ocho horas más tarde (8h).

L = lóbulos

L	HORA CERO				HORA OCHO			
	Cerdo # 11		Cerdo # 12		Cerdo # 13		Cerdo # 14	
	BGM	LBGM	BGM	LBGM	BGM	LBGM	BGM	LBGM
AI	1.610x10 ⁶	6.206	1.481x10 ⁶	6.170	3.106x10 ⁵	5.492	2.453x10 ⁵	5.389
AD	1.157x10 ⁶	6.063	1.826x10 ⁶	6.261	2.402x10 ⁵	5.380	2.389x10 ⁵	5.378
CI	2.061x10 ⁶	6.314	2.430x10 ⁶	6.385	1.993x10 ⁵	5.299	2.959	5.471
CD	2.581x10 ⁶	6.411	3.493x10 ⁶	6.802	2.063x10 ⁵	5.317	3.108x10 ⁵	5.492
I	1.544x10 ⁶	6.188	1.932x10 ⁶	6.286	2.171x10 ⁵	5.336	1.859x10 ⁵	5.629
DI	3.432x10 ⁶	6.535	2.798x10 ⁶	6.446	2.559x10 ⁵	5.408	2.993x10 ⁵	5.476
DD	1.098x10 ⁶	6.040	1.623x10 ⁶	6.210	1.924x10 ⁵	5.284	2.398x10 ⁵	5.379

CUADRO # 14 Resultados individualizados del número de bacterias por gramo de muestra (BGM) y su transformación logarítmica de cada lóbulo del pulmón al día 7 postdesafío del virus de Aujeszky; inmediatamente después del aerosol con la Pasturella multocida (0h) y ocho horas más tarde (8h).

L = lóbulos

L	HORA CERO				HORA OCHO			
	Cerdo # 15		Cerdo # 16		Cerdo # 17		Cerdo # 18	
	BGM	LBGM	BGM	LBGM	BGM	LBGM	BGM	LBGM
AI	1.832×10^7	7.262	2.790×10^7	7.445	8.750×10^4	4.945	5.500×10^4	4.740
AD	1.988×10^7	7.298	4.935×10^7	7.693	4.115×10^4	4.614	4.720×10^4	4.673
CI	2.527×10^7	7.402	4.440×10^7	7.647	4.938×10^4	4.693	4.210×10^4	4.624
CD	3.838×10^7	7.584	6.115×10^6	6.786	6.750×10^4	4.829	1.230×10^5	5.089
I	3.430×10^7	7.535	4.133×10^7	7.616	1.373×10^5	5.138	6.300×10^4	4.799
DI	4.561×10^7	7.659	4.819×10^7	7.682	1.705×10^4	4.231	8.450×10^4	4.926
DD	4.468×10^7	7.650	4.471×10^7	7.650	1.200×10^4	4.079	1.025×10^5	5.010

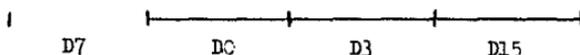
CUADRO# 16 Resultados indivilizadoc del número de bacterias por gramo de muestra (BGM) y su transformación logarítmica (LBGM) - de cada lóbulo del pulmón al día 15 posdesafío del virus de Au--jeszky; inmediatamente después del aerosol de la Pasteurella multocida (0h) y ocho horas más tarde (8h).

L = lóbulos

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos	23	13.137	0.571	6.140	0.001
Días	3	10.121	3.374	36.279*	0.001
Lóbulo	2	0.117	0.058	0.623	> 0.5
Pulmón	1	0.137	0.137	1.473	> 0.1
Día x lóbulo	6	1.375	0.230	2.473	> 0.5
Día x pulmón	3	0.202	0.067	0.720	> 0.5
Lóbulo x pulmón	2	0.217	0.108	1.161	> 0.5
Día x lóbulo x pulmón	6	0.965	0.161	1.731	> 0.5
Error	24	2.223	0.093		
Total	47	15.360			

CUADRO # 16 ANOVA, construido apartir de los datos (LBGM) obtenidos a la hora cero (0h) después de la aerosolización de la Pasteurella multocida, para determinar la existencia o no de un efecto debido a tratamientos sobre el número de bacterias depositadas, en los distintos días posinfección viral.

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos	3	11.415	3.805	41.165	0.001
Error	44	4.067	0.092		
Total	47	15.482			

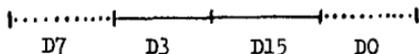


CUADRO # 17 ANOVA y prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) de los datos expresados en LEGM, obtenidos a la hora cero (0h) en los diferentes grupos de cerdos aerosolizados con la Pasteurella multocida, para determinar la existencia o no de un efecto debido a días posinoculación del virus de Aujeszky sobre el número de bacterias depositadas. Los grupos unidos por la misma barra no se encontró diferencias estadísticamente significativas.

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos	23	16.899	0.704	12.351	0.001
Día	3	14.751	4.917	86.236	0.001
Lóbulo	2	0.328	0.164	2.877	0.10
Pulmón	1	0.089	0.089	1.561	0.1
Día x lóbulo	6	0.371	0.062	1.088	0.397
Día x pulmón	3	0.454	0.151	2.649	0.372
Lóbulo x pulmón	2	0.076	0.037	0.649	0.25
Día x lóbulo x pulmón	6	0.831	0.138	2.421	0.4
Error	24	1.360	0.057		
Total	47	18.259			

CUADRO # 10 ANOVA, construido apartir de los datos obtenidos a las 8 horas después del aerosol que contenía la Pasteurella multocida, expresado en LRCM, utilizado para determinar la existencia o no de un efecto debido a tratamientos, sobre el número de bacterias recuperadas en los distintos días posinfección viral.

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos	3	14.464	4.821	55.903	0.001
Error	44	3.795	0.086		
Total	47	18.259			



CUADRO #19 ANOVA y prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$) de los datos expresados en LBGM, obtenidos a los 8 horas en los diferentes grupos de cerdos aerosolizado con la Pasteurella multocida en los distintos días posinfección viral y efectuados para determinar la existencia o no de un efecto de días, --- sobre el número de bacterias eliminadas del pulmón. Los --- grupos unidos por la misma barra, no se encontró diferencias estadísticamente significativas.

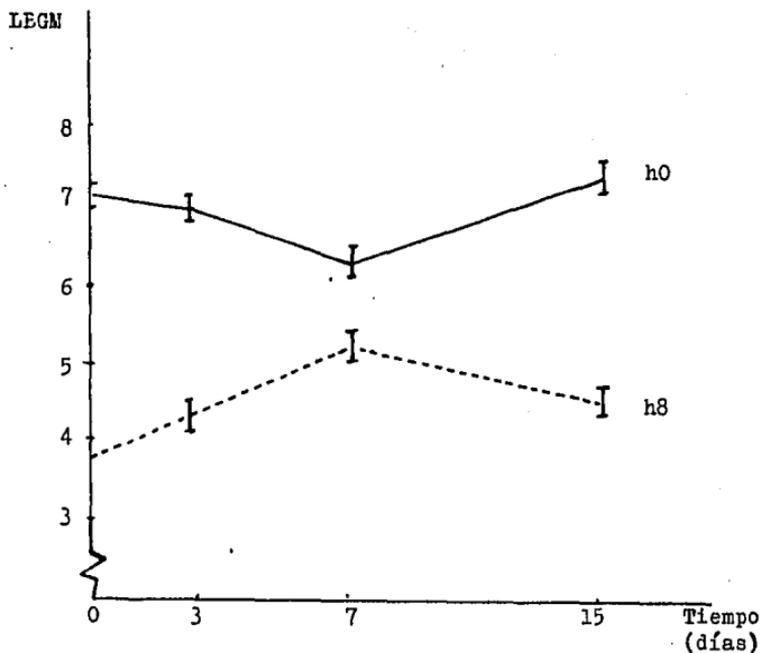


FIGURA #6. Número de bacterias por gramo de muestra, transformación logarítmica (LEGM) en relación al tiempo transcurrido tras la aerosolización de la *P. multocida* (h0 y h8) y a diferentes tiempos después del desafío con el virus de Aujeszky.

P	Días posdesafío con VEA							
	0		3		7		15	
	% REM	% RET	% REM	% RET	% REM	%RET	% REM	% RET
I	99.87	0.13	99.87	0.13	87.42	12.57	99.82	0.15
D	99.80	0.3	99.80	0.2	88.52	11.48	99.82	0.18
LI	99.91	0.09	99.91	0.09	90.29	9.71	99.69	0.31

CUADRO # 20 Medias de los índices de remoción (% Rem BGM) retención de la Pasteurella multocida (% Ret BGM) del pulmón izquierdo (I) derecho (D) y lóbulo (LI) intermedio, - en relación al tiempo transcurrido después del desafío -- con el virus de Aujeszky.

P = Pulmón

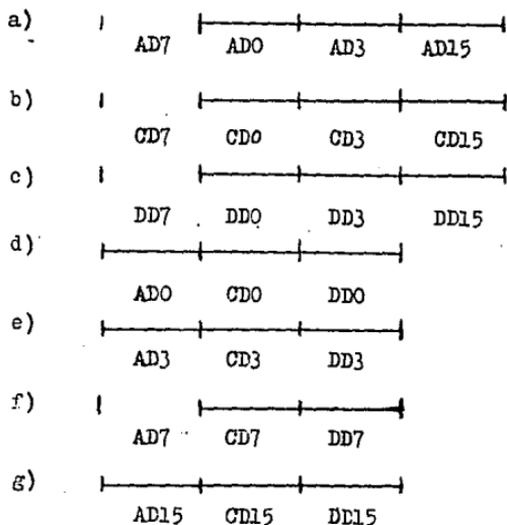
L	Días posdesafío con VEA							
	0		3		7		15	
	% REM	% RET	% REM	% RET	% REM	% RET	% REM	% RET
A	99.87	0.13	99.55	0.45	87.53	12.47	99.34	0.16
C	99.86	0.14	99.82	0.18	87.30	12.20	99.31	0.19
D	99.85	0.15	99.83	0.17	88.60	11.40	99.85	0.15
I	99.92	0.08	99.91	0.09	90.29	9.71	99.69	0.31

CUADRO # 21 Medias de los índices de retención (% RET BGM) y remoción de la Pasteurella multocida (% REM BGM) de los lóbulos apicales (A) cardíacos (C), diafragmáticos (D) e intermedio (I) en relación al tiempo transcurrido después del desafío con el virus de Aujeszky.

L = lóbulos

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamientos	23	1477.087	64.221	38.796	<0.001
Día	3	1342.08	447.362	270.254	<0.01
Lóbulo	2	27.77	13.888	8.389	<0.005
Pulmón	1	0.905	0.910	0.546	>0.25
Día x lóbulo	6	83.922	13.987	8.450	<0.001
Día x pulmón	3	4.591	1.527	0.922	0.4
Pulmón x lóbulo	2	5.129	2.564	1.282	>0.25
Día x lóbulo x pulmón	6	12.687	2.114	1.277	>0.25
Error	24	39.728	1.655		
Total	47				

CUADRO #22 Tabla de ANOVA construido a partir de los índices de retención bacteriana (% Ret BGM) para detectar un efecto debido a día, lóbulo y pulmón, a distintos tiempos posinfección de los cerdos con el virus de Aujeszky.



CUADRO # 23 Prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$), para detectar diferencias en el % de retención (% Ret BGM) entre: a) días en lóbulos apicales, b) días en los lóbulos cardíacos, c) días en los lóbulos diafragmáticos d) lóbulos días cero, e) lóbulos día 3, f) lóbulos día 7, g) lóbulos día 15. Las barras unen los grupos en los que no se encontró diferencia estadística significativa.

5. Estudio anatomopatológico

5.1. Lesiones

En los pulmones de los cerdos utilizados en el experimento de remoción de la Pasteurella multocida, no se encontraron lesiones macroscópicas a la hora 0, 8 y 30 después de la aerosolización de la bacteria.

En el Cuadro 24 se presentan las lesiones macroscópicas encontradas en los cerdos aerosolizados con la Pasteurella multocida (h0 y h8) a los 3, 7 y 15 días después del desaffo con el virus de Aujeszky. En el se observa que los cerdos - al tercer día de la infección viral desarrollaron congestiones leves en los lóbulos apicales (AI, AD), cardiacos (CI, CD) y en el lóbulo intermedio (LI); 7 días después en todos los animales hubo zonas de consolidación roja de 1 a 3 cm. de diámetro en los lóbulos apicales y cardiacos; y al 15o. día se observaron en dos cerdos las mismas lesiones encontradas a los 7 días después del desaffo del virus.

5.2. Hallazgos histopatológicos

Los resultados del estudio histopatológico a los 3, 7 y 15 días después del desaffo de los cerdos con el virus de la enfermedad de Aujeszky se encuentran detallados en el Cuadro 25, como se observa, al tercer día después del desaffo con el virus (3 DIP-VEA), los cerdos desarrollaron cambios histopatológicos variables que consistieron en edema, hemorragia y congestión, colapso alveolar, bronconeumonía e infiltraciones linfocitarias peribronquial y de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) en la luz de los bronquios. Al séptimo día - (7 DIP-VEA) se encontró además de los hallazgos anteriores: Consolidación e infiltración de macrófagos en la luz alveolar. En el décimo quinto día (15 DIP-VEA) las lesiones fue-

ron parecidas a las encontradas a los 3 y 7 días, además se observó engrosamiento de los septos alveolares e infiltración de macrófagos en la luz alveolar.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Experimentos	Lesiones macroscópicas
#1 REM P. multocida	Pulmón normal en los 6 cerdos
# 2 Interacción	
3 DIP - VEA C7 h0 C8 h0 C9 h8 C10 h8	Congestión leve en los lóbulos (en los 4 cerdos) AI, AD, CI, CD, LI (AI) apical izquierdo (AD) apical derecho (CI) cardíaco izquierdo (CD) cardíaco derecho (LI) lóbulo izquierdo
7 DIP - VEA C11 h0 C12 h0 C13 h8 C14 h8	Consolidación roja en Consolidación roja en Consolidación roja en Consolidación roja en AD, CI, CD, LI AI, AD AI, AD, CI AI, AD
15 DIP - VEA C15 h0 C16 h0 C17 h8 C18 h8	Pulmón normal consolidación Pulmón normal consolidación AD AI

CUADRO # 24 Lesiones macroscópicas registradas en los experimentos de remoción de Pasteurella multocida (#1 REM Pasteurella multocida) y en el experimento para detectar el efecto del virus de Aujeszky (#2 Interacción) sobre la remoción de la bacteria, a los 3, 7 y 15 días posinoculación del virus, DIP: días después de la inoculación del virus.

15 DIP - VEA	
C15 h0	-Bronconeumonía, congestión con predominio macrófago en la luz alveolar, edema y hemorragia.
C16 h0	-Atelectasia y engrosamiento de septos.
C17 h3	--Bronconeumonía, con predominio de PMN en bronquios y alveolos. Colapso alveolar.
C18 h3	-Bronconeumonía, con predominio de PMN en bronquios y alveolos.

CUADRO # 25 Hallazgos Histopatológicos de los experimentos #1 (REM de Pasteurella multocida) y #2 (interacción) para detectar el efecto del virus de Aujeszky sobre la remoción de la Pasteurella multocida a diferentes días posinoculación del virus. * DIP-VEA-días posinoculación del virus de Aujeszky.

NO. DEL CERDO	TITULO DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES	
	4 SEMANAS DESPUES DE LA VACUNACION	6 SEMANAS DESPUES DE LA VACUNACION (MOMENTO DE DESAFIO CON VEA)
1	1:8	-
2	1:16	-
3	1:16	-
4	1:8	-
5	1:16	-
6	1:8	-
7	1:8	1:32
8	1:8	1:64
9	1:16	1:64
10	1:16	1:64
9	1:8	1:32
10	1:16	1:64
11	1:16	1:32
12	1:16	1:32
13	1:8	1:64
14	1:16	1:32
15	1:8	1:32
16	1:16	1:64
17	1:8	1:32
18	1:8	-

CUADRO 26. Título de anticuerpos neutralizantes a las 4 y 6 semanas después de la inmunización de cerdos con una vacuna inactivada contra el virus de la enfermedad de Aujeszky.

Experimentos	
#1 REM P. multocida	Hallazgos Histopatológicos Ausencia de lesiones
# 2 Interacción	
3 DIP - VEA *	
C7 h0	-Proliferación linfocitaria peribronquial edema, hemorragia en aveolos.
C8 h0	-Congestión y hemorragia en alveolos.
C9 h0	-Congestión, bronconeumonía exudativa con Predominio de PMN, pocos macrófagos en la luz alveolar.
C10 h8	-Proliferación linfocitaria peribronquial, Bronconeumonía con predominio de PMN en bronquios. Colapso alveolar.
7 DIP - VEA	
C11 h0	-Bronconeumonía con abundantes PMN en alveolos, proliferación linfocitaria peribronquial, edema, hemorragia.
C12 h0	-Bronconeumonía con abundantes PMN en bronquios y alveolos, abundante macrófagos en la luz alveolar, edema alveolar, proliferación peribronquial.
C13 h8	-Bronconeumonía, abundantes en PMN en alveolos, edema.
C14 h8	-Bronconeumonía, proliferación peribronquial de linfocitos, exudado purulento en bronquios, consolidación con reparación.

VI. DISCUSION

La determinación del patrón de remoción pulmonar de Pasteurella multocida en cerdos de engorda bajo condiciones normales de salud y la posible alteración del patrón de eliminación por el efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky en cerdos que fueron previamente vacunados contra dicho virus, fueron los objetivos establecidos en este trabajo de investigación. Los resultados obtenidos en el primer experimento se utilizaron como punto de referencia para compararlos con los obtenidos en el estudio del efecto del VEA, como modelo para determinar el papel que juega este virus como patógeno primario y que facilitaría la colonización del pulmón por un agente oportunista como P. multocida.

El modelo de inoculación de bacterias por aerosol y la determinación de la remoción bacteriana del pulmón, fueron los métodos elegidos para cumplir con los objetivos de este trabajo de investigación, debido a que se ha utilizado ampliamente en el estudio de la respuesta del tracto respiratorio a bacterias inoculadas bajo condiciones normales o adversas (Thomson y Gilka, 1974; López y cols. 1976).

Por otro lado el modelo de inoculación por aerosoles ofrecen múltiples ventajas sobre otras vías de inoculación dado a que: Es el método que más se aproxima a la vía natural de transmisión de las enfermedades respiratorias, se puede inocular un gran número de animales simultáneamente, asegura una distribución homogénea de partículas en el tracto respiratorio, puede ser calculado el número de microor-

ganismos depositados en el pulmón de animales expuestos - bajo condiciones normales o adversas, a una concentración conocida de bacteria durante un tiempo controlado (López, cols. 1982; Martínez, 1984),

En el estudio de la remoción pulmonar de Pasteurella multocida en el cerdo normal, se observó un comportamiento asintótico en su patrón de eliminación con respecto al tiempo posaerosolización del microorganismo (Figura 3). Este patrón de eliminación bacteriano concuerda con los resultados obtenidos con otras bacterias, en diferentes especies animales y en las mismas condiciones normales de salud (Campbell y cols, 1983; Curtis y cols. 1976, Jakab y Dick, 1974; Lillie y Thomson, 1972; Martínez y cols. -- 1984; Nugent y Pesanti, 1982; Saunder y cols, 1983; Veit y cols, 1978). Todos estos autores demostraron la gran -- capacidad del pulmón para remover distintas especies bacterianas de manera rápida y predecible.

Este experimento se demostró que el pulmón de cerdo, tiene gran capacidad para la eliminación de Pasteurella multocida en condiciones normales de salud, con un patrón similar a otros trabajos, empleando otras bacterias y diferentes especies animales, sin embargo han existido descripciones de patrones de eliminación anormales en ratones inoculados con Pseudomona sp. y Klebsiella neumoniae, en los que se ha encontrado una multiplicación bacteriana en el pulmón en vez de la eliminación. Las alteraciones en la remoción pulmonar de bacterias que se han sugerido se deben a la producción de sustancias extracelulares tóxicas, a los componentes de la cápsula y de la pared celular (Jackson y cols. 1976; Jay y cols. 1976),

En nuestros datos el análisis de varianza reveló diferencias significativas ($P < 0,001$) entre el número de bacterias depositadas a 0 horas y entre las recuperadas a 8 y 30 horas (Cuadro 5). Y la prueba de Tukey de los datos expresados en LBGN, mostraron que entre las 8 y 30 horas existió diferencia significativa ($P < 0,05$); sin embargo estas diferencias no fueron observadas entre las 8 y 30 horas cuando se analizaron los resultados en base a los índices de remoción (% Rem BGM ver los Cuadros 10, 11, 111 y Figura 5). Con estos resultados se pudo determinar el mejor momento adecuado para proceder al sacrificio los cordos del segundo experimento, con los cuales se calcularon la retención y la remoción bacteriana a distintos días después del desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky. El momento más adecuado para nuestras condiciones experimentales fue el de ocho horas después de haber realizado la inoculación de la bacteria, aunado al hecho de que como se muestra en el Cuadro 10 los valores de Remoción bacteriana indican que éstas fueron eliminadas del pulmón casi totalmente a las 8 horas después de la aerosolización; así mismo en la Figura 5 se aprecia claramente que en este tiempo los valores de eliminación pulmonar para la multocida fueron superiores al 99%.

El hecho de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas por análisis de varianza (Cuadros 6, 7 y 8) entre el pulmón izquierdo y derecho, ni entre los lóbulos craneales, medios y caudales, en el número de bacterias recuperadas a las 0, 8 y 30 horas después de la inoculación de la Pasteurella multocida por aerosol; podría indicar que el método de infección por aerosoles utilizado en esta investigación, asegura una distribución homogénea de

partículas microbianas en el pulmón y que el pulmón del cerdo en condiciones normales de salud responde eficazmente y de manera uniforme en la eliminación de la bacteria. Estos resultados concuerdan de modo general con lo publicado por Saunder y cols. (1983) trabajando en cerdos de engorda inoculados con Bacillus subtilis por aerosol y con Sebunya y cols. (1984) trabajando en la misma categoría de cerdos inoculados con Bacillus subtilis y Haemophilus pleuropneumoniae por aerosol. Observaron que el número de microorganismos depositados a la 0 horas tras los aerosoles bacterianos fue superior en los lóbulos caudales que al de los lóbulos craneales y medios; sin embargo a las 12 horas después de la inoculación el número de microorganismos retenidos en las 3 regiones del pulmón no varió significativamente.

Los estudios de remoción pulmonar de bacterias en condiciones normales, proporciona bases para el estudio de los factores que pueden influir adversamente en la eliminación de bacterias del pulmón y de esta manera permitir su multiplicación y en consecuencia el desarrollo de procesos neumónicos (Thomson y Gilka, 1974). En este sentido se investigó el efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de Pasteurella multocida, en cerdos previamente vacunados contra el virus (VEA). Esta interacción fue determinada relacionando el tiempo transcurrido entre el desafío de los cerdos con el virus y el de la inoculación de la bacteria por aerosol. La vacunación fue justificada con base a que su utilización no proviene la multiplicación viral ni el desarrollo de lesiones neumónicas observadas después del desafío con el virus (Wittman y cols, 1980, Alva Valdés y cols. 1981).

Los resultados obtenidos en este experimento, demostraron que el virus de la enfermedad de Aujeszky interfirió marcadamente con la remoción pulmonar de Pasteurella multocida a los 7 días después de la infección viral y en menor grado a los 3 y 15 días, momento en que el número de bacterias recuperadas a las 8 horas después de la aerosolización, fué -- significativamente ($P < 0,001$) diferente al grupo control de remoción normal (Cuadros 17, 19 y figura 6).

Las alteraciones pulmonares posiblemente son la causa del aumento del número de bacterias recuperadas a las 8 horas después del aerosol bacteriano, (cuadros 24 y 25) o a los efectos generales inducidos por el virus de la enfermedad de Aujeszky que disminuyen la capacidad fisiológica del pulmón para remover las bacterias depositadas. Se descubren los mecanismos de inmunosupresión inducido por el VEA, a nivel del tracto respiratorio que permitan la colonización del pulmón por bacterias oportunistas. Sin embargo, se ha demostrado que algunos virus con tropismo respiratorio tales como el virus de la Parainfluenza e Influenza producen alteraciones en los mecanismos antibacterianos del pulmón (Jakab, 1981a). Entre estos defectos de la defensa pulmonar durante la infección viral se han mencionado las siguientes; disminución de la remoción mucociliar, disminución de los niveles de sustancias tenso-activa, supresión de la actividad fagocitaria del macrófago alveolar (quimiotaxis, adherencia, ingestión, fusión de fago-lisomas, acción lítica y degradativa intracelular) y una disminución de los niveles de enzimas lisosomales (Jakab, 1981a, Yates, - - 1982a).

En este estudio fue necesario un intervalo de 7 días para observarse una retención bacteriana altamente significativa ($P < 0,001$) en cerdos infectados con el virus de la enfermedad Aujeszky. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en otras investigaciones en los que se ha demostrado que diversos virus tienen la capacidad de deprimir la habilidad del aparato respiratorio de diferentes especies animales para eliminar bacterias inhaladas (Klein y cols. 1969; López y cols. 1976; Jakab, 1981b, Pijoan y Ochoa, 1978; Jakab, 1974; Warr y Jakab, 1983; Badiola y Pujols, 1984). Todos estos estudios han demostrado que cada virus tiene un tiempo crítico para alterar los mecanismos de defensa del tracto respiratorio, y si las bacterias son inhaladas en este momento, el resultado será una infección combinada virus-bacteria y neumonía,

En estos datos el análisis de varianza reveló que hubo un efecto de día posinfección viral en el número de bacterias depositadas a la hora 0 después el aerosol bacteriano ($P < 0,001$), Y la prueba de Tukey mostró que el número de bacterias depositadas a las horas cero fue significativamente menor ($P < 0,05$) en el día 7 que las encontradas en los días 0 (control de retención bacteriana en la curva de remoción en la hora cero) 3 y 15 posdesafío con el virus de Aujeszky entre los cuales no se encontró diferencia (Cuadros 16, 17 y Figura 6). Este fenómeno quizás se debe a que en este momento fue cuando aparecieron los cambios macroscópicos más marcados que consistieron en áreas de consolidación pulmonar (ver Cuadro 24). En este sentido Jakab y Green (1974) demostraron que áreas de consolidación pulmonar de ratones infectados con virus Sendai retienen el 10% de las bacterias inoculadas y el 90% restante se retienen en las áreas no consolidadas del pulmón.

Estos autores sugirieron que el bajo depósito de partículas en las áreas consolidadas se debe a la poca ventilación que ocurre en estas regiones afectadas y como resultado las partículas se depositan en las regiones del pulmón menos alteradas,

El ANOVA realizado con los datos expresados en porcentajes de retención (Cuadro 22) bacteriana a distintos tiempos después de la infección de los cerdos con el virus de enfermedad Aujeszky, mostró que no hubo diferencias entre el pulmón izquierdo y el derecho; sin embargo se registró un efecto de día y una interacción entre día y lóbulo significativa ($P < 0.001$). Las pruebas estadísticas posteriores (Tukey, Cuadro 22) indicaron que entre los días 0 (control de remoción bacteriana), 3 y 15 posdesafío con el virus no se encontró diferencia entre lóbulos en los índices de remoción. Sin embargo en el día 7 en el cual el porcentaje de retención fue significativamente mayor ($P = 0.05$) en relación a los demás días después de la infección vírica, se encontró que los índices de retención bacteriana fueron significativamente mayores en el lóbulo apical ($P < 0.05$) que en los lóbulos cardiacos y diafragmáticos entre los cuales no hubo diferencia. De acuerdo a estos resultados, los lóbulos apicales son los más afectados por el virus que los lóbulos cardiacos y diafragmáticos, al séptimo día, momento en que el virus de la enfermedad de Aujeszky interfiere marcadamente con la remoción bacteriana. Este efecto quizás se deba, más no confirma por un lado al método de inoculación del virus lo que haría posible que llegasen más partículas virales a los lóbulos craneales, que en los demás lóbulos pulmonares, induciendo con esto el desarrollo de áreas de consolidación más marcadas en los lóbulos apicales que en las

demás áreas del pulmón y por otro lado quizás a una marcada supresión de la actividad bactericida en estas áreas - más lesionadas del pulmón. En este sentido Jakab y Green (1974) en un estudio orientado a comparar los mecanismos bactericidas de regiones consolidadas del pulmón de ratones infectados con virus Sendai y desafiados a los 7 días posinfección vírica con Staphylococcus aureus marcados -- radioactivamente, encontraron que los mecanismos estaban similarmente suprimidos en ambas zonas, aunque la supresión fue mayor en las áreas consolidadas, donde la multiplicación bacteriana estuvo limitada.

El hecho de no encontrarse lesiones macroscópicas, - ni microscópicas en el pulmón de los cerdos en el experimento de la remoción pulmonar de la Pasteurella multocida (Cuadros 24 y 25) indican que esta bacteria no es capaz - de producir patología pulmonar por sí sola en cerdos. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Carter --- (1975), Pijoan y cols, (1982), Gois y cols, (1983); los - que demuestran que la inoculación experimental de la bacteria no producen signos ni lesiones de la enfermedad respiratoria del cerdo. Por otro lado se ha demostrado que - esta bacteria solo puede producir lesiones neumónicas sólo cuando es inoculada en combinación con otros agentes - que disminuyen la defensa del pulmón; por lo tanto se le ha considerado como un agente oportunista de los procesos neumónicos (Kielstein y cols, 1977; Pijoan y Ochoa, 1978).

En esta investigación se encontraron signos de un -- cuadro respiratorio discreto de corta duración, cambios - anatomopatológicos variados cuanto al tipo y grado de lesión (Cuadros 24 y 25) y una respuesta serológica moderada de anticuerpos virus-neutralizantes (Cuadro 26). Estos

resultados indican que la inmunización de los cerdos con una vacuna de uso comercial contra el VEA protegió a los cerdos contra la presentación nerviosa de la enfermedad de Aujeszky. Sin embargo, no protegió al cerdo del cuadro respiratorio ni de las lesiones neumónicas observadas. A similares conclusiones llegaron ; Wittman y cols. (1980), Vanier (1982), Alva Valdés y Cols. (1983), todos estos autores trabajando con cerdos de engorda inmunizados con vacunas inactivadas de uso comercial y desafiando los animales con cepas virulentas de VEA a distintos tiempos después de la vacunación.

Los tipos y la distribución de las lesiones macroscópicas caracterizadas por congestión y consolidación leve en los lóbulos apicales cardiacos e intermedio, principalmente observadas al tercer y séptimo día posinfección vírica, concuerdan con varios reportes de la literatura enfocados a determinar el efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre el pulmón del cerdo susceptible o vacunado (Baskerville, 1971, 1973; Wittman y cols. 1980; Vanier, 1982; Alva Valdés y cols. 1983). Sin embargo, hay cierta discrepancia entre los hallazgos histopatológicos encontrados en este estudio (Cuadro 25) donde la lesión más sobresaliente fué una bronconeumonía exudativa con predominio de células blancas y entre las lesiones observadas por los autores citados antes los cuales encuentran principalmente bronquitis, bronquiolitis y alveolitis. Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos en este experimento y los obtenidos por los autores citados previamente, quizás se deban a variantes en los modelos experimentales tales como: edad de los animales, estado inmune, dosis de virus y al tropismo de las cepas utilizadas.

La bronconeumonía y los cambios histopatológicos encontrados en los animales utilizados en esta investigación,

sugieren una alteración de los mecanismos de defensa pulmonar inducido por el virus de Aujeszky, lo que conduce -- probablemente a una multiplicación bacteriana de origen -- saprófita. Tales alteraciones no pueden ser atribuidas a -- la Pasteurella multocida inoculados por aerosol, dado al -- corto tiempo entre la exposición de los animales a la bac -- teria y el sacrificio de los mismo y por otro lado a la na -- turaleza de las lesiones observadas.

En esta investigación se demostró que cepas virulentas del virus de Aujeszky (VAC-1) afectan la remoción pulmonar de la Pasteurella multocida e inducen al desarrollo de procesos neumónicos, en cerdos inmunizados contra el -- VEA. Sin embargo queda por definir: qué mecanismos de defensa del pulmón son los más afectados por el virus, por otro lado si este fenómeno puede ocurrir con cepas naturalmente atenuadas , tanto en cerdos vacunados como en cerdos sin inmunización y por último sería importante investigar si la inmunización por inoculación intranasal con ambos -- agentes evita el desarrollo de procesos neumónicos en el -- cerdo de engorda. Estas investigaciones permitirían profundizar más acerca de la interacción-virus de la enfermedad de Aujeszky y Pasteurella multocida en los procesos -- neumónicos del cerdo y así como sugerir alternativas de con -- trol para las enfermedades respiratorias de estos animales.

BIBLIOGRAFIA

Alva-Valdes, R.; Glock, R. D.; Kluge, J. P.; Keune, C. M.; Effects of vaccination on lesion development in pseudorabies virus --- challenged swine. Am. J. Vet. Res. 44(4):558-595(1983).

Badiola, S. J. I.; Pujols, R. J.; Estudio sobre la interacción de - Aujeszky con la Pasteurella multocida en los procesos neumónicos del cerdo. Tesis de Maestría : Area de Microbiología. F.E.S.-C.-UNAM. (1984).

Badiola, S. J. I.; Pujols, R. J.; González, G. S.; Ciprián, C. A.; Interacción virus-bacteria en las neumonías del cerdo. I. Relación-virus de Aujeszky-Pasteurella multocida en pulmones neumónicos colectados en rastro, XIX Congreso AMVEC. Mazatlán, Sin. p.9-11 - (1984a).

Badiola, S. J. I.; Pujols, R. J.; Aguilar, S. A.; Hernández, B. E.; Interacción virus-bacteria en la neumonías del cerdo. II. Técnica de inmunoelectroforesis (IOEP) para la detección de anticuerpos en cerdos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky, XIX. Congreso AMVEC. Mazatlán, Sin, México, p. 12-14(1984b).

Baluyut, S. C.; Berggen, K. A.; Simonson, R. R.; Bemrick, W. J.; Maheswaran, S. K.; Interaction of Pasteurella haemolytica with bovine neutrophils: Identification and partial characterization of a cytotoxin. Am. J. Vet. Res. 42:1920(1981)

Barrañón, C.; Velasco, R.; Secuela de un brote de la enfermedad de Aujeszky. Memorias del Simposio sobre el análisis y perspectivas de control de la enfermedad de Aujeszky en México. AMVEC. - p 39-44 (1984).

Baskerville, A.; The histopathology of pneumonia produced by aerosol infection of pig with a strain of Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 12:590-592(1971).

Baskerville,A. : Ultrastructural changes in the pulmonary airways of pigs with a strain of Aujeszky's disease virus, Res. Vet. Sci. 13: 127-132(1972).

Baskerville,A. : The histopathology of experimental pneumonia in pigs produced by Aujeszky's disease virus, Res. Vet. Sci. 14:223-228 (1973a).

Baskerville,A. : Ultrastructural changes in the lungs of pigs infected with Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 14:229-233 (1973b).

Benson,M,L.; Thomson,R,G.; Valli,V,E,O.; The bovine alveolar macrophage,II. In vitro studies with Pasteurella haemolytica. Can. J. Comp. Med. 42(3): 368-369 (1978).

Bran.L.;Suhaci,I.; Ursache,R.; Experimental production of Aujeszky's disease by nasal instillation of culture virus. Archiva. -- Vet. 5: 83-87 (1968).

Campbell,S,G.; Mtero,S,S.; Niperbuhl,C,J.;Collin,F,M. : Fate of-- Pasteurella haemolytica in conventionally raised and germ free mice, Infect. Immun. 39:202-207 (1983).

Carter,G.R. :Pasteurella multocida and Pasteurella haemolytica. In advances in Veterinary Science. Vol II,C.A. Brandly and C.A. Cornelius(eds).Academic Press. New York,(1967).

Carter,G.R. : Pasteurellosis. In: Disease of swine,H.W. Dunne -- and A.D. Leman(eds). 4th. Iowa State. Univ. Press.,Iowa, pp. 621 - 629(1975).

Cartwright,S. : Epidemiology and control of Aujeszky's disease in Great Britain.In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds.), Louxbourg,(1982).

Clark, G. J. ; The upper respiratory system in current veterinary therapy food animal practice, Edited by J.L. Howard. Eds. W.B. Saunder Company, Philadelphia, U,S.A. p. 817-823 (1981).

Cohen, A.B. and Gold, W.M.; Defense mechanisms of the lungs. Annual Rev. of Phys. 37:325-350 (1975).

Curtis, S.R.; Kingdom, R.D.; Simon, J.; Drumond, J.D. : Effects of age and cold on pulmonary bacterial clearance in the young pig. Am. J. Vet. Res. 37:299-301 (1976).

Cowan, S.T.; Steel's K, J. ; Manual for the identification of medical bacteria, 2th, Cambridge Univ. Press. pp. 137-142. - (1974).

Cowart, R.P.; Backstrom, L. : Prevalence of dermonecrotic toxin ucing Pasteurella multocida. Strains in Illinois swine herds with varying levels of atrophic rhinitis and pneumonie. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium (1984).

Daniel, W. W. : Bioestadística, bases para el análisis de las ciencias de la salud, Ed. Limusa, México, p. 485 (1980).

Degre, M.; Glasgow, L.A. ; Synergistic effect in viral-bacterial infection, I Combined infection of the respiratory tract in mice with parainfluenza virus and Haemophilus influenzae. J. Infect. Dis. 118:449-462 (1968).

Degre, M. : Combined viral-bacterial infection in the respiratory tract; An experimental study. Universitetsforlaget. - - Trykningsentral, Oslo. (1971).

De Leeuw, P. W.; Wijsmuller, J.M.; Zating, J. W.; Tielen, M.J.M.: Comparison of intranasal and parenteral vaccination against - - Aujeszky's disease in 12-week-ols pigs from immunised dams. G. Wittmann S.A. Hall (eds.), Louwembourg (1982).

Dunnill, N.S. : Some aspects of pulmonary defence. J. Pathol., 128: 222-236 (1979).

Easterday, B.C. : Swine influenza, In; Diseases of swine, H.W. Dunne and A.D. Leman (eds.) 4th, Iowa State Univ. Press, Iowa, pp. 141-167 (1975).

Gois, M.; Kusksa, F.; Sisak, F.; Microbiological findings in the lungs of slaughter pigs. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Copenhagen, p. 214 (1980).

Gois, M.; Barnes, H.J.; Ross, R.F.; Potentiation of turbinate atrophy in pigs by long-term nasal colonization with - - Pasteurella multocida. Am. J. Vet. Res., 44(3): 372-378 (1983).

Goldstein, E.; Green, G.M. : Alteration of the pathogenicity of Pasteurella pneumotropica for the murine lung caused by changes in pulmonary antibacterial activity. J. Bact. 93:1651-1656 (1967).

Goodwin, R.F.W. : The economics of enzootic pneumonia. Vet. Rec. 89:77-81 (1971).

Grandell, R. A.; Mock, R.E.; Mesfing, G.M. : Latency in pseudo rabies vaccinated pigs, Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health. -- Assoc. 83:444-447 (1979).

Green, G.M. The J. Burns Amberson Lecture, In defense of the lung. Am. Rev. Resp. Dis. 102:691-703 (1970).

Green, G.M. : Lung defense mechanisms. Med. Clin. North. Am. 57: 547-562 (1973).

Green, G.M.; Jakab, G.J.; Low, R.B.; David, G.S.; Defense mechanism of the respiratory membrane, Am. Rev. Respir. Dis. 115: 479-514 (1977).

Gutenkunst, D.E.; Pirtle, E.C.; Humoral and cellular immune responses in swine after vaccination with inactivated - - pseudorabies virus, Am. J. Vet. Res. 40 (10):1343-1346 (1979).

Gutenkunst, D.E.; Pirtle, E.C.; Miller, L. D.; Stewart, W.C.; Isolation of pseudorabies from trigeminal ganglia of a latently infected sow, Am. J. Vet. Res. 41(8):1315-1316 (1980).

Harris, G.D.; Johanson, W, and Pierce, A.K.; Determinants of lung bacterial clearance in mice after acute hypoxia, Am. Rev. of Resp. Disease, 116:671-677 (1977).

Hawkes; General principles underlying laboratory diagnosis of viral infections, In: Diagnostic procedures for viral, - - rickettsial and chlamydial infections, 5o, Edition; ed. E.H. Lennette y N.J. Schmidt, p, 3-49 (1979).

Heddleston, K. L.; Gallegher, J.E.; Rebers, P.A.; Fowl cholera gel diffusion precipitin test for serotyping Pasteurella multocida from avian species. Avian. Dis., 16:925-936 (1972).

Hernández, B.E.; Neumonías causados por otros agentes virales. Memorias del I Curso Latinoamericano de Actualización sobre - Neumonías de los Cerdos. E.N.E.P.- C, - U.N.A.M./A.M.V.E.C. México, pp. 99-107 (1978).

Hernández, B.E.; Influenza porcina, En: Diagnóstico de las enfermedades del cerdo, Ed, R.R. Necoechea y C. Pijoan, México, pp. 459-466 (1982).

Hurley, D.P.; Aguilar, A.; Garibay, J.R.; Landers, J.; Estadística, Curso CINVESTAV-SEP. Dept. Matemáticas, FES-Cuautitlán, México (1981).

Hurley, P.D.; Aguilar, A.; Garibay, J.R.; Landero, J. : Técnicas de diseño experimental. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Departamento de Matemáticas F.E.S.-C - U.N.A.M. p. 345 (1981).

Jackson, A.E.; Southern, P.M.; Pierce, A.K.; Sanford, J.P.: Pulmonary clearance of gram-negative bacilli. J. Lab. Clin. Med. 69:833-841 (1967).

Jakab, G.J.; Green, G.M.: The effect of Sendai virus infection on bactericidal and transport mechanisms of the murine lung. J. Clin. Invest. 51:1989-1998 (1972).

Jakab, G.J.; Green, G.M.; Pulmonary mechanisms in consolidated and non consolidated regions of the lungs infected Sendai virus. J. Infect. Dis. 129:263-270 (1974).

Jakab, G.J. : Effect of sequential inoculations of Sendai virus and Pasteurella pneumotropica in mice. J. Am. Vet. Med. Ass. 164:723-728 (1974).

Jakab, G.C.; Dick, E.C.: Synergistic effect in dural respiratory infection of mice with Sendai virus and Pasteurella pneumotropica by aerosol. Bact. Proc. pp. 116-117 (1974).

Jakab, G.J.; Green, G.M.; Defect in intracellular killing of Staphylococcus aureus within alveolar macrophages in Sendai virus-infected murine lungs. J. Clin. Invest. 57:1533-1539 (1976).

Jakab, G.J.: Mechanism of virus-induced bacterial superinfections of the lung. Clinics in Chest, Med, Vol, 2(1):59-66 (1981a).

Jakab, G.J.: Interactions between Sendai virus infection and bacterial pathogens in the murine lung; A review. Lab. Anim. Sci. 31:170-176 (1981b).

Jericho, K. W. F.: Pathogenesis of pneumonia in pigs. Vet. Rec. 82:509-516 (1968).

Jericho, K.W.F.; Langford, E.V.; Pantekoek, J.; Recovery of Pasteurella haemolytica from aerosols at differing temperature and humidity. Can. J. Comp. Med. 41:211-214 (1977),

Jay, S.J.; Hohanson, W. G.; Pierse, A.K.; Reisch, J.S.: Determinants of bacterial clearance in normal mice. J. Clin. Invest. 57: 811-817 (1976).

Jubb, K. and Kennedy, P.; Pathology of domestic animals. I ed. Academic. Press Inc.; pp, 219-327. N, York, U.S.A, (1970)

Kasza, L.; Hodges, R, T.; Betts, A.O.; Trexler, P.C.: Pneumonia in gnotobiotic pigs produced by simultaneous inoculations of a swine adenovirus and mycoplasma. Vet. Rec. 84:262-267 (1969).

Kielstein, P.; Martin, J.; Janetschke, D.; Experimental Pasteurella multocida infection of Swine a contribution to the etiology of enzootic porcine pneumonia. Arch. Exp. Vet. Med. Leipzig, 31: 609-619 (1977).

King, M.J.; Hsu, S.S.; Hong, C.B.; Lee, R.C.T.: An atlas of general pathology. Joi comission on rural reconstruction and pig research Institute of Taiwan, Republica de China p.1448 (1976).

Klein, J.O.; Green, G.M.; Tilles, J.G.; Kass, E.H.; Finland, M.: Effect of intranasal infection on antibacterial activity of mouse lung. J. Infect. Dis. 119:43-50 (1969).

Kojnok, J.: The role of carrier sows in the spreading of Aujeszky's disease to suckling pigs, data on Aujeszky's virus carrier ship among fattening pigs, Acta. Vet., Hung. 15:281-295 (1965).

Lai, S.S.; Chen, C.S.; Huang, T.H.; Ho, W.C. and Wang, F.Z.: Persistent infection of a Pseudorabies virus contaminated swine herd, and eradication program and latent virus infection of seropositive sows. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. México, p. 148 (1982).

Lillie, L.E.; Thomson, R.G.: The pulmonary clearance of bacteria by calves and mice. Can. J. Comp. Med. 36:129-137 (1972).

Little, T.W.A.: Respiratory disease in pigs. A study. Vet. Rec. 96:540-544 (1975).

Little, T.M.; Hill, F.J.: Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura. Ed. Trillas, Segunda reimpression. México. (1979).

Loosli, C.G.: Sinergism between respiratory viruses and bacteria. Yale. J. Biol. Med. 40:522-540 (1968).

López, A.; Thomson, R.G.; Savan, M.: The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica in calves infected with bovine parainfluenza-3 virus, Can. J. Comp. Med. 40:385-391 (1976).

López, E.; Gilka, F.; Lillie, L.E.; Thomson, R.G.; Maxic, M.G.; Mcmillan, I.: A mouse model for estimation of Pasteurella haemolytica deposition in calf lungs following aerosol exposure. Can. J. Comp. Med. 46:314-316 (1982).

Maheswaran, S.K.; Thies, E.S.; Influence of encapsulation on phagocytosis of Pasteurella multocida by bovine neutrophils. Infection and Immunity 26(1); 76-81 (1979).

Maqueda, A.J.; Incidencia de neumonía enzootica en varios estados productores de cerdos en la República Mexicana. I Congreso Latinoamericano de Veterinarios Especialistas en Cerdos. XIII Convención AMVEC-UAM-XOCHIMILCO, México, (1977).

Martínez, J.; Eventos inflamatorios en el pulmón y su correlación con la remoción bacteriana en ratones inoculados - - Pasteurella haemolytica y Staphylococcus aureus, Tesis Maestría FMVZ-UNAM, México (1984).

McFerran, J.B.; McCracken, R.M.; Dow, C.; Comparative studies with inactivated vaccines for protection of fattening pigs. In; Aujeszky's disease, G. Wittmann, S.A. Hall (eds). - - Luxembourg (1982).

Mercado, S.A.; Rosales, J.C.; Martell, M.D.; Avances de los resultados serológicos en el estudio epizootiológico de la enfermedad de Aujeszky en México. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México (1982).

Mendoza, E.S.E.; Localización del gene responsable de la producción de la exotoxina de Pasteurella multocida tipo D. Tesis. FES-C-UNAM (1985).

Morrison, R.B.; Pijoan, C.; Hilley, H.D.; Leman, A.D.; Rapp, V.: An etiological investigation into pneumonia in slaughter weight swine. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong., Belgium (1984).

Nacochea, R.R., Pijoan, C., Flores R.: Otras causas de neumonías. Memorias del I Curso Latinoamericano de Actualización sobre las neumonías de los cerdos. ENEP-C-UNAM. AMVEC. (1978).

Necocchea, R.R.: Enfermedad y su relación con el medio ambiente. En: Diagnóstico de las enfermedades del cerdo, Ed. R.R. Necocchea y C. Pijoan, México pp. 155-176 (1982).

Newhousá, M.; Sanchis, J.; Biennestock, J.: Lung defense mechanisms. N. Engl. J. Med. 295:990-998 (1976).

Nielsen, R.: An outbreak of pleuropneumonia among a group of baconers. Nord. Vet. Med. 25:492-496 (1973).

Nogueira, R.H.G.; Rezende, M.; Reis, R.; Nascimento, E.F.; Chquiloff, M.A.G.: Pulmonary lesions in swine IV: Microbiologic and pathologic diagnoses in swine enzootic pneumonia in the state of Minas Gerais, Brasil, Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. México (1982).

Nugent, K.M.; Pesanti, E.L.: Nonphagocytic clearance of Staphylococcus aureus from murine lungs. Infec. and Immun. 36 (3):1185-1191 (1982).

Ochoa, G.: Aislamiento y caracterización de agentes bacterianos de pulmones neumónicos del cerdo. Tesis de Licenciatura, FMVZ-UNAM, México (1978).

Pijoan, C.; Ochoa, G.; Trigo, F.: Aislamiento e identificación de bacterias de pulmones neumónicos en cerdos. Tec. Pec. Mex. (29):46 (1976).

Pijoan, C.: Interacción etiológica en la producción de neumonía. Memorias del I Curso Latinoamericano de Actualización sobre Neumonías de los Cerdos. AMVEC-ENEP-C (1978a).

Pijoan, C.: Mecanismos de defensa pulmonar. En: Memorias del I Curso Latinoamericano de Actualización sobre Neumonías de los Cerdos. p. 45-48 (1978b). AMVEC-ENEP-C-UNAM (1978).

Pijoan, C.; Ochoa, G. ; Interaction between a hog cholera vaccine and Pasteurella multocida in the production of porcine pneumonia. J. Comp. Path. 88:167-170 (1978).

Pijoan, C.; Campos, M.; Ochoa, G. ; Effect of a hog cholera vaccine strain on the bactericidal activity of porcine alveolar macrophages. Rev. Lat-Amér. Microbiol. 22:69-71 (1980).

Pijoan, C.: Micoplasmosis. En : Diagnóstico de las enfermedades del cerdo. Ed. R.R. Necoechea y C. Pijoan. México. pp. 527-531 (1982a).

Pijoan, C.; Trigo, F.; Pasteurellosis. En: Diagnóstico de las enfermedades del cerdo, Ed. R.R. Necoechea y C. Pijoan. México. pp. 511-513 (1982).

Pijoan, C.; Morrison, R.B.; Hilley, H.D.: Serotyping of - - - Pasteurella multocida isolated from swine lungs collected at slaughter. J. Clin. Microbiol. 17:1074-1076 (1983).

Pujols, R.J, Badiola, S.J.I.; Mendoza, S.; Ciprián, C.A.: Interacción virus-bacteria en las neumonías del cerdo. I. Tipificación de Pasteurella multocida aislada en rastro y patogenicidad para ratón, Memorias del XIX Congreso de AMVEC. Mazatlán, México (1984).

Pijoan, C.; Lastra, A.; Ramirez, C.; Leman, A.D.: Isolation of toxigenic strains of Pasteurella multocida from lungs of pneumonic swine. J.A.V.M.A. 185(5):522-523 (1984).

Pijoan, C. : Neumonía del Cerdo. Memorias del Encuentro sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo. Ed. AMVEC, México, D.F. p. 85-99 (1985).

Pedersen, K.D.; Barford, K. : The etiological significance of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida in atrophic rhinitis of swine. Nord. Vet. Med. 33:513-522 (1981).

Pensaert, M.; Maes, L.; Andires, K.: Aujeszky's disease: Current situation in Belgium. In: Aujeszky's disease; Current situation in Belgium. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds). Louxembourg (1982).

Pimentel, F. ; Curso de estadística experimental, Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina p, 323 (1978).

Potgieter, L.N.D.; McCracken, M.D.; Hopkins; Walker, R.D.; Guy, J.S. ; Experimental production of bovine respiratory tract disease with bovine viral diarrhoea virus. Am. J. Vet. Res. Vol. 45 No. 8:1582-1585 (1984).

Rosales, J.C.; Aspectos epizootiológicos de la enfermedad de Aujeszky. Memorias del Simposio sobre el Análisis y Perspectivas de Control de la Enfermedad de Aujeszky en México. p. 69-79, (1984).

Rouse, B.T.; Babiux, L.A. : Mechanims of recovery from herpesvirus infections. A. Review. Can. J. Comp. Med. 42:414-427 (1978).

Runnells, R.: Monlux, W.; Monlux, A.: Principios de patología veterinaria. 1a. ed. Comp. Ed. Continental, S.A. (1968).

Rutter, J.M. Virulence of Pasteurella multocida in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with Bordetella bronchiseptica. Res. Vet. Sci. 34:287-295 (1983).

Rutter, J.M.; Rolley, N.J.; McKenzie, A.: The toxigenicity of Pasteurella multocida in atrophic rhinitis. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium (1984).

Rziha, H.J.; Doller, P.C.; Wittman, G.; Detection of Aujeszky's disease virus and viral DNA in tissues of latently infected pigs. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A, Hall (eds.), Luxembourg, (1982).

Saunders, J.R.; Sebunya, T.N.K.; Pulmonary clearance of Bacillus subtilis spores in pigs, Can. J. Comp. Med. 47:43-47 (1983).

Schultz, R.A.; Haemophilus pleuropneumoniae. update. Proc. 23 Ann. Nebraska Conference, Nebraska (1983).

Schnunenbuyer, L.W. 1978 y 1981 (Citado por Solorzano, R.F. y Mercado S.S. En Pruebas serológicas disponibles y resultados de encuesta hechas en México), Epizootiología de pseudorrabia - - (Enfermedad de Aujeszky). Memorias del Simposio sobre el análisis y perspectivas de control de la Enfermedad de Aujeszky en México. Eds. AMVEC, p, 80-92 (1984).

Sebunya, T.N.K.; Saundeps, J.R.; Osborne, A.D.: A Model aerosol exposure system for induction of porcine Haemophilus pleuropneumonia Ca. J, Comp. Med, 47:48-53 (1983).

Shope, 1931. Citado por Loosli, C.G.; Synergism between respiratory viruses and bacteria. Yale, J. Biol. Med. 40:522-540 (1968).

Seller y cols. (1961), Citado por Kass, E.H.; Green, G.M.; Godstein, E.; Mechanisms of antibacterial action in the respiratory system, Bact. Rev. 30:448-496 (1966).

Smith, H.A.; Jones, T.C.; Itnut, R.D.; Veterinary pathology 4a. edition, Ed, Lea and Febiger Philadelphia, E.U.A. (1972).

Smith, I.M.; Betts, A.O.; Watt, R.G.; Hayward, H.S.; Experimental infections with Pasteurella septica (sero group A) and an adeno or entero virus in gnotobiotic piglets. J. Comp. Med. 83:1-12 (1973).

Smith, P.C.; Frank, G.H.; Gillette, J.K.; Viral infections in bovine respiratory diseases in the United State. Bull off int Epizoot. 88:179-190 (1977)

Solorzano, R. F.; Mercado, S.S.; Pruebas serológicas disponibles y resultados de encuesta hecha en México, Epizootiología de Pseudorrabia (Enfermedad de Aujeszky), Memorias del Simposio sobre el análisis y perspectivas de control de la Enfermedad de Aujeszky en México, Eds. A.M.V.E.C. p.80-92 (1984).

Straw, B.; Studies on pneumonia, atrophic rhinitis, rate of gain, breed, and their interactions in finishing pigs. Int. Pig, Vet, Soc, Cong, México, p, 115 (1982).

Straw, B.E.; Burgi, J.; Hilley, D.; Pneumonia and atrophic rhinitis in pigs from a test station. J.A.V.M.A. 182:607-611 (1983).

Thawley, D.G.; Wright, J.C.; Solorzano, R.F.; Epidemiologic monitoring following and episode of pseudorabbies involving swine, sheep and cattle. JAVMA 176:1001-1003 (1980).

Thomas, P.; The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to Pneumonia. Pig New and Information. 5(4):343-349 (1984).

Thomson, G.R.; Gilka, F.; A brief review of pulmonary clearance of bacterial aerosols emphasizing aspects of particular relevance to veterinary medicine. Can. Vet. J. 15:99-106 (1974).

Toma, B.: La maladie d'Aujeszky en France en 1979, Réc. Méd. Vét. 155:491-494 (1980)

Trigo, F.; Pijoan, C.: Neumonías causadas por Pasteurella. En Memorias del I Curso Latinoamericano de actualización sobre neumonías de los cerdos. ENEP/C-UNAM-AMVEC, p. 51-54 (1978).

Vannier, P.: Efficiency of an inactivated virus vaccine against Aujeszky's disease for fattening pigs or without passive immunity. In: Aujeszky's disease, G. Wittmann S.A. Hall (eds.). - - Luxembourg (1982).

Veit, H.P.; Farrell, R.L. and Trouh, H.F.: Pulmonary clearance of Serratia marcescens in calves. Am. J. Vet. Res. 39:1646-1650. (1978).

Walker, R.D.; Corstuet, R.E.; Less Ley, B.A.; Panciera, R.J.: Study of bovine pulmonary response to Pasteurella haemolytica: Specificity of immunoglobulins isolated from bovine lung. Am. J. Vet. Res. 41:1015-1023. (1980).

Warr, G.A.; Jakab, G.J.: Pulmonary inflammatory responses during viral pneumonia and secondary bacterial infection. Inflammation 7:93-104 (1983).

Wittman, G.; Jakubic, J.; Ahl, R.: Multiplication and distribution of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus in vaccinated and non-vaccinated pigs after intranasal infection. Arch. Virol. 66:227-240 (1980).

Wittman, G.; Rziha, H.J. Doller, P.C.: Occurrence of clinical Aujeszky's disease in immunosuppressed latently infected pigs. In: Aujeszky's disease. G. Wittman S.A. Hall (eds.), Luxembourg (1982).

Yates, W.D.G.: A review of infectious bovine rhinotracheitis, Shipping fever pneumonia and viral bacterial synergism in respiratory diseases of cattle, Can. J. Comp. Med. 46:225-263 (1982)

Yates, W. D. G.; Babiuk, L.A. and Jericho, K, W, F.: Viral - Bacterial pneumonia in calves; Duration of the interaction between bovine herpesvirus 1 and Pasteurella haemolytica. Can. J. Comp. Med. 47:257-264 (1983),

