

13
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**" EFECTO DE LA TOXINA DE Bordetella bronchiseptica SOBRE LA
REMOCION DE Pasteurella multocida EN PULMON Y CORNETES DE
RATON"**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
JUANA IRMA CASTILLO SALAZAR

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA
M. en C. VIRGINIA LARA SAGAHON

ASESOR DE TESIS: Dr. en C. ABEL CIPRIAN CARRASCO

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MEXICO

1992



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

	Página
RESUMEN	X
1. INTRODUCCION	
1.1 Rinitis Atrófica	1
1.2 Características Generales de <u>B. bronchiseptica</u>	4
1.2.2. Clasificación	4
1.2.2 Hábitat	4
1.2.3 Morfología	5
1.2.4 Características de Cultivo	5
1.2.5 Estudios de Inmunidad	6
1.2.6 Toxinas	8
1.2.6.1 Purificación	9
1.2.7 Mecanismo de Patogenicidad	12
1.3 Características Generales de <u>P. multocida</u>	16
1.3.1. Morfología	16
1.3.2 Antígenos	16
1.3.3 Toxina	17
1.3.4 Material extracromosomal.	18
1.3.5 Adherencia.	19
1.3.4 Patogénesis	22
1.4 Asociación bacteriana	25
1.5 Mecanismo de distribución y depósito de Aerosoles bacterianos	28

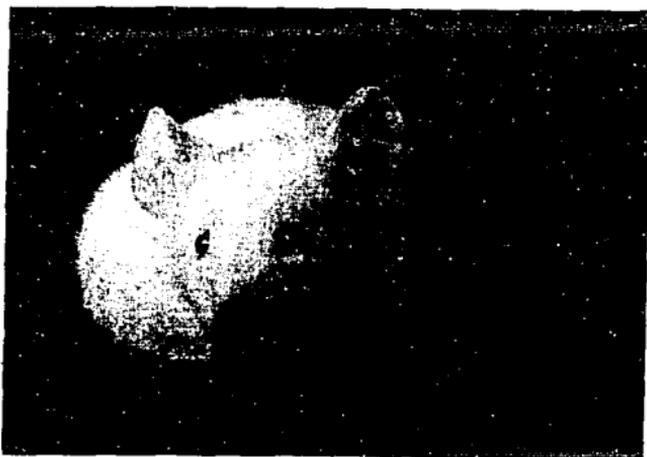
II JUSTIFICACION DEL PROYECTO	31
III OBJETIVOS	34
IV. HIPOTESIS	35
V. MATERIAL Y METODOS	36
5.1 Cepas de <u>B. bronchiseptica</u> y <u>P. multocida</u>	36
5.1.2 Producción de Exotoxina dermonecrotóxina.	36
5.2 Inoculación por aerosolización	37
5.3 Animales.	38
5.4 Remoción Bacteriana.	39
5.5 Recuperación Bacteriana	40
5.6 Estudio Histopatológico.	40
5.6.1 Análisis de Datos.	41
5.6.2 Diseño Experimental.	42
VI. RESULTADOS	
6.1 Identificación Bacteriana	45
6.2 Aerosolización	45
6.4 Efecto de la Toxina de <u>Bordetella bronchiseptica</u>	46
6.5 Estudio Histopatológico	47
6.6 Análisis de Varianza	64
VII. DISCUSION	66
VIII. CONCLUSIONES	71
XI. BIBLIOGRAFIA.	72

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó un modelo experimental de remoción bacteriana para la Rinitis Atrófica (RA); una enfermedad respiratoria muy común en el cerdo. Esto con la finalidad de estudiar la interacción de Pasteurella multocida y la toxina Bordetella bronchiseptica utilizando la vía natural de infección de la enfermedad a través de aerosoles bacterianos. El desarrollo de la misma se determinó mediante un estudio de remoción-retención de una carga bacteriana conocida en cornetes y pulmones de ratones de 21 días. El daño producido se verificó mediante un estudio histológico efectuado a los mismos días postinoculación.

El estudio de remoción indicó que la toxina no contribuye de manera significativa en la adherencia o eliminación de Pasteurella multocida en el tracto respiratorio del ratón, permaneciendo constante, en número, a lo largo de la infección; lo cual indicó que la bacteria no fué removida. Sin embargo los resultados de histopatología revelaron que tanto la toxina de B. bronchiseptica como P. multocida inoculadas por separado son capaces de inducir atrófia en los cornetes nasales de los ratones infectados; pero la severidad de las lesiones se incrementa con la combinación de estos dos factores, poniendo de manifiesto su relación sinérgica al reproducir en los cornetes de ratones lesiones microscópicas semejantes a las ya ampliamente reportados en cerdos.

**EFECTO DE LA TOXINA DE *Bordetella bronchiseptica*
SOBRE LA REMOCION DE *Pasteurella multocida*
EN PULMON Y CORNETES DE RATON.**



CUAUTITLAN IZCALLI, 1992

I. INTRODUCCION

1.1 RINITIS ATROFICA

Es una enfermedad infecto contagiosa ampliamente distribuida en la población porcina, descrita por Franke desde 1830 en Europa central. Se caracteriza por una severa necrosis del epitelio del tracto superior, así como por deformación y reducción en volumen y tamaño de los cornetes nasales, que puede ser ir de moderada a severa. Los cornetes ventrales inferiores son los más comunmente afectados llegando a observarse cierto grado de distorsión facial, incluyendo braquidnatia superior "mandíbula corta" y desviación lateral del morro, ocasionalmente se presenta también hemorragia nasal (Smith 1980, Leman y cols.,1981).

La Rinitis Atrófica (RA), es una enfermedad de distribución mundial (Pedersen y Elling, 1984). Se reportó en Estados Unidos de Norteamérica (Doyle y cols, 1944) siendo subsecuentemente reconocida en otras áreas del mundo que cuentan con una producción importante de cerdos. La condición precisa de la atrofia ha sido debatida activamente en este siglo y su entendimiento todavía permanece incompleto. Se ha dicho frecuentemente que la Rinitis Atrófica lleva a un retraso en el crecimiento de aproximadamente un 5%, aunque en Japón se ha encontrado hasta un 10% (Leman y cols, 1981). Existen otros reportes donde el retraso del crecimiento es muy poco o no lo hay, aún en animales con Rinitis Atrófica severa (Schofield, 1956; Pearce, 1967, 1984).

La mayor frecuencia de esta enfermedad esta dada en dos estaciones del año, primavera e invierno. El estrés aumenta la intensidad de las lesiones de los cornetes nasales, además de otros factores ambientales que influyen en la presentación y severidad de las mismas. Los factores más significativos que

agravan la enfermedad son: Una mala ventilación e irritación de la mucosa nasal por partículas suspendidas en el aire (Martineau, 1982). La frecuencia con la que se infectan los cerdos son:

% DE INFECCION	EDAD
4-10 SEMANAS	55-95
5-6 MESES	30-35
8-9 MESES	20-25

(Runnels, 1982)

Un manejo inadecuado, el hacinamiento y el medio ambiente desfavorable llevan a un retraso en el crecimiento del animal, esas condiciones generalmente se presentan en sistemas intensivos de producción, cuando los cerdos están confinados en lugares pequeños. Penny en 1977, Smith y Giles en 1980 identificaron algunos factores ambientales que tienden a predisponer la gravedad de la Rinitis Atrófica, cuando los animales están en lugares escasamente ventilados.

La principal forma de transmisión de la enfermedad es de cerdo a cerdo y por medio de aerosoles infectados, los cerdos expuestos pueden desarrollar Rinitis catarral, Faringitis y otras alteraciones antes de producirse la Rinitis Atrófica.

Los factores que contribuyen al incremento o decremento de la enfermedad son los siguientes:

INCREMENTO	DECREMENTO
Piaras pequeñas en áreas cerradas	Piaras grandes en áreas abiertas
Expansión de la pira	Tamaño estático de las piaras
Alta población de lechones jóvenes	Alta población de animales adultos
Destete en grupos	Destete en camada
Frecuencia de movimiento y mezclado	Poco movimiento y no mezclado
Sistemas internos intensivos	Sistemas abiertos
Hacinamiento	Baja carga animal por m ²
Temperaturas bajas	Control de temperatura
Higiene y desinfección deficiente	Higiene y desinfección adecuada

1.2 CARACTERISTICAS GENERALES DE Bordetella bronchiseptica

1.2.1 Clasificación

Ferry aisló e identificó Bordetella bronchiseptica como Bacillus bronchicanis en 1910. Este nombre fue seleccionado porque se aisló del tracto respiratorio de perros. Después organismos con características idénticas fueron descritos y aislados del tracto respiratorio de cuyes, monos y humanos (Ferry, 1912-1913). El organismo fue reclasificado varias veces, Alcaligenes bronchisepticus (Bergey, 1925), Brucella bronchiseptica (Topley y Wilson 1929), Alcaligenes bronchicanis Haupt (1935), y Haemophilus bronchisepticus, Wilson y Miles (1946). Estas clasificaciones se realizaron en base a la morfología, crecimiento y características bioquímicas, pero su nombre actual fue dado cuando Moreno López describió el género Bordetella, en honor a Jules Bordet por ser el primero en aislar el organismo (Pittman, 1974) encontrando que las tres especies de Bordetella son patógenas para los mamíferos.

1.2.2 Hábitat

En cerdos Bordetella bronchiseptica se aisló por vez primera a partir de pulmones neumáticos (Throp y Tanner 1940; 1943) y aunque este organismo es patógeno ocasional en las bronconeumonías primarias de cerdos jóvenes, puede también actuar como un patógeno del tracto respiratorio inferior en animales viejos. Esta bacteria fue aislada primero de la cavidad nasal por Switzer en 1956, quien demostró la habilidad de este organismo para inducir cambios hipoplásticos

(atrofia) en cornetes y consecuentemente se le consideró como patógeno primario en la Rinitis Atrófica.

1.2.3 Morfología

Bordetella bronchiseptica es un cocobacilo, no produce esporas, pleomórfico, en crecimiento sobre medio sólido, se presenta principalmente en forma cocoide, de un tamaño de $3.0 \times 0.5 \text{ um}$ a $0.4 \times 0.72 \text{ um}$ a $0.5 \times 0.4 \text{ um}$; algunas formas filamentosas tienen en promedio un tamaño de $0.4 \times 8.0 \text{ um}$ (Richeter y Kress, 1967), presenta motilidad positiva, por flagelos peritricos. Estudios con microscopía electrónica, han mostrado flagelos, en donde se puede observar una triple hélice con dirección a la izquierda teniendo un promedio de diámetro de 13.9 nm (Labaw y Mosley, 1955; Goodnow, 1980).

1.2.4 Características de cultivo

La identificación de B. bronchiseptica de aislamiento primario, la han reportado como más difícil, que las cepas mantenidas en el Laboratorio. Cuando estas bacterias crecen sobre agar sangre las colonias suelen ser hemolíticas desarrollando un diámetro de promedio de 0.2 mm en 2 días aproximadamente. Sin embargo, Simpson (1976) reporta un aislamiento de cultivos primarios en muestras nasofaríngeas, las cuales produjeron colonias no hemolíticas, no características, pero que correspondían a B. bronchiseptica.

Las colonias de B. bronchiseptica sobre placas de agar sangre, son características y de aspecto rugoso o lisas. A las colonias lisas se les ha designado como de fase I, estas son virulentas, mientras que a las colonias rugosas se les ha

designado como de fase IV siendo avirulentas (Parker 1976). Nakase (1957) designa como de fase I a las colonias lisas que son patógenas para el ratón, y de fase IV a las colonias rugosas que no son virulentas para el ratón. La fase I es extremadamente inestable y se transforma rápidamente a fase II, III, y IV. La fase III se ha encontrado asociada con antígenos capsulares o antígenos somáticos o bien con ambos. La fase IV o colonias rugosas han sido consideradas como de fase III celular y a las que les faltan físicamente los antígenos flagelares.

1.2.5 Estudios de Inmunidad

Las bacterinas que se han utilizado a base de B. bronchiseptica, para prevenir la distorsión facial y la atrofia de los cornetes nasales, solo han mostrado que disminuyen la infección en la membrana nasal (Hanada y cols., 1979). Harris y Switzer (1969) no pudieron inducir resistencia nasal contra este microorganismo, cuando vacunaron cerdos por vía intramuscular con una bacterina a base de células completas y sin adyuvante. En estudios posteriores Harris y Switzer (1972) demostraron que se reduce la infección nasal con una bacterina preparada a base de células sonicadas.

La prevención de la infección de la mucosa del tracto respiratorio por la B. bronchiseptica (pulmón, tráquea, o cornetes nasales), parece ser depende de la inhibición de la adhesión y posterior colonización por la bacteria. Se cuenta con pocos reportes de una infección septicémica, la inhibición debida a una actividad localizada de aglutininas, antitoxinas humorales o factores inmunes celulares. Los preparados de antígenos de B. bronchiseptica han sido administrados en una variedad de formas, con y sin adyuvante y por diferentes vías de administración. Se han realizado estudios de inmunidad con el uso de Ag de B. pertusis (Harris y

Switzer, 1972). Se han usado vacunas de B. bronchiseptica viva avirulenta o de subunidades, para inmunizar cerdos, cuyes y perros (Bercovich y Dosterwoud, 1977; Pedersen y Barfod, 1977; Goodnow y cols., 1979; Giles y Smith, 1982).

Las células completas inactivadas químicamente de B. bronchiseptica en adyuvante completo de Freund o hidróxido de aluminio, han sido utilizadas exitosamente para proteger cuyes contra la muerte, pero no contra bronconeumonía, resultante de una infección natural o inducida en el laboratorio (Ganaway, 1965; Little, 1975; Fitzl, 1975; Giles y Smith, 1982).

Con el uso de un anticuerpo monoclonal se ha identificado un antígeno (una proteína de membrana de 68 kd) presente en B. bronchiseptica y también en B. pertussis y B. parapertussis. Este anticuerpo protege a ratones de la infección por aerosoles con B. bronchiseptica con mortalidad reducida y lesiones leves en cornetes. El antígeno de membrana de B. bronchiseptica se purificó por cromatografía de afinidad y se evaluó al inmunizar ratones que fueron desafiados por vía intraperitoneal y por aerosoles con B. bronchiseptica. La inmunización con el antígeno de 68 kd en adyuvante incompleto de Freund, redujo significativamente los niveles de mortalidad en los ratones desafiados por vía intraperitoneal. En el modelo de infección por aerosoles, la inyección de antígeno 68 kd con adyuvante completo e incompleto de Freund o con saponina redujo las cuentas bacterianas en el pulmón de los ratones desafiados infectados. Estos resultados sugieren que la proteína 68 kd puede corresponder a un antígeno de protección para B. bronchiseptica (Montaraz y cols., 1985).

Los miembros del género *Bordetella* poseen características antigénicas similares, cada especie posee un Antígeno "0" somático termoestable, una dermonecrotóxima termolábil, y un aglutinógeno termolábil común, (Ferry, 1918; Eldering, 1942; Hoiby y cols., 1976; Olsen y cols., 1976), sin embargo cada especie tiene un aglutinógeno especie específico y otros 10 aglutinógenos están

presentes en las tres especies (Pittman, 1974). Las diferencias de estructura morfológica y antigénica se deben a la fase colonial y fueron medidos con sueros monoespecíficos; los resultados indicaron que B. bronchiseptica, puede ser dividido en tres fases lisas y una fase rugosa. Las células lisas fase 1 y 2 poseen una antígeno idéntico L (cápsula termolábil), antígenos H₂S (de superficie termoestables) y antígenos O las células de la fase III, fueron divididas antigénicamente en tres grupos más, fase III-1 (antígenos, H, 0 y 0) y la fase III-2 (antígenos H, O y 0). Las células rugosas de la fase IV poseen únicamente 0 y 0. Las propiedades antigénicas de B. bronchiseptica, son variables por el tipo de nutrientes usados para su crecimiento y por el número de pases seriados hechos en el laboratorio en medios de crecimiento. Además cepas de laboratorio han fallado en la aglutinación con suero preparado contra cepas aisladas frescas. Un antígeno (Proteína de membrana de 68 Kd) de B. bronchiseptica fué identificado mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce dos determinantes que no cruzan entre sí. Este anticuerpo también reaccionó con proteínas homólogas de B. pertusis pero no con otros 12 organismos de otros géneros de bacterias (Montaraz y cols., 1985).

1.2.6 Toxina de Bordetella bronchiseptica

Los organismos de todas las especies de Bordetella sintetizan por lo menos dos toxinas, una que es similar química y biológicamente al lipopolisacárido de otros gram negativos (Evans y Mai, 1939; Maitland y Mac lennan, 1960), la otra es una toxina termolábil con propiedades biológicas e inmunológicas semejantes, la dermonecrotina de P. multocida con efectos dermonecrotizantes y esplenotrópicos en varios animales de laboratorio como conejos, ratas y ratón

cuando se administra por vía intradérmica, intraperitoneal o intravenosa a estos animales.

Se demostró que esta toxina es uno de los principales factores responsables de la atrofia de turbinas en cerdos jóvenes (Hanada, et al 1979; Nakase, et al 1980).

1.2.6.1 Purificación

La DNT no se secreta durante el crecimiento activo de las bacterias, su localización es probablemente el espacio citoplásmico. Esta hipótesis se basa en el hecho de que la cantidad de DNT se incrementa solo en pequeñas cantidades después de un choque osmótico, y aumenta significativamente cuando se somete a sonicación y posteriormente se centrifuga incrementándose la actividad del sobrenadante.

Existen muchos reportes acerca de la purificación de la DNT usando cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, electroforesis preparativa en gel, y otros métodos (Endoh y Nakase 1986). Nakai y Kume (1986), existiendo hasta la fecha algunas incongruencias en la descripción de la DNT.

Nakare y cols. en (1969) reportaron la purificación de la misma DNT como una proteína de bajo peso molecular unida a una molécula de azúcar. Enhon y cols., (1986) purificaron una DNT de *B. bronchiseptica* con un PM de 102.000 d y un punto isoeléctrico de 69, ellos también reportaron a la DNT como una proteína simple formada de un tetrámero que consiste de dos subunidades (una de 30, 000 y otra de 20,000 Kd), la DNT de *B. bronchiseptica* también ha sido aislada por Kume y Nakai en 1986 reportando un PM de 190 000 Kd con una proporción considerable de azúcar, proponiendo que esto puede deberse a que la DNT tiende a agregarse y formar complejos con otras sustancias celulares, las cuales pueden

causar dificultades en la purificación de la toxina y propiciar así la inconstancia de las preparaciones de la DNT ya reportadas.

Como se ha dicho anteriormente la actividad de la DNT se funda principalmente en extractos celulares más que en sobrenadantes de cultivos.

LAS PROPIEDADES QUE SE HAN DETERMINADO PARA LA DNT SON:

- *PRESENTA UN PUNTO ISOELECTRICO DE 6.3 - 6.7
- *ES UNA PROTEINA SIMPLE CON P.M DE 145.000 d
- *SE INACTIVA POR COMPLETO POR CALENTAMIENTO A 56°C DURANTE 20 MINUTOS.
- *LA DOSIS MINIMA DE ENZIMA PURIFICADA QUE CAUSA NECROSIS DERMICA ES DE > 5 ng.
- *AGLUTINA ERITROCITOS DE POLLO, CABALLO, FERRO, RATON, CUYE, CERDOS, BORREGOS, GATOS Y VACAS.
- *SU EFECTO SE PIERDE POR EXPOSICION A FORMALDEHIDO ALCOHOL O TOLUENO.
- *SU ACTIVIDAD DECRECE A UN 50 % CUANDO SE MANTIENE UNA SEMANA A 90°C.
- *LA MOLECULA QUE LA FORMA TIENDE A AGREGARSE Y FORMAR COMPLEJO CON OTRAS SUSTANCIAS COEXISTENTES.
- *PRESENTA EFECTO CITOPATICO EN CELULAS DE PULMON DE BOVINOS
- *TIENE EFECTO DEGENERATIVO EN BAZO DE RATONES.

Cuando la toxina dermonecrotóxica fue inoculada intravenosamente en conejos, inicialmente se indujo una hiperglicemia, con posterior hipoglucemia, acabando finalmente con la muerte. El factor inductivo a hipoglucemia fue reducido o eliminado, cuando se calentó la toxina a 55°C durante 30 minutos (Oddy y Evans, 1940). La toxina fue sensible a la formalina, no fue antigénica, y perdió su potencia después del contacto con la formalina, lo mismo ocurrió después de la filtración a través de un filtro-Seitz-E-R, (Evans, 1940). En contraste, Evans (1940) encontró que la toxina de B.bronchiseptica formalinizada era

antigénica, una antitoxina así preparada bloqueó la toxina de B. bronchiseptica, y neutralizó a las toxinas de todas las especies de Bordetella. Por otro lado la antitoxina incrementa la actividad de adenilatociclasa en cultivos en fase I para las tres especies de Bordetella, que liberan esta enzima al fluido, excepto B. pertusis, que produjo más actividad intracelular (Endoh y cols., 1980). Los cultivos en la fase III de estas especies no tienen actividad enzimática extracelular e intracelular.

Han sido descritos 3 tipos de aglutinógenos en B. bronchiseptica : Antígeno flagelar II, Antígeno 0 de superficie y un Antígeno termoestable (Eldering, 1942; Lautrop y Lucas, 1960). Debido a que B. pertusis y B. parapertusis son inmóviles, carecen del antígeno H, pero las tres especies de Bordetella, tienen un antígeno 0 compartido similar, (Eldering, 1938). Cada especie mostró un antígeno K diferente, con variaciones en los números de antígenos parciales K (Anderse, 1953). Un total de 14 antígenos K, han sido encontrados en las tres especies de Bordetella.

Existe una correlación directa entre la dermonecrototoxicidad y las lesiones nasales y pulmonares, en animales jóvenes B. bronchiseptica es el patógeno primario, un extracto de B. bronchiseptica inoculado por vía intravenosa daña áreas preferentemente de tejido linfático , particularmente el bazo, por lo que evidentemente la toxina puede producir un desorden en la inmunidad mediada por células. Se piensa que el posible mecanismo por el cual actúa la toxina es básicamente induciendo vasoconstricción irreversible, debida quizá a la acción directa sobre los músculos y no sobre el sistema nervioso central, no induce agregación planetaria, resultando en isquemia y posible anoxia con necrosis y hemorragia.

1.2.7 Mecanismos de Patogenicidad

La bordetellosis y la RA han sido estrictamente ligadas en muchísimas ocasiones como virtuales sinónimos (Ogata y cols., 1970; Switzer y Farrington; 1975; Switzer, 1981). Una parte sustancial de esta opinión se sostiene en el oeste de Europa en donde de una manera extensa y precisa se ha involucrado a este microorganismo en la RA Aunque esta opinión es variada en cuanto a la naturaleza exacta de esta relación o asociación. (Done, 1975; De Johns y cols., 1976; Tornoe y cols., 1976; Giles y cols., 1980; Woodmins, 1980; Pedersen y Barford, 1981; Rutter, 1981, Whittlestone, 1982).

Este microorganismo está asociado con infecciones respiratorias en animales, particularmente en RA de cerdos (Chang y cols., 1975; Bermis y Appel, 1977), la cual está caracterizada por atrofia de los huesos de los cornetes nasales, pneumonia y crecimiento retardado (Foged y cols., 1987; Pedersen y cols., 1980). La prevalencia de B. bronchiseptica es muy alta en la población de cerdos de los países con alta productividad. Estudios hechos en los Estados Unidos mediante el cultivo de muestras nasales de cerdos jóvenes han demostrado la presencia de B. bronchiseptica en el 25-54 % de los animales (Ross y Harris, 1969) y en cerca del 11 % de los cerdos adultos (Farrington y Switzer, 1977 y Jenkins y cols., 1977). Los resultados de las estimaciones en el oeste de Europa muestran una alta prevalencia (Cameron y cols., 1980). En el este de Inglaterra, en los cerdos de engorda, se estimó que el 40% de los mismos albergan al microorganismo (Anon, 1954).

La transmisión de B. bronchiseptica de cerdo a cerdo es por aerosoles. La alta prevalencia de la infección en cerdos en desarrollo, sugiere que la transmisión puede ocurrir en cualquier edad, pero es más probable en cerdos jóvenes

susceptibles, en los cuales se produce una activa rinitis, con estornudos, por lo que la enfermedad puede distribirse rápidamente (Smith y cols., 1982). Los factores que predisponen a la infección, pueden ser diversos pero el más importante parece ser la edad; la habilidad del cerdo lactante a resistir la infección, depende no únicamente del desafío, sino también del grado de protección pasiva proporcionado por las cerdas que se encuentran infectadas en la piara (Guiles, 1981).

Las observaciones sobre la enfermedad experimental son numerosas, y los efectos clínicos y patológicos de la infección están bien documentados. Esta bacteria ha sido ampliamente aislada de cerdos jóvenes con Rinitis Atrófica, en cerdos con neumonía y en animales sin signos clínicos de la enfermedad. Este microorganismo también es un patógeno potencial en otros mamíferos, incluyendo perro, gato y ratas (Goodnow; 1980).

La lesiones de B. bronchiseptica en la cavidad nasal han sido estudiadas en detalle, particularmente en cuanto a la naturaleza y el efecto de los factores tóxicos y el daño osteoblástico producido en el desarrollo del hueso. Sin embargo el mecanismo preciso por el cual se producen las lesiones en los cornetes permanece incierto; se considera que la colonización de B. bronchiseptica en la cavidad nasal ocurre por adherencia del microorganismo, este se une preferentemente a las células de los epitelios ciliados (Yokomizu y Shimizu, 1979), seguido por la multiplicación de la bacteria sobre la superficie de la mucosa y la producción de cambios inflamatorios proliferativos y degenerativos en el epitelio nasal, incluyendo la pérdida de cilios (Duncan y cols., 1966; Edington y cols., 1976). El organismo no es considerado un invasor de tejidos profundos, esto supone que en

la mucosa elabora un factor agresivo o una toxina que se extiende al tejido óseo de los cornetes y es responsable de la osteopatía.

Extractos libres de células en fase I de esta bacteria, contienen una toxina termolábil, dermonecrótica, que es probablemente un factor importante en la patogénesis y la osteopatía (Harris y cols., 1971), cuando este extracto fue inoculado intranasalmente en cerdos, desarrollaron lesiones nasales similares a la RA (Hanada y cols., 1979; Nakase y cols., 1980). Existen algunas variaciones en la toxicidad de las diferentes fases de B. bronchiseptica aisladas de cerdos; cepas en fase I son más tóxicas que las de fase III (Rutter y Collins, 1983), pero aparentemente no existe diferencia entre las cepas de las pjaras con y sin RA (Rutter y cols., 1982).

Por largo tiempo se ha considerado que una osteogénesis deficiente, en lugar de una osteolisis marcada, es el mecanismo fundamentalmente básico en el desarrollo de la hipoplasia de los cornetes en cerdos jóvenes (Schofield y Jones, 1950). Observaciones ultraestructurales tienden a confirmar esto, los estudios han revelado que los osteoblastos (en el interior del periosteum), son las células donde ocurren las anomalías en la Rinitis Hipoplásica inducida por B. bronchiseptica (Fetter y cols., 1975; Silveira y cols., 1982). Se presume que el factor tóxico o tóxicos liberados por el microorganismo pueden inducir estos cambios en los osteoblastos diferenciados, la actividad de fosfatasa alcalina en los huesos de los cornetes se presenta disminuida 4 días después de la infección experimental con la bacteria. Esta actividad enzimática se incrementa 2 semanas después de la infección, sin embargo, la acción del factor tóxico sobre los osteoblastos es de duración más limitada que la persistencia de la infección (Silveira y cols., 1982).

En 1975 Switzer demostró que la Rinitis Atrófica se puede inducir en el laboratorio, por medio de cultivos puros de la bacteria aplicada a los cornetes nasales, el papel primario de la B. bronchiseptica en cerdos, sin embargo no fue completamente aclarado. Durante el siguiente año Switzer fue apoyado por otros investigadores (Brassine y cols., 1976; Mc Candlish y cols., 1976; Tornøe y Nielsen, 1976).

Se ha demostrado la participación de B. bronchiseptica como patógeno primario en las infecciones respiratorias en animales de laboratorio (Fisk y Soave, 1973). Las lesiones dermonecróticas, así como las reacciones alérgicas sistémicas han sido observadas en animales de laboratorio después de inyectar la toxina, lo que ha permitido inferir que la toxina está involucrada en los mecanismos patogénicos de la atrofia, inducida por B. bronchiseptica en los tejidos de los cornetes nasales de los cerdos (Skelly y cols., 1980).

1.3 CARACTERISTICAS GENERALES DE Pasteurella multocida

1.3.1 Morfología

Cuando P. multocida se aísla de los animales que murieron por la infección, se observa como un cocobacilo pequeño, de aproximadamente 1.0 um de longitud y 0.5 a 0.8 um de ancho. Son bacterias gram negativas e inmóviles; sin embargo, la morfología de estos microorganismos es variable ya que si son aislados del tracto respiratorio superior de animales clínicamente sanos se observan como bacilos relativamente largos, que miden aproximadamente 5 um de longitud y 1.0 um de ancho (Buxton y Fraser, 1977; Nicolet, 1985).

1.3.2 Antígenos

Las características antigénicas de P. multocida han sido determinadas por estudios inmunológicos empleando pruebas de hemaglutinación indirecta, autoaglutinación en presencia de acriflavina e inhibición de la formación capsular por hialuronidasa. Mediante estas pruebas se han encontrado diferencias entre tipos de esta especie, caracterizando cuatro tipos en base a pruebas de protección en ratón, los tipos de Roberts: I, II, III y IV, pero si se relaciona con antígenos capsulares son los tipos de Carter: A, B, D y E, correspondiendo una y otra clasificación de la siguiente manera: I con B; II con A; III con E y IV con D. (Roberts, 1947; Carter, 1955; Carter, 1957; Carter y Subronto, 1973; Carter y Rundell, 1975).

Se han estudiado doce tipos de antígenos somáticos numerados del 1 al 12 (Namioka y Murata, 1961). Mediante pruebas de inmunodifusión y extractos salinos de células capsuladas y no capsuladas formalinizadas y calentadas a 100 °C durante una hora, se han determinado tipos somáticos de P. multocida (1-16) de origen aviario (Heddleston y cols., 1972).

1.3.3 Toxinas

En Europa, se ha demostrado que las Pasteurellas aisladas de casos de Rinitis Atrófica pertenecen al serotipo "D", y se caracterizan por producir toxinas que se identifican por medio de pruebas biológicas, como la producción de una lesión dermonecrótica (DNT) (de Jong y cols., 1980); por letalidad en ratones (Rutter, 1983) y toxicidad en cultivos de celulares (Lastra y Pijota, 1984). Nakai y cols., (1986), purificaron una toxina DNT a partir de extractos obtenidos por sonicación de P. multocida tipo "D" (cepas SP-72 y 4745a) y de B. bronchiseptica (cepa L3), las propiedades fisicoquímicas de la toxina de P. multocida fueron: PM de 160,000 d punto isoeléctrico de 4.7 a 4.8 y reacción de absorción a 280/269 nm de 1.89 en relación a P. bronchiseptica de 190,000 d, de 6.5 a 6.6 y de 1.93, respectivamente. Esto sugiere que se trata de glicoproteínas que tienen propiedades biológicas y actividades tóxicas similares, pero que difieren en pruebas de neutralización cruzada. En trabajos similares realizados por Niels y cols., (1986) se encontró que la DNT de P. multocida tipo "D" (cepa 45/78) obtenida de sobrenadantes, tuvo un PM de 143,000 d y concluyeron que resultó similar en cuanto a actividad biológica a la toxina de B. bronchiseptica pero diferente en propiedades químicas, probablemente debido a las diferentes cepas de P. multocida

estudiadas y a que la sonicación de un cultivo en fase exponencial pudiera llevar a la liberación de una toxina intracelular activa, ya preformada.

La caracterización del lipopolisacárido (LPS) de algunas cepas de *P. multocida* (14 tipo A; 11 tipo B; 5 tipo D y 3 tipo E), han revelado la presencia de monosacáridos como la glucosamina, galactosamina, L-glicero-D-mannoheptosa, D-glicero-D-mannoheptosa, glucosa y galactosa, lo que ha permitido subdividir esta especie en cuatro tipos químicos (I-IV), sin embargo no se encontró una equivalencia con los serotipos de Carter (Erler y cols., 1977). También se ha reportado en las cepas aviarias una endotoxina (de cepas capsuladas y no capsuladas) que se ha relacionado con la virulencia en el Cólera Aviario (Rebers y Heddeleston, 1974).

1.3.4 Material extracromosomal

En México, Mendoza (1985) aisló una exotoxina en los sobrenadantes de cultivo de 18 horas; los hallazgos hicieron pensar que la fracción de PM de 22,000 fue la causante de la reacción dermonecrotóxica en la piel del cuye (DNT positiva). Esta actividad se perdió con el tratamiento con tripsina, pepsina y elevación de temperatura, coincidiendo con los resultados de Rutter (1983) y Van Der Heyden y cols., (1984), además en este trabajo la cepa control de *P. multocida* tipo "D" mostró tener un plásmido de alrededor de 5.2 Kd en geles de agarosa, esta banda parece ser la responsable de la presencia (DNT) en el plásmido que dio una reacción dermonecrotóxica en la piel de cuye en comparación con la cepa curada (tratada con 400 ug de naranja de acridina), no mostró la presencia de plásmido y no dio positividad a la reacción en la piel de cuye. Además con la pérdida del

material extracromosomal, se perdió la resistencia a varios antibióticos, lo que sugiere que estos factores estén en el mismo plásmido. En un estudio se aislaron 58 cepas de P. multocida serotipo 3 de pavos y se encontró la presencia de plásmido R, en 7 de estas cepas las cuales fueron resistentes a estreptomina, tetraciclinas y sulfonamidas, (Hirsh y cols., 1984). También se ha demostrado en cepas de P. haemolytica aisladas del tracto respiratorio de ganado vacuno resistencia a tetraciclina y ampicilina, codificada en DNA extracromosomal (Richard y cols., 1984; Boyce y Marter, 1986). En otro estudio con 5 cepas de P. haemolytica, solo tres de ellas presentaron plásmidos medianos con resistencia hacia algunos antibióticos (Jackwood y cols., 1987).

1.3.5 Adherencia

La Rinittis Atrófica es una enfermedad multifactorial muy compleja. Se sabe que tanto Bordetella bronchiseptica como Pasteurella multocida, son capaces de causar atrofia en las turbinas nasales de cerdos, pero la severidad y la persistencia de los cambios que se inducen son diferentes. Esto constituye una evidencia de que la colonización y toxicidad, son los determinantes virulentos más importantes de estos microorganismos.

La colonización es esencial para la producción de lesiones en los cornetes, tanto macroscópicas como microscópicas y para la persistencia de la infección "in situ", más aún la aplicación de un irritante como ácido acético, ha sido considerado como un requisito para la colonización de P. multocida (Elling y Pedersen, 1983) lo que indica probablemente que P. multocida se encuentra como un residente normal en la mucosa de cerdos.

La adherencia es una interacción compleja, entre la bacteria y el epitelio nasal, lo que permite la colonización y propicia que se exprese su patogenicidad y se desencadenen los mecanismos inmunológicos ya conocidos. Con respecto a esto Frymus y cols. observaron muy poca adherencia de P. multocida tipo "D" aislada de epitelio nasal porcino en contraste con P. multocida tipo "A" que se adhirió en gran número a células de epitelio traqueal porcino, y mucho más deficiente colonizador si se le compara con B. bronchiseptica; aunque no existen estudios donde se compare la adherencia de un gran número de aislamientos de estos microorganismos, bajo las mismas condiciones experimentales. Jacques y Parent, (1988) compararon veinticinco aislamientos de P. multocida, reportando que su adhesión es significativamente seis veces menor que B. bronchiseptica en estudios "in vivo".

Hasta ahora la información de las características de virulencia de P. multocida en tracto respiratorio superior o el proceso por medio del cual el organismo coloniza la mucosa nasal es poco conocido, Nakai y Kume (1985) y Oyamada y cols. (1986) demostraron que P. multocida no coloniza la mucosa nasal en cerdos sanos y que cuando lo hace en lechones es de una manera diferente a B. bronchiseptica, posiblemente esto explique las diferencias que presentan ambas bacterias. Nakai y cols, (1987) encontraron en un estudio de adherencia de estas bacterias, que en células epiteliales cultivadas "in vitro" el número de bacterias de B. bronchiseptica adheridas por célula fue aproximadamente 3 veces más alto que el correspondiente a P. multocida, y una mínima afinidad de esta a la mucosa se comprobó mediante microscopía electrónica observando que los fragmentos celulares a los cuales se adherieron presentaron una estructura normal, mientras que los fragmentos colonizados por B. bronchiseptica mostraron una marcada degeneración, escamación y severa reacción inflamatoria. Coincidiendo esto , con lo publicado por Nakai y Kume, (1986) quienes cultivando fragmentos de epitelio

nasal en un medio que contenía DNT de *Pasteurella* o *Bordetella* indujeron cambios morfológicos semejantes a los producidos "in vivo" incrementando con esto la adherencia y colonización de *B.bronchiseptica*, mientras que con *P. multocida* el epitelio presenta una morfología aparentemente normal y una carencia de habilidad para la colonización, lo que implica una disminución o no producción de DNT esto soportaría la hipótesis previa de que *B.bronchiseptica* induce RA aún en ausencia de *P.multocida*.

Varios autores (Kume y cols, 1986), Rivera y cols, (1986) han reportado la incapacidad de *Pasteurella* para atacar diferentes cultivos celulares, sugiriendo la ausencia de adhesinas en estos extractos, sin embargo algunas cepas de otras especies animales mostraron poseer fimbrias y un ataque más rápido a las células (Glorioso y cols.,1982). Recientemente Fortín y Jacques, (1987) reportaron que el 44 % de las *Pasteurellas* aisladas de RA fueron capaces de hemaglutinar eritrocitos humanos grupo "O", lo que sugiere que estos extractos fueron citoadherentes, aún cuando no confirmaron la presencia de fimbrias mediante microscopía electrónica. Trigo y Pijoan investigando la toxigenicidad de extractos de *P. multocida* encontraron que todo aquellos aislados de RA fueron toxigénicos y la mayor parte de ellos presentaron fimbrias, estas estructuras son cortas de aproximadamente 0.5 micras de largo por 0.01 de diámetro, muy similares a las de *Escherichia coli* (Issacson y cols., 1987), aunque la naturaleza exacta de esta estructura no ha sido aun bien determinada.

Otro descubrimiento interesante es que todas las cepas aisladas de pulmón resultaron ser no toxigénicas y al menos del 88 al 90 % de estas fueron también no pilliadas. Estos resultados sugieren que la toxigenicidad y la pilliación son factores asociados con la RA mientras que la neumonía y la pleuritis se relaciona con cepas serotipo "A" no toxigénicas y no pilliadas.

1.3.4 Patogénesis

Pasteurella multocida es un agente extremadamente común en las neumonías del cerdo. Normalmente, el microorganismo está considerado como una bacteria incapaz de invadir el pulmón a menos que exista un factor predisponente (Ross, 1984). Sin embargo, se ha demostrado que *P. multocida* es el principal agente involucrado en las "neumonías crónicas" del cerdo (Pijoan, 1985). Estudios microbiológicos y patológicos realizados en pulmones neumónicos, colectados de rastros, han demostrado que una serie de microorganismos están asociados al proceso neumónico y los análisis de correlación estadística comprueban que *P. multocida* es el único agente responsable de las lesiones severas en la "neumonía crónica" (Morrison y cols., 1985).

Las características biotípicas de *P. multocida* aisladas de cerdos como son: la producción de toxinas, y otras ya descritas (Buxton y Fraser, 1977) son importantes en la virulencia de la misma, pero solo en la Rinitis Atrófica y no en las neumonías. Se ha demostrado que las cepas de *P. multocida* importantes en Rinitis Atrófica son las de tipo "D" toxigénicas (DNT), sin embargo, estas no son patógenas para el pulmón (Pijoan, 1985).

La flora nasal del cerdo rinitico se compone en un 80% de *P. multocida* tipo "D" y 20 % de tipo "A" y mientras que la flora pulmonar del cerdo neumónico es 5% de tipo A y 15 % de tipo "D". Se ha demostrado que esto se debe al comportamiento del macrófago alveolar ya que ésta célula es capaz de fagocitar rápidamente a las cepas "D" pero no a las cepas "A", aparentemente debido a que las cepas "A" poseen una 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 producen las P. multocida tipo "D" (Pijoan, 1984).

En el caso de la Rinitis Atrófica, se ha demostrado que la invasión secundaria por P. multocida, se llevaría a cabo después de una infección con B. bronchiseptica, induciendo lesiones más severas e intensificando el desarrollo de la atrofia de los cornetes, estos estudios sugieren que P. multocida juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, (Pedersen y Barfod, 1981; Martineu, 1982; Runnels, 1982; Rutter y Rojas, 1982).

Mediante microscopía electrónica, se ha encontrado la presencia de fimbrias en P. multocida que se han asociado a su patogenicidad, (Pijoan y Trigo, 1988). A pesar de esto es difícil de llevar a cabo la colonización en las fosas nasales de cerdos sanos con P. multocida, a menos que se combine con B. bronchiseptica o que se presenten otros factores predisponentes (Rutter, 1983; Pijoan y Morrison, 1985)

Estudios con cepas toxigénicas de P. multocida inoculadas después de la irritación con ácido acético, han inducido el desarrollo de la Rinitis Atrófica, asociado con la reabsorción inicial del hueso y con la falta de osteogénesis, debido al daño sobre los osteoblastos (Switzer y cols., 1975; Smith y cols., 1982). Por otro lado, no se ha encontrado que P. multocida produzca una respuesta inflamatoria en el desarrollo de la Rinitis Atrófica y si un factor que estimula la reabsorción del hueso y suprime la síntesis osteoide (Pedersen y Elling, 1984).

Se ha reportado que P. multocida induce osteoporosis en los cornetes nasales a través de un proceso de osteólisis de osteoclastos e inhibición de la osteogénesis, causando degeneración y muerte de osteoblastos. En un estudio de cerdos privados de calostro y obtenidos por cesárea se observó una marcada reducción bilateral en

un volumen relativo de hueso trabecular después del tratamiento con toxina entre los días 3 y 15 posteriores a la inoculación. La toxina provocó un aumento de osteoclastos entre los días 3 y 9 en los espacios medulares que separan las trabéculas óseas. La degeneración y necrosis de las células formadoras de hueso, principalmente osteoblastos se acompañó con una disminución en la mineralización y reducción en la matriz ósea. Los osteoclastos presentes a lo largo de la superficie de la resorción ósea mostraron una mayor cantidad de vacuolas y un borde de microvellosidades más prominente, con mayor número de núcleos por célula que los correspondientes a los grupos control (Dominik, 1988).

1.4 ASOCIACION BACTERIANA EN LA PATOGENIA DE LA RINITIS ATROFICA.

Existen muchas investigaciones dirigidas a la definición precisa del o de los agentes microbiológicos responsables de la RA Mientras algunos factores pueden influir en la severidad y expresión clínica de la enfermedad, se ha establecido que la condición primaria es de carácter infeccioso, más que un desorden nutricional (Brown y cols., 1966).

Aunque algunos trabajos asocian la RA con agentes infecciosos tales como: tricomonas (Switzer, 19831), virus (Switzer y Cuyer, 1960; Edington y cols., 1976) y Micoplasma (Switzer, 1955; Gols y cols., 1977); solo dos bacterias han sido consideradas realmente de importancia P. multocida y B. bronchiseptica, con las que se ha podido desarrollar la atrofia experimental de los cornetes nasales de cerdo y ratón, cuando han sido inoculados cultivos puros por vía intranasal (Sawata y Kume, 1982; Semjen y Magyar, 1985; Montaraz, 1986 y Switzer, 1988), atribuyendo la expresión de la enfermedad principalmente a las toxinas de P. multocida y B. bronchiseptica, reportadas como responsables del cuadro rinitico, (Roop y cols., 1987). Un grupo de investigadores ha demostrado que los cerdos inoculados desarrollan frecuentemente en los primeros días de vida, atrofia leve de los cornetes y que en cerdos de más edad se desarrollan lesiones más severas (Leman y cols., 1981). En cerdos lactantes la presencia de la RA puede resultar de una infección mixta de cepas toxigénicas de P. multocida y B. bronchiseptica (Whittlestone, 1981). Se ha discutido mucho el que B. bronchiseptica sea el agente etiológico primario en la atrofia de los cornetes de los cerdos en el campo (Switzer y Farrington, 1972). Considerando que la invasión por B. bronchiseptica

(Martineau, 1982; Rummels, 1982), es muy importante para el desarrollo e intensificación de la Rinitis Atrófica, (Gois; 1983; Harris y Switzer, 1968; Nielsen, 1976; 1984)). Confirmándose esto con la producción de Dermonecrotoxinas por parte de P. multocida tipo "D" y B. bronchiseptica la producción de dermonecrotóxicas capaces de producir lesiones severas en los cornetes nasales (De Jong, 1980; Schos y Thiel, 1984; Nakai y cols., 1985). Las cepas de P. multocida tipo "D" que producen la dermonecrotoxina, colonizan la nariz de cerdos inoculados con B. bronchiseptica por tiempos prolongados (Rutter, 1983). La inoculación intranasal de la toxina P. multocida en cerdos gnotobióticos, ha provocado la atrofia marcada de los cornetes (Martineau, 1982).

Duncan y cols.(1965 y 1966), utilizando la tinción de anticuerpos fluorescentes, encontraron en cerdos B. bronchiseptica sobre el epitelio de los cornetes nasales y en la Tráquea. El organismo no parece invadir el tejido subyacente. Además de poseer la habilidad para modificar los cilios de la mucosa nasal. Una evaluación de los osteoblastos y osteocitos del hueso de cerdos infectados con B. bronchiseptica, mostró distensión del retículo endoplásmico, de las mitocondrias y lisis celular (Fetter y cols., 1975).

Otros estudios muestran que P. multocida toxigénica es el agente primario en el desarrollo de la Rinitis Atrófica progresiva, que presenta lesiones moderadas a severas, es permanente y afecta la producción porcícola. Estas lesiones también se presentan cuando ambas bacterias han sido inoculadas intranasalmente a cerdos jóvenes. Al respecto cuando fueron inoculados los cerdos con cultivos puros de P. multocida tipo "D" la bacteria se adhirió al epitelio nasal, debido a la infección previa de B. bronchiseptica, las lesiones fueron muy severas en los cornetes con desviación del morro (Maniats y Johnson, 1980; Rutter y Rojas, 1982; Pedersen y Barfod, 1981 y Rutter, 1983).

Los autores que han trabajado la hipótesis sobre la atrofia progresiva, sugieren que el daño de la mucosa nasal en cerdos jóvenes es provocado por B. bronchiseptica, en adición a los irritantes que se encuentran en el medio ambiente e infecciones con otros microorganismos.

1.5 MECANISMO DE DISTRIBUCION Y DEPOSITO DE AEROSOLES BACTERIANOS.

Muchas de las infecciones respiratorias se producen por microorganismos que son inhalados, a su vez la diseminación de estas infecciones depende de la producción de partículas conteniendo microorganismos (Mims, 1976).

La velocidad del aire en el tracto respiratorio superior es suficientemente elevada para formar aerosoles que pueden ser inspirados o expirados durante la respiración normal, el lugar de la deposición depende de las propiedades físicas de la partícula, así como de la profundidad y frecuencia de la respiración, era observado, con respecto al tamaño, que las partículas mayores de 10 μm de diámetro son retenidas en el aparato respiratorio superior, debido a los cambios bruscos de dirección turbulencia del flujo de aire en los cornetes, laringe y bifurcación bronquial, las partículas entre 10 y 2 μm se depositan en bronquios y bronquiolos, las partículas comprendidas entre 2 y 0.5 μm pueden alcanzar el alvéolo y las partículas menores de 0.5 μm tienden a ser retenidas en lugares próximos a bronquios terminales o bien salir espiradas (Hatch, 1961).

Con respecto a la mecánica respiratoria, la velocidad del aire va disminuyendo paulatinamente a lo largo de las vías aéreas, hasta ser prácticamente nula a nivel del alveolo; sólo un 10 % del volumen residual del pulmón, se considera que la zona de reemplazo envuelve minimamente a la zona alveolar (Dunnill, 1979), aunque esto depende de la profundidad y frecuencia respiratoria, así como de la especie animal, peso corporal, factores ambientales ., (Fhillis, 1976).

Los mecanismos propuestos para explicar el depósito de partículas en el aparato respiratorio son: impacto inercial, sedimentación y movimiento browniano,

el impacto ocurre primariamente en la nariz y vias respiratorias superiores, por este mecanismo se depositan el mayor número de partículas, cuando la corriente de aire en que está suspendida es bruscamente desviada, como ocurre en cornetes nasales y bifurcaciones de bronquios.

La posibilidad de diseminación de una infección bacteriana aerógena, se relaciona con la viabilidad de la bacteria en el aerosol, y se ha observado que disminuye rápidamente con el tiempo. La disminución de la viabilidad depende de la fase de crecimiento en que se encuentra la bacteria, las características del aire en que está suspendida, temperatura, humedad relativa y en la especie bacteriana de la que se trate (Goodlow, 1961).

Los aerosoles de bacterias han sido ampliamente utilizados en experimentos de deposición de bacterias en el tracto respiratorio, estudios de remoción bacteriana y de transmisión de enfermedades por vía aerógena, inducción experimental de neumonía, estudios de la reacción inflamatoria y respuesta inmune. (Lillie y Thomson, 1972; López y cols., 1976; Pierce y cols., 1977; Jericho y Langford, 1978; Puyols y Badiola, Mendoza, Caballero, 1978).

La determinación de la remoción bacteriana del pulmón es un método "in vivo" que se utiliza para medir la velocidad a la cual, las bacterias inhaladas, desaparecen del tracto respiratorio.

Por este método se puede evaluar la capacidad del pulmón para inactivar las bacterias en el depositadas, puede calcularse el número e microorganismos depositados, y los índices de remoción-retención de bacterias a distintos tiempos posexposición. Como desventaja cabe apuntar que este método por si solo no puede diferenciar que mecanismo de defensa pulmonar esta actuando, o se encuentra afectado ya sea el aparato mucociliar o el sistema de fagocitos y además en que proporción. (López y cols., 1876).

Los factores que se supone determinan la remoción pulmonar de bacterias, y con ello el establecimiento de la infección o por el contrario la eliminación bacteriana son: concentración y volumen del inóculo, virulencia de la bacteria, el estado de los mecanismos de defensa pulmonar, en particular, y del huésped en general (Green, 1968).

Laurenzi y cols,(1964), utilizando un aerosol de Staphilococcus aureus, determinaron el porcentaje de bacterias eliminadas por el pulmón a distintos intervalos de tiempo y encontraron que la eliminación de esta bacteria fue rápida y constante, se observó además que la concentración del aerosol no influyó significativamente, en el porcentaje de bacterias eliminadas y se concluyó que el pulmón de ratones, en condiciones normales elimina rápidamente los Staph. aureus inhalados sin sufrir daño alguno.

Goldstein y Green en 1967, trabajando con aerosoles de Pasteurella pneumotropica, observaron que los ratones eliminaron el 45 % en 2 horas, el 65 % en 4 horas, el 80 % en 6 horas y el 99 % a las 34 horas. La eliminación de esta bacteria resulta más lenta que la de Staph. aureus y las variaciones del índice de remoción, de animal a animal es más amplia.

Lillie y Thomson (1972) realizaron estudios comparativos de los índices de remoción para Pasteurella haemolytica y Staph. aureus inhalados por aerosol. P. haemolytica se eliminó en un 65 % a las 2 horas, el 67 % a las 4 horas y el 93 % a las 8 horas. Para S. aureus encontraron que el 57 % se removió a las 2 horas, el 79 % a las 4 horas y el 93 % a las 8 horas.

II. JUSTIFICACION DEL PROYECTO

La Rinitis Atrófica de cerdos, es una enfermedad que año con año causa severas pérdidas económicas a la industria porcícola en muchos países del mundo, y aún cuando ha sido objeto de muchas y profundas investigaciones al respecto, hoy en día la etiología de la enfermedad continúa siendo motivo de gran controversia.

A pesar de que los estudios alrededor de la R.A son numerosos, aun existen muchos resultados contradictorios en cuanto a la reproducción experimental de la enfermedad clínica.

Durante muchos años Bordetella bronchiseptica fue considerado como el agente etiológico primario de la Rinitis Atrófica, pero recientemente la importancia de Pasteurella multocida se ha incrementado, esto debido a la producción de una toxina responsable de inducir severos síntomas clínicos, teniendo un papel muy importante en el inicio y severidad de las lesiones.

Algunas investigaciones mencionan que la Rinitis Atrófica se presenta de dos formas: Una causada por Bordetella bronchiseptica, que produce lesiones de tipo transitorio y regresivo, de poco impacto económico, y otra originada por Pasteurella multocida, cuyas lesiones son más severas, progresivas e irreversibles; debido a esto se ha planteado la hipótesis de que el cuadro final es el producto de la asociación de ambas bacterias, ya que al administrar cultivos virulentos de Bordetella bronchiseptica o su toxina, seguido por la inoculación de Pasteurella multocida se han reproducido los signos y síntomas que corresponden al curso natural de la enfermedad.

Se ha debatido que la participación de Bordetella bronchiseptica no sólo se delimita a la producción de la toxina, sino también a su gran afinidad por la

membrana mucosa del tracto respiratorio, iniciándose así el proceso de enfermedad mientras que para Pasteurella multocida se ha reportado la presencia de fimbrias que contribuyen de manera significativa a la adhesión al epitelio nasal.

Con respecto a la edad del animal y su relación con la enfermedad, se sabe que Bordetella bronchiseptica es el microorganismo más frecuentemente aislado en animales jóvenes, esto se relaciona con el hecho de que la infección con este microorganismo se da casi al nacimiento, en los primeros meses de vida, mientras que Pasteurella multocida se aísla principalmente de cerdos adultos, siendo en muy raras ocasiones ambas bacterias aisladas juntas.

La vacunación con bacterinas de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida han reducido en parte las pérdidas económicas, así como los signos clínicos y la atrofia de cornetes, sin lograr hasta el momento ser eliminados por completo en animales vacunados. El hecho es que la relación precisa entre ambas bacterias así como sus factores de virulencia continúan discutiéndose.

Habiéndose demostrado ya que la Rinitis Atrófica puede inducirse en el laboratorio el propósito del presente trabajo es básicamente estudiar el efecto de la toxina de Bordetella bronchiseptica que favorezca una infección por Pasteurella multocida, utilizando el modo natural de infección así como también el empleo para tal objetivo, de un modelo de remoción en ratones de 21 días.

La utilización de animales SPF lechones gnotobióticos usados comunmente para este propósito resultan caros y poco prácticos para un laboratorio de investigación convencional, lo que ocasiona que el número de animales usados por grupo de estudio sea bajo, originando con esto, la necesidad de emplear animales

fácilmente manipulables, en los cuales las lesiones producidas sean equivalentes a los signos producidos en cerdos, con la ventaja adicional de mejorar lo subjetivo de los métodos para medir las lesiones. En algunos estudios anteriores se han utilizado ratones lactantes, pero su manipulación es difícil y el número de animales que sobreviven a la infección es bajo por lo que en este modelo propuesto se pretende medir la capacidad del animal para manejar una carga microbiana conocida mediante una curva de remoción y la verificación del daño causado mediante un estudio histológico. Otra ventaja adicional en el uso de ratones es el amplio conocimiento que se tiene de su sistema inmune en comparación con el del cerdo.

De ser demostrada la funcionalidad y reproducción de los signos de la enfermedad este modelo, constituiría una buena opción para ser utilizado en la evaluación de futuros toxoides bacterianos de una manera más rápida y práctica encaminada a la prevención de esta enfermedad.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1.- Desarrollar un modelo experimental de remoción bacteriana en ratones de 21 días para el estudio de la interacción de la toxina de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida tipo "D".

OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar el patrón de remoción de Pasteurella multocida en pulmón y cornetes de ratón utilizando un modelo de infección por aerosoles.

2.- Estudiar el efecto de la toxina de Bordetella bronchiseptica, en el desarrollo de la infección pulmonar por Pasteurella multocida en ratones de 21 días.

3.- Verificar el efecto inicial de la toxina de Bordetella bronchiseptica, en cornetes nasales de ratón mediante un estudio histológico y relacionarlo con un estudio bacteriológico paralelo.

IV. HIPOTESIS

1. La remoción bacteriana en el grupo control debe ser muy rápida durante las primeras horas posinoculación dado que Pasteurella multocida presenta una pobre adherencia al epitelio nasal.

2.- En pulmones el aparato mucociliar es capaz de eliminar fácilmente el inóculo de P. multocida, ya que la cepa empleada para la infección es susceptible a los macrófagos alveolares.

3.- La remoción del grupo III experimental se espera más lenta que en el grupo control, ya que la toxina actúa en los cornetes nasales como un factor acondicionante de la adhesión.

4.- Se espera que las lesiones producidas en el grupo III experimental sean más severas que las producidas por cada uno de los factores por separado.

V. MATERIAL Y METODOS

5.1 Cepas de Bordetella bronchiseptica y de Pasteurella multocida

Ambas cepas bacterianas se obtuvieron del cepario del laboratorio de microbiología de la unidad de postgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, para su purificación se sembraron en agar Mc. Conkey al 1% de glucosa y en agar gelosa sangre (5% sangre de bovino v/v) incubándose posteriormente en aerobiosis a 37° durante 18 horas, y observando el aspecto de las diferentes colonias recuperadas, se seleccionaron aquellas cuya morfología colonial presentó las siguientes características: Colonias aperladas pequeñas, de bordes regulares y mucoides. Estas se aislaron en placas de agar Mc. Conkey y agar sangre para ser identificadas posteriormente.

En relación a lo publicado por diversos autores (Cowan y Steell, 1974) se determinó que las pruebas mínimas para la identificación de las especies de Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica incluyeran tinción de gram, oxidasa, catalasa, oxidación, fermentación, motilidad, crecimiento en agar Mc. Conkey, hemolisis en agar sangre al 3%, indolureasa, producción de H₂S, producción de ácido a partir de glucosa, sacarosa, manitol, rafinosa, trehalosa y arabinosa.

Estas pruebas se utilizaron para confirmar la identidad de las cepas de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida empleadas en los experimentos.

5.1.2 Producción de exotoxina dermonecrotóxica (DNT)

La producción de Toxina dermonecrotóxica de Bordetella bronchiseptica se llevó a cabo mediante la técnica de De Jong y cols. (1980). Se inóculo la bacteria en medio fluido de BHI (infusión cerebro corazón), durante 18 horas a 37°C, el líquido sobrenadante se centrifugó a 3000 rpm, durante 45 minutos y posteriormente se filtró por membrana de 0.22 μ m, la producción de toxina de la cepa de Bordetella bronchiseptica se corroboró mediante las pruebas de: dermonecrototoxicidad en piel de cuye, muerte de ratón lactante y atrofia de bazo de ratón, una vez comprobado el efecto tóxico en el sobrenadante, este se utilizó para la inoculación de los grupos correspondientes.

5.2 Inoculación por aerosolización

Para la infección por aerosolización de los ratones se empleó una cámara rectangular de metal, herméticamente sellada, cuyas dimensiones estén especificadas en la figura No. 1, la cámara esta constituida por una tapa de cristal con sello de neopreno, un nebulizador (Devilbis mod. 645) conectado a una perforación lateral por medio de tuberías de latex para entrada y salida del aerosol, rejillas para prevenir accidentes con los ratones y baffles deflectores parabólicos en las esquinas para evitar la acumulación del aerosol en estos lugares, a la salida va conectado un matraz Kitasato con Formaldehído al 10 % para la inactivación de las bacterias. El flujo del aire y la producción del aerosol se generó con una bomba compresora (modelo B-131 Industria G. Murgia S.A.)

ajustada a 14.3 Psi 3 kg/cm empleando una bomba de vacío de 3 kg de para liberar la presión generada en la cámara y propiciar la extracción de las bacterias.

La estandarización y evaluación del sistema se llevó a cabo en 1981 por Mendoza y cols. utilizando una suspensión bacteriana (1×10^{10} UFC) y placas con medio fluido BHI estéril en distintas posiciones encontrando que la distribución del aerosol es la misma en toda la cámara.

La suspensión bacteriana utilizada en la aerosolización se preparó como sigue: Con una asa metálica se tomaron 5 colonias aisladas de la cepa 4 de Pasteurella multocida previamente desarrollada en agar gelosa sangre, con las que se inoculó un matraz nefelométrico que contenía 50 ml de caldo BHI, este se cultivó con agitación constante a 37 °C y 120 rpm, hasta la fase estacionaria, determinada por nefelometría a 660 nm, en un espectrofotómetro. El contenido del matraz se centrifugó durante 45 minutos a 3500 x g. El paquete bacteriano se lavó 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 y en el que se resuspendieron las bacterias hasta obtener una concentración final de 5×10^6 unidades formadoras de colonias(UFC/ml).

De la suspensión bacteriana ajustada se tomaron 5 ml con los que se aerosolizaron los ratones.

5.3 Animales

Se utilizaron ratones machos de 14 a 19 g. de peso de 21 días de edad cepa NIH-3 obtenidos del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, y se inocularon en grupos de 20 ratones cada uno, para los diferentes

grupos experimentales. Después de 10 minutos de nebulización los animales se sacaron de la cámara y se pusieron en sus respectivas jaulas

El grupo control negativo se aerosolizó solamente con medio fluido estéril (BHI) bajo las mismas constantes de tiempo (10 minutos) y Volumen del inóculo (5 ml).

5.4 Remoción bacteriana

Los ratones se sacrificaron por desnucamiento, a los siguientes tiempos: 30 minutos el día 0, y a los 2,4,8 y 16 días postdesafío, respectivamente. Para el estudio de remoción en cornete a los animales les fueron extirpados los cornetes nasales y sosteniéndolos con pinzas estériles, se lavaron, introduciendo con una jeringa 1 ml de PBS estéril por las fosas nasales.

Para el estudio de remoción pulmonar, dos de los animales de cada grupo se inocularon y sacrificaron a los tiempos y forma ya descritos para la remoción en cornete, una vez sacrificado, el cuerpo del ratón se desinfectó con alcohol etílico al 70 % en una mesa de disección colocada dentro de una cámara de flujo laminar, posteriormente se hizo un corte en la cavidad abdominal y por sección de la arteria renal izquierda se desangró al animal. Posteriormente se abrió la cavidad torácica y de ella se extrajo el paquete cardíaco-pulmonar, cuidando de no seccionar el esófago. De este paquete se extrajeron los pulmones y se colocaron en un mortero teen-broeck estéril que contenía 5 ml de solución PBS estéril. Los pulmones se homogeneizaron con 15 golpes de mortero.

5.5 Recuperación bacteriana

Tanto de los lavados nasales como de los homogenizados pulmonares se realizaron diluciones en base 10 con solución PBS hasta 10^{-10} , de cada dilución se sembraron por separado 3 gotas de 10 microlitros/gota en placas de agar BHI y agar Mc Conckey que posteriormente fueron incubadas durante 18 horas a 37°C, después de lo cual se realizó el conteo del número de unidades formadoras de colonia por gota, utilizando el factor de dilución se calculó el número de unidades formadoras de colonia/órgano. Verificando previamente la identidad de las colonias recuperadas mediante la morfología colonial y las características bioquímicas ya mencionadas anteriormente.

5.6 Estudio Histopatológico

Para efectuar el estudio histopatológico, dos de los ratones de cada grupo se sacrificaron a los mismos tiempos que los utilizados para el estudio bacteriológico (0,2,4,8 y 16 días). Una vez cortados, los cornetes nasales se fijaron y conservaron en formaldehído al 10 % en solución PBS, durante 2 semanas, para descalcificarlos se lavaron de 4 a 6 veces con agua corriente, y posteriormente con solución de Lorch (Acido cítrico, NaOH 0.2 N, HCL 0.2 N, ZnSO₂ al 1 % y CHCl₃ 0.1 %), la cual fue sustituida cada 3^{er} día durante tres semanas, los cornetes descalcificados se incluyeron en parafina y se procedió a realizar cortes de 6 micras que se tiñeron con hematoxilina-Eosina.

Es importante señalar que los cortes se hicieron barajados y la evaluación del daño se realizó a ciegas, esto es, que el histopatólogo no sabía a que grupo correspondía cada muestra.

Para catalogar el grado de atrófia, hemorragia y edemás se estableció un sistema de puntuación por cruces.

En la fig. No. 2 se muestra el diagrama de flujo de la fase experimental.

5.6.1 Análisis de datos

Se empleó la técnica de análisis de varianza (ANDEVA) para comparar el número de UFC/órgano/día utilizando un diseño factorial, considerando las siguientes variables:

- A) DIA POSTINOCULACION** (0,2,4,8, y 16)
- B) ORGANO** (CORNETE Y/O PULMON)
- C) GRUPO EXPERIMENTAL** (GRUPO DE INFECCION AL CUAL PERTENECE)

Las comparaciones de medias se realizaron por contrastes lineales, se tuvieron 2 repeticiones por cada tratamiento.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se formarán los siguientes grupos experimentales, con el tratamiento indicado:

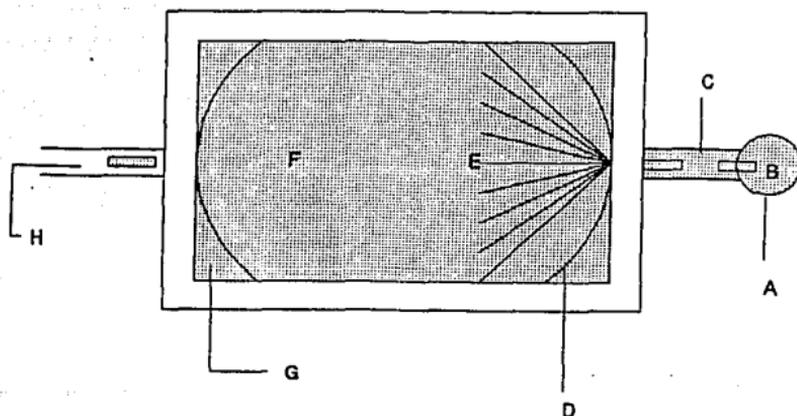
GRUPO I: *Pasteurella multocida* LAVADA
Y AEROSOLIZADA.

GRUPO II: TOXINA DE *B. bronchiseptica*
INOCULADA POR VIA INTRANASAL.

GRUPO III: TOXINA DE *B. bronchiseptica*
INOCULADA INTRANASALMENTE Y
P. multocida LAVADA Y AEROSOLIZADA

GRUPO IV: MEDIO FLUIDO BHI 0.1 ml INOCULADO
POR VIA INTRANASAL.

CAMARA DE AEROSOLIZACION



- A Entrada de aire a presión 3 Kg/cm
- B Nebulizador
- C Aerosol Bacteriano
- D Parabolas Deflectoras
- E Bacterias Suspendidas
- F Zona para los ratones
- G Zonas muertas
- H Extraccion Residual de Bacterias

FIG. No. 1

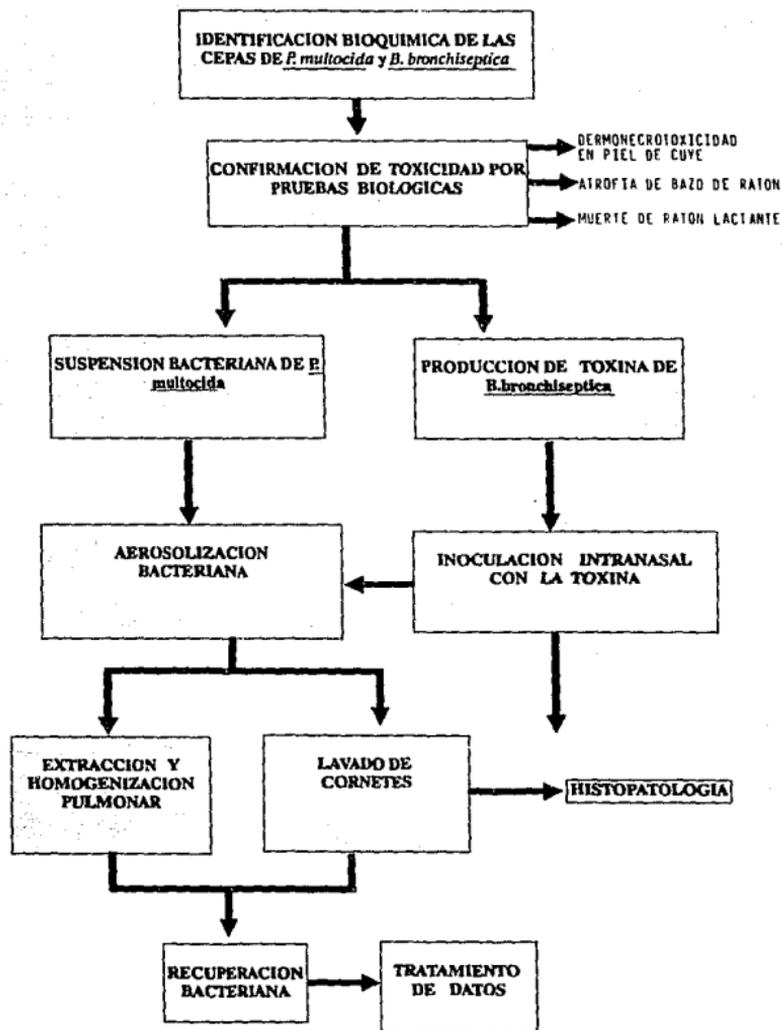


FIGURA No. 2 DIAGRAMA DE LA FASE EXPERIMENTAL

VI. RESULTADOS

6.1 Identificación Bacteriana

Se comprobó la identidad de las cepas de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida utilizadas en el desarrollo de la fase experimental, la primera para la producción de la toxina y la segunda para la inoculación bacteriana por aerosoles, se empleó como criterio de selección las características bioquímicas y morfológicas ya descritas anteriormente, resultando todas ellas positivas para las dos bacterias.

Dado que de ambas especies la principal característica de interés es la producción de la Toxina dermonecrotóxica, la detección y verificación de la actividad biológica de la misma para ambas cepas se comprobó mediante las pruebas de endurecimiento y necrosis en piel de cuye, atrofia de bazo y muerte en ratón lactante, efectuadas a los sobrenadantes de un cultivo en medio fluido BHI de cada una de las bacterias resultando ambas cepas positivas a las tres pruebas efectuadas (Cuadro No.1).

6.2 Aerosolización

Con el fin de establecer la cinética de remoción de Pasteurella multocida, y verificar el efecto de la toxina en su comportamiento se inocularon dos grupos de animales, uno tratado previamente con la Toxina de Bordetella bronchiseptica y otro únicamente con P. multocida.

El 100 % de los animales de los grupos estudiados sobrevivieron al desafío bacteriano. Los ratones del grupo control negativo inoculados solamente con medio fluido BHI no mostraron ninguna alteración macroscópica de las fosas

nasales. Sin embargo un 80 % del total de los grupos II y III a los cuales se les administro 0.05 ml de la toxina de B. bronchiseptica en cada fosa nasal, presentaron una marcada inflamación y enrojecimiento de las fosas nasales, aproximadamente las 48 horas de iniciada la administración de la toxina.

Recuperación bacteriana

Una vez infectados los animales se efectuó la recuperación bacteriana, tanto de los lavados de los cornetes, como de los homogenizados pulmonares, la identificación de las colonias recuperadas se corroboró mediante las características bioquímicas y de morfología colonial, correspondiendo estas plenamente a las ya citadas anteriormente para P. multocida.

6.4 Efecto de la toxina de Bordetella bronchiseptica en la remoción de Pasteurella multocida en cornete y pulmón.

La transformación logarítmica de los resultados obtenidos se presentan en el cuadro No.2. Se evaluó el efecto del tratamiento con la toxina de Bordetella bronchiseptica sobre el número de bacterias recuperadas a diferentes tiempos posinoculación de cornete y pulmón. Para ello se realizó un diseño factorial en el cual los factores estudiados fueron : Tratamiento con o sin la Toxina, Tiempo posinoculación, (0, 2, 4, 8, y 16 días) y órgano (pulmón y cornete) .

En el cuadro No 3 se muestran los resultados generales de las cuentas bacterianas para el análisis de varianza del diseño experimental utilizado, el cual no detectó un efecto significativo del tratamiento con toxina en ninguno de los días posinoculación estudiados, para ninguno de los dos órganos. El número de

bacterias se mantuvo constante durante el periodo de observación, es decir no se obtuvo diferencia significativa en los números de unidades formadoras de colonia recuperadas a los distintos tiempos a los cuales se evaluó (Gráficas 1 y 2).

Se encontró que el número de bacterias recuperadas del cornete fue significativamente menor ($p < 0.01$) que aquellas recuperadas de pulmón , en promedio la diferencia fue de $\log 1.0740 \text{ UFC } \pm \log 0.016$. Esto se observó independientemente tiempo posinfección y del tratamiento con la toxina de Bordetella bronchiseptica

6.5 Resultados del Estudio Histológico

Para evidenciar el efecto de la toxina en la remoción bacteriana de Pasteurella multocida se efectuó un estudio histopatológico a cortes de cornetes de los grupos obtenidos a los mismos tiempos posinoculación . Los resultados generales de este estudio histopatológico se muestran en el cuadro NO. 4 Los parámetros que se evaluaron fueron los siguientes: inflamación de periostio, congestión hemorrágica, remoción de periostio, presencia de periostioblastos, calcificación de tabique, y finalmente, atrofia de hueso, los cortes efectuados al grupo control negativo inoculado solamente con medio fluido BHI presentaron un tabique cartilagoso normal, integridad en los cilios y no se observó ningún cambio morfológico indicativo de la enfermedad (Fig 3) el grupo I correspondiente al grupo control inoculado solamente con P.multocida, presentó adelgazamiento de hueso (Fig.4A), sin afección del tabique nasal cartilagoso, se detectó remoción del periostio del cuarto día en adelante, y congestión hemorrágica durante todo el curso de la infección, además de marginación leucocitaria e irregularidad ciliar (Fig 5A) con emoción del tejido periostial al final de la infección (Fig.5B Y 6). No se observó inflamación del periostio y la presencia de osteoblastos fue escasa. Finalizando

con la calcificación de tabique, atrofia de hueso y evidenciándose claramente la necrosis el día dieciséis posterior a la inoculación (Fig.5)

En el grupo control II inoculado con la Toxina de B.bronchiseptica, por vía intranasal se presentaron marcados signos característicos de inflamación, congestión e infiltración linfocitaria (Figs. 7 y 8) desde el día 2 posterior a la infección, la remoción de periostio y congestión hemorrágica (Fig 10), se presentan prácticamente desde el inicio de la infección, no así la atrofia de hueso y la calcificación de tabique que prácticamente desaparecen al final de la misma, la necrosis se presenta entre el día cuatro y el día ocho (Fig 9) donde se observa adelgazamiento del cornete con remoción ósea y congestión hemorrágica (Fig. 10), por lo demás las lesiones apreciadas son semejantes a las que presenta P.multocida, el signo más característico lo constituye la inflamación del periostio durante los primeros días y presencia de osteoclastos (Fig 10B), los osteoblastos solo se observaron a la mitad del proceso.

Todos los signos anteriormente descritos se vieron incrementados en el grupo experimental, inoculado con la toxina de B. bronchiseptica y aerosolizado con P. multocida diferenciándose solo en la severidad de las lesiones producidas en los cornetes, ausencia de osteoblastos y presencia de osteoclastos (Fig 11) mientras que los demás signos, como remoción ósea periostial y deformación del hueso se ven también claramente manifestados con mayor intensidad que en cualquiera de los grupos control inoculados solamente con uno de los dos factores involucrados. Los signos predominantes lo constituyen una marcada degeneración del epitelio nasal y del hueso, pérdida de integridad ciliar y congestión vascular de la mucosa (Fig.12), acompañado de infiltración leucocitaria abundante (Fig.13), así como de células inflamatorias y una marcada reducción y deformación en el volumen y

tamaño del hueso, característicos de Rinitis Atrófica, (Fig. 14) que se presenta desde los primeros ocho días.

Todo lo anterior muestra que si bien es cierto el tipo de lesiones es muy semejante en los tres grupos, estos varían en cuanto a la severidad de las mismas.

PRUEBA	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
NECROSIS EN PIEL DE CUYE	POSITIVA	POSITIVA
MUERTE DE RATON LACTANTE	POSITIVA	POSITIVA
ATROFIA DE BAZO DE RATON	POSITIVA	POSITIVA

CUADRO NO 1.
RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOLOGICAS REALIZADAS A LAS CEPAS AISLADAS DE
***P. multocida* y *B. bronchiseptica* PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE TOXINA**
DERMONECROTOXICA EN SOBRENADANTES DE CULTIVOS INDEPENDIENTES DE 24
HORAS EN MEDIO FLUIDO BHI.

DIAS POSTINOCULACION	CORNETE		PULMON	
	CON TOXINA	SIN TOXINA	CON TOXINA	SIN TOXINA
0	4.17686	4.2379	5.001	4.8022
2	4.1855	3.3367	4.72808	4.1333
4	4.44885	4.63111	4.87686	5.32295
8	4.57985	5.14595	4.5963	5.40344
16	4.16479	3.74433	4.57245	5.40935

CUADRO No. 2

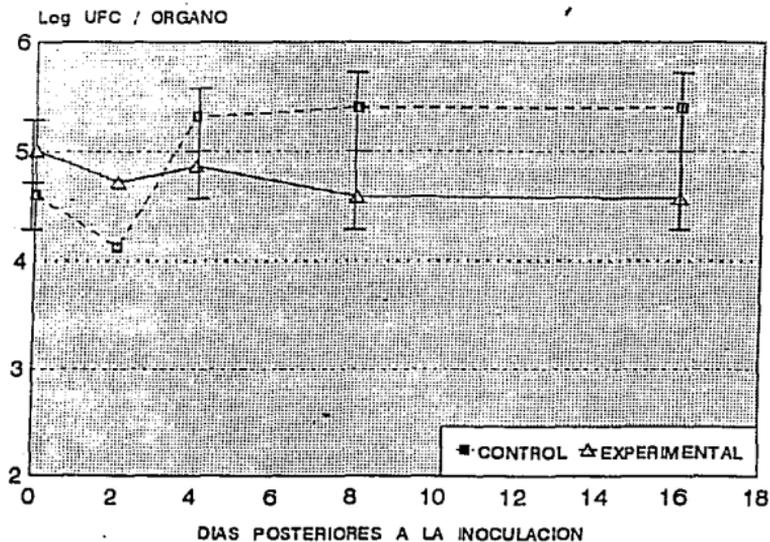
PROMEDIO DE LAS UFC OBTENIDAS DE RATONES AEROSOLIZADOS CON P. multocida. LA CUENTA BACTERIANA SE REALIZO EN RATONES PREVIAMENTE TRATADOS CON TOXINA DE Bordetella bronchiseptica.

ORGANO	DIAS 0	DIA 2	DIA 4	DIA 8	DIA 16
CORNETE	4.50437	4.02288	4.0964	4.9303	3.606
	3.97145	2.0505	4.2657	5.3615	3.8834
	4.27018	5.5379	5.315	4.514	3.8207
	4.08317	4.6991	3.5827	4.6556	5.5088
PULMON	5.0962	4.6665	5.3866	5.2667	5.006
	4.1081	3.5997	4.3871	5.5401	5.8126
	5.11	5.1195	6.367	4.542	3.985
	4.9119	4.2609	4.2781	4.6505	5.1998

CUADRO No. 3

LOS RESULTADOS GENERALES QUE MUESTRAN LA TRANSFORMACION LOGARITMICA DE LAS UFC RECUPERADAS DE CORNETE Y PULMON UTILIZADOS EN EL ANALISIS DE VARIANZA.

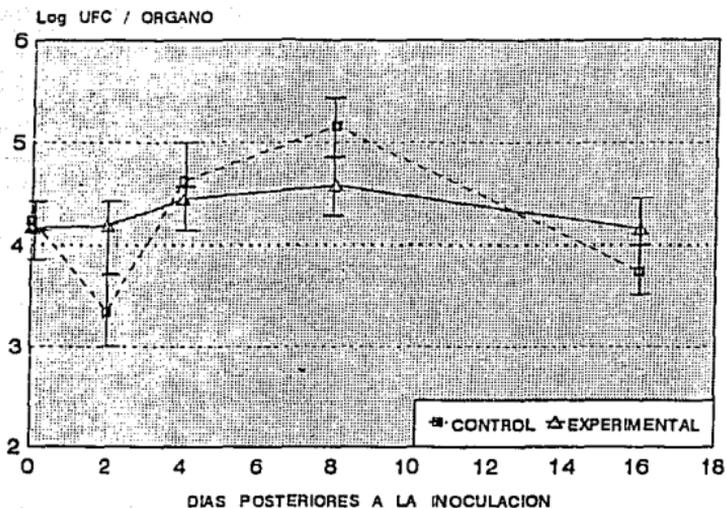
REMOCION COMPARATIVA EN CORNETE



GRAFICA No. 1

CINETICAS DE REMOCION BACTERIANA EN CORNETE DE RATONES AEROSOLIZADOS CON Pasteurella multocida A DIFERENTES DIAS POSTERIORES A LA INOCULACION.

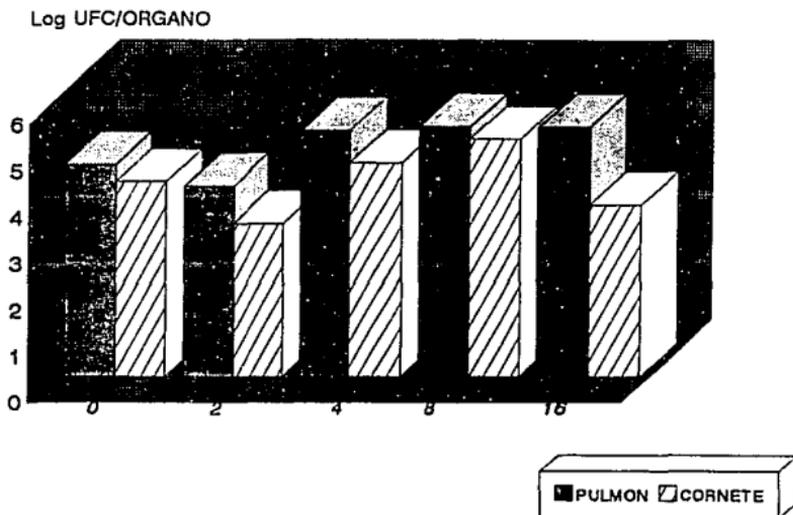
REMOCION COMPARATIVA EN PULMON.



GRAFICA No. 2

CINETICAS COMPARATIVAS DE REMOCION DE LOS GRUPOS CONTROL Y EXPERIMENTAL OBTENIDAS DE LA RECUPERACION BACTERIANA DE LOS HOMOGENIZADOS PULMONARES DE RATONES AEROSOLIZADOS CON Pasteurella multocida, A DIFERENTES DIAS POSTINOCULACION.

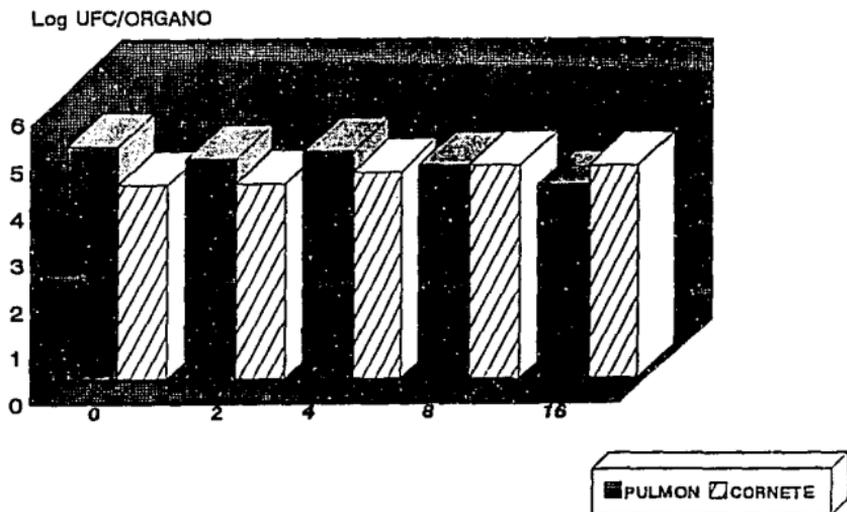
REMOCION COMPARATIVA EN ORGANOS GRUPO EXPERIMENTAL



GRAFICA No. 3

LA GRAFICA MUESTRA LAS CUENTAS BACTERIANAS OBTENIDAS EN CORNETE Y PULMON PARA EL GRUPO CONTROL, AEROSOLIZADO *P. multocida*.

REMOCION COMPARATIVA EN ORGANOS GRUPO CONTROL



GRAFICA No. 4

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA RECUPERADAS DE CORNETE Y PULMON EN EL GRUPO EXPERIMENTAL AEROSOLIZADO CON P. maltocida E INOCULADO PREVIAMENTE CON B. bronchiseptica A DIFERENTES DIAS POSTERIORES A LA INOCULACION.



FIG. No. 3

TABIQUE CARTILAGOSO NORMAL PERTENECIENTE AL GRUPO CONTROL INOCULADO SOLAMENTE CON MEDIO FLUIDO BHI ESTERIL. SE MUESTRA INTEGRIDAD EN LOS CILIOS Y NINGUN CAMBIO MORFOLOGICO INDICATIVO DE LA ENFERMEDAD. (E&H)



FIG. No. 4

CORTE QUE MUESTRA ADELGAZAMIENTO DEL HUESO (A), LA MUESTRA CORRESPONDE A LOS CUATRO DIAS POSTERIORES A LA INOCULACION GRUPO No. I, EL TABIQUE NASAL CARTILAGOSO NO SE PRESENTA AFECTADO.



FIG. 5

GRUPO I. PRESENTA MARGINACION LEUCOCITARIA CON HEMORRAGIA (A), IRREGULARIDAD CILIAR (B) Y ADELGAZAMIENTO OSEO CON HEMOCION DEL TEJIDO PERIOSTIAL AL FINAL DE LA INFECCION. (E&H).



FIG. 6

GRUPO No. I OCTAVO DIA POSTINOCULACION, SE OBSERVA ADELGAZAMIENTO DEL CORNETE CON REMOCION OSEA Y CONGESTION HEMORRAGICA.



FIG. 7

GRUPO No. II CUARTO DIA POSTERIOR A LA INOCULACION, MARCADA CONGESTION HEMORRAGICA Y SIGNOS CARACTERISTICOS DE INFLAMACION. (E&H)



FIG. No. 8

GRUPO II EXPERIMENTAL. SIGNOS CARACTERISTICOS DE INFLAMACION, CONGESTION E INFILTRACION LENFOCITARIA EN EPITELIO RESPIRATORIO. (E&H).



FIG. No. 9
GRUPO No. II, CUARTO DIA POSTINOCULACION, SE PRESENTA ADELGAZAMIENTO DE
CORNETE CON REMOCION OSEA Y CONGESTION HEMORRAGICA.



FIG. No. 10
MARCADA CONGESTION HEMORRAGICA CARACTERISTICA DEL EFECTO DE LA
TOXINA DURANTE TODO EL CURSO DE LA INFECCION (A), REMOCION PERIOSTIAL (B),
Y PRESENCIA DE OSTEOCLASTOS. (E&H)



FIG. No. 11
GRUPO II REMOCION PERIOSTIAL CON PRESENCIA DE OSTEOCLASTOS (E&H).



FIG. No. 12
GRUPO III EXPERIMENTAL A LOS 16 DIAS POSTERIORES A LA INOCULACION
REMOSION OSEA PERIOSTEAL, CON UNA MARCADA DEFORMACION DEL HUESO,
PERDIDA DE INTEGRIDAD CILAR Y CONGESTION VASCULAR. (TINCION H&E).



FIG. No. 13

GRUPO III MARCADA CONGESTION HEMORRAGICA E INFILTRACION CELULAR CON REMOCION PERIOSTIAL.



FIG. No. 14

GRUPO III ATROFIA Y DEGENERACION DE CORNETE A LOS 21 DIAS POSTERIORES A LA INOCULACION, DEFORMACION Y CONGESTION HEMORRAGICA.

GRUPO Y DIA	INFLAMACION DE PERIOSTO	PERIOSTO OSTEOCLASTO	CONGESTION HEMORRAGICA	REMISION DE PERIOSTO	CALCIFICACION DE TABIQUE	ATROFIA DE HUESO	OBSERVACIONES
I							
0	-	-	+	-	-	-	
2	-	+	+	-	-	±	
4	-	+	+	-	-	±	
8	++++	++++	++++	+	+	+	
18	++++	++++	++++	+	+	+	NECROSIS
II							
0	++	±	+	+	-	-	
2	+	-	+	+	+	+	
4	-	+	+	+	+	+	
8	-	-	+	+	+	+	
18	-	-	+	+	-	+	
21	++++	++++	++++	-	-	-	NECROSIS
III							
0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
2	-	-	++	+	+	+	
4	-	-	++++	++++	++++	+	
8	++++	++++	+	++++	++++	+	
18	++++	++++	-	+	+	+	NECROSIS
21	++++	++++	+	+	+	-	NECROSIS
IV							
0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
2	-	-	±	-	-	±	
4	-	-	-	-	-	-	
8	-	±	-	±	-	-	
18	-	-	-	±	-	-	
21	-	-	-	±	±	-	

NOTA: N.D. = NO DETERMINADO

CUADRO No. 4

EL CUADRO MUESTRA LOS RESULTADOS GENERALES DEL ESTUDIO HISTOPATOLOGICO REALIZADO A LOS CORNETES DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.

6.6 RESULTADOS DEL ANALISIS ESTADISTICO DE VARIANZA

VARIABLE ESTUDIADA	NIVEL	VALORES
GRUPO EXPERIMENTAL	2	1,2
ORGANO	2	1,2
DIAS	5	0,2,4,8,16

NUMERO TOTAL DE OBSERVACIONES= 40

Variable dependiente : UFC

	gl	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRATICA	VALOR F	Pr>f
MODELO	19	11.58371792	0.60966936	1.33	0.2661
ERROR	20	9.16912493	0.45845625		
ERROR	35	20.75284285			
CORRELACION TOTAL	39	20.75284285			

R-CUADRATICA	CV	MSE	UFC PROMEDIO
0.558175	14.87457	0.677094	4.55202275

VARIABLE DEPENDIENTE: UFC

FUENTE DE VARIACION	gl	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA CUADRATICA	VALOR F	P>>F
GRUPO	1	0.02467476	0.02467476	0.05	0.8189
ORGANO	1	3.98210093	3.98210093	8.69	0.0080
DLA	4	3.51954535	0.87988634	1.92	0.1465
G*O	1	0.26742159	0.26742159	0.58	0.4539
G*D	4	2.17843799	0.54460950	1.19	0.3464
O*D	4	0.85199301	0.21299835	0.46	0.7609
G*O*D	4	0.75954428	0.18988607	0.41	0.7964

Debido a que no se encontraron interacciones significativas en ninguno de los diferentes grupos experimentales y el único efecto significativo fue el del factor órgano, se tomó el promedio de las Unidades Formadoras de Colonia recuperadas por órgano de todos los grupos para la determinación de la diferencia de medias.

ORGANO	X	S
CORNETE	4.288545	0.6308242
PULMON	4.817542	0.6660944

gl= 55

$\Delta=0.01\%$

La diferencia de medias entre las UFC recuperadas en pulmón y cornete es igual a log. 1.0740, +/- 0.016

VII. DISCUSSION

En base a estudios anteriores se sabe que tanto Bordetella bronchiseptica como Pasteurella multocida, así como sus respectivas toxinas son capaces de inducir atrofia experimental en los cornetes nasales, no solo en lechones sino también en otras especies menores como conejos, cuyes, ratas y ratones; a su vez el daño producido en los mismos se encuentra determinado entre otras causas por la edad del animal y la cepa infectante (Maggy cols.). La interacción de estos dos microorganismos en la Rinitis Atrófica ha sido ampliamente estudiada tanto "in vivo" como "in vitro" (Nakai y cols. 1985; Rutter y Rojas, 1982), siendo reconocidos como los virtuales agentes etiológicos, así como los más frecuentemente aislados en otras enfermedades de tipo respiratorio en los cerdos (Pijoan, 1984).

En el desarrollo de la enfermedad natural se ha propuesto que Bordetella bronchiseptica es el agente primario en la patogénesis de la enfermedad debido a su capacidad para adherirse y multiplicarse en la cavidad nasal del cerdo donde produce una toxina dermonecrotóxica que causa una hiperplasia del epitelio, la siguiente reacción es una irritación crónica de la lámina propia con infiltración celular de neutrófilos, polimorfonucleares y linfocitos, esto favorece la instalación de Pasteurella multocida, lo que constituye en sí un paso importante ya que la persistencia en este órgano por largos periodos de tiempo puede ser preparatoria para iniciar o agravar la atrofia en las turbinas nasales, aún cuando se tienen algunos antecedentes que cuestionan este mecanismo, tales como el hecho de que ambas bacterias rara vez se aíslan juntas de cerdos con Rinitis Atrófica; o que estas bacterias han sido también aisladas de cerdos sanos sin Rinitis Atrófica; con respecto a la edad del animal Bordetella bronchiseptica se aísla principalmente de cerdos jóvenes, mientras que el porcentaje de aislamientos de Pasteurella multocida se incrementa con la edad (Iglesias y Pijoan 1987; Trigo y Pijoan 1978), encontrándose también que existen marcadas diferencias en cuanto a la

expresión de la enfermedad, ya que mientras la toxina de Bordetella bronchiseptica origina una reacción transitoria y moderada de tipo inflamatorio, que puede ser regresiva en caso de no existir una infección secundaria con Pasteurella multocida, que puede originarse ya sea por la transmisión de otros animales enfermos o por que la bacteria en si forme parte de la flora nasal del cerdo, bajo estas condiciones, se establece, persiste y se multiplica en la cavidad nasal, si se trata además de una cepa toxigénica, origina entonces un cuadro de Rinitis Atrófica mucho más severo y en la mayoría de los casos, de carácter irreversible (De Jong, 1980; Pedersen y Elling, 1984), cuestionando con esto, si la Rinitis Atrófica es el resultado de factores producidos por el microorganismo o bien si se trata de un fenómeno específico asociado con los mecanismos de defensa del huésped; ya que aún cuando se plantea que la sinergia de ambas bacterias da como resultado el cuadro final de la enfermedad, se ha propuesto que la contribución individual es el resultado de mecanismos diferentes (Trigo y Pijoan 1978, Pijoan, 1978).

Existen numerosos estudios en los que se ha reportado la incapacidad de este microorganismo para adherirse al tracto respiratorio de algunas especies animales así como líneas celulares susceptibles a menos que se cuente con un factor que favorezca su colonización. (Pedersen y Barford, 1981; Rutter y Rojas, 1982; Elling y Pedersen, 1985, Rutter, 1983; Penningsy Stern, 1984), habiendose demostrado ya que la adherencia es un factor esencial en la expresión de la patogenicidad de P. multocida.

Para el estudio entonces, del tipo de interacción que existe entre la toxina de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida se diseñó un modelo de infección por aerosoles en ratones de 21 días para la reproducción de la enfermedad y su asociación con la cinética de remoción bacteriana obtenida a partir del monitoréo en el número de bacterias adheridas a corne y pulmón, a en

base a una carga bacteria conocida de Pasteurella multocida durante 18 días posteriores a la inoculación. Los resultados de remoción bacteriana obtenidas de los lavados de cornete tanto del grupo I, inoculado solamente con Pasteurella multocida, como del grupo III inoculado previamente con la toxina de Bordetella bronchiseptica mostraron un comportamiento similar, sin variación significativa con respecto al número de UFC recuperadas por día postinoculación, ni con respecto al grupo experimental, en el caso del pulmón el comportamiento se repite también sin diferencias significativas entre ambos grupos experimentales, y días postinfección, pero significativamente mayor en cuanto a el número de bacterias recuperadas en este órgano, este aumento se puede explicar claramente en la gráfica No. 2, donde las cuentas son mayores para pulmón en ambos grupos experimentales, desde el tiempo cero, esto es que la carga inicialmente impactada en pulmón fue mayor, conservándose así a lo largo de la infección, pero sin ninguna diferencia adicional, con respecto al cornete, en cuanto a comportamiento, lo que demuestra la homogeneidad del tejido mucociliar a lo largo del sistema respiratorio. Considerando además que con respecto a los resultados de remoción pulmonar tampoco existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental, con cinéticas de remoción semejantes a las obtenidas para cornete.

Esto indica que Pasteurella multocida no fue removida en ninguno de estos dos órganos independientemente de la presencia o ausencia de la toxina en cornetes nasales. El hecho de que las cuentas permanezcan constantes en ambos grupos implica de algún modo que la bacteria se adhirió al epitelio sin la aparente participación de la toxina, aún cuando se esperaba que en el grupo control la pasteurella se eliminará un elevado porcentaje durante las primeras horas posteriores a la inoculación. A este respecto Smith y cols. en 1981 observaron que

Pasteurella multocida tipo "A" no era eliminada del tracto respiratorio al menos durante las siguientes cincuenta horas posteriores a la inoculación.

Existen numerosos estudios en los que se ha reportado la incapacidad de este organismo para adherirse al tracto respiratorio de algunas especies animales y líneas celulares susceptibles, a menos que se cuente con un factor que favorezca su colonización. (Pedersen y Barford, 1981; Rutter y Rojas, 1982; Elling y Pedersen, 1985; Rutter, 1983; Pennings y Stern, 1984) habiéndose demostrado ya que la adherencia es un factor esencial en la expresión de la patogenicidad de *Pasteurella multocida* sin relación alguna entre cepas toxigénicas y las que exhiben o no antígenos somáticos. Se ha observado que la adhesividad a células traqueales porcinas disminuye con la edad (Jackes, 1987), atribuyendo esto a la excesividad y el número de receptores, así como a la presencia de anticuerpos secretores.

Aún cuando los resultados de remoción bacteriana no evidenciarán claramente la participación de la toxina en el proceso de remoción bacteriana, al relacionarlos con los resultados histológicos, estos sí revelaron que la infección inducida en cornetes en presencia de la toxina fue capaz de desarrollar atrofia de hueso y necrosis.

Estos resultados mostrarán que cada uno de los factores involucrados por sí solo fue suficiente para inducir atrofia de este órgano, pero si hubo diferencias en cuanto al tiempo de aparición de las lesiones y la severidad de las mismas.

El grupo control inoculado solamente con la toxina de *B. bronchiseptica* mostró elementos indicativos de remoción periosteal con congestión hemorrágica y adelgazamiento del hueso, las lesiones inflamatorias se presentan prácticamente desde el inicio de la infección, no así la atrofia de hueso y la calcificación de tabique que prácticamente desaparecen al final de la misma, la necrosis se presenta entre el día cuatro y el día ocho, con adelgazamiento del cornete, hemoción osea y una marcada congestión hemorrágica el signo más característico

lo constituye la inflamación del periostio durante los primeros días con presencia de osteoclastos, los osteoblastos solo se observaron a la mitad del proceso las demás lesiones apreciadas son semejantes a las desarrolladas por Pasteurella multocida en cuanto a la infección de éste grupo experimental

Todos los signos anteriormente descritos se vieron incrementados en el grupo experimental inoculado con la toxina de B. bronchiseptica y Pasteurella multocida pero diferenciándose claramente en cuanto a la severidad de las lesiones producidas en los cornetes, con ausencia de osteoblastos y presencia de osteoclastos, mientras que los demás signos, como remoción osea periostial y deformación del hueso se ven también claramente manifestados con mayor intensidad que en cualquiera de los grupos control inoculados con alguno de los factores involucrados. Los signos predominantes son una marcada degeneración del epitelio nasal y del volumen del hueso, que se presenta desde los primeros ocho días, además de pérdida de integridad ciliar y congestión vascular de la mucosa, acompañado de infiltración leucocitaria abundante, así como de células inflamatorias lo que permite discriminar el papel de P. multocida

Todo lo anterior muestra que si bien es cierto el tipo de lesión es muy semejante en los tres grupos estudiados, estos varían en cuanto a la severidad y persistencia, confirmando que la contribución de cada uno de los factores se da por mecanismos sinérgicos diferentes.

VIII. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en el modelo de remoción bacteriana, se concluye que:

Pasteurella multocida inoculada mediante aerosoles bacterianos no se remueve del tracto respiratorio de ratones de 21 días , al menos durante los primeros 18 días posteriores a la infección, independientemente de la presencia de la toxina de Bordetella bronchiseptica

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a comportamiento, número, día, o grupo experimental, entre cornete y pulmón.

A pesar de que el modelo de remoción no evidencio la participación de la toxina al favorecer la instalación de Pasteurella multocida, los cambios microscópicos observados en los grupos experimentales sí mostraron que tanto la toxina de Bordetella bronchiseptica como Pasteurella multocida inoculadas por separado fueron capaces de inducir necrosis y atrofia en las turbinas nasales, signos característicos de Rinitis Atrófica, en los ratones infectados, pero las lesiones desarrolladas en el grupo inoculado con ambos factores fueron más severas, progresivas e irreversibles, lo que hace a este modelo útil en el estudio de los mecanismos involucrados en el proceso de esta enfermedad.

XL BIBLIOGRAFIA

Andersen, E. K (1953). Serological studies on *Haemophilus pertusis*, *Haemophilus parapertusis* and *Haemophilus bronchisepticus* *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 33:202-204.

Anon. (1954) New Pig Disease in Britain. *Vet. Rec.* 66:316.

Beard, C.W.; Easterday, B.C. (1965): An aerosol apparatus for the exposure of large and small animals: description and operation characteristics. *Am. J. Vet. Res.* 26:174-183

Becovish, Z. and Oosterwoud R.A (1977). Vaccination with *Bordetella bronchiseptica* vaccine on a farm with atrophic rhinitis: an evaluation of a field experiment. *Tijdschr. Diergeneesk.* 102: 485-494

Bemis, D.A. and Appel, M.J. "(1977)". Aerosol Nolvasan treatment of *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *Vet. Med. Small Anim. Clin.* 72:53-55.

Bemis, D.A.; Greisen, H.A.; Appel, M.J. (1977). Pathogenesis of canine bordetellosis. *J. Infect. Dis.* 135:753-762

Bergey's (1925). *Manual of determinative bacteriology*, The Williams and Wilkins. Col. Baltimore.

Brassine, M.A.; Dewaele, A.; Gouffaux, M. (1976). Intranasal infection with *Bordetella bronchiseptica* in gnotobiotic piglets, *Res. Vet. Sci.* 20:162-166

Brown, W.R.; Krook, L.A. and Pond, W.G. (1966). Atrophic rhinitis in swine. *Etiology, Pathogenesis and prophylaxis* *Cornell Vet.* 56 (supl 1).

Bruckener, I.E. and Evans, D.G. (1939). The toxin of *Bordetella bronchiseptica* and the relationship of this organism to *Haemophilus pertusis* and *Bordetella bronchiseptica*. *J. Pathol.* 49: 567-570

Buxton, A. and Fraser, J. (1977). *Animal Microbiology*. Vol. I; First Edition; Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne. Pages 121-126 and 267-269

Cameron, R.; Giles, C.J.; and Smith, I.M. (1980). The prevalence of *Bordetella bronchiseptica* and Turbinate (concha) atrophy in English pig herds in 1978-79. *Vet. Rec.* 107:146.

Carter, G.R. : (1955). Studies on *Pasteurella multocida* I. A haemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.* 16:437

- Cartes, G.R. and Subronto, P. (1973). Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with Acriflavine; *Am. J. Vet. Res.* 34 (2): 293-294
- Carter, G.R. (1975). *Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology*; second edition; Charles C. Thomas Publisher; Springfield Illinois, U.S.A.
- Carter G.R. (1987). Serological classification of *Pasteurella multocida* *Vet. Rec.* 121:382.
- Chang, K.C., Zakheim, C.T., C.C.T., and Montgomery, J.C. (1975). Posttraumatic purulent meningitis due to *Bordetella bronchiseptica*. *J. Pediatr.* 86:639-640
- Cowan, S.T. (1974). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of medical bacteria*, 2nd edit. Cambridge University Press, Cambridge.
- Cowart, R.P. and Backstrom, L. (1982). Prevalence of dermonecrotic toxin producing *Pasteurella multocida* in herds with varying levels of atrophic rhinitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 141:1467-1468.
- Cross, R.F. and Chaffin, R.M. (1962). *Bordetella bronchiseptica* induced porcine atrophic rhinitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 141:1467-1468.
- De Jong, M.F.; Del, M.L. and Tentenburg, G.L. (1980) Atrophic Rhinitis pathogenicity test for *Pasteurella multocida* isolates. *proceedings Int. Peg. Vet. Soc. Congress 1980; Copenhagen, p. 211.*
- De Johns, D.; Duncan J.F.; Ross, R.F. Switzer, W.P. (1976) Pathology of experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in swine. *Am. J. Vet. Res.* 27:467-472
- Done J.T. (1975). Infectious rhinitis of pigs: Rational control at the herd level. *Vet. Annu.* 15:105.
- Doyle, L.P.; C.R. and Hutchings, L.M. (1944) Report of a type of Rhinitis in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 107:132. 107:132
- Duncan J.R. and Ramsey, F.K. (1965). Fine structural changes in the porcine nasal ciliated epithelial cell produced by *Bordetella bronchiseptica* rhinitis. *Am. J. Pathol.* 47:601-512
- Duncan J.R.; and Ramsey, F.K. and Switzer, W.P. (1966). Pathology of experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in swine: atrophic rhinitis. *Am. J. Vet. Res.* 27:467-472

Dunnill, M.S. (1979). Some aspects of pulmonary defense. *J. Pathol.* 128: 222-236

Eldering, G. and Kendrick, P. (1938). *Bacillus parapertusis*: a species resembling both *Bacillus pertusis* and *Bacillus bronchisepticus* but identical with neither. *J. Bacteriol* 35:561-572

Eldering, G. (1942). A study of the antigenic properties of *Haemophilus pertusis* and related organisms. II protection test in mice. *AM. J. Hyg.* 36:294-232

Elias, D.G.; Kruger, M.; Rats, F. (1982): *Epizootiologische Untersuchungen der Rhinitis des Schweines. II. Biologische Eigenschaften der von Schweinen isolierten B. bronchiseptica* *Stamm Zentrabl Veterinarmed.* 99:619-635

Eddington, N.; Smith, J.M.; Flowright, and Watt, R.G. (1976). Relation ship of porcine cytomegalovirus and.

Bordetella bronchiseptica to atrophic rhinitis in gnotobiotics piglets *Vet. Rec.* 48:42

Endoh, M.; Toshiyuki, T.; Nakase, Y (1980). Adenylate cyclase activity of *Bordetella bronchiseptica* organism. I. Its production in liquid medium. *Microbiol. Immunol* 24: 24: 95-104.

Erler, W.; Feist, H. Flossmann, K-D und Jacob, B. (1977). Charakterisierung der Lipopolysaccharide einiger *Pasteurella multocida* Stämme. *Atame.Arch. Exper. Vet. Med.Leipzig* 31:139-144

Evans, G. and Maitland H.B. (1939). The toxin of *Bordetella bronchiseptica* and the relationship of this organism to *Haemophilus pertusis* *J. Pathol.* 43:67-78

Evans, D.G. (1940) The production of pertussis antitoxin in rabbits and the neutralization of pertussis, parapertusis y bronchiseptica toxins. *J. Pathol.* 51:49-58.

Farrington, D.O. and Switzer, W.P. (1977). Evaluation of nasal culturing procedures for the control of atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. *J. Am. Vet. Res.* 40: 1347-1351.

Ferry N.S. and Klix, C. (1918). Studies relative to the apparent close relationship between *Bact. pertusis* and *Bordetella bronchiseptica* II Complement fixation test. *J. Bacterol.* 3:309-312

Fetter, A.W.; Switzer, W.P. and Capon, C. (1975). Electron microscopic evaluation of bone cells in pigs with experimentally induced *Bordetella bronchiseptica* rhinitis (turbinate osteoporosis) *Am. J. Vet Res.* 36 36: 15-22

Fisk, S.K. and Soave, D.A. (1973). *Bordetella bronchiseptica* in laboratory cats from central California. *Lab. Anim. Sci.* 23:33-35

Fitzl, M. (1975). Selective isolation of *Bordetella bronchiseptica* Zentralb. Bakteriell parasitendk infektionskr Hyg. Abt. I. orig 224:270-272.

Franque. (1930). Was ist die schufflekrankheit der schweine Dtsch. Z. Gesamte. Tierheilkd. 1:75.

Foged, N.T.; Pedersen, K.B. and Ellind, F. (1987). FEEMS Microbiology Letters. 43 y 45

Ganaway, J.R.; Allen, A.M.; Mcpherson, C.W. (1965) prevention of acute *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in guinea pig colony. *Lab. Anim. Care* 15:152-162

Gerone, P.J.; R.B.; Keefer, G.V.; Douglas, R.G.; Derrembacher E.B. and Knight, V. (1966). Assesment of experimetal and natural viral aerosols. *Bact. Rev.* 30: 576-584

Giles, C.J.; Smith, I.M.; Baskerville, and Oliphant, J. (1981) (1981). Treatmen of experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in young pigs with potentiated sulphomamide in the drinking water. *Vet. Rec.* 108:136

Giles C.J. and Smith, I.M. (1982). The value of vaccinating pigs whit *Bordetella bronchiseptica*. *Pig. Vet. Soc. Proc.* 9:1.

Gois, M.F.; Kuksa, F. and Sisak, F. (1977). Experimetal infection og gnotobiotic piglets whit *Mycoplasma hyorhinis* and *Bordetella bronchiseptica* Zentralb. Veterinae med Rcibe B.24:89-96

Gois, M.; Kuksa, F. and Sisak, F. (1980). Microbiological findings in the lungs of slaughterer pigs. *Proceedings Ints. Pig. Vet. Soc. Congress 1980, del nmark, p.* 214.

Gois, M. Barner, H.J. and Ross, R.F. (1983). Potentiation of turbinate atrophy in pigs by long term nasal colonization whit *Pasteurella multocida* *Am. J. Vet. Res.* 44:372

Goodnow, R.J. (1961). Viability and infectivity of microorganisms of experimetal airborne infection. *Bact. Rev.* 25: 182-187

Goodnow, R.A.; Lehr, C.D.; Shade, F.J. and Wisecarver, J.L (1977). Mouse potency assay for *Bordetella bronchiseptica* bacterins. *J. Clin. Microbil* 6:43-46

- Goodnow, R.A.; Shade, F.J. and Switzer, W.P.; (1979). Efficacy *Bordetella bronchiseptica* bacterin in controlling enzootic atrophic rhinitis in swine. *Am. J. - Vet. Res.* 40:59-60
- Godnow R.A.: (1980). *Biology of Bordetella bronchiseptica* *Microbiol. Rev.* 44:772-738.
- Green, G.M.; Low, R.B.; and Davis, G.S. (1978) Defense mechanism of the respiratory membrane. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115:479-514
- Hanada, M.K.; Shimoda, S.; Tomita, Y. and Nishiya, Y. (1979). Production of lesion similar to naturally occurring swine atrophic rhinitis by cell-free sonicated extract of *Bordetella bronchiseptica* *Jpn. J. Vet. Sci.* 41:1-8
- Harris D.L and Switzer, W.P. (1979). Turbinate atrophy in young pigs exposed to *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* and combined inoculum. *Am. J. Vet. Res.* 29:777-785
- Harris, D.L. and Switzer, and Harris, R.A. ; (1971). A suggested mechanism for the pathogenesis of infectious atrophic rhinitis. *Can. J. Comp. Med.* 35:318-323.
- Harris, D.L. and Switzer, W.P. (1972). Immunization of pigs against *Bordetella bronchiseptica* infection by parenteral vaccination. *Am. J. Vet. Res.* 33: 1975-1984
- Hatch, M.T. and Dimmick, R.L. (1966). Physiological response of air borne bacteria to shifts. *Bact. Rev.* 30:597-603
- Iglesias, G.; Pijoan, C. And Hernandez, J. (1982). Characterization of a substance in tracheal exudates with activity against *Pasteurella multocida*. *Proceedings Int. Pig. Vet. Soc. Congress, Mexico*, p. 86.
- Jacques, M.; Parent, N. and Boire, B. (1988). Adherence of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* to porcine nasal and tracheal epithelial cells. *Can. J. Vet. Res.* 52:283-285
- Jenkins, E.M.; Anthony, V.; Vance, R.; Cleveland, J. and Gradwohl, S.G. (1977). Prevalence of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine of *Bordetella bronchiseptica* infection in swine of south
- Kemeay, L.J. (1972). Experimental atrophic rhinitis produced by *Bordetella bronchiseptica* culture in young pigs. *Cornell Vet.* 62: 477-485.

- Kemeay, L.J. (1972).** *Experimental atrophic rhinitis produced by Bordetella bronchiseptica culture in young pigs.* Cornell Vet. 62: 477-485.
- Lawey, L.J. (1972).** *Experimental atrophic rhinitis produced by Bordetella bronchiseptica. culture in young pigs.* Cornell Vet. 62:477-485.
- Labaw, L.W. and Mosley, V.M. (1955).** *Periodic estructurein the flagella of Brucella bronchiseptica.* Biochim. Biophys. Acta. 17: 322-324.
- Lastra, A. and Pijoun, C. (1984).** *Tissue culture test for the identificacion of toxigenic Pasteurella multocida proceedings Am. Assoc. Swine Pract.; Kansas City. p. 170.*
- Lautrop, H. and Lacey, B.W. (1960).** *Laboratory diagnosis of whooping cough or Bordetella bronchiseptica infections.* Bull, Little, T.W.A. (1975). *Respiratory disease in pigs: a study* Vet. Rec. 96:549-544.
- Leman, A.D.; Straw, B.; Glock, R.; Mengeling, W.; Penny, R.H.; Giles, C.J. (1985).** *Diseases of swine. Sixth edition. Cap.38-40.*
- Lillie, T.W.A.; and Thomson, R.G. (1972).** *The pulmonary clearance of bacteria by calves and mice.* Can. J. Comp. Med. 36:129-137.
- Lopez, A.; Thomson, R.G.; and Savan, M. (1976).** *The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica in calves infected whit bovine parainfluenza-3 virus.* Can. J. Comp. Med. 40:385-391.
- Magyar, T.; Semjen, G. and Oswatch, Z.(1985)** *Investigation of adhesive and nonadhesive Bordetella bronchiseptica strains in suckling-mouse model.* Acta. Vet. Hungarica 33:173-141.
- Martineu, G.P.; Broes, A.; De Jong, M.F. ; Martinea-Roueze, B. (1982).** *Experimental reproduction of atrophic rhinitis whit Pasteurella multocida on gnotobiotic and conventiona piglets.* Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. México. p. 88.
- McCandlish, I.P.A; Thomson, H. and Writh, G. (1976)** *Kennel cough: vaccination against Bordetella bronchiseptica infection.* Vet. Rec. 981:56-157.
- Mendoza, E.S. (1985).** *Localizacion del gene responsable de la produccion de la exotoxina de Pasteurella multocida tipo D; Tesis Licenciatura; FES-Cuautitlan, UNAM.*
- Mercer, T.T.; (1973).** *Production and Characterization of aerosols.* Arch. Intern. Med. 13139-49.

Miniatis, O.P. and Jhonson, J.A. (1980). *Experimental atrophic rhinitis in gnotobiotic pigs*, *Can. J. Com. Med.* 44:358.

Montaraz, J.A.; Novotny, P. and Ivanyi, J. (1985) *Identification of a 68-Kilodalton protective antigen from Bordetella bronchiseptica*. *Infect. and Immunity* 47:(3):744-751.

Morrison, R.B.; Pijoan, C.; Hilley, H.D. and Rapp; V. (1985). *Microorganisms associated whit pneumonia in slaughter weight swine*; *Can. J. Com. Med.* 49:129-137.

Nakai, T.; Sawata, A. and Kume, K. (1985). *Intracellular locations of dermonecrotic toxins in Pasteurella multocida and Bordetella bronchiseptica*. *Am. J. Vet. Res.* 46:870-874.

Nakase Y. (1957). *studies on Haemophilus bronchisepticus. I. The antigenic structures of Haemophilus bronchisepticus from guinea pigs*. *Kitasato Archi. Exp. Med.* 30 57-72.

Nakase, Y.; Kume, K.; Shimoda, K. and Sawata, A. (1980). *Experimental atrophic rhinitis produced by cell-free extract of Bordetella bronchiseptica*. *Proc. Int. Cong. Pig. Vet. Soc.* p. 202.

Niels, T.F.; Folmer, E. and Pedersen, K.B. (1986). *Isolation and characterization of a toxin from Pasteurella multocida* *Proceedings Int. Pig. Vet. Soc. Congress, Espaa*, p. 231.

Nielsen, N.C. Riising, H.J. and Bille (1976) *Experimental reproduction of atrophic rhinitis in pigs reared to slaughter weight*. *Proc. Int. Cong. Pig vet. Soc. Iwoa State Univ*; p. 202.

Novotny, P.; Chubb, K.; and Montaraz. J.A. (1988) *Adenylate cyclase activity of a 68,000 molecular-weight protein isolated from the outer membrane of B. bronchiseptica*. *Infection and immun.* 50: (1): 199-206.

Oddy, J.G. and Evans, D.G. (1940) *The effects produced by toxic and nontoxic extracts of H. pertussis and B. bronchiseptica on the blood sugar of rabbits*. *J. Pathol.* 56: 11-15.

Ogata, M.; Koshimizu, K.; Kang, B.; Atobe, H.; Yamamoto, K.; Kino, T. and Ikeda, A. (1970) *Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. I. Relation ship between the disease and bacterial flora of nasal cavity of pigs* *JPN. J. Vet. Sci.* 32:185.

Olsen G.R.; Hoover, E.A.; Mathes.L.E.; Heding, L, and Challer , J.(1976). Immunization against feline oncovirus disease usin a killed tumor cell vaccine. cancer. Res. 36:3642-3646.

Osborne . A.D.;Saunders, J.R.; Sebunya. T.K.; Willson, P.and Green, G.H. (1985) A simple aerosol chamber for experimental reproductionof respiratory disease in pigs and other species. Can. J. Com. Med. 49: 434-435.

Parker, C (1976). Role of the genetics and physiology of *Bordetella pertusis* in the production of vaccine and the study of the host-parasite relationships in the pertusis Adv. Appl. Microbiol. 20: 27-42.

Pashov, T.V; Kurbala, M.Y. and Sereda, D.I. (1967) Aetiologi role of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in the porcine infectius atrophic rhinitis veterinary . Moscow. 14: 48.

Pedersen, K.B, and Barbord, K. (1981). The Aetiologi significance of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of swine. Nord. Vet. Med. 33:513.

Pedersen K.B. and Elling, F.(1984). Persistent atrophic rhinitis induced by dermonecrotic *Pasteurella multocida* J. of Com. Pathol. 34: 203-214.

Pedersen K.B. and Nielsen , N.C. (1983), Atrophic rhinitis of pigs. Com. Eur. Communites Rep. Eur. 8043 En Luxemburg p.205.

Penny, R.H.C.(1977) The influence of managen changes of the disease picture in pigs. Vet. Annu. 17:111.

Phillis, J.W. (1976). *Veterinary physiology*. W.B. Saunders Philadelphia.
Ray, J.D. (1950) *Brucella bronchiseptica*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 116:51.

Richeter, G.W. and Kress, Y. (1967). Electron microscopy of strain of *Bordetella bronchiseptica*. J. Bacteriol. 94:1216-1224.

Roop, M.R.; Veit, H.P.; Sinsky, R.J.; Veit. S.; Hewlett, E.L. and Kornegay, E. (1987). Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated whit the production of infectius atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine. Infect. and Innum. 55(1):217-222.

Roos, R.F. (1984). Switzer W.P. and Duncan, J.R. (1967) Comparison of pathogenicity of varrius isolates of *Bordetella bronchiseptica* in young pigs. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 31:53-57.

Roos, R.F. (1984). Chronic pneumonia of swine emphasis on mycoplasma pneumoniae. *Proceedings American Association of swine practitioners USA.* p. 79-96.

Roos, R.F. and Harry, P.M. (1969). Histamine-sensitizing factor mouse protective antigens, and other antigens of some members of genus *Bordetella*. *J. Bacteriol.* 99:57-64.

Runnels, L.J. (1982). Infection atrophic rhinitis of swine symposium on diagnosis and treatment swine diseases. p. 301-318.

Rutter, J.M. (1981). Quantitative observations on *Bordetella bronchiseptica* Infection in atrophic rhinitis of pigs. *Vet. Rec.* 108:451.

Rutter, J.M. and Rojas, X. (1982) Atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets: Differences in the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in combination infection with *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Rec.* 110:531.

Rutter J.M.; Francis, L.M.; and Samson, B.F. (1982). Virulence of *Bordetella bronchiseptica* from pigs with or without atrophic rhinitis. *J. Med. Microbiol.* 15:105.

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

Rutter, J.M. and Collings, L.A. (1983) The virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*; *Res. Vet. Sci.* 34:287-295

Rutter and Collings, L.A. (1983). The virulence of *Bordetella bronchiseptica* in atrophic rhinitis of pigs. *Comm. Rur. Communities. Rep. EUR. Luxemburg.* p. 77

Rutter, J.M. (1986) Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica* *Vet. Sci.* 34:287-295.

Seburny, N.R.; Saunders, J.R. and Osborne, A.D. (1983). Dose response relationship of *H. pleuropneumoniae* aerosols in pigs. *Can. J. Comp. Med.* 47:54-56.

Semjen, G. and Magyar, T. (1985). A bovine haemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* responsible for adherence. *Acta Vet. Hungarica.* 33:129-136.

Schofield, F.W. and Jones, (1950). The pathology and bacteriology of infectious atrophic rhinitis in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 116:120.

Schoss, P. and Thiel, C.P. (1984). Occurrence of toxin producing strains of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* in pigs herds with atrophic rhinitis and in unaffected herds. *Proc. Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Belgium* p. 94.

Shimizu, T.M.; Nakagawa, M.; Shibata, S. and Suzuki, K. (1971). Atrophic rhinitis produced by intranasal inoculation

Silverira, D. Edintong, N. and Smith, I.M. (1971) Ultrastructural changes in the nasal turbinate bone of pigs in early infection with *Bordetella bronchiseptica*. *Res. Vet. Sci.* 33:37.

Simmons, D.F.A. and Simpson, W. (1977). The biochemical and cultural characteristics of *Pasteurella multocida*, *Med. Lab. Sci.* 34:145-148

Skelly, B.J.; Pruss, M.; Pellegrino, R.; Andersen, D. and Abruzzo, G. (1980). Variation in the degree of atrophic rhinitis with field isolates of *Bordetella bronchiseptica* *Proc. Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Copenhagen*, p. 210

Smith, I.M.; Cliphant, J.; Baskerville, A.J.; and Giles, C.J. (1980) High prevalence of strains of *Bordetella bronchiseptica* resistant to potentiated sulfonamide in English pig herds in 1978-1979. *Vet. Rec.* 106:466.

Smith I.M.; Giles, C.J. and Baskerville, A.J. (1982). The immunisation of pigs against experimental infection with *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Rec.* 110: 488.

Switzer, W.P. (1931). Switzer W.P. (1955). Studies on infections atrophic rhinitis. Characterization of pleuropneumonia like organism isolated from the nasal cavities of swine. *Am. J. Vet. Res.* 16:540

Switzer W.P. (1956). Studies of infectious atrophic rhinitis. V. Concept. That several agents may cause turbinate atrophy *Am. J. Vet. Res.* 16:540.

Switzer, W.P. and L. Ecuyer, C. (1960). Detection of swine nasal viruses in cells culture. *Am. J. Vet. Res.* 17:473-484

Switzer, W.P. and Ferrington, D.O. (1972). progress in the control of atrophic rhinitis caused by *Bordetella bronchiseptica* in swine. *J. Am. Vet. Assoc.* 160:1325.

Switzer, W.P. and Ferrington, D.O. (1975) Infectious atrophic rhinitis in disease of swine, 4th. ed. H.W. Dunne and P. Leman, Ames, Iowa. State Univ. press. p. 687.

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

Thorp, F. and Tanner, F.W. (1940). Bacteriological study of the aerobic flora occurring in pneumonic lungs of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 96:149-160.

Tornøe N. and Ntelsen, N.C. (1976) Inoculation experiments with white *Bordetella bronchiseptica* strains associated with atrophic rhinitis in swine. *Proc. Int. Cong. Vet. Brazil*, p. 31.

Trigo, E. and Pijoan, C. (1988) Presence of pili in *Pasteurella multocida* strains associated with atrophic rhinitis. *Vet. Rec.* 122:19.

Trigo E. and Pijoan, C. (1988). Effect of piliation, hemagglutination and capsular serotype of *Pasteurella multocida* on the production of atrophic rhinitis in swine. *Proc. Int. Cong. Vet. Brazil*, p. 31.

Van Der Heyden, P.J.; Kamp, E.M.; Pals J.W. and Tatenboug, G.J. (1984). Isolation and characterization of a heat-labile dermonecrotxin from *Pasteurella multocida* proceedings Int. Pig. Vet. Soc. Congress, Belgium.

Wittlestone, P. (1982). Infectious agents associated with porcine respiratory diseases. *Pig. Vet. Soc. Proc.* 9:

Wilson, M.P. and Miles, G. (1946). *Bordetella bronchiseptica* a reassessment of its role in canine respiratory disease *Vet. Rec.* 93:486-487.

Yocomizo, Y. and Shimizu, T (1979). Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to swine nasal epithelial cells and its possible role in virulence *Res. Vet. Sci.* 27:15.

Zink, CH. and Yaker, J. (1987) Experimental infection of piglets by aerosol of *Rhodococcus equi* *Can. J. Vet. Res.* 51 p. 290-296.