



50  
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



Facultad de Estudios Superiores  
"Cuautitlán"

**"EVALUACION DE LA INMUNIDAD CONFERIDA POR UNA  
VACUNA BIVALENTE DEL VIRUS DE LA PSEUDORABIA Y  
Pasteurella multocida, MEDIANTE DESAFIO EXPERIMENTAL  
EN CERDOS."**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A N :  
LILIA EUNICE GONZALEZ VAZQUEZ  
DANIEL HERNANDEZ RODRIGUEZ

DIRECTORES:

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO  
DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

ASESORES:

M. en C. SUSANA MENDOZA ELVIRA  
M. en C. JORGE LUIS TORTORA PEREZ

TESIS CON  
FALJA DE ORIGEN



## **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.

## CONTENIDO.

<b>Resumen</b> .....	<b>a</b>
<b>Lista de Cuadros</b> .....	<b>b</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>c</b>
<b>1. INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Enfermedad de Aujeszky</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.1. Antecedentes</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.2. Sinonimias</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1.3. Etiología</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.4. Patogenesis</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1.5. Signos clínicos</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1.6. Lesiones macroscópicas encontradas a la necropsia e histopatología</b> .....	<b>9</b>
<b>1.2. Evidencias que apoyan la participación del virus de la enfermedad de Aujeszky como agente primario en las neumonías</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3. Pasteurellosis pulmonar del cerdo</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3.1. Antecedentes</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3.2. Etiología</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3.3. Patogenia</b> .....	<b>19</b>
<b>1.3.4. Interacción entre virus, micoplasmas y agentes bacterianos secundarios en la neumonía del cerdo</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3.5. Interacción entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y <u>P. multocida</u></b> .....	<b>23</b>

1.3.5.1.	Estudio serológico de relación del virus de la enfermedad de Aujeszky y <u>P. multocida</u> .	23
1.3.5.2.	Estudio de remoción pulmonar de <u>P. multocida</u> en ratones.....	24
1.3.5.3.	Estudio de interacción del virus de la enfermedad de Aujeszky y <u>P. multocida</u> en ratones mediante el modelo de remoción retención.....	25
1.3.5.4.	Interacción del virus de la enfermedad de Aujeszky y <u>Pasteurella multocida</u> en cerdos convencionales.....	26
1.3.5.4.1	Patrón de remoción pulmonar de <u>P. multocida</u> en cerdos convencionales.....	26
1.3.5.4.2	Efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción de <u>P. multocida</u> en el cerdo	27
2.	OBJETIVO.....	29
2.1.	Planteamiento del objetivo general .....	29
2.2.	Objetivos particulares .....	30
3.	MATERIALES Y METODOS.....	31
3.1.	Materiales.....	31
3.1.1.	Animales.....	31
3.1.2.	Alimento.....	32
3.1.3.	Instalaciones.....	32
3.1.3.1.	Granja piloto.....	32

3.1.3.2.	Unidad de aislamiento.....	33
3.1.3.3.	Cámara de nebulización.....	35
3.1.4.	Microorganismos.....	37
3.2.	Métodos.....	37
3.2.1.	Preparación de inmunógenos.....	37
3.2.1.1.	Producción del virus.....	37
3.2.1.2.	Producción de la cepa bacteriana.....	39
3.2.1.3.	Elaboración de la vacuna bivalente.....	39
3.2.1.4.	Control de calidad.....	39
3.2.2.	Desarrollo experimental.....	40
3.2.3.	Desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky.....	41
3.2.4.	Desafío con <u>P. multocida</u> .....	41
3.2.5.	Sacrificio de los cerdos para la evaluación de las lesiones y la presencia de los agentes inoculados.....	41
3.2.6.	Equipo para la prueba serológica de Elisa competitivo con la glicoproteína X (gpX) del virus de la Pseudorrabia (TOLVID).....	43
3.2.6.1.	Principio.....	44

4.	<b>RESULTADOS</b> .....	46
4.1.	<b>Instalaciones</b> .....	46
4.1.1.	<b>Granja piloto</b> .....	46
4.1.2.	<b>Unidad de aislamiento</b> .....	46
4.2.	<b>Animales</b> .....	46
4.3.	<b>Inmunógenos</b> .....	47
4.3.1.	<b>Control de calidad</b> .....	47
4.4.	<b>Efecto de la vacunación en los cerdos de los grupos experimentales</b> .....	47
4.5.	<b>Efecto inmediato posdesafío</b> .....	47
4.6.	<b>Evolución de los signos clínicos después del desafío</b> .....	48
4.6.1.	<b>Temperatura</b> .....	48
4.6.2.	<b>Signos respiratorios</b> .....	52
4.7.	<b>Sacrificio de los cerdos para la evaluación de las lesiones y la presencia de los agentes inoculados</b> .....	52
4.7.1.	<b>Sitio de inoculación</b> .....	52
4.7.2.	<b>Lesiones macroscópicas</b> .....	54
4.7.3.	<b>Lesiones microscópicas</b> .....	60
4.7.4.	<b>Aislamiento e identificación de los agentes inoculados</b> .....	61

4.7.5.	<i>Prueba serológica de Elisa competitivo</i>	
	<i>"Tolvid".....</i>	<i>64</i>
5.	<i>Discusión.....</i>	<i>66</i>
6.	<i>Conclusión.....</i>	<i>73</i>
7.	<i>Bibliografía.....</i>	<i>74</i>

## RESUMEN

En este trabajo se evaluó una vacuna bivalente, elaborada con el virus de la pseudorabia y P. multocida; los parámetros utilizados para la evaluación fueron: temperatura rectal, signos respiratorios, grado de lesión pulmonar (macro y microscópica), serología contra el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) y aislamiento bacteriano.

El estudio se realizó utilizando cerdos SPF a fiebre porcina clásica (FPC), VEA y parvovirus porcino; se formaron 5 grupos de 4 cerdos cada uno: El grupo I (Desafiado sólo con P. multocida); El grupo II (Desafiado con PRV y P. multocida); El grupo III (vacunado contra P. multocida, desafiado con P. multocida); El grupo IV (vacunado contra PRV, desafiado con PRV y P. multocida); y el grupo V (Vacunado con VEA y P. multocida, desafiado con VEA y P. multocida) fue en el que se evaluó la vacuna bivalente.

El trabajo se desarrolló cronológicamente de la siguiente forma: El día 1 del experimento se vacunaron a los grupos III, IV y V; el desafío con el virus de la pseudorabia a los grupos II, IV y V fue el día 11, utilizando 1800 TCID<sub>50</sub> con 2 ml vía intranasal; el día 15 se desafió con P. multocida a los cinco grupos, el desafío se realizó en una cámara de nebulización; la nebulización fue con  $3 \times 10^8$  bacterias/ml (total 14 ml en 30 minutos).

En los animales de los grupos I y III la temperatura fue normal, no observándose algún signo respiratorio después del desafío con P. multocida. El grupo II mostró ligera apatía y anorexia al cuarto día posdesafío con PRV, hipertermia del segundo al quinto día después de este desafío; a los 2 días posdesafío con P. multocida los signos de apatía y anorexia fueron aún más marcados, sin observarse la pastereiosis pulmonar esperada. El grupo IV no presentó cambio alguno después del desafío con PRV, al tercer día posdesafío con P. multocida manifestaron hipertermia con una ligera apatía y anorexia, sin signos respiratorios, macroscópicamente en todos los animales de este grupo, se observaron lesiones pulmonares hemorrágicas abarcando de un 23 al 25 % de la superficie pulmonar. En el grupo V la temperatura fue normal sin manifestar signos respiratorios, en dos animales de este grupo se observaron lesiones pulmonares macroscópicas, el primero presentó una lesión de tipo hemorrágico, abarcando un 25 % de la superficie pulmonar, el segundo animal presentó una lesión típica de Actinobacillus pleuropneumoniae, mostrando una área de consolidación en un 20 % de la superficie pulmonar, con aspecto gris rojizo fibrinohemorrágico con adherencias.

En todos los grupos se realizó P. multocida a partir de muestras pulmonares.

El grupo II a partir del tercer sangrado (día 18 del experimento) 4/4 animales fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra PRV. El grupo IV 1/4 fue positivo a la presencia de anticuerpos contra PRV a partir del segundo sangrado (día 11 del experimento), pero al tercer sangrado



4/4 fueron positivos a dicha prueba. En el grupo V al segundo sangrado 3/4, y al tercer sangrado 4/4 fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra PRV.

La diferencia en la respuesta inmune entre los grupos IV y V, probablemente se debe a que en la vacuna bivalente (grupo V), la presencia del antígeno bacteriano y sus componentes quimiotácticos, pudieran favorecer una mejor respuesta inmune que el grupo IV.

Estos resultados demuestran, que la dosis de desafío empleada en animales no vacunados (grupo II), sirvió como antígeno capaz de producir una respuesta inmune y no así una inmunosupresión pulmonar, debido a que los animales vacunados y posteriormente desafiados con el virus (grupos IV), se comportaron serológicamente igual al grupo II, con excepción del animal que salió positivo al segundo sangrado; pero a los 7 días después del desafío con PRV, ambos grupos fueron 100 % positivos.

Debido a que el grupo V (vacuna bivalente) presentó menor número de animales con lesión pulmonar con respecto del IV (vacuna contra PRV), el cual presentó anorexia, apatía e hipertermia después del desafío con *E. multocida*; planteando así la posibilidad de que la utilización de la vacuna bivalente tiene mejor resultado en la prevención de la pasterelosis pulmonar (inducida por la PRV), que la vacunación sólo contra *Aujeszky*.

### LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1 <i>Signos clínicos representativos de cada uno de los grupos experimentales.....</i>	53
2 <i>Lesiones microscópicas características, encontradas en los pulmones y encéfalo de los diferentes grupos.....</i>	62
3 <i>Aislamiento e identificación de <u>P. multocida</u> en diversos tejidos.....</i>	63
4 <i>Interpretación de los resultados obtenidos con la prueba serológica de Elisa competitivo</i>	65
5 <i>Diagrama del experimento.....</i>	42

*LISTA DE FIGURAS*

<i>figura</i>	<i>Página</i>
1 Granja piloto.....	34
2 Unidad de aislamiento.....	36
3 Vista isométrica de la cámara de nebulización	38
4 Media de temperatura de los grupos I, II, III y IV.....	50
5 Media de temperatura del grupo V.....	51
6 Vista dorsal y ventral de las lesiones macroscópicas de los animales del grupo I....	55
7 Vista dorsal y ventral de las lesiones macroscópicas de los animales del grupo II...	56
8 Vista dorsal y ventral de las lesiones macroscópicas de los animales del grupo III..	57
9 Vista dorsal y ventral de las lesiones macroscópicas de los animales del grupo IV...	58
10 Vista dorsal y ventral de las lesiones macroscópicas de los animales del grupo V....	59

## 1. INTRODUCCION.

La producción moderna de los cerdos, tiende a evolucionar hacia una actividad cada vez más especializada y de tipo industrial, esto debido principalmente a que las técnicas de producción animal han permitido alta concentración de animales por unidad de producción.

La clave en el éxito de la porcicultura moderna radica en aumentar los índices de ganancia diaria de peso (GDP) y disminuir la conversión alimenticia (CA), parámetros que se observan seriamente afectados por enfermedades de tipo crónico, especialmente las neumonías. En el caso de la "neumonía enzootica" se presentan fenómenos desfavorables en la productividad, es así que la GDP disminuye entre un 6 y 25% mientras que la CA aumenta entre un 17 y 30% prolongando la engorda una semana (Morrison y cols., 1986).

Se ha determinado que los cerdos infectados con Mycoplasma hyopneumoniae consumen 32% más de alimento, estos parámetros fueron considerablemente más graves cuando la infección fue en forma secuencial, primero Mycoplasma hyopneumoniae seguida de Pasteurella multocida (P. multocida) lo que provocó que los cerdos consumieran 59% mayor cantidad de alimento, comparado con los cerdos del grupo testigo (Ciprián y cols., 1988).

El efecto de la pleuroneumonía contagiosa porcina sobre la GDP y CA se ha calculado en los Estados Unidos, y han estimado que por cada 1% de lesión pulmonar en el cerdo, se

incrementa el periodo de engorda para alcanzar los 90 Kg de peso en 1.2 días, por lo que se ha estimado las pérdidas económicas producidas por esta enfermedad son de millones de dolares al año (Armstrong, 1982).

También se ha demostrado que la GDP fue desfavorable cuando los cerdos vacunados contra la enfermedad de Aujeszky fueron desafiados con el virus patógeno de Aujeszky, sin embargo, la pérdida fue total cuando fueron desafiados primero con el virus patógeno de Aujeszky y posteriormente con una dosis mínima de Actinobacillus pleuropneumoniae (A. pleuropneumoniae) (Falcón, 1989).

### 1.1. Enfermedad de Aujeszky.

#### 1.1.1. Antecedentes.

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1902 por Alandar Aujeszky, en Hungría y desde entonces ha sido reportada en diversos países de todo el mundo. En México el virus se aisló por primera vez de cerdos en 1971, aunque la enfermedad ya había sido descrita con anterioridad por Bachotold en 1945 en ganado vacuno. (Martell y cols., 1971).

#### 1.1.2 Sinonimias.

Virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA), Pseudorrabia (PRV), prurito loco, comezón loca o parálisis infecciosa bulbar (Necochea, 1982).

### 1.1.3. Etiología.

En el cuarto reporte del comité internacional para la taxonomía de los virus el VEA está clasificado como perteneciente a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, género: grupo I de los Herpes Virus Suinos, especie: Herpesvirus suis I (Pseudorrabia) (Matthews, 1982).

Se ha observado que el virus es capaz de producir una respuesta de anticuerpos neutralizantes después de la infección natural o experimental (Baskerville y cols., 1973). Algunos de los componentes del virión, especialmente las glicoproteínas mayoritarias de la envoltura viral, son importantes en la neutralización (Dalsgaard, 1982; Pauli y cols., 1982).

La caracterización de estas proteínas, en un futuro, podrá aportar datos de cuales de ellas son más importantes en la neutralización del virus, cuales se expresan en células infectadas latentemente y, a efectos profilácticos, la posibilidad de clonar segmentos del genoma para la producción de antígenos inmunizantes libres de ácidos nucleicos (Doogson y cols., 1982).

### 1.1.4. Patogenesis.

En condiciones naturales se admite que el cerdo es infectado mediante la introducción o inhalación del virus en la cavidad nasal (Baskerville y cols., 1973). En condiciones experimentales la exposición intranasal produce un síndrome

más parecido al de la infección natural que la inoculación por otras vías (Olander y cols., 1966).

La transmisión directa cerdo a cerdo se produce por las secreciones orales y nasales, durante y después de la enfermedad natural (Shope, 1964).

Los animales que se han recuperado de la enfermedad pueden pasar a un estadio de infección latente. La reactivación de los virus latentes se considera una de las formas más importantes de transmisión, y persistencia en la explotación porcina, de la enfermedad (Sabo, 1969).

Una vez que el virus entra en la nasofaringe, el sitio primario de replicación parece estar en el tracto respiratorio superior (Mc Ferran y Dow, 1965).

Durante las primeras 24 horas, después de la infección la multiplicación del virus estuvo limitada a mucosa nasal, farínge, tonsilas (Mc Ferran y Dow, 1965) y también en el pulmón (Wittman y cols., 1980).

Se estipuló que el virus emigra a lo largo de las fibras nerviosas, por el axoplasma, por flujo axonal retrógrado hacia los cuerpos neuronales en ganglios y de allí al SNC (Delivo y cols., 1978).

El virus ha sido aislado del suero, a bajos títulos, desde el día 1 al 7 posinfección (Wittman y cols., 1980), pero otros autores consideran que la capacidad del virus para invadir el torrente sanguíneo y producir viremia, es una característica de determinadas cepas del virus (Sabo y cols., 1968 y 1969). Esto podría explicar la afección

*inconstante de otros órganos además del SNC, aparato respiratorio y nódulos linfáticos (Baskerville y cols., 1973).*

*En condiciones naturales, el VEA suele tener un curso terminal (agudo y mortal) en la mayoría de las especies afectadas; excepto en el cerdo, donde la enfermedad es leve en animales adultos y grave en lechones, por lo que esta especie está considerada como un reservorio natural del virus (Kojnok, 1965; Gustafson, 1975).*

*La inmunidad posinfección, calostrual o postvacunal (ya sea con una vacuna atenuada o inactivada) no protege de la infección, ni tampoco del establecimiento de la infección latente, ni evita la excreción del virus (Mc Ferran y Dow, 1973; Mc Ferran y Dow, 1975; Andries y cols., 1978; Mock y cols., 1981).*

*El movimiento de objetos también se ha relacionado como factor de transmisión: equipamiento compartido entre explotaciones, vehículos de la granja, camiones de entrega... (Cartwright, 1982). El hombre puede actuar como vector mecánico, ya que no hay evidencias de que el humano se infecte, y no se han detectado anticuerpos neutralizantes en el suero humano (Gustafson, 1975). Otras especies como pájaros, insectos... podrían estar involucradas en la diseminación local en forma mecánica (Cartwright, 1982).*

*El tipo de alimentación se ha relacionado con la incidencia de la enfermedad ya que esta es especialmente*



elevada en las explotaciones que utilizan restos de alimentación humana "escamocha" (Howarth y cols., 1981).

La enfermedad presenta una cierta estacionalidad, habiéndose observado un aumento en el número de focos en los meses invernales y, por el contrario, una disminución durante los meses de verano (Lautie, 1969; Toma, 1980; Pensaert y cols., 1982).

El tamaño de la explotación ha sido relacionado con el establecimiento enzoótico de la enfermedad (Sabo y Grunet, 1971; Ursache y cols., 1977; Lenihan y O'Connor, 1982).

Existen múltiples evidencias de focos posintroducción de animales, aparentemente sanos, a la explotación. En algunos casos la enfermedad no se manifestó hasta 20 meses más tarde (Gustafson, 1975; Bitsch y Andersen, 1982; Cartwright, 1982).

Los aspectos a considerar para control y erradicación del VEA son: eliminación de animales portadores, y evitar el movimiento de cerdos entre explotaciones (Thawley y cols., 1979; Lenihan y O'Connor, 1982).

#### 1.1.5. Signos clínicos.

La enfermedad en el cerdo está caracterizada por síntomas clínicos, lesiones macroscópicas y cambios histopatológicos en el SNC; pero aunque estas manifestaciones están casi siempre presentes en algunos estadios de la infección natural y experimental, estas

pueden variar considerablemente en severidad (Olander y cols., 1966; Pirtle y Gutekunst, 1978). Algunos autores han señalado que los signos respiratorios pueden ser la característica más importante de la enfermedad (Ghenev y Stoyanov, 1958; Lautie, 1969; Baskerville y cols., 1971).

En la infección natural se ha observado formas leves con fiebre, anorexia, sonido nasal y bajo porcentaje de mortalidad. En las formas severas los animales presentan además vómito, postración y síntomas nerviosos como: excitación incoordinación, paresia del tercio posterior, movimientos en círculos, convulsiones epileptiformes y depresión de estadios terminales; esta forma clínica se acompaña de altos índices de mortalidad (Dow y Mc Farran, 1962; Olander y cols., 1966; Baskerville y cols., 1973).

Las diferencias observadas en cuanto a las manifestaciones clínicas han sido atribuidas a: edad del cerdo (Baskerville y cols., 1973), cepas del virus (Baskerville y cols., 1971), dosis de exposición (Baskerville, 1972a), susceptibilidad individual y estado inmune (Gutekunst y Pirtle, 1979; Alva-Valdes y cols., 1983).

Con respecto a la edad, se considera que los lechones son los más susceptibles hasta las dos semanas de edad, presentan una mortalidad del 100% que disminuye progresivamente para alcanzar un nivel del 5-20% a las 5 semanas de edad (Baskerville y cols., 1973). La forma clínica de la enfermedad puede variar en relación al tiempo

de vida de los animales; la inoculación experimental a dosis constantes, produce en cerdos de 4 semanas signos exclusivamente nerviosos, mientras que, en los de 10 semanas, se observó rinitis, tonsilitis, neumonía y síntomas nerviosos leves (Bran y cols., 1968).

En cerdos de engorda la sintomatología es difícil de describir ya que presenta características subclínicas, y el proceso se diagnostica posteriormente debido a la transmisión a bovinos, ovinos, perros y gatos (Lautie, 1969; Thawley y cols., 1980; Toma, 1980); O simplemente detectado en estudio serológico (Thawley y cols., 1979; Szweda y cols., 1980; Pittler, 1982; Ne Ferran y cols., 1982). En otros casos se presenta una enfermedad con fiebre inapetencia y ligeras manifestaciones nerviosas o como un problema pulmonar acompañado de disnea, la mortalidad en estos casos oscila entre 1 y 3% (Lautie, 1969; Akkermans, 1976).

En los animales reproductores la enfermedad puede pasar desapercibida ya que los síntomas nerviosos son raros y sólo se observa ligera anorexia y fiebre; en cerdas gestantes y como secuela de la infección, se pueden presentar abortos, mortinatos y momificaciones (Kluge y Maró., 1974; Wohlgemuth y cols., 1978; Thawley y cols., 1980 ).

### **1.1.6. Lesiones macroscópicas encontradas a la necropsia e histopatología.**

En general las lesiones macroscópicas son poco marcadas, tanto en la infección natural como experimental, se observa: rinitis purulenta, faringitis, tonsilitis (Corner, 1965., Bran y cols., 1968), pequeñas hemorragias y congestión periféricas débil en nódulos linfáticos, especialmente los de cabeza, cuello y aparato respiratorio; ocasionalmente, en un reducido número de animales, se observan petequias en médula renal, congestión de cerebro y meninges, acompañado de edema en pulmón y líquido cerebro espinal en exceso (Dow y Mc Ferran, 1962; Gustafson, 1975; Olander y cols., 1966).

La infección natural y experimental con cepas neumotropas produce lesiones más marcadas en pulmón, que consisten en grandes áreas de consolidación roja oscura principalmente en lóbulos apicales y cardiaco (Becker, 1964; Corner, 1965).

Baskerville (1973a) realizó un estudio detallado sobre las lesiones en pulmón de cerdos inoculados vía intranasal y observó que, además de los lóbulos apicales y cardiaco, se afectaron las áreas ventrales del lóbulo diafragmático e intermedio, aunque en menor proporción. Alrededor de las áreas consolidadas fue común el edema superficial y del septo interlobular, a menudo los bronquios estuvieron parcialmente o totalmente, ocluidos por exudados. Estas lesiones se observaron desde las 24 horas hasta el día 16

posinoculación experimental. Es conveniente señalar que estas lesiones en el pulmón serán difícilmente diferenciables de lesiones de neumonía enzootica porcina (Livingston y cols., 1972) y de influenza porcina (Easterday, 1975).

Las lesiones microscópicas, tanto en infección experimental vía intranasal como en la natural, fueron: meningoencefalitis no supurativa acompañada de mielitis, ganglioneuritis, infiltración perivascular de células mononucleares, gliosis focal difusa, necrosis neuronal, glia extensa y neuronofagia. Estas lesiones se encuentran principalmente en la materia gris del cerebro, corteza cerebral y, con menor intensidad, se observa también en el cerebro primitivo especialmente en las regiones dorsales, alrededor del conducto cerebral y ventrículos (Dow y Mc Ferran, 1962; Olander y cols., 1966; Gustafson, 1975).

También pueden encontrarse inclusiones intranucleares en neurona, astrocitos y oligodendoglia, particularmente en la corteza cerebral, y ocasionalmente pueden observarse en células de Purkinje, cerebro primitivo y cuerda espinal (Dow y Mc Ferran 1962).

La infección experimental, con cepas neumotropas, producen una necrosis no selectiva y extensa que conduce a una bronquitis, bronquiolitis y alveolitis necrosante (Baskerville, 1973a; Ducatelle y cols., 1982).

Los cambios exudativos y necrosantes, particularmente los observados en la superficie de los

bronquios, así como la presencia de inclusiones intranucleares en las células epiteliales de bronquios y alveolos, hacen que sea posible diferenciar este tipo de neumonía de la producida por la influenza porcina y neumonía enzootica (Livingston y cols., 1972; Baskerville, 1973a; Easterday, 1975).

**1.2. Evidencias que apoyan la participación del virus de la enfermedad de Aujeszky como agente primario en las neumonías.**

La participación de este virus en las afecciones respiratorias del cerdo se resumen en las siguientes evidencias:

a) El virus posee la capacidad de multiplicación en nasofaringe, tráquea y pulmón, produciendo lesiones leves en el tracto respiratorio. Además de que existen cepas neumotropas asociadas a neumonías severas (Becker, 1964; Corner, 1965; Bran et al., 1968; Baskerville, 1973). Es conveniente señalar que estas lesiones en el pulmón serán difícilmente diferenciables de lesiones de neumonía enzootica. (Livingston et al., 1972) y de Influenza Porcina (Easterday, 1975).

b) En el cerdo de engorde la enfermedad tiende a manifestarse de forma subclínica, pudiendo pasar desapercibida o seguir un curso caracterizado por alteraciones respiratorias de intensidad variable, acompañadas o no de afección nerviosa ligera (Akkermans, 1976).

c) Las cepas neumotropas, las atenuadas naturalmente y las vacunales muestran un comportamiento parecido para los marcadores de virulencia (Bartha, 1961; Bodon et al., 1968; Platt et al., 1979; Platt, 1980; Platt, 1981).

d) En explotaciones pequeñas, de menos de 50 reproductoras, la enfermedad es autolimitante ya que todos los animales adquieren altos títulos de anticuerpos neutralizantes en cortos periodos de tiempo; en explotaciones mayores de más de 100 reproductoras, la enfermedad tiende a establecerse en forma enzoótica (Sabo y Grunet, 1971; Akkermans, 1976; Ursache et al., 1977). El virus continúa circulando en esta última bien por rupturas en la inmunidad de hato, bien por la capacidad del virus de la enfermedad de Aujeszky para establecerse de forma latente o ambas situaciones en armonía, lo que explicaría la existencia de ciclos de reinfección que se manifestarían con formas clínicas leves y respiratorias en los cerdos de engorda (Akkermans, 1970; Akkermans et al., 1976).

e) Evidencias por aislamientos del virus de la enfermedad de Aujeszky, en unidades de engorda con problemas respiratorios, que al analizarlas encuentran la presencia del virus de Influenza porcina, así como el virus de la enfermedad de Aujeszky, pero éste, último en mayor proporción (Motovsky, 1975; Andries et al., 1981).

### 1.3. *Pasteurellosis pulmonar del cerdo.*

#### 1.3.1. *Antecedentes.*

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 las bacterias más comunmente relacionadas con el pulmón neumónico es la *P. multocida* (Pijoan y cols., 1976; Ochoa, 1978; Badiola y cols., 1984).

Se han reconocido cuatro serotipos de *P. multocida* denominada A, B, D y E, esta clasificación está basada en los antígenos capsulares (Carter, 1975).

Algunos resultados de estudios en México, particularmente a partir de pulmones neumónicos de cerdos de engorda, han mostrado que la mayoría de las cepas de *Pasteurella* pertenecen a los serotipos A y D (Licea J., 1980; 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).

Se ha demostrado que *P. multocida* no cuenta con la característica de citoadherencia la cual es uno de los mecanismos de patogenicidad importante para producir la infección respiratoria cuando es inoculada por sí sola (Pijoan y Cols. 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 *P. multocida*, cuando es inoculada por vía intranasal, no produce signos respiratorios, ni lesiones neumónicas (Carter, 1975; Gois y cols., 1983).

Sin embargo se ha comprobado que estas bacterias sólo pueden producir cuadros patológicos, cuando el tracto respiratorio (de modo general) es inmunosuprimido por primoinfecciones 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 pulmonar por pasteurelas; Entre las teorías que se han mencionado se encuentran las siguientes: Que las cepas capsuladas son más patogénicas y resistentes a la fagocitosis 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 bacterianas producirían sustancias tóxicas que alteran la actividad de las células fagocitarias del tracto respiratorio (Walker y cols., 1980; Benson y cols., 1978; Baluyut y cols., 1981).

### 1.3.2. Etiología.

El nombre de Pasteurella fue introducido en homenaje a Louis Pasteur, por sus observaciones sobre cólera aviar. El nombre actual de la P. multocida fue acuñada por Rosembusch y Merchant en 1939.

La pasteurellosis pulmonar en cerdos parece ser una de las enfermedades respiratorias más comunes de los animales en México. En efecto, Pijoan, Ochoa y Trigo; encontraron que P. multocida (más no así Pasteurella haemolytica) era el agente que con mayor frecuencia se relacionaba con lesiones pulmonares severas. (Pijoan y Trigo, 1976).

P. multocida, es un cocobacilo, bastón, Gram negativa, ovoide, corto, capsulados, con una bipolaridad característica; mide aproximadamente  $1 \times 0.5-0.8 \mu\text{m}$ . Aunque la morfología y características tintoriales pueden variar, particularmente cuando se aíslan de tracto respiratorio y después de subcultivos repetidos en medios artificiales. En esas circunstancias deja de observarse la bipolaridad y pueden tomar forma de bacilos alargados, de hasta  $5 \times 1 \mu\text{m}$  con pérdida de cápsula (Buxton y Frase, 1977; Carter, 1978).

Estos microorganismos son inmóviles, no esporulados, anaerobios facultativos y crecen bien en medios sintéticos, enriquecidos con sangre y suero; cuya identificación rápida puede hacerse utilizando el medio de SIM-rafinosa (Pijoan y Ochoa, 1978) después de su primoaislamiento, que se realiza en agar sangre (Pijoan y Trigo 1976). Las colonias bacterianas, en medios sólidos, son de tamaño mediano,

redondas brillantes, grisáceas. Se han observado variantes coloniales lisas-iridiscentes, mucosas-iridiscentes y rugosas azules (Carter, 1975).

Los antígenos capsulares han sido estudiados por distintos autores. Roberts (1947) definió cuatro grupos: I, II, III, y IV, mediante pruebas de protección cruzada. Carter (1955), por hemoaglutinación indirecta, procedimiento en el cual se adsorben los polisacáridos capsulares a glóbulos rojos, ratificó la existencia de cuatro tipos de capsula: A, B, C y D; más tarde el serogrupo C se descartó para establecer un nuevo tipo E (Carter, 1961 y 1963), la clasificación de Carter se corresponde con la de Roberts del siguiente modo B/I, A/II, E/III, D/IV (Badiola, 1984). Además cada serotipo subcapsular está subdividido a su vez en subserotipos que representan antígenos somáticos de pared celular.

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

Las características biotípicas de la *P. multocida* aisladas de cerdos como son producción de toxinas presencia de fimbrias, y otras ya descritas (Buxton y Fraser, 1977) son importantes en la virulencia de la misma, pero parece ser que solo en la rinitis atrófica y no en las neumonías. A pesar de eso es difícil de llevar a cabo la colonización de

las fosas nasales de cerdos sanos con P. multocida, a menos que se combine con Bordetella bronchiseptica o que se presenten factores predisponentes (Rutter, 1983; Pijoan y Morrison, 1985).

En Europa se ha demostrado que las pasteurelas aisladas de casos de Rinitis atrófica pertenecen al serotipo D, se caracterizan por producir toxinas, que se miden biológicamente con las siguientes pruebas: inoculación de sobrenadante de un cultivo por vía intradérmica a la piel de cuye; el resultado se expresa como la producción de una dermonecrotoxina (DNT+) por parte de la P. multocida, o inoculación por vía intraperitoneal (De Jong et al., 1980) a ratones para estudio de letalidad (Rutter, 1983) o pruebas de toxicidad en cultivo de tejidos (Lastra y Pijoan, 1984).

El aislamiento y serotipificación de P. multocida, aislada a partir de pulmón neumónico colectados en rastros, a revelado que el 97.3% son del tipo capsular A, y el 2.7% del tipo D; el antígeno somático primario más frecuentemente encontrado fue el tipo 3 (86%), y dentro de los secundarios fue el tipo 5 (88.7%); así el serotipo más frecuentemente encontrado fue el A: 3, 5 (39.2%); seguido de A: 3, 4, 5, 12, (12.2%); A: 3, 4, 5, (11.2%); A: 3, 5, 12, (10.4%); A: 3, (6.8%) y A: 5, (6.8%). Las cepas tipo D tuvieron una distribución similar de serotipos, pero el más encontrado fue el D: 5, (33.3%) y el D: 3 (5), (33.3%), en efecto, la prevalencia de las cepas A y D en pulmones neumónicos favorece en forma muy significativa a las cepas A, sin

embargo es posible que el uso de técnicas de inoculación animal como parte del aislamiento primario de rutina resultaría en una alta proporción de cepas tipo D de pulmones neumónicos de cerdo (Pijoan et al., 1983). la flora nasal del cerdo rinitico es de 80% D y 20% A y la flora del cerdo neumónico es 55% A y 15% D. Se ha demostrado que esto se debe al comportamiento del macrófago alveolar ya que esta célula es capaz de fagocitar rápidamente a las cepas D pero no a las A, aparentemente debido a que las A poseen una espesa cápsula de ácido hialurónico que las protege de la fagocitosis (Pijoan, 1985). Por otro lado los macrófagos alveolares no son susceptibles a la acción de la toxina que produce la P. multocida tipo D (Pijoan, 1984).

En México, Badiola y Pujols (1984) realizaron un estudio con pulmones neumónicos y normales de rastro y encontraron que de 72 pulmones con lesiones neumónicas, del 51% se aisló algún tipo de Pasteurella y de los 34 pulmones normales en un 21% también se aisló la bacteria. Un 14% (6) resultó tener P. haemolytica y un 86% (38) tuvo P. multocida. la tipificación pulmonar encontrada fue: 14% no tipificadas; 18% tipo capsular A y 68% del tipo capsular D. Además observaron una falta de correlación entre el tipo capsular y la patogenicidad para el ratón cuando se inocularon por vía intraperitoneal. En México aún no se han determinado los serotipos somáticos (Pijoan y Trigo, 1976).

### 1.3.3. Patogenia.

La P. multocida es un comensal frecuente de la nasofaringe que puede persistir allí, sin daño aparente para el huésped. Aunque la adherencia a epitelios no parece ser una característica de esta bacteria, Harris y Switzer (1968) observaron que la colonización nasal se vió favorecida después de la inoculación de B. bronchiseptica; Pedersen y Elling (1984) sólo produjeron la colonización nasal después del tratamiento con una solución de ácido acético al 1% sobre la mucosa; Gois y cols. (1983) obtuvieron la colonización nasal, a corto y largo plazo, en cerdos obtenidos por cesárea y privados de calostro, por inoculación nasal de la bacteria. Estos resultados sugieren que la bacteria sólo coloniza la mucosa de la nariz bajo determinadas situaciones predisponentes.

La colonización nasal podría explicar el que las bacterias puedan descender hasta el tracto respiratorio inferior del mismo animal, o de animales cercanos libres que se infectarían por inhalación de los aerosoles liberados de los cerdos portadores. Pijoan y cols. (1982), en un experimento con P. multocida tipo A inoculada a cerdos, observaron que los animales control, que no estuvieron en contacto directo con los inoculados, desarrollaron anticuerpos una semana después que los demás; por lo que concluyeron que P. multocida es capaz de difundirse rápidamente en las explotaciones.

La inoculación experimental no reproduce los síntomas y lesiones de la enfermedad respiratoria (Carter, 1975; Pijoan y cols., 1982; Gois y cols., 1983), sin embargo, P. multocida es uno de los agentes aislados con mayor frecuencia de pulmones neumónicos (Kielstein y cols., 1977; Ochoa 1978; Yamamoto y Ogata, 1982); además estas bacterias muestran una relación significativa con lesiones neumónicas (Ochoa, 1978; Gois y cols., 1980; Cowart y Beckström, 1984; Morrison y cols., 1984).

En una infección por P. multocida ocurrirán una serie de eventos como los propuestos por Pijoan, (1985a), Pijoan y Morrison (1985):

1ro.- Colonización de las bacterias en gran número en las fosas nasales.

2do.- Las bacterias son inhaladas al pulmón en las gotas de tamaño pequeño eludiendo los mecanismos de remoción traqueobronquial e impactándose en los alveolos.

3ro.- El macrófago está suprimido por una infección viral (virus vacunal de Fiebre Porcina Clásica o el virus de la enfermedad de Aujeszky).

4to.- Si la P. multocida pertenece a un serotipo que es difícil de fagocitar por el macrófago, ésta coloniza al pulmón y se producen las lesiones neumónicas más severas.

Es evidente que mientras el árbol traqueobronquial es bastante resistente, el alveolo pulmonar es muy susceptible. De hecho, estudios de Pijoan y Ochoa (1978) demostraron que P. multocida fue susceptible a la acción microbiana del

sobrenadante de cultivos de tráqueas embrionarias (explantos traqueales) de cerdo, debido a la secreción de una sustancia bactericida inespecífica. Esta sustancia bactericida fue una glicoproteína de una sola cadena con 20% de carbohidratos. al parecer es una sustancia diferente a la lisosima y betalisisina, que tenía un espectro antibacteriano amplio, especialmente contra patógenos respiratorios (Iglesias y cols., 1981). Estos trabajos sugieren que la *P. multocida* en el conducto traqueobronquial es inactivada por las sustancias bactericidas presentes en los cerdos sanos. En el alveolo, no existe este moco y es entonces que el macrófago alveolar juega un papel importante en los mecanismos de inmunidad innata. El macrófago sólo procesa el antígeno y como fagocito no inmune, está relativamente inactivo y poco preparado para combatir una infección bacteriana a menos que exista un estado inmune previo (Pijoan, 1985a).

El pronóstico de la pasteurelosis pulmonar es favorable, ya que la enfermedad raramente ocasiona la muerte del animal. Sin embargo, la respuesta al tratamiento con antibióticos es en general pobre, dando como resultado que la enfermedad se establezca en forma crónica lo que causa un marcado retraso para el crecimiento (Pijoan y Cols. 1976).

#### 1.3.4. Interacción entre virus, micoplasmas y agentes bacterianos secundarios en la neumonía del cerdo.

La idea de que pudiera haber una cooperación entre virus y bacterias en las neumonías fue conceptuada a raíz de las pandemias de Influenza humana, ocurridas durante el



siglo pasado. Aún hoy en día, la neumonía por agentes bacterianos secundarios es una de las complicaciones de la influenza (Degre y cols., 1971; Loosli, 1968).

En los cerdos, Shope (1931), observó que los casos de influenza porcina se encontraban frecuentemente asociados con Haemophilus influenzae suis en los procesos neumónicos.

Un aspecto importante de P. multocida es su aparente baja virulencia y la necesidad de factores externos para colonizar el pulmón y desencadenar la enfermedad, esto incluye diversos factores climáticos como, humedad y frío (Pijoan, y Trigo, 1987) y algunas virosis como el enterovirus tipo 2 y P. multocida que participa sinérgicamente en el desarrollo de las neumonías del cerdo (Smith y cols., 1973). Sin embargo, este virus es poco común y no explica la alta prevalencia de la enfermedad; de ahí el problema de encontrar cuales virus están involucrados de manera rutinaria (Pijoan, 1985a).

En México se ha descrito el desencadenamiento de la pasteurelisis pulmonar por cepas vacunales del virus de la Fiebre Porcina Clásica (FPC); lo cual tiene gran importancia práctica debido a la inmunosupresión de la vacuna, que favorece la colonización de la P. multocida (Pijoan, y Trigo, 1987): Este experimento clásico de interacción virus-bacteria fue realizado por Pijoan y Ochoa (Pijoan, y Ochoa, 1978) en la FES-Cuautitlán, en donde demostraron que el virus de la FPC, incluso en forma de cepas "atenuadas" vacunales (cepa china), podría predisponer a los cerdos a

quedar colonizados por P. multocida. Los cerdos fueron primeramente vacunados con dicho virus y, cuando presentaron los signos posvacunales, fueron infectados con P. multocida. Los resultados obtenidos fueron que en los días 3 y 4, posvacunación, los cerdos presentaron mayores lesiones neumónicas en contraste con las encontradas el día 14, en todos los casos se realsió P. multocida.

#### 1.3.5. Interacción entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y P. multocida.

El virus de la enfermedad de Aujeszky ha sido poco estudiado en cuanto a su participación como agente primario en las neumonías del cerdo (Fuentes, y Pijoan, 1984).

En la Coordinación general de Estudios de Posgrado de la FES-Cuautitlán, UNAM; desde hace varios años, un grupo multidisciplinario de investigadores ha venido trabajando los procesos neumónicos del cerdo, trabajos que a continuación se presentan, en los que se llevaron a cabo varios modelos experimentales para demostrar el efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky y P. multocida.

##### 1.3.5.1. Estudio serológico de relación del virus de la enfermedad de Aujeszky y P. multocida.

En un primer estudio se correlacionó la serología positiva hacia el virus de la enfermedad de Aujeszky con el aislamiento de P. multocida; con muestras que se obtuvieron de rastro, en donde se muestrearon un total de 106 pulmones, el 68% fueron de tipo neumónico y el 32% de tipo normal. De

los casos neumónicos en un 67% se observó serología positiva al virus de la enfermedad de Aujeszky, mientras que en los casos normales sólo 32% se acompañaron de serología positiva; De los pulmones neumónicos en un 51% se aisló algún tipo de Pasteurella el 25% de los que se aislaron otras bacterias y 24% de los que no se aisló ninguna bacteria. De los pulmones normales en un 20% se aislaron pasteurellas, en un 9% otras bacterias y en el 71% no se logró ningún tipo de aislamiento. Con el análisis estadístico se comprobó una relación altamente significativa entre pulmón neumónico y serología positiva al virus de la enfermedad de Aujeszky ( $p = 0.0015$ ); entre el tipo de lesión pulmonar frente a tipo de aislamiento ( $p = 0.0002$ ) y entre serología positiva al virus de la enfermedad de Aujeszky frente el tipo de aislamiento ( $p = 0.0002$ ). Estos resultados apoyaron la hipótesis de que el virus de la enfermedad de Aujeszky pudiera estar involucrado como agente primario en las neumonías del cerdo, ya que, como se observa, la serología positiva hacia el virus de la enfermedad de Aujeszky estuvo fuertemente relacionada a las lesiones pulmonares características de una pasteurelisis pulmonar del cerdo, al aislamiento no sólo de P. multocida sino de otros agentes bacterianos (Badiola, I. y Pujols, J., 1984).

#### 1.3.5.2. Estudio de remoción pulmonar de P. multocida en ratones.

El segundo trabajo consistió en demostrar la interacción del virus de la enfermedad de Aujeszky y P.

multocida empleando un modelo de remoción pulmonar de la bacteria en ratones. En este estudio se midió primero la remoción pulmonar de P. multocida en ratones en donde se nebulizaron durante varios minutos en una cámara de nebulización construida para ese fin. Los animales inoculados se sacrificaron a diferentes intervalos de tiempo (0, 6, 12, 24 y 48 hrs), realizándose el recuento de bacterias viables UFC (unidades formadoras de colonia) de los pulmones de los animales sacrificados. De los resultados se observó un patrón de remoción distinto al publicado para otras bacterias, tanto Gram (+) como Gram (-). El análisis estadístico sólo mostró diferencias persistentes entre 0 y 6 horas, momento de máxima remoción (Badiola, I. y Pujols, J., 1984).

1.3.5.3. Estudio de interacción del virus de la enfermedad de Aujeszky y P. multocida en ratones mediante el modelo de remoción retención.

Finalmente, se desarrolló un modelo experimental en ratón para demostrar la interacción entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y P. multocida, teniendo como parámetro principal la remoción. Para este estudio de remoción, los ratones se agruparon en varios grupos. Cuarenta y ocho ratones se inocularon en bloque con un aerosol del virus y 8 quedaron como grupo control, sin virus. P. multocida se inoculó también en aerosol a los 0, 2, 3, 5, 7, 11 y 15 días posinfección viral. Ocho ratones de cada grupo se sacrificaron 4 a las 0 horas y 4 a las 6 horas

posteriores a la nebulización con P. multocida, realizándose en todos los ratones el recuento de bacterias viables de sus homogeneizados pulmonares. Los resultados de remoción obtenidos mostraron una marcada disminución de la eliminación bacteriana del pulmón hacia el día 11 posinfección con el virus de la enfermedad de Aujeszky. Mostrando todos los grupos diferencias estadísticas entre el número de bacterias recuperadas a las 0 y 6 horas, excepto para los días 11 y 15 en los que la remoción pulmonar estuvo inhibida (Badiola, y Pujols, 1984).

#### 1.3.5.4. Interacción del virus de la enfermedad de Aujeszky y P. multocida en cerdos convencionales.

Los experimentos anteriores, dieron la pauta para demostrar que la interacción del virus de la enfermedad de Aujeszky y P. multocida podría llevarse a cabo en los cerdos. Para ello realizaron los siguientes trabajos:

##### 1.3.5.4.1. Patrón de remoción pulmonar de P. multocida en cerdos convencionales.

La remoción pulmonar de P. multocida se llevó a cabo (al igual que en ratones) con un patrón progresivo "menos bacterias a mayor tiempo". De una suspensión de P. multocida lavada y ajustada a  $10^{10}$ /ml se tomaron 20 ml, de los cuales se repartieron equitativamente entre los tres nebulizadores de la cámara. Inmediatamente se nebulizaron 6 cerdos de un peso promedio de 16 Kg durante 20 minutos, los animales se sacaron y se dividieron al azar en tres grupos de dos

animales cada uno. Cada grupo se sacrificó a las 0, 8 y 30 horas, los pulmones de estos cerdos se colectaron y los lóbulos (apicales, cardiacos, diafragmáticos derechos e izquierdos así como el accesorio) se procesaron para determinar las UFC de P. multocida. Se encontraron diferencias estadísticas entre el número de bacterias depositadas a las 0 horas y entre las recuperadas a las 8 y 30 horas, el momento para realizar el experimento posterior fue a las 0 y 8 horas ya que a estos tiempos la remoción y retención de P. multocida fueron oportunos. El análisis de varianza reveló que no se encontraron diferencias estadísticas en cuanto a la distribución de la bacteria en los diferentes lóbulos, tal distribución fue homogénea. La remoción de P. multocida en pulmones de cerdos sanos, mostró un comportamiento asintótico en su patrón de eliminación con respecto al tiempo posnebulización demostrándose la gran capacidad de remoción pulmonar del cerdo en condiciones normales (Caballero, 1985).

1.3.5.4.2. Efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción de P. multocida en el cerdo.

Se utilizaron 12 cerdos convencionales de un peso promedio de 16 Kg. que previamente habían sido vacunados contra la enfermedad de Aujeszky con una vacuna comercial inactivada. Posteriormente los cerdos se desafiaron con una dosis de  $10^4$  DITC /ml a las seis semanas posvacunación. Con estos animales se formaron tres grupos de 4 cerdos cada uno. Los grupos se nebulizaron a los 3, 7 y 15 días posteriores

al desafío. La nebulización de cada grupo se realizó con una suspensión de P. multocida lavada y ajustada a  $10^{10}$  /ml. se tomaron 20 ml. de los cuales se repartieron equitativamente entre los tres nebulizadores de la cámara. Inmediatamente después de nebulizar a 4 cerdos durante 20 minutos, los animales se sacaron y se dividieron al azar dos animales se sacrificaron a las 0 y otros dos a las 8 horas, los pulmones de estos cerdos se colectaron y los lóbulos (apicales, cardiacos, diafragmáticos derechos e izquierdos así como el accesorio) se procesaron para determinar las UFC de P. multocida. Los datos obtenidos fueron procesados mediante el análisis de varianza, análisis de regresión y prueba de Tukey. Se encontró que el virus de la enfermedad de Aujeszky afectó la remoción pulmonar de la bacteria a partir del día 7 y en menor grado a los 3 y 15 posinfección, también se encontró que la retención de P. multocida al día 7 a la posinfección viral fue significativamente mayor en los lóbulos apicales, que en los lóbulos cardiacos y diafragmáticos, mientras que entre estos no hubo diferencias (Caballero, 1985).

Todas las evidencias antes mencionadas apoyaron la hipótesis de que el virus de la enfermedad de Aujeszky está involucrado como agente primario en algunas pasteurelosis pulmonares del cerdo.

## 2. OBJETIVO.

### 2.1. Planteamiento del objetivo general.

A partir de los estudios realizados en la Coordinación de estudios de Posgrado de la FES-Cuautitlán, sobre la interacción de Pasteurella multocida y el virus de la enfermedad de Aujeszky en los procesos neumónicos del cerdo, siendo los resultados concluyentes, en la interacción que mantienen dichos agentes; por lo que este trabajo tiene la finalidad de continuar la investigación de dicho complejo respiratorio.

Debido a que el virus de la enfermedad de Aujeszky es capaz de producir una supresión de la remoción pulmonar, así como de la respuesta inmune pulmonar, permitiendo a P. multocida actuar como patógeno oportunista produciendo así una pasterelosis pulmonar; este fenómeno se ha observado aun utilizando la vacuna contra VEA. Es por esto que, con la finalidad de aportar medidas que puedan ayudar a la industria porcina se evaluará una vacuna que contenga a los principales agentes involucrados en la neumonía porcina (VEA y P. multocida), con la finalidad de comprobar si ésta es capaz de prevenir una pasterelosis pulmonar.



## **2.2. Objetivos particulares.**

### **2.2.1. Crear un centro piloto de cerdos SPF, en el INIFAP.**

*La finalidad de este centro, es la de ser un proveedor constante de cerdos, con una alta calidad sanitaria (SPF).*

**2.2.2. Estudio de patogenicidad de estos dos agentes en un diseño experimental de dos grupos con cuatro cerdos cada uno: Grupo I (No vacunado y desafiado con P. multocida) y II (No vacunado y desafiado con VEA y P. multocida).**

**2.2.3. Evaluación de los inmunógenos utilizados como control de la vacuna bivalente: Para esto se utilizaron dos grupos de cuatro cerdos cada uno, Gpo III (Vacunado intraperitonealmente contra P. multocida y desafiado con P. multocida en una cámara de nebulización) y IV (Vacunado intraperitonealmente contra VEA y desafiado con VEA intranasalmente y P. multocida en la cámara de nebulización).**

**2.2.4. Evaluación de la vacuna bivalente: se utilizaron cuatro cerdos en el grupo V (Vacunado intraperitonealmente contra VEA y P. multocida, desafiado con VEA intranasalmente y P. multocida en la cámara de nebulización).**

### 3. MATERIALES Y METODOS.

#### 3.1. Materiales

##### 3.1.1. Animales.

a) *Pie de cría:* Debido a que en el mercado no se encontraron lechones de calidad sanitaria certificada se tuvieron que adquirir animales de una granja (Portek) del estado de Sonora, que estuviera libre de fiebre porcina clásica (Cólera porcino), parvovirus porcino, pseudorrabia. La adquisición consistió en cuatro cerdas de primer parto y dos verracos, siendo éste el pie de cría.

A estos animales se les realizó un estudio serológico contra fiebre porcina clásica, parvovirus porcino, pseudorrabia.

b) *Lechones:* El empadre se realizó utilizando a los dos sementales para cubrir a cada una de las cerdas, esto se realizó en el corral de montas de la granja piloto; la obtención de lechones se realizó en el área de maternidad de la granja piloto. El cuidado de los animales se realizó desde su llegada, durante y después del parto; las actividades realizadas con los lechones fueron, aplicación de hierro, identificación (aretes). El destete se realizó a las cuatro semanas de edad; una vez destetados los lechones se trasladaron en cajas herméticas al "área de aislamiento", en donde se realizaría el presente trabajo.

### 3.1.2. Alimento.

Los lechones fueron alimentados con alimento comercial "Lechoncina" sin antibiótico (Purina de México). La alimentación fue al libre acceso, durante todas las etapas del experimento.

### 3.1.3. Instalaciones.

#### 3.1.3.1. Granja Piloto.

Es la zona donde se confinó el pie de cría, y es una unidad que se mantiene aislada del exterior mediante sistemas de ventilación y extracción de aire, ventanas para dar iluminación natural las cuales están cerradas herméticamente y con doble vidrio, una de estas tiene la función de ventanilla de observación. El acceso a la unidad está controlado con un sistema de doble puerta con presión negativa, lo cual impide que haya salida o entrada de aire, ya que cuando se abre una puerta, la otra automáticamente se cierra; el espacio comprendido entre estas puertas sirve como bodega, el último sistema que mantiene hermética a la unidad, son las compuertas de acero de los estercoleros, uno de estos es para las zahurdas y el otro para la maternidad, dichas compuertas se abren únicamente cuando baja la corriente de agua del sistema "Flush tank".

La granja piloto está formada por cinco zahurdas, continúa una de otra y dividida por rejas tubulares cada una, las zahurdas son con piso de cemento en una parte.

excepto una zahurda, a la cual se le agregó arena para que sirviera como "corral de montas" en esta área se encuentran los comederos. la porción restante del piso es de reja y es donde se encuentra el bebedero, debajo de el piso de reja se encuentra el estercolero; estas cinco zahurdas son limpiadas automáticamente al unisono por un sistema de "flush tank". La otra parte de la granja es el área de maternidad, que consta de cuatro jaulas paridero, las cuales a su vez están divididas en tres zonas; La primer zona es la de la jaula es donde se aloja la cerda, la segunda zona son los dos pasillos laterales de lactancia, la tercera zona es la lechonera frontal con una fuente de calor (foco), y cama de biruta esterilizada previamente en autoclave. (figura 1)

### 3.1.3.2. Unidad de aislamiento.

Esta área está destinada a realizar investigaciones con microclima controlado, manteniendola así aislada del exterior.

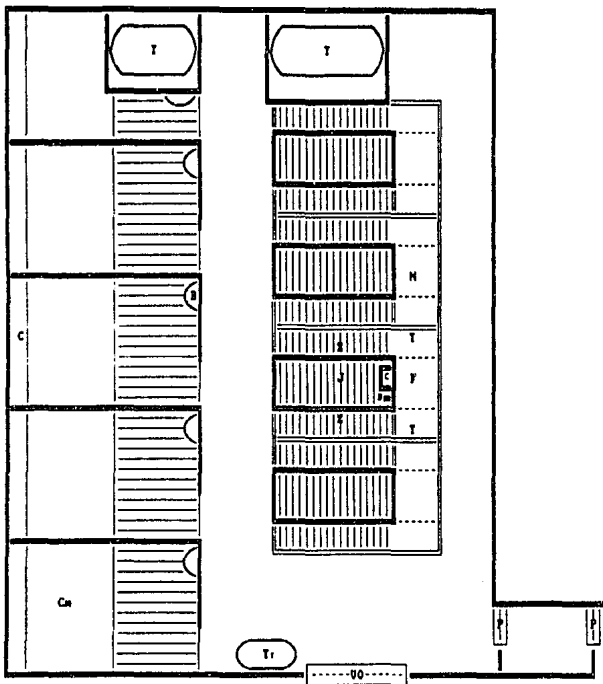
La unidad de aislamiento está formada por: diez "módulos" que se encuentran en dos hileras paralelas de cinco cada una. Cada "módulo" está formado por dos áreas, la primera es un pequeño cuarto que cuenta con un lavabo, lámpara de luz ultravioleta, toma de agua con manguera; esta área comunica con el pasillo central y con la segunda área, la cual es un corral que se encuentra aislado de los demás, cuenta con una puerta que lo comunica con el pasillo lateral la cual sirve para el acceso de los animales, la otra puerta

**Figura : 1 GRANJA PILOTO (INIFAP)**

====: Piso tipo reja.  
T : Flush tank.  
P : Puertas de doble.  
acción.  
VO : Ventanillas de  
observación.  
Z : Pasillos de  
lactancia.

J : Jaula paridero.  
B : Bebedero.  
C : Comedero.  
N : Lechonera frontal.  
Cm : Corral de montas.  
Tr : Tarja.  
F : Fuente de calor.

FIGURE 1: GRANJA PILOTO



lo comunica con la primera área del módulo, la cual comunica con el pasillo central, que sirve de acceso al personal. Cada módulo tiene una ventana de observación. La unidad de aislamiento cuenta además con una bodega, incinerador, regaderas y sala de necropsias, toda la unidad cuenta con sistema de ventilación y extracción de aire; el drenaje de la unidad es recolectado en una cisterna donde se le agrega sosa cáustica, para evitar la contaminación con material biológico (Figura 2).

#### 3.1.3.3. Cámara de nebulización.

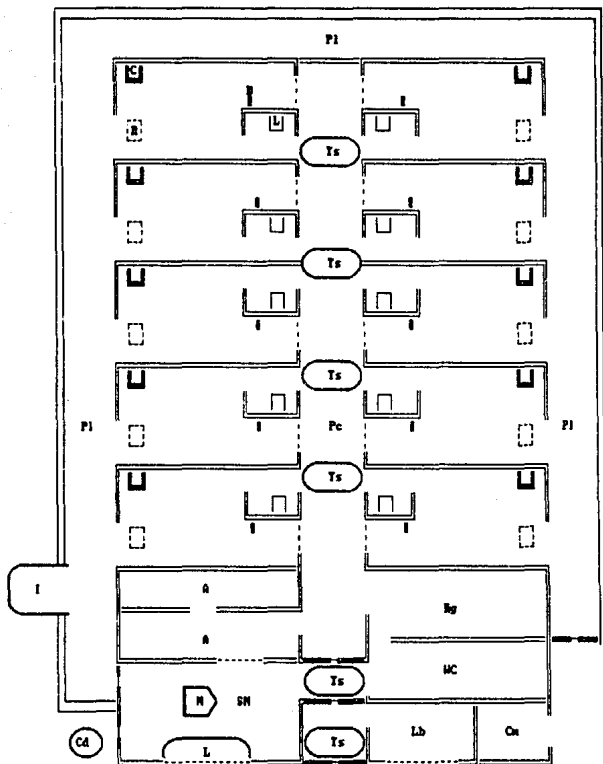
Este sistema de infección está constituido por una cámara de aerosolización, de forma rectangular (150 X 120 X 100 cm), hecha con lámina galvanizada y sellada con silicón en las uniones; los tres nebulizadores (Devilbiss, Co. Modelo 645, Somerset, P.A., USA) fueron conectados respectivamente en tres perforaciones circulares en diferentes caras de la cámara, incluyendo una en la puerta. El flujo de aire para la producción del aerosol fue generado por una compresora ajustada a 10 PSI. De la compresora sale una manguera de 1 cm de diámetro, la cual se une a un tubo con tres salidas, donde se conectan tres mangueras de 0.5 cm de diámetro las cuales se conectan respectivamente a un 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  $\mu$ m, según indicaciones de los fabricantes; estas partículas nebulizadas fueron

**Figura : 2 UNIDAD DE AISLAMIENTO (INIFAP)**

<b>Cd</b> : Cisterna del drenaje.	<b>WC</b> : Baños.
<b>SN</b> : Sala de necropsia	<b>C</b> : Comedero.
<b>M</b> : Mesa de necropsia	<b>B</b> : Bebedero.
<b>Cm</b> : Cuarto de máquinas.	<b>L</b> : Lavabo.
<b>A</b> : Almacén.	<b>R</b> : Registros.
<b>I</b> : Incinerador.	<b>Pl</b> : Pasillo lateral.
<b>Lb</b> : Laboratorio.	<b>Pc</b> : Pasillo central.
<b>....</b> : Ventanas de observación	<b>Ts</b> : Tapete sanitario
	<b>Rg</b> : Regaderas.
	<b>■-■</b> : Puertas de seguridad de la unidad.



FIGURA 2 : UNIDAD DE AISLAMIENTO



extraídas del interior con un motor eléctrico con turbina de extracción, llevando un filtro que se encuentra en el interior de la cámara. La puerta de acceso a la cámara se encuentra localizada en la parte frontal de la misma (Colmenares, 1990) (Figura 3).

#### 3.1.4. Microorganismos.

Se utilizó la cepa Teoloyucan del virus de la Pseudorrabia, cultivada en la línea celular PK-15, este virus sirvió como semilla vacunal y como virus de desafío. Se cultivó y se obtuvo la biomasa bacteriana de *P. multocida* tipo capsular "A", aislada, identificada y tipificada a partir de un cerdo con neumonía, en el laboratorio de Bacteriología de la coordinación de Estudios de Posgrado de la FES-C.

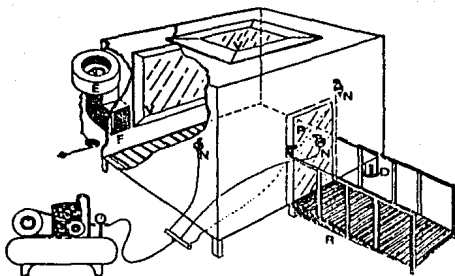
### 3.2. METODOS.

#### 3.2.1. Preparación de inmunógenos.

##### 3.2.1.1. Producción del virus.

Se cultivó la cepa Teoloyucán del virus de la enfermedad de Aujeszky, en línea celular PK-15, a partir de este lote el virus se utilizó como semilla vacunal y como virus de desafío. El cultivo de la cepa Teoloyucan mostró un título de  $10^3$  en ratón, por lo que se tuvo que concentrar con un sistema de ultrafiltración (Ninitan, Millipore).

FIGURA 3



*Vista isométrica de la cámara de nebulización diseñada para el desafío experimental de los cerdos. P. puerta; R. rampa de acceso; V. ventana; F. filtro; E. extractor; N. nebulizador; D. drenaje.*

posteriormente se determinó el título y este fue de  $10^5$ . de este lote una parte se utilizó como semilla vacunal inactivándose con  $\beta$ -propiolactona; como virus de desafío se ajustó a 1800 DICT/ml.

#### 3.2.1.2. Producción de la cepa bacteriana.

A partir de un pulmón de cerdo con lesiones neumónicas sugestivas de P. multocida, se cultivó y se obtuvo la biomasa de P. multocida tipo capsular "A". Esto se realizó utilizando medio de BHI líquido suplementado con extracto fresco de levadura al 10 %, las células se lavaron tres veces con una solución amortiguadora de fosfatos y por nefelometría se ajustó a  $10^8$ /ml; esta se utilizó como semilla de desafío y vacunal, a la que posteriormente se le adicionó el adyuvante hidróxido de aluminio, inactivándose con formaldeído al 0.3 % .

#### 3.2.1.3. Elaboración de la vacuna bivalente.

Consistió en combinar 20 ml de la semilla del virus de la enfermedad de Aujeszky inactivado con  $\beta$  propiolactona, con título de  $10^5$  en ratón, con 20 ml de P. multocida a  $10^8$ /ml en adyuvante inactivada con formaldeído.

#### 3.2.1.4. Control de calidad.

El control de esterilidad de las vacunas se determinó sembrándose en diversos medios de cultivo en condiciones aero y aneróbicas, y el de inocuidad inoculando 2.0 ml por

vía subcutánea, intramuscular e intraperitoneal a conejos recién destetados. Los animales inoculados se mantuvieron en observación durante 15 días, en espera de algún signo clínico característico de la enfermedad de Aujeszky como: rascado, irritabilidad y/o muerte.

### 3.2.2. Desarrollo experimental.

Se formaron cinco grupos experimentales a partir de 20 cerdos SPF destetados a las cuatro semanas de edad, producidos en el bioterio del CENID-Microbiología (cuatro cerdos por grupo). Cada grupo experimental se confinó en un módulo de la unidad de aislamiento; antes de iniciar el experimento, a todos los animales se les mantuvo en periodo de adaptación durante siete días. Los grupos formados fueron los siguientes:

GRUPO I.- Inoculados sólo con sol. salina estéril vía intraperitoneal (no vacunados) y desafiados con P. multocida, el día 15 del experimento.

GRUPO II.- Inoculados sólo con sol. salina estéril vía intraperitoneal. Desafiados con VEA el día 11 y P. multocida el día 15 del experimento.

GRUPO III.- Vacunado contra P. multocida el día 1 del experimento, 2.0 ml vía intraperitoneal. Desafiado con P. multocida el día 15.

**GRUPO IV.** - Vacunado contra VEA el día 1 del experimento. 2.0 ml vía intraperitoneal. Desafiado con VEA el día 11 y con P. multocida el día 15.

**GRUPO V.** - Vacunado contra VEA y P. multocida el día 1 (con 2.0 ml vía intraperitoneal). Desafiados con VEA el día 11 y con P. multocida el día 15 (Cuadro 5).

**3.2.3.** - Desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky.

Los grupos II, IV y V el día 11 del experimento, se desafiaron con 1800 dosis infectantes en cultivo de tejidos (TCID), por vía intranasal (2 ml).

**3.2.4.** - Desafío con P. multocida.

Los grupos I, II, III, IV y V, fueron desafiados con P. multocida con una nebulización de  $3 \times 10^8$  bacterias/ml (total 14 ml en 30 minutos), en una cámara construida exprofeso para cerdos. El desafío se realizó a los 4 días después del desafío con el virus de la enfermedad de Aujeszky (día 15).

**3.2.5.** Sacrificio de los cerdos para la evaluación de las lesiones y la presencia de los agentes inoculados.

Todos los cerdos fueron sacrificados al día 31 del experimento (16 días posdesafío con P. multocida), se sedaron con Azaperona, utilizando 2 mg/Kg de peso por vía IM



y se anestesiaron con Clorhidrato de metomidato, utilizando 1.5 mg/Kg de peso por vía IV. Se determinó la extensión y aspecto de las lesiones macroscópicas; se tomaron muestras de diversos órganos (pulmón, corazón, riñón, bazo e hígado) para determinar la presencia de los agentes inoculados.

**3.2.6. Equipo para la prueba serológica de ELISA competitiva con la glicoproteína X (gpX) del virus de la pseudorrabia (Aujeszky). TOLVID.**

El diagnóstico de Tolvid es una prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA), que permite la diferenciación entre el virus infectante y el vacunal de VEA. Se está usando para el manejo de hatos y la erradicación de la pseudorrabia, aplicada en conjunto con la vacuna suprimida de la gpX (vacuna Tolvid). El diagnóstico es para distinguir a los cerdos infectados de los no infectados, cuando la vacuna Tolvid a sido administrada.

La vacuna Tolvid fue desarrollada por procedimientos de ingeniería genética, con supresión de dos genes en el genoma del virus de pseudorrabia. Una supresión elimina la timidina Kinasa (tK) del genoma viral, que se requiere para que el virus se replique en el sistema nervioso del cerdo, para producir enfermedad. Una segunda supresión elimina la gpX, con lo que se previene la formación de anticuerpos para la glicoproteína X.

Tanto los cerdos no vacunados como los no infectados y vacunados con la cepa Tolvid, serán negativos cuando su



siero sea provado por el diagnóstico de Tolvid. Los cerdos vacunados con cepas sin supresión de la gpX, y subsecuentemente infectados con VEA, serán positivos cuando su suero sea provado con el diagnóstico de Tolvid. Los cerdos vacunados con vacunas que contienen gpX de VEA pueden producir anticuerpos a gpX de VEA y no serán distinguidos de los que han padecido la infección natural con esta prueba diagnóstica (Tolvid Diagnostic, 1989).

#### 3.2.6.1. Principio.

El equipo de diagnóstico de Tolvid es un inmunoensayo enzimático, desarrollado para diferenciar los cerdos vacunados con Tolvid de cerdos infectados. En este equipo, los platos de microtitulación están cubiertos con antígeno de gpX obtenido en *E. coli* recombinante. Las diluciones simples de los sueros porcinos, son incubadas en los pozos con cubierta de gpX. Los anticuerpos anti gpX presentes en el suero positivo se ligarán a la gpX que cubre el pozo. Después de lavar los pozos para remover los anticuerpos libres, los anticuerpos conjugados a peroxidasa que reconocieron el antígeno, generarán peróxidos cuando se adicione el sustrato (peróxido de hidrógeno), y cambia el color del indicador O-fenilenediamina (OPD).

Después de una corta incubación, se adiciona una solución de ácido sulfúrico para fijar la reacción.

La muestra de suero negativo a la gpX, produce un color entre naranja y amarillo (ambar) en la prueba. Las muestras positivas a la gpX, producen colores intermedios claros.

La reacción se mide usando el espectofotómetro con absorbancia de 490 nm, y se determina la densidad óptica para cada muestra (Tolvid Diagnostic, 1989).

#### 4. RESULTADOS.

##### 4.1. Instalaciones.

###### 4.1.1. Granja piloto.

Una vez hechas las modificaciones en las instalaciones, las montas y obtención de lechones se realizaron sin contratiempo, quedando instalada esta granja para abastecer lechones de alta calidad sanitaria.

###### 4.1.2. Unidad de aislamiento.

En esta unidad se presentó el problema de la calefacción, ya que las resistencias eléctricas estaban fundidas, no pudiendo controlar el microclima de los corrales para la realización de este trabajo.

##### 4.2. Animales.

De las cuatro cerdas utilizadas como pie de cría, el promedio por camada fue de 9 lechones destetados (a los 28 días), de estas cuatro camadas se tomaron 20 lechones al azar sin importar el sexo.

Las pruebas serológicas realizadas en el laboratorio de virología (CENID-microbiología) tanto el pie de cría (hembras y sementales) como los 20 lechones, resultaron negativos a la presencia de anticuerpos contra la fiebre porcina clásica, parvovirus porcino y pseudorrabia.

#### 4.3. Inmunógenos.

##### 4.3.1. Control de calidad.

El control de calidad de las vacunas consistió en determinar la esterilidad e inocuidad de las vacunas. Al término de la observación no se encontró signo alguno en los conejos, por lo que se sacrificaron; al realizar la necropsia, el sitio de inoculación se encontró sin cambios patológicos aparentes. Con lo que cumplió las normas establecidas por el Código de Normas Federales del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, para estos parámetros.

##### 4.4 Efecto de la vacunación en los cerdos de los grupos experimentales.

En ningún caso, los animales de los tres grupos vacunados (III, IV y V), presentaron cambio alguno en su comportamiento o en sus constantes fisiológicas, luego de la aplicación de los inmunógenos.

##### 4.5. Efecto inmediato posdesafío.

Grupo I: No vacunado y desafiados con P. multocida. No hubo cambio en su comportamiento, ni en sus constantes fisiológicas.

Grupo II: No vacunado y desafiado con VEA y P. multocida. Presentaron ligera apatía y anorexia cuatro días después del desafío con VEA. Lo mismo sucedió después del

desafío con P. multocida, pero en una forma más marcada a los dos días posdesafío

Grupo III: Vacunados con P. multocida y desafiados con P. multocida. No presentaron cambio alguno en su comportamiento ni en sus constantes fisiológicas.

Grupo IV: Vacunado con VEA, desafiado con VEA y P. multocida. No presentaron cambio alguno en su comportamiento ni en sus constantes fisiológicas después del desafío con VEA. Después del desafío con P. multocida manifestaron anorexia y apatía.

Grupo V: Vacunado con VEA y P. multocida, desafiados con VEA y P. multocida. Se encontraron sin cambio en su comportamiento ni en sus constantes fisiológicas (cuadro 1).

#### 4.6. Evolución de los signos clínicos después del desafío.

##### 4.6.1. Temperatura.

Grupo I: No vacunado, y desafiado con P. multocida. presentaron hipotermia al tercer día posdesafío, al octavo día del desafío presentaron hipertermia; los cinco últimos días del experimento presentaron una hipotermia (Figura 4).

Grupo II: No vacunado y desafiado con VEA y P. multocida, presentaron hipertermia del segundo al quinto día posdesafío con VEA; en los últimos cinco días del experimento manifestaron una hipotermia (Figura 4).

Grupo III: Vacunado contra P. multocida, y desafiado con P. multocida, los últimos cinco días del experimento presentaron hipotermia (Figura 4).

Grupos IV: Vacunado contra VEA, desafiado con VEA y P. multocida. Después del desafío con VEA su temperatura se mantuvo dentro del rango normal, al tercer día posdesafío con P. multocida, presentaron hipertermia; los últimos días del experimento manifestaron una hipotermia (Figura 4).

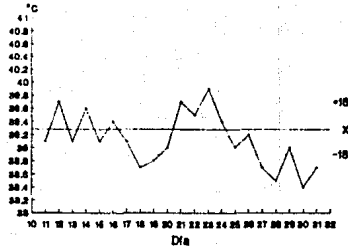
Grupo V: Vacunado contra VEA y P. multocida, desafiado con VEA y P. multocida. Se mantuvieron dentro del rango normal de temperatura después del desafío con ambos agentes; manifestando solo una hipotermia en los últimos días del experimento (Figura 5).

**Figura 4: MEDIAS DE TEMPERATURA DE LOS GRUPOS I, II, III y IV.**

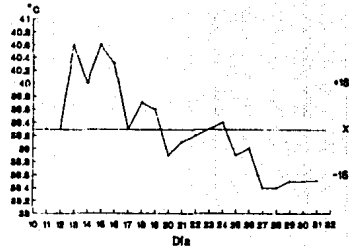
En la figura 4 I se observa un pico de hipertermia máxima el día 24. En la figura 4 II se observan dos picos de hipertermia, el primero con una máxima el día 13 y el segundo el día 15. En la figura 4 III se observan dos picos de hipertermia, el primero con una máxima el día 11 y el segundo del día 13 al 15. En la figura 4 IV se observan dos picos de hipertermia, el primero con una máxima el día 18 y el segundo el día 20. La hipotermia observada en los cuatro grupos los últimos 6 días del experimento, se debió al ayuno.

Figure 4

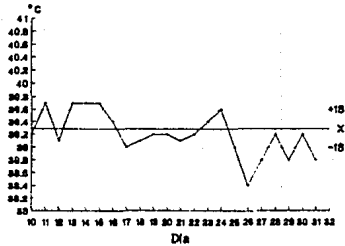
### GRUPO I



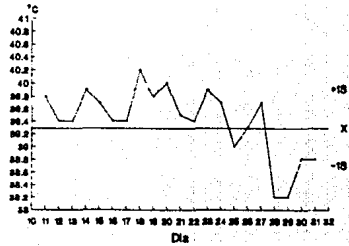
### GRUPO II



### GRUPO III



### GRUPO IV



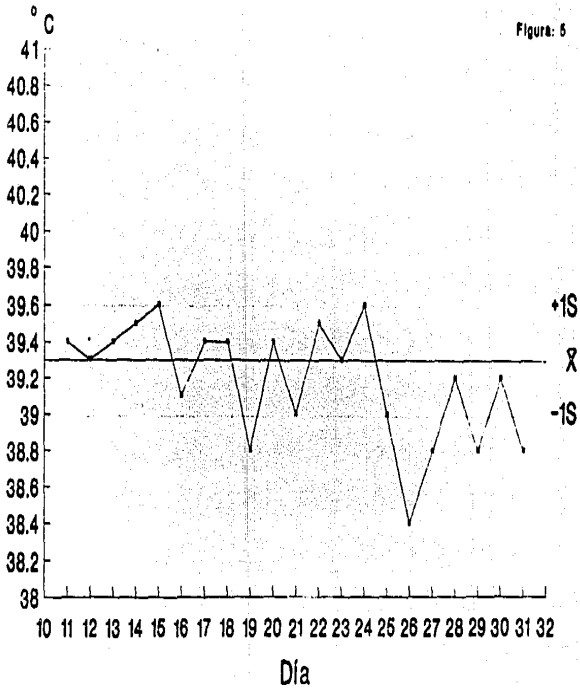


**FIGURA 5: MEDIAS DE TEMPERATURA DEL GRUPO V.**

**En la figura 5 la temperatura fue normal con excepción de una ligera hipotermia, con un pico máximo el día 19. La hipotermia observada en los últimos 6 días del experimento, se debió al ayuno.**

# GRUPO V

Figura: 5



#### 4.6.2. Signos respiratorios.

Los animales de los grupos I (no vacunado, y desafiado con P. multocida) y III (vacunado contra P. multocida, y desafiado con P. multocida), no presentaron signos respiratorios.

Los cerdos del grupo II (no vacunado y desafiado con VEA y P. multocida), no presentaron algún signo respiratorio.

Los animales del grupo IV (vacunado contra VEA, desafiado con VEA y P. multocida), no presentaron signos respiratorios.

Los animales del grupo V (vacunado contra VEA y P. multocida, desafiado con VEA y P. multocida), sólo un animal presentó disnea, tos y postración en los últimos días del experimento, de éste se aisló A. pleuropneumoniae (Cuadro 1).

#### 4.7. Sacrificio de los cerdos para la evaluación de las lesiones y la presencia de los agentes inoculados.

Después del sacrificio se obtuvieron muestras asépticas de sangre, pulmón, riñón, corazón, bazo e hígado.

##### 4.7.1. Sitio de inoculación.

En el sitio de inoculación de las vacunas (intraperitoneal), no se observaron cambios patológicos aparentes.

CUADRO 1: SIGNOS CLINICOS REPRESENTATIVOS

GRUPO	POST-UNCLINACION (DIA 1-11)	POST-INOCULACION CON UEA (DIA 12-15)	POST-INOCULACION CON <u>P. multocida</u> (DIA 16-30)	SACRIFICIO (DIA 31)	LESION EN SITIO DE UNCLINACION*
I	-	-	SSCA	SSCA	SCPA
II	-	Se presento ligera apatia y anorexia durante los primeros cuatro dias.	Los signos fueron apatia, anorexia durante los dos primeros dias.	SSCA	SCPA
III	SSCA	-	SSCA	SSCA	SCPA
IV	SSCA	SSCA	Presentaron apatia del dia 17 al 21 con hipertermia postdesafio con <u>P. multocida</u> .	SSCA	SCPA
V	SSCA	SSCA	** Sólo un animal presentó disnea y postración.	SSCA	SCPA

- = ACTIVIDAD NO REALIZADA.  
 SSCA = SIN SIGNOS CLINICOS APARENTES.  
 SCPA = SIN CAMBIOS PATOLOGICOS APARENTES.  
 \*\* = SE AISLO A. pleuropneumoniae y P. multocida.

#### 4.7.2. Lesiones macroscópicas.

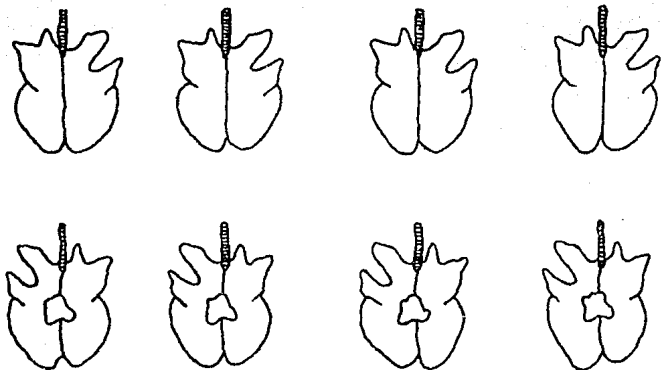
En los animales de los grupos I (no vacunado y desafiado con P. multocida) y II (no vacunado, desafiado con VEA y P. multocida), no hubo lesiones pulmonares macroscópicas (Figura 6 y 7).

En los animales del grupo III (vacunado contra P. multocida y desafiado con P. multocida), sólo un animal presentó lesiones en lóbulos apicales, de aspecto rojizo (hemorrágico), abarcando aproximadamente un 5% de la superficie pulmonar. (Figura 8).

Todos los animales del grupo IV (vacunado contra VEA, desafiado con VEA y P. multocida), presentaron áreas de lesión pulmonar hemorrágica, que variaron del 23 al 25% de la superficie pulmonar (Figura 9).

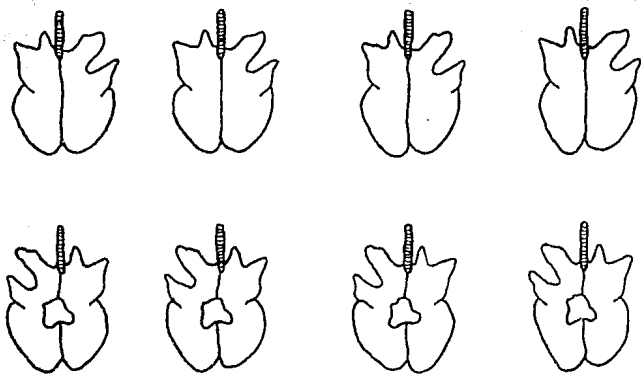
Dos animales del grupo V (vacunado contra VEA y P. multocida, desafiado con VEA y P. multocida) presentaron lesiones: el primero presentó un área de consolidación de aproximadamente 20 % de superficie pulmonar, con aspecto gris rojizo fibrinohemorrágico y adherencias, en donde además de recuperar P. multocida, se aisló Actinobacillus pleuropneumoniae; el segundo animal presentó una lesión de tipo hemorrágico, en un 25% de la superficie pulmonar (Figura 10).

FIGURA 6



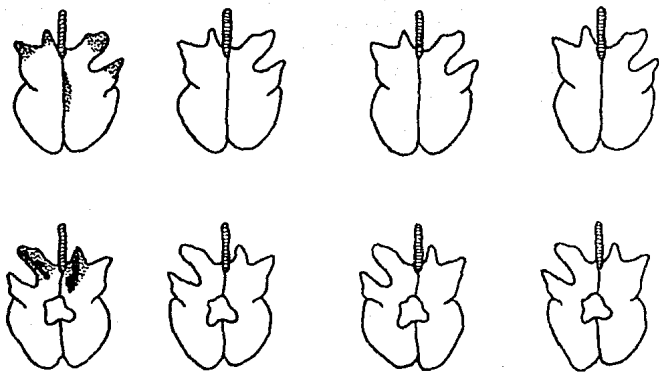
Distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos después del desafío experimental con *P. multocida*, en los animales del grupo I (no vacunados).

FIGURA 7



*Distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos, después del desafío experimental con el VEA y P. multocida, en los animales del grupo II (no vacunado)*

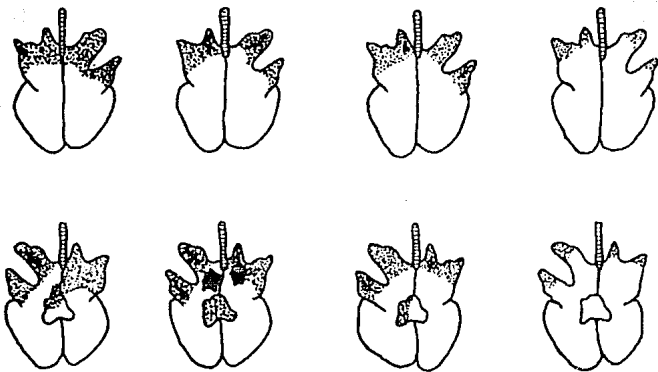
FIGURA 8



*Distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos, después del desafío experimental con P. multocida, en los animales del grupo III (vacunados contra P. multocida).*

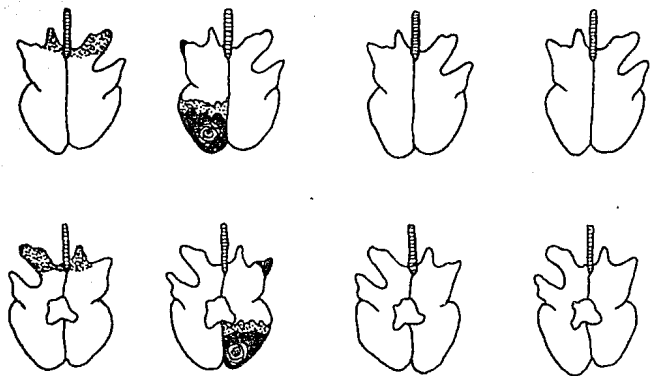


FIGURA 9



*Distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos, después del desafío experimental con VEA y P. multocida, en los animales del grupo IV (vacunado contra VEA).*

FIGURA 10



*Distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos, después del desafío experimental con VEA y P. multocida, en los animales del grupo V (vacunado contra VEA y P. multocida).*

#### 4.7.3. Lesiones microscópicas.

Las lesiones pulmonares representativas de los grupos I (no vacunado y desafiado con P. multocida) y III (vacunado contra P. multocida y desafiado con P. multocida), corresponden a pequeñas áreas de atelectasia, esto es que se observan los alvéolos colapsados, además presentaron pequeñas zonas de hemorragia. Los encéfalos de ambos grupos se encontraron sin cambios patológicos aparentes.

En los cerdos del grupo II (no vacunado, desafiado con VEA y P. multocida), la lesión pulmonar característica fue de hemorragia subpleural. Los encéfalos se encontraron sin cambios patológicos aparentes.

Los cerdos del grupo IV (vacunado contra VEA, desafiado con VEA y P. multocida), presentaron zonas con alvéolos colapsados (atelectasia), infiltrado de mononucleares en alveolos y bronquiolos; los septos interlobulillares se observaron engrosados (edema) y hemorrágicos. En bronquiolos se observó hipertrofia de la mucosa, proliferación de tejido linfoide asociado y hemorragia. A nivel alveolar sólo se demostró atelectasia y engrosamiento del septo alveolar. En el encéfalo de un cerdo se observó satelitosis y degeneración neuronal.

Las lesiones representativas del grupo V (vacunado contra VEA y P. multocida, desafiado con VEA y P. multocida), fueron: alveolos colapsados (atelectasia), engrosamiento de septos alveolares, pequeñas zonas de hemorragia y congestión, proliferación linfoide

peribronquial, no encontrándose polimorfonucleares. Es de mencionar que un animal del grupo V presentó la lesión más severa de todos los grupos, con una zona de necrosis coagulativa, hemorragia e infiltrado de macrófagos; el proceso aparentemente se estaba encapsulando. Se observaron zonas con infiltración de polimorfonucleares lo que sugiere la presencia de P. multocida, o alguna otra bacteria contaminante piógena; núcleos ovalados y alargados agrupados como "pinceladas", este tipo de hallazgo puede sugerir presencia de A. Pleuropneumoniae, aunque también cepas toxigénicas de P. multocida producen este cambio; que se atribuye a la transformación de macrófagos por efecto de toxinas. Presentó además hemorragia y fibrina fuera de la cápsula que delimita la lesión. En este animal se aisló P. multocida y A. pleuropneumoniae de pulmón. Los encéfalos de estos animales se encontraron sin cambios patológicos aparentes (Cuadro 2).

#### 4.7.4. Aislamiento e identificación de los agentes inoculados.

A cada uno de los animales de los diferentes grupos, después del sacrificio se le tomaron muestras de: bazo, riñón, corazón hígado y pulmón. Siendo negativos al aislamiento de P. multocida, excepto pulmón, ya que se aisló P. multocida en los pulmones de todos los grupos (Cuadro 3).

**CUADRO 2 : LESIONES MICROSCOPICAS CARACTERISTICAS, ENCONTRADOS EN LOS PULMONES Y ENCEFALO DE LOS DIFERENTES GRUPOS .**

GRUPO	PULMON	ENCEFALO
I	En todos los animales de este grupo se encontraron en algunas zonas lesiones de atelectasia; además de presentar pequeñas zonas hemorrágicas.	SCPA
II	Las lesiones encontradas en este grupo corresponden solamente a hemorragia subpleural.	SCPA
III	Se encontraron pequeñas zonas de hemorragia, con zonas de atelectasia.	SCPA
IV	Presentaron zonas de atelectasia con infiltrado de mononucleares, engrosamiento de septos, hipertrofia bronquiolar con hemorragia en la luz y en septos; congestión y proliferación linfóide peribronquial.	Sólo un animal presentó satelitosis y degeneración neuronal.
U	Presentaron zonas de atelectasia hemorragia congestión proliferación linfóide peribronquial engrosamiento de septos. Zona con necrosis coagulativa, (donde aparentemente hubo hemorragia e infiltrado de macrófagos) el proceso se está encapsulando; hay zonas con infiltración de polimorfos, hay núcleos en forma de coma, hay hemorragia con fibrina por fuera de la cápsula.	SCPA

SCPA: SIN CAMBIOS PATOLOGICOS APARENTES.

- = SOLO EN UN ANIMAL (de los 104, pleuropneumoniae y P. multocida.)

CUADRO 1: AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE  
Pasteurella multocida  
 EN DIVERSOS TEJIDOS

GRUPO	NUMERO	MOZO	RINCON	COMAZON	HIGADO	PULMON
I	887	-	-	-	-	+
	886	-	-	-	-	+
	888	-	-	-	-	+
	889	-	-	-	-	+
II	882	-	-	-	-	+
	883	-	-	-	-	+
	881	-	-	-	-	+
	888	-	-	-	-	+
III	381	-	-	-	-	+
	383	-	-	-	-	+
	386	-	-	-	-	+
	387	-	-	-	-	+
IV	885	-	-	-	-	+
	* 898	-	-	-	-	+
	891	-	-	-	-	+
	892	-	-	-	-	+

\* SE AISLO A. pleuropneumoniae

#### 4.7.5. Prueba serológica de ELISA Competitivo "Tolvid".

Sólo los grupos II, IV y V resultaron positivos a dicha prueba.

En los animales del grupo II (no vacunado, desafiado con VEA y P. multocida), salieron positivos a partir de la tercer muestra, tomada el día 18 del experimento (séptimo día posdesafío con VEA).

En los animales del grupo IV (vacunado contra VEA, desafiado con VEA y P. multocida), sólo un animal salió positivo a partir de la segunda muestra tomada el día 11 (desafío con VEA). A partir del día 18 todos los animales fueron positivos (séptimo día posdesafío con VEA).

Del grupo V, el día 11 (desafío con VEA), tres animales resultaron positivos, a partir del tercer sangrado correspondiente al día 18 del experimento (séptimo día posdesafío con VEA), todos los animales resultaron positivos (Cuadro 4).

**GRABNO 4: INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS CON LA PRUEBA SEROLOGICA DE ELISA COMPETITIVO\***

GRUPO	No. ANIM.	DIA DEL SACRIFICIO				
		1	11	18	24	31
I	887	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	886	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	888	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	889	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
II	882	NEG	NEG	POS	POS	POS
	883	NEG	NEG	POS	POS	POS
	881	NEG	NEG	POS	POS	POS
	880	NEG	NEG	POS	POS	POS
III	381	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	383	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	386	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	387	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
IV	885	NEG	POS	POS	POS	POS
	890	NEG	NEG	POS	POS	POS
	891	NEG	NEG	POS	POS	POS
	892	NEG	NEG	POS	POS	POS
U	923	NEG	POS	POS	POS	POS
	926	NEG	POS	POS	POS	POS
	927	NEG	NEG	POS	POS	POS
	928	NEG	POS	POS	POS	POS

\* Toluid Diagnostic; The Upjohn Company



### 5. DISCUSION.

La hipertermia sin signos respiratorios que mostraron los animales del grupo II (no vacunados, desafiados con VEA y P. multocida), después del desafío con el virus (día 11): no coincidió con lo observado por Badiola y Pujols (1984). Probablemente se debió, a que la dosis de desafío con VEA, no actuó como factor inmunosupresor capaz de producir una pasteurellosis pulmonar, con la dosis de desafío utilizada (1800 TCID). Probablemente la dosis de desafío actuó como inductora de una inmunidad posinfectante, debido a que los animales del grupo IV (vacunados contra VEA, desafiados con VEA y P. multocida), se comportaron en forma similar que el grupo II (no vacunados, desafiados con VEA y P. multocida)

Sólo el animal en que se aisló A. pleuropneumoniae y P. multocida, a partir del pulmón, presentó disnea y tos.

Los animales del grupo IV (Vacunados con VEA y desafiados con Aujeszky y P. multocida), no presentaron signos respiratorios: debido probablemente a la dosis viral de desafío. Aunque esta dosis, sí fue capaz de producir mayor lesión pulmonar en los animales del grupo IV (vacunados contra VEA), que en los del grupo V (vacuna bivalente). Se considera que estas diferencias en cuanto a la presencia o ausencia de las manifestaciones clínicas respiratorias, pueden deberse a: edad del cerdo (Baskerville

y cols., 1973). cepa del virus (Baskerville y cols., 1971). susceptibilidad individual y estado inmune (Gutekunst y Pirtle, 1979; Alva Valdes y cols., 1983). En este trabajo, estas diferencias se atribuyen probablemente a la dosis de desafío (Baskerville, 1972a).

Los pulmones de los grupos I y III no presentaron lesiones macroscópicas, las pequeñas lesiones microscópicas de hemorragia y atelectasia encontradas, comunes a todos los grupos, se consideran como lesiones poco representativas de los patógenos inoculados en este estudio. En los grupos IV y V, se considera que la neumonía proliferativa observada, es debido probablemente a que la vacunación, más la dosis de desafío, fueron capaces de producir ligera inmunosupresión pulmonar; ocasionando que la bacteria produjera lesión sin presentar signos respiratorios (enfermedad subclínica). Debido a que el grupo V (vacuna bivalente) presentó menor número de animales con lesión pulmonar con respecto del IV, es posible que la utilización de la vacuna bivalente haya resultado mejor que la vacunación sólo contra Aujeszky.

El hecho de que en los grupos I y III fue posible el reaslamiento pulmonar de P. multocida, no concuerda con los obtenidos por Caballero (1985), en donde demuestra la alta capacidad de remoción pulmonar en cerdos convencionales, debido a que eliminan del tracto respiratorio a P. multocida en un periodo de 8 horas. La presencia pulmonar de P.

multocida en estos grupo (I y III), se considera de mucha importancia, situación para la que no se tiene explicación. Debido a que el pulmón normal es estéril; esto sugiere que el pulmón tiene una inmensa capacidad bactericida (Pijoan, C., 1978a). Por otro lado se ha comprobado que cuando se inocula P. multocida, por vía intranasal en el cerdo, no se reproducen los signos respiratorios, ni lesiones neumónicas (Carter, 1975; Gois y cols., 1983). El reaislamiento pulmonar de P. multocida en los grupos II, IV y V aunado a los demás resultados, hace pensar que la infección con VEA, no fue suficiente para producir una franca neumonía; pero si para reducir la capacidad de remoción pulmonar de P. multocida.

La prueba se ELISA competitivo (Prueba de Tolvid) en donde la glicoproteina X (gpX) es un componente del virus de Aujeszky, el cual está suprimido en la vacuna de "Tolvid"; por lo que cuando se utiliza esta prueba, detectará positivos a la gpX los animales que presenten al virus infectante o que estén inmunizados con vacunas que no están suprimidas de dicha glicoproteína, y serán negativos los inmunizados con la vacuna de "Tolvid" (Tolvid Diagnostic, 1989). La semilla vacunal de este experimento no está suprimida de la gpX, por lo que esta prueba no distinguió los anticuerpos producidos por la vacuna con virus completo, de los anticuerpos del virus de desafío. Este hecho quedó confirmado con los resultados de los grupos II, IV y V, tal y como se muestra a continuación:

El grupo II (no vacunado, desafiado con VEA y P. multocida) presentó anticuerpos contra el virus siete días después del desafío con Aujeszky.

De los grupos IV y V, 25 y 75 % respectivamente salieron positivo a la presencia de anticuerpos contra VEA a partir del segundo sangrado, que corresponde al día 11 (10 días después de la vacunación). La diferencia en la respuesta inmune entre ambos grupos, es probablemente que se deba, ha que en la vacuna bivalente (grupo V), la presencia del cuerpo bacteriano y sus componentes quimiotácticos, favorecieron una mejor respuesta inmune que en el grupo IV (vacunado sólo con VEA). Al tercer sangrado, realizado el día 18 (7 días posdesafío con Aujeszky), el 100 % de los animales de los grupos II, IV y V fueron positivo a la presencia de anticuerpos.

Estos resultados demuestran que la dosis de desafío empleada en animales no vacunados (grupo II), sirvió como inmunógeno capaz de producir una respuesta inmune posinfectante, y no así una inmunosupresión pulmonar. Debido a que los animales vacunados sólo contra VEA, y posteriormente desafiados con el virus (grupos IV), se comportaron serológicamente igual que el grupo II; con excepción del animal que salió positivo al segundo sangrado.

El hecho de que el grupo IV haya mostrado mayor lesión pulmonar que el grupo II, sugiere que la vacunación sólo contra VEA puede actuar como factor capaz de producir un

proceso de hipersensibilidad, ocasionando con esto que, cuando un animal vacunado contra Aujeszky esté expuesto al virus, pueda presentar una neumonía.

Los grupos experimentales I, II, III y IV aportaron una pieza valiosa para la evaluación de la vacuna bivalente (grupo V), tal y como se muestra a continuación:

El grupo I demostró que la P. multocida, no fue removida por el pulmón de animales sanos, hecho que no pone en desventaja a la vacuna bivalente, por haber presentado aislamiento pulmonar de dicho microorganismo. Además, demostró que esta por sí sola no es capaz de producir daño alguno en pulmón.

El grupo III descartó la posibilidad de que la vacunación contra P. multocida, tenga utilidad práctica, en el control de la pasterelosis pulmonar del cerdo. Esto es, por los resultados obtenidos en el grupo I, en donde se confirma que P. multocida no es capaz de producir daño pulmonar por se; confirmando así, que el agente primario (VEA) es el factor principal, al cual hay que controlar para evitar la pasterelosis pulmonar.

El grupo II sirvió para demostrar que la inmunidad posinfección, con dosis bajas de virus, no sirve para proteger de infecciones subsecuentes, y con esto ocasionar una inmunosupresión pulmonar; tal y como se observó en el grupo IV, mas no así en el grupo V (vacuna bivalente).

El grupo IV demostró que una inmunidad posvacunal no protege de futuras infecciones, por lo que no se evita la inmunosupresión pulmonar, favoreciendo con esto la presentación de una pastereiosis pulmonar subclínica, tal y como se observó en este grupo.

Por los resultados obtenidos en los parámetros de respuesta inmune, y grado de lesión pulmonar; indican que la vacuna bivalente tuvo un mejor respuesta, que la vacuna sola contra VEA. Esta diferencia es atribuida a la presencia del cuerpo bacteriano en la vacuna bivalente, favoreciendo así una mejor respuesta humoral contra VEA, y por consiguiente evitó una lesión pulmonar (como la observada en el grupo IV). Por todo lo que se ha mencionado, se considera que la vacuna bivalente tiene algunas aportaciones dentro de la porcicultura, a pesar de no poder evitar la colonización pulmonar con P. multocida.

La presencia de A. pleuropneumoniae, se debió a que en la unidad de aislamiento en forma simultánea este trabajo, se realizó otro, el cual utilizó dicho microorganismo, por lo que la presencia de éste, sugiere una falla en las medidas de higiene y de bioseguridad utilizadas.

La hipotermia observada en los últimos ocho días del experimento en todos los grupos, fue ocasionada por la falta de abastecimiento del concentrado, del día 23 al 29 del

*experimento, por lo que se alimentaron con zacate los animales, aunado a esto, fue el problema que se tuvo con la calefacción en la unidad de aislamiento, favoreciendo así la presentación de la hipotermia colectiva en los cerdos.*

## 6. CONCLUSION.

1.- La presencia del cuerpo bacteriano de P. multocida, en la vacuna bivalente, probablemente estimuló una mejor respuesta humoral contra VEA, en comparación con los vacunados sólo contra VEA.

2.- La vacuna bivalente evitó y/o redujo la lesión pulmonar, en comparación con los vacunado contra VEA.

3.- La vacunación contra VEA, no protege del establecimiento del virus en el pulmón, ni de futuras infecciones.

4.- La inoculación de P. multocida, por medio de aerosoles colonizó el pulmón, tanto en animales inmunizados como en los no inmunizados con P. multocida.

### Sugerencia:

Se considera conveniente una prueba a mayor escala, en los lugares en que estas enfermedades resulten problemáticas para la producción porcina. De esta manera será posible evaluar el impacto que este trabajo pueda tener, para mejorar la producción de carne de cerdo en México.



## 7. BIBLIOGRAFIA.

Akkermans, J.P.W.M.: Serum prophylaxis in Aujeszky's disease in pigs. Neth. J. Vet. Sci., 3:12-17 (1970).

Akkermans, J.P.W.M.: Aujeszky's disease. Ann. Med. Vet. 120:295-306 (1976).

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

Andries, K.; Pensaert, M.; Vandeputte, J.: Effect of experimental infection with pseudorabies virus on pigs with maternal immunity from vaccinated sows. Am. J. Vet. Res. 39(8):1282-1285 (1978).

Andries, K.; Pensaert, M.; and Vandeputte, J.: Virological examination of pig with acute respiratory disorders. Vlams. Dier. Tijds. 50:236-241 (1981).

Armstrong, C.H.: Mycoplasmal pneumonia of swine. International Update (Squibb), Issue One: 1-8 (1982).

Badiola, S.J.I.; Pujols, R.J.: Estudio sobre la interacción del virus de Aujeszky con Pasteurella multocida en los procesos neumónicos del cerdo. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Fac. de Est. Sup. Cuautitlán, U.N.A.M. México, (1984)

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).

Bartha, A.: Attempts at attenuating the virulence of Aujeszky's disease virus. Magy. Allatorv. Lap. 16:42-45 (1961)

Baskerville, A.; Mc Cracken, R.N.; Mc Ferran, J.B.: The histopathology of experimental rhinitis in pigs produced by a strain of Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 12:323-326 (1971).

Baskerville, A.: The influence of dose of virus on the clinical signs in experimental Aujeszky's disease in pigs Br. Vet. J 138-394 (1972a)

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

Baskerville, A.; Mc Ferran, J.B.; Dow, C.: Aujeszky's disease in pigs. Vet. Bull. 43:465-480 (1973)

Becker, C.H.: Zur bedeutung der lunge fur die pathologisch anatomische diagnose der Aujeszky'schen krankheit des schweines. Monatshefte Vet. Med. 19:5-11 (1964).

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 (1976).

Bitsch, V.; Andersen, J.B.: On the epidemiology of Aujeszky's disease in Denmark and the possibilities of its control. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds). Louzembourg. (1982).

Bodon, L.; Meszaros, J.; Papp-Vid, G. and Romvary, J.: Properties of Aujeszky's disease virus strains isolated from swine pneumonia cases. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 18:107-109 (1968).

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

Buxton, A.; Fraser, G.: Animal microbiology. Blackwell Sci. Publ., Oxford. (1977)

Caballero, C.S.: Efecto del virus de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de Pasteurella multocida en cerdos de engorda. Tesis de maestría. Fac. de Est. Sup. Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Izcalli, Edo. de México. 1985.

Carter, G.R.: Studies on Pasteurella multocida. I A hemagglutination test for the identification of serological types. Am. J. Vet. Res. 16:481-484 (1955).

Carter, G.R.: A new serological type of Pasteurella multocida from central Africa. Vet. Rec. 73:1052 (1961).

Carter, G.R.: Proposed modification of the serological classification of Pasteurella multocida. Vet. Rec. 75: 1264 (1963).

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

Carter, G.R.; Subronto, P.: Identification of type D strain of Pasteurella multocida with acriflavina. Am. J. Vet. Res. 34:293-294 (1973).

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).

Carter, G.R.: Pasteurella, Yersinia, and Francisella. In: Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 3th. CH.C. Thomas Publisher, Illinois. p.99-107 (1978).

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

Ciprián, C.A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tórtora, J., Colmenares, G., López-Revilla, R. and Garza de la, M.: Mycoplasma hyopneumoniae increases the susceptibility of pigs to experimental Pasteurella multocida pneumonia. Can. J. Vet. Res., 52: 434-438 (1988).

Colmenares, V.G.: Evaluación de la inmunidad conferida por extractos proteicos de Haemophilus pleuropneumoniae mediante desafío experimental. Tesis de maestría. Fac. de Est. Sup. Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. 1990.

Corner, A.H.: Pathology of experimental Aujeszky's disease in piglets. Res. Vet. Sci. 6:337-343 (1965).

Cowart, R.P.; Backstöm, L.: Prevalence of dermonecrotic toxin-producing Pasteurella multocida strains in Illinois swine herds with varying levels of atrophic rhinitis and pneumonia. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Belgium (1984).

Dalsgaard, K.: Precipitating antigens involved in protection against Aujeszky disease after natural infection and after immunization with inactivated vaccine. In: Aujeszky's disease. G. Wittman S.A. Hall (eds.) Luxembourg. (1982).

Degre, M.; Solberg, L.A.: Synergic effect in viral-bacterial infection. III Histopathological changes in the trachea of mice following viral and bacterial infection. Acta. Path. Microbiol., Scand. 72:129-136 (1971).

De Jong, M.F.; Oci, H.L.; Tetenbourg, G.L.: AR-pathogenicity test for Pasteurella multocida isoletes. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Copenhagen, p.211. (1980).

Delivo, M.; Baretta, F.; Bonifas, V.; Foroglou, C.: Ultrastructure and function in sympathetic ganglia isolated from rats infected with pseudorabies virus. Brain Res. 140(1):11-124 (1978).

Doogson, J.B.; Maes, R.K.; Ruiz, J.C.: Cloning and characterization of pseudorabies virus DNA sequences. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Mexico, pp.152 (1982).

Dow, C.; Mc Ferran, J.B.: The neuropathology of Aujeszky's disease in the pigs. Res. Vet. Sci. 3:436 (1962).

Ducatelle, R.; Coussement, W.; Hoorens, J.: Etiopathology of Aujeszky's virus pneumonia in young pigs. An immunoperoxidase and histopathologic study. Vlams. Dier. Tijds. 51(1):1-10 (1982).

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

Falcón, N.A.: Efecto del virus de la Enfermedad de Aujeszky (Pseudo-Rabia) sobre la presentación de la pleuropneumonia contagiosa porcina. Tesis de maestría. Fac. de Est. Sup. Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Cuautitlán, Izcalli, Edo. de México, (1989).

Fuentes, M. and Pijoan, C.: Studies on the interaction between vaccinal and pathogenic Aujeszky's virus and Pasteurella multocida in young pigs. Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, Ghent, Belgium, 1984. 28. International Pig Veterinary Society, Ghent, Belgium (1984).

Ghenev, C.; Stoyanov, V.: Recherches sur les infections pulmonaires a virus du porc dans les fermes d'engraissement en Bulgarie. Bull. Off. Int. Epiz. 42:373-382 (1958).

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

Gustafson, D.P.: Pseudorabies. In: *Diseases of swine*, H.W. Dunne and A.D. Leman (eds.), 4th, Iowa State Univ. Press, Iowa. pp. 391-410 (1975).

Gutekunst, 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)

Harris, D.L.; Switzer, W.P.: Turbinate atrophy in young pigs exposed to Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida, and combined inoculum. Am. J. Vet. Res. 29: 777-785 (1968).

Howarth, J.A.; Hokama, Y.; West, G.B.E.: An epidemiological study of pseudorabies in California swine herds. California Vet. 2:13-16 (1981).

Iglesias, J.G.: Estudio sobre sustancias bactericidas presentes en secreción bronquial de cerdo embrionario. Tesis maestría. FES-Cuautitlán, UNAM, México (1981).

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).

Kluge, J.P.; Mare, C.J.: Swine Pseudorabies: Abortion, clinical disease and lesions in pregnant gilts infected with pseudorabies virus (Aujeszky's disease). Am. J. Vet. Res. 35:911-915 (1974).

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

Lastra, A. and Pijoan, C.: Tissue culture test for the identification of toxigenic Pasteurella multocida. Proceedings Am. Assoc. Swine Pract., Kansas City, p.170 (1984).

Lautie, R.: La maladie d'Aujeszky. Maladies animales a virus. Ed. Exp. Cientif. Francaise (1969).

Lenihan, P.; O'Connor, P.J.: Epidemiology and control control of Aujeszky's disease in the Republic of Ireland. In: Aujeszky's disease. Q. Wittmann S.A. Hall (eds.), Luxembourg, (1982).

Licea, J.A.: Aislamiento y tipificación de Pasteurella multocida de pulmones neumonicos de cerdo en la Piedad, Michoacán. Tesis de Licenciatura; ENEP-Cuautitlán UNAM México (1980).

Livingston, C.W.; Stair, E.L.; Underdahl, N.R. and Mebus, C.A.: Pathogenesis of Mycoplasmal pneumonia in swine. Am. J. Vet. Res. 33:2249-2258 (1972).

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

Maes, R.K.; Kanitz, C.L.; Gustafson, P.P. (1979). Citado por: Cartwright, S. en: Epidemiology and control of Aujeszky's disease in Great Britain. G. Wittmann and S.A. Hall (eds.), Luxembourg. (1982).

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

Martell, M.D.; Alcocer, B.; Ceron, F.; Lozano, J.L.; Del Valle, P.; Auro, A.: Aislamiento y caracterización del virus de la enfermedad de Aujeszky o pseudorabia en México. Técnica Pecuaria México 18:27-31 (1971).

Matthews, R.E.F.: Clasificación y nomenclatura de los virus de vertebrados. Intervirolgy 17(1-3) (1982), según la traducción del Ph.D. Eliseo Hernández Baumgarten.

McFerran, J.B.; Dow, C.: The distribution of the virus of Aujeszky's disease (pseudorabies virus) in experimentally infected swine. Amer. J. Vet. Res. 26:631-635 (1965).

McFerran, J.B.; Dow, C.: The effect of colostrum derived antibody on mortality and virus excretion following experimental infection of piglets with Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 15:208-214 (1973).

McFerran, J.B.; Dow, C.: Studies on immunisation of pigs with Bartha strain of Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 19 (1): 17-22 (1975).

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

Mock, R.E.; Crandell, R.A.; Mesfin, G.M.: Induced latency in pseudorabies vaccinated pigs. Can. J. Comp. Med. 45:56-59 (1981).

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).

Morrison, R.B., Pijoan, C., Leman, A.D.: Association between enzootic pneumonia and performance. Pig News and Information, 7: 23-31 (1986).

Motovskiy, A.: The role of Aujeszky's disease virus in the respiratory disease of swine. Vet. Med. Nauki 12:40-44 (1975).

Necoechea, R.R.: Enfermedad y su relacion con el medio ambiente. En: Diagnostico de las enfermedades del cerdo. Ed. R.R. Necoechea y C. Pijoan. Mexico pp. 155-176 (1982).

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

Olander, H.J.; Saunders, J.R.; Gustafson, D.P.; Jones, R.K.: Pathologic findings in swine affected with a virulent strain of Aujeszky's virus. Path. Vet. 3: 64-82 (1966).

Pauli, G.; Bund, K.; Podesta, B.: Antigenic components of Aujeszky's disease virus. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds.) Luxembourg, (1982).

Pedersen, K.B.; Elling, Q.: Persistent atrophic rhinitis induced by dermonecrotic Pasteurella multocida. Proc. Int Pig Vet. Soc. Cong. Belgium, (1984).

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

Pijoan, C.; Ochoa, G.; Trigo, F.: Aislamiento e identificación de bacterias de pulmones neumónicos en cerdos. Técnica Pecuaria México 29: 46-49 (1976).

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

Pijoan, C.: Mecanismos de defensa pulmonar. Memorias de I Curso latinoamericano de Enfermedades respiratorias de los cerdos. ENEP-Cuautitlan, UNAM AMVEC (1978a).



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

Pijoan.C.; Trigo.F.: Pasteurelosis. En : Enfermedades de los Cerdos. Editado por Ramírez, R.N. y Pijoan, A.C., Diana, México. pp511-513 (1987) (1982).

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

Pijoan.C.; Lastra.A.; Ramirez.C.: Preliminary observations on the presence and role of toxigenic Pasteurella multocida in swine pneumonia. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Belgium (1984).

Pijoan.C.: Neumonía del cerdo. En encuentro sobre enfermedades infecciosas del cerdo. Editado por Correa.G.P. y Mc-illa.G.A.; Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (ANVEC). pp 85-99 (1985a).

Pijoan.C. and Morrison.R.: Enzootic pneumonia of pigs: The role of Pasteurella multocida. Swine Consultant (Norden, Smithkline CIA.). Winter pp 1-6 (1985).

Pirtle.E.C.; Gutekunst. D.E.: Virus isolation and immune responses in susceptible swine exposed with pseudorabies virus (Shope strain). Am. J. Vet. Res. 39:1367-1368 (1978).

Pittler.H.: The occurrence and control of Aujeszky's disease in the federal Republic of Germany. In Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds.). Louxemburg. (1982).

Platt.K.B.; Mare.C.J. and Hinz.P.N.: Differentiation of vaccine strains and field isolates of Pseudorabies virus thermal sensitivity and rabbit virulence markers. Arch. Virology 60:12-23 (1979).

Platt.K.B.; Mare.C.J. and Hinz.P.N.: Differentiation of vaccine strains isolates of Pseudorabies (Aujeszky disease) virus: Trypsin sensitivity and mouse virulence markers. Arch. Virology 63:107-114 (1980).

Platt, K.B.: Genetic stability of the thermal, trypsin, rabbit and mouse markers of Aujeszky disease (Pseudorabies) virus in the pig. Vet. Microbiol. 6:225-232. (1981).

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).

Rimler, R.B.; Boycott, B.R.: Cross-protection between avian, porcine and bovine strains of Pasteurella multocida in the mouse. J. Comp. Path. 89:89-98 (1979).

Rosebusch, C.T.; Merchant, I.A.: (1939). Citado por: Iglesias, G. en: Estudio sobre substancias bactericidas presentes en secreción traqueal de cerdo embrionario. Tesis maestría, FES-Cuautitlan, UNAM, México, (1981).

Roberts, R.S.: An immunological study of Pasteurella septica. J. Comp. Path. 57:261-278 (1947).

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

Sabo, A.; Rajcani, J.; Blaskovic, D.: Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease. I: Distribution of the virulent virus in piglets after peroral infection. Acta Virol. (Praha) 12:214-221 (1968).

Sabo, A.; Rajcani, J.; Blaskovic, D.: Studies on the pathogenesis of Aujeszky's disease. III: The distribution of virulent virus in piglets after intranasal infection. Acta Virol. (Praha) 13:407-414 (1969).

Sabo, A.; Grunet, Z.: Persistence of virulent pseudorabies virus in herds of vaccinated and non-vaccinated pigs. Acta Virol. (Praha) 15:87-94 (1971).

Shope, R.E.: Swine Influenza. III Filtration experiments and etiology. J. exp. Med. 54: 373-385 (1931).

Shope, R.E.: Swine Influenza. In: Diseases of swine. 2nd. ed. Editor. H.W. Dunne. Iowa State Univer. Press. Ames. (1964).

Smith, I.M.: Studies on the role of some microorganisms in the respiratory infection of the pig with special reference to the involvement of Pasteurella septica. Tesis. de Ph. D., U. de Londres. 1970.

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

Szweda, W.; Koncicki, A.; Myszka, J.; Baczcoc, W.: The role of asymptomatic infections in the epizootiology of Aujeszky's disease. Med. Weter., 36:391-393 (1980).

Thawley, D.G.; Wright, J.C.; Solorzano, R.F.: Test and removal proced res v.s. vaccination for control and eradication of pseudorabies in misouri. Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc., 83:448-463 (1979).

Thawley, D.G.; Wright, J.C.; Solorzano, R.F.: Epidemiologic monitoring following an episode of pseudorabies involving swine, sheep and cattle. J.A.V.M.A., 1976:1002-1003 (1980).

Tolvid Diagnostic: Pseudorabies (Aujeszky's) virus glycoprotein X Antibody test kit. The Upjohn Company, Kalamazoo, MI 49001. USA (1989).

Toma, B.: La maladie d'Aujeszky en France en 1979. Rec. Med. Vet., 155:491-494 (1980).

Ursache, R.; Plateau, E.; Bernard, F.: Elements conditionant le diagnostic de la maladie d'Aujeszky. Rec. Med. Vet., 128:1317-1333 (1977).

Van der Marel, G.M.; De Wachter, J.C.; Van Dam, R.H.: Mousepotency test of an experimental Pasteurella multocida vaccine. Proc. Int Pig Vet. Soc. Cong. Belgium (1984).

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).

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).

Wohlgemuth,K.; Leslie,P.F.; Reed,D.E.; Smidt,D.K.: Pseudorabies virusm associated with abortion in swine. J.A.V.M.A. 172:478-479 (1978).

Yamamoto,K.; Ogata,M.: Mycoplasmal and bacterial flora in the lungs of pigs. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Belgium. p.94 (1982).