

44  
201



**Universidad Nacional Autónoma  
de México**

Facultad de Estudios Superiores  
CUAUTITLAN



**“Interacción entre Bordetella bronchiseptica y  
Pasteurella multocida en la Rinitis Atrófica,  
empleando un modelo experimental de  
Infección por aerosoles en ratón”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A

MA. ELENA LOPEZ DAVALOS

DIRECTORES: M. en C. Virginia Lara Sagahón  
M. en C. Susana E. Mendoza Elvira

ASESOR: Dr. José Abel Ciprian Carraseo

Cuautitlán Izcalli, Edo. de México

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# I N D I C E

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

### RESUMEN

I. INTRODUCCION	Página
<b>1. Rinitis Atrófica</b>	
1.1 Definición .....	1
1.2 Distribución e Importancia.....	1
1.3 Influencia Ambiental.....	2
1.4 Agentes Etiológicos Involucrados.....	3
1.5 Modo de Infección .....	5
1.6 Patogenia de la Enfermedad .....	5
1.7 Signos Clínicos .....	7
1.8 Lesiones Microscópicas.....	8
<b>2. Generalidades de <u>Bordetella bronchiseptica</u></b>	
2.1 Morfología .....	9
2.2 Características de Cultivo .....	9
2.3 Antígenos .....	10
2.4 Enzimas y Toxinas .....	11
2.5 Participación en la Rinitis Atrófica .....	12
2.6 Estudios de Inmunidad .....	16
<b>3. Generalidades de <u>Pasteurella multocida</u></b>	
3.1 Morfología .....	19
3.2 Antígenos .....	19
3.3 Toxinas.....	20
3.4 Material Extracrosomal .....	21
3.5 Importancia en la Rinitis Atrófica .....	22
<b>4. Biofísica de las Infecciones Respiratorias</b>	
4.1 Vías de Entrada de Partículas .....	24
4.2 Aerosoles .....	25
4.3 Inhalación de Partículas .....	26
4.4 Distribución y Mecanismos de depósito de las... Partículas Inhaladas.	27
4.5 Aparatos Productores de Aerosoles.....	28
<b>5. Remoción Bacteriana</b>	
5.1 Aerosoles de Bacterias .....	30
5.2 Remoción Bacteriana .....	31
<b>II. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>

### III. MATERIAL Y METODO

1.	Cepas Bacterianas .....	34
2.	Identificación por Pruebas Bioquímicas.....	34
3.	Pruebas Biológicas para la Determinación de .... la Dermonecrototoxicidad.	35
3.1	Producción de Exotoxina Dermonecrotóxica ....	35
3.2	Necrosis en piel de cuye .....	35
3.3	Letalidad en Ratón Lactante.....	35
3.4	Atrofia de Bazo de Ratón .....	36
4.	Patrón de Remoción de <u>Bordetella bronchiseptica</u> y <u>Pasteurella multocida</u> en ratones.	
4.1	Cámara de Aerosolización .....	36
4.2	Evaluación y Estandarización del Sistema .....	38
4.3	Animales .....	38
4.4	Preparación del Inóculo .....	38
5.	Estudio de la Infección de <u>B. bronchiseptica</u> y <u>P. multocida</u> en ratones por medio de aerosoles.	
5.1	Aerosolización .....	39
5.2	Estudio de Remoción Bacteriana en Cornete .....	40
5.3	Estudio de Remoción Bacteriana en Pulmón .....	40
5.4	Estudio Histopatológico .....	42
5.7	Análisis de Resultados .....	43

### IV. RESULTADOS.

1.	Identificación Bacteriana y Dermonecrototoxicidad.	44
2.	Resultados de la Remoción Bacteriana en Cornete. y Pulmón.	44
2.1	Comparación de la Remoción de <u>P. multocida</u> y.... <u>B. bronchiseptica</u> .	46
2.2	Efecto de <u>P. multocida</u> sobre la remoción de..... <u>B. bronchiseptica</u>	50
2.3	Efecto de <u>B. bronchiseptica</u> en la remoción .....	55
	de <u>P. multocida</u>	
3.	Resultados del Estudio Histopatológico .....	63

### V. DISCUSION..... 69

### VI CONCLUSIONES..... 76

### VII. BIBLIOGRAFIA..... 77

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS	Pagina
1. Efecto del Tamaño de Partícula en la ..... Distribución de Partículas en el Tracto Respiratorio.	29
1. Diagrama de Trabajo Experimental.....	41
3. Resultados de las Cuentas Bacterianas en Cornete.. y Pulmón de los Diferentes Grupos Experimentales. Muestras Pares.	45
4. Resultados de la Remoción de <u>P. multocida</u> y de .. <u>B. bronchiseptica</u> en Cornete y Pulmón de Ratón.	47
5. Análisis Estadístico. Comportamiento de las..... bacterias inoculadas independientemente.	48
6. Resultados de Remoción Bacteriana en UFC/organo.. Efecto de <u>P. multocida</u> sobre la remoción de ..... <u>B. bronchiseptica</u> .	51
7. Análisis Estadístico. Comparación del..... Comportamiento de <u>B. bronchiseptica</u> en presencia de <u>P. multocida</u> .	54
8. Resultados del Efecto de <u>B. bronchiseptica</u> en la. remoción de <u>P. multocida</u> .	56
9. Análisis Estadístico. Comparación del..... comportamiento de <u>P. multocida</u> en presencia de <u>B. bronchiseptica</u> .	57
10. Resultados del Estudio Histopatológico ..... realizado a los Cornetes de los Ratones de los diferentes grupos experimentales.	65

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
1. Cámara de Aerosolización .....	37
2. Remoción Bacteriana. <u>B. bronchiseptica</u> y..... <u>P. multocida</u> en Cornete.	49
3. Remoción Bacteriana. <u>B. bronchiseptica</u> y..... <u>P. multocida</u> en Pulmón.	49
4. Remoción Bacteriana de <u>B. bronchiseptica</u> ..... Interacción de <u>B. bronchiseptica</u> con <u>P. multocida</u> .	52
5. Remoción Bacteriana de <u>P. multocida</u> ..... Interacción de <u>P. multocida</u> con <u>B. bronchiseptica</u> .	59
6. Remoción Bacteriana. <u>B. bronchiseptica</u> y ..... <u>P. multocida</u> en Cornete y Pulmón.	61
7. Remoción Bacteriana. Interacción de <u>B.</u> ..... <u>bronchiseptica</u> y <u>P. multocida</u> en Cornete.	62
8. Remoción Bacteriana. Interacción de <u>B.</u> ..... <u>bronchiseptica</u> y <u>P. multocida</u> en Pulmón.	62
9. Histopatología. Cornete Nasal Normal.....	66
10 a 14. Histopatología. Daño producido en diferentes estadios de la enfermedad.	67

## RESUMEN

El presente trabajo analiza la interacción de B. bronchiseptica y P. multocida en el desarrollo de la Rinitis Atrófica, empleando un modelo de ratón de 21 días, desafiados con las bacterias mediante la técnica de aerosolización.

Se utilizaron cuatro grupos de 20 ratones cada uno, los cuales se clasificaron como: I. Testigo, II. Aerosolizado con B. bronchiseptica, III. Aerosolizado con P. multocida y IV. aerosolizado con B. bronchiseptica y cuatro días después con P. multocida. De cada grupo experimental se sacrificaron 4 ratones los días 0, 2, 4, 8 y 16 post-inoculación, para determinar el desarrollo de la enfermedad mediante los parámetros remoción-retención de bacterias y lesión histopatológica. Estos parámetros fueron evaluados en cornete, mientras que el pulmón solo se determinó la remoción bacteriana.

En el grupo I, no se aislaron las bacterias en estudio ni se encontró lesión microscópica alguna.

En el grupo II, se encontró un aumento en las UFC de B. bronchiseptica, indicando que esta bacteria coloniza el epitelio y no logra removerse de esa zona. Histopatológicamente se observó daño en los cornetes nasales, produciendo lesiones de tipo transitorio.

En el grupo III, se observó colonización y multiplicación de P. multocida en cornete nasal, lo cual hizo posible que no se removiera y que causara daño, esta colonización fue menor que en el caso de B. bronchiseptica, ya que las cuentas bacterianas son más bajas, sin embargo a nivel histopatológico P. multocida produjo lesiones más severas y de tipo progresivo.

En el grupo IV, aerosolizado con ambas bacterias se encontró un efecto de interacción, tanto a nivel de cuenta bacteriana como en el daño producido, ya que el día dos post-inculación de P. multocida se observó un aumento significativo de las - UFC de P. multocida, debido a la administración previa de B. bronchiseptica. A nivel microscópico se observaron lesiones desde el inicio del desafío hasta el día 16 post-inoculación. Estas lesiones fueron más severas y de tipo permanente.

# INTRODUCCION

## **. INTRODUCCION**

### **1. RINITIS ATROFICA**

#### **1.1 Definición**

La Rinitis Atrófica (RA) porcina, es una enfermedad infecciosa del cerdo, caracterizada por severa necrosis del epitelio del tracto respiratorio alto y por deformación y reducción en el tamaño de los cornetes nasales. Fué reconocida por primera vez en Alemania desde hace más de 150 años (Franque, 1830) y desde entonces ha sido objeto de discusión, debido a la importancia que tiene a nivel porcícola y al impacto económico que representa.

#### **1.2 Distribución e Importancia.**

La Rinitis Atrófica es una enfermedad de distribución mundial (Pedersen y Elling, 1984), ya que está ampliamente distribuida en la población porcícola. Ha sido reportada en Estados Unidos de Norteamérica (Doyle y cols., 1944) y en Inglaterra (Anon, 1954) siendo subsecuentemente reconocida en otras áreas del mundo que cuentan con una producción importante de cerdos.

En México, hace aproximadamente 20 años, la RA era considerada como una enfermedad exótica o diferente a las ya conocidas en nuestro país. Sin embargo, la presencia de población animal susceptible y el tráfico internacional de población animal infectada constituye el principal mecanismo de transmisión. Al

respecto se han hecho algunas consideraciones sobre la importación de animales para pie de cría, como la causa de la introducción de la enfermedad a México (Maqueda, 1973).

Ocaña en 1971, había manifestado que el 40% de los animales reproductores importados estaban infectados. Mercadillo (1973), calcula una incidencia que va del 60 al 80% en general, desde los casos más leves hasta casos graves de desviación total. Korenfeld (1978), reportó un total de 25.43% de animales afectados en un estudio a nivel de rastro, en el que se observaron 5,000 cerdos provenientes de varios estados de la República. Hoy en día la RA es un padecimiento con el cual muchas granjas se han visto obligadas a convivir.

### **1.3 Influencia Ambiental**

Existen diversos factores ambientales que se han relacionado con la enfermedad, entre éstos se menciona que la mayor frecuencia de la enfermedad se da en primavera e invierno. La mala ventilación e irritación de la mucosa por materia particulada suspendida en el aire son de los factores más significativos que predisponen para el desarrollo de la enfermedad (Martineau, 1982). Estos factores unidos al mal manejo y al hacinamiento de los cerdos, así como un medio ambiente desfavorable conducen a un severo retraso de crecimiento (Wilson, 1981), lo cual se presenta en sistemas intensivos de producción, cuando los cerdos están confinados en lugares pequeños.

Smith y cols., (1982) identificaron algunos factores ambientales que tienden a predisponer la severidad de la RA:

<b>Incremento</b>	<b>Decremento</b>
Piaras pequeñas y cerradas	Piaras grandes y abiertas
Expansión de la piara	Tamaño estático de las piaras
Alta proporción de lechones	Principalmente cerdos viejos
Destete en grupos	Destete en camada
Frecuencia de movimiento y mezclados	Poco movimiento y no mezclados
Sistemas intensivos internos	Sistemas abiertos
Hacinamiento	Baja carga animal por m <sup>2</sup>
Ventilación pobre y no control de temperatura.	Buena ventilación y control de temperatura.
Higiene pobre y mala desinfección.	Buena desinfección e higiene.

#### **1.4 Agentes Etiológicos Involucrados**

La RA ha sido muy discutida sobre todo en el aspecto de su etiología, ya que surgieron tres teorías sobre la ocurrencia de la enfermedad, éstas teorías son:

- a) La enfermedad es debida a una deficiencia nutricional (deficiencia de calcio, fósforo, vitamina A, de proteínas, etc.)
- b) Es debida a un factor genético.
- c) Producida por agentes infecciosos.

Las dos primeras teorías han sido descartadas por la mayoría de los investigadores, debido a que no han podido ser confirmadas.

Sin embargo, la última ha sido más aceptada por los investigadores (Brown y cols., 1966 citado por Iglesias y Pijoan, 1982).

Se han realizado muchas investigaciones dirigidas a la definición precisa del o de los agentes microbiológicos responsables de la enfermedad. Se ha señalado la posible asociación con agentes infecciosos tales como: trichomonas (Switzer, 1981), virus (Switzer y L'Cuyer, 1961; Endington y cols., 1976) y micoplasma (Switzer, 1955; Gois y cols., 1977); sin embargo, solo dos bacterias han sido consideradas de importancia y son Pasteurella multocida y Bordetella 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; Montaraz, 1986). Se ha observado en cerdos lactantes que la presencia de la RA puede resultar de una infección mixta de cepas toxigénicas de B. bronchiseptica y P. multocida (Whittlestone, 1982). 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). La invasión secundaria por otros microorganismos como P. multocida, se lleva a cabo después de una infección por B. bronchiseptica (Martineau, 1982; Runnels, 1982), siendo muy importante para el desarrollo e intensificación de la rinitis atrófica, (Gois, 1983; Harris y Switzer, 1968; Nielsen, 1976; Schoss, 1984).

### 1.5 Modo de Infección

La RA es transmitida primariamente a través del contacto de cerdo a cerdo, y la transmisión en la manada es usualmente a través de la madre portadora hacia su progenie y de lechón infectado a otros lechones. El esparcimiento de la infección es llevada a cabo cuando los lechones son mezclados y los cerdos son trasladados en grupo a lo largo de la granja.

Por lo que puede decirse que la principal forma de transmisión de la enfermedad es de cerdo a cerdo, por medio de aerosoles infectados y los cerdos expuestos pueden desarrollar rinitis catarral, faringitis y otras alteraciones antes de producirse rinitis atrófica (Harris y Switzer, 1968; Martineau, 1982).

### 1.6 Patogenia de la Rinitis Atrófica

Los agentes infecciosos primarios y secundarios colonizan la superficie del epitelio de la cavidad nasal, faringe y tráquea, pero no invaden el tejido subyacente. Con la utilización de la tinción de anticuerpos fluorescentes se ha encontrado a B. bronchiseptica sobre el epitelio de cornetes nasales y tráquea de cerdos (Duncan y cols., 1966). Al respecto, realizando estudios "in vitro" sobre la adherencia de ésta bacteria se encontró que se adhiere al epitelio y produce modificaciones en los cilios o pérdida de los mismos en la mucosa nasal (Nakai y cols., 1988). Una evaluación de los osteoblastos y osteocitos del hueso de cerdos infectados con B. bronchiseptica, mostró lisis celular

(Fetter y cols., 1975).

Recientemente se ha encontrado en P. multocida tipo "D" y B. bronchiseptica la producción de dermonecrotoxinas capaces de producir lesiones severas en los cornetes nasales (De Jong, 1980; Schoss y Thiel, 1984; Nakai y cols., 1985). Las endotoxinas producidas por B. bronchiseptica penetran al tejido de los cornetes nasales, causando cambios degenerativos, fibroplasia e hipoplasia de las mismas (Martineau y cols., 1982; Switzer, 1981).

Las cepas de P. multocida tipo "D" que producen la dermonecrotoxina DNT (+), colonizan la nariz de cerdos inoculados con B. bronchiseptica por tiempos prolongados (Rutter, 1983). 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 producidas fueron muy severas en los cornetes con desviación del morro (Miniatis y Johnson, 1980; Rutter y Rojas, 1982; Pedersen y Barfod, 1981 y Rutter, 1983).

Otros estudios muestran que P. multocida es el agente primario en el desarrollo de la RA progresiva, que presenta lesiones de moderadas a severas, es permanente y afecta la producción porcícola. Estas lesiones también se han observado cuando las dos bacterias han sido inoculadas intranasalmente a cerdos jóvenes.

Los autores que han trabajado la hipótesis sobre la atrofia progresiva, sugieren que el daño de la mucosa nasal en cerdos jóvenes es provocada por B. bronchiseptica, en adición a los

irritantes que se encuentran en el medio ambiente u otras infecciones (Gois y cols., 1983).

Por otra parte, la inoculación intranasal de la toxina de Pa. multocida en cerdos gnotobióticos, ha provocado la atrofia marcada de los cornetes (Martineau, 1982).

En general, la edad de los cerdos y el número de organismos patógenos establecidos en el epitelio nasal influye en el grado de atrofia de los cornetes y en la distorción facial (Harris y Switzer, 1969; Nielsen y cols., 1976; Switzer y Farrington 1975). Los cerdos susceptibles al desarrollo de la enfermedad tienen alrededor de 10 semanas de edad y desarrollan signos más severos y más lesiones que los que se infectan y que tienen mayor edad. Los cerdos viejos susceptibles pueden desarrollar signos y lesiones de una infección inicial pero éstos de más baja intensidad.

### **1.7 Signos Clínicos**

Clínicamente la RA es caracterizada por:

a) Estornudos crónicos y catarro con descarga mucopurulenta y ocasional epixtasis, que generalmente se presenta en lechones y es indicativo de Rinitis Catarral Aguda.

b) Marcada deformación del hueso de la cara con mal funcionamiento fisiológico.

c) Disminución y retardo del crecimiento, lo que conduce a reducción del rendimiento alimenticio.

d) En brotes moderados a severos, la distorción facial incluye braquignatia superior "mandíbula corta" y desviación lateral del morro.

e) En los casos más severos se observa conjuntivitis y deformación del hocico.

f) Desviación del septo nasal.

g) Parcial o completa pérdida de los cornetes.

i) Incremento del espacio entre el hueso nasal y los cornetes.

j) Se puede observar edema de la membrana mucosa y el cornete ventral del cornete ventral, se torna fibroso y flexible y éste es frecuentemente más afectado que el cornete dorsal. En casos avanzados, el cornete ventral puede ser completamente atrofiada (Runnels, 1982; Schoss, 1984).

### **1.8 Lesiones Microscópicas**

Entre las lesiones que se producen a nivel microscópico se encuentran principalmente disturbios en la osteogénesis con metaplasia e hiperplasia del epitelio de la membrana mucosa. Se observa cierto grado de inflamación mezclado con un proceso de degeneración y un proceso reparativo. Debido al proceso inflamatorio, se encuentra infiltración celular y hay presencia de osteoclastos por la osteogénesis deficiente (Harris y Switzer, 1968).

## 2. CARACTERISTICAS GENERALES DE Bordetella bronchiseptica

### 2.1 Morfología

Bordetella bronchiseptica es un cocobacilo, Gram negativo, no produce esporas, pleomórfico, en crecimiento sobre medio sólido, se presenta principalmente en forma cocoide, de un tamaño de 3.0 por 0.5 um a 0.4 x 0.72 um a 0.5 x 0.4 um; algunas formas filamentosas tienen en promedio un tamaño de 0.4 x 8.0 um (Richter y Kress, 1967), presenta motilidad positiva por flagelos peritricos (Goodnow, 1980).

Algunas de sus características bioquímicas son: O/F Fermentativo, Catalasa - Positiva, Oxidasa - Positiva, Indol - Negativo, H<sub>2</sub>S - Negativo, Ureasa - Positivo, Citrato - Positivo, Crecimiento en Mc Conkey - Positivo (Cowan, 1974).

### 2.2 Características de Cultivo

La identificación de B. bronchiseptica de aislamiento primario, se ha 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 promedio de diámetro de 0.2 mm en 2 días aproximadamente. Sin embargo Simpson y Simmons (1977), reportan un aislamiento de cultivos primarios en muestras nasofaríngeas, las cuales no presentaron hemólisis, ni tenían el aspecto característico, pero que correspondían a B. bronchiseptica.

Las colonias de B. bronchiseptica son características y de aspecto rugoso o lisas. A las colonias lisas se les ha designado

como de fase I y son virulentas y las colonias rugosas como de fase IV y son avirulentas (Parker, 1976). Nakase (1957), designa como de fase I a las colonias lisas que son patógenas para el ratón, como 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 únicamente los antígenos flagelares.

### 2.3 Antígenos

Los miembros del género Bordetella poseen características antigénicas similares, cada especie posee un antígeno "O" somático termoestable, una dermonecrotina termolábil y un aglutinógeno termolábil común, (Ferry, 1918; Eldering, 1942). 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 .

#### 2.4 Enzimas y Toxinas

Todas las especies de Bordetella sintetizan por lo menos una toxina, la cual es similar química y biológicamente al lipopolisacárido de otros Gram negativos (Evans y Maitland, 1939). Además de una toxina termolábil, preparada a partir de extractos libres de B. bronchiseptica y B. pertusis que ha resultado ser tóxica en cuyes y en ratón, produciendo lesiones dermonecrotóxicas, cuando la toxina es inoculada intradérmicamente a estos animales.

Cuando la toxina fue inoculada intravenosamente en conejos, inicialmente se indujo una hiperglicemia, con posterior hipoglucemia y acabando finalmente en la muerte. El factor inductivo a hipoglucemia fue reducido o eliminado, cuando se calentó la toxina a 55 C 30 mins. (Oddy y Evans, 1940). La toxina fue sensible a la formalina, no fue antigénica, y perdió la potencia después de la filtración a través de un filtro-Seitz-E-R. En contraste, Evans (1940) encontró que B. bronchiseptica formalinizada fue antigénica y una antitoxina así preparada bloqueó la toxina de B. bronchiseptica, además de neutralizar a las toxinas de todas las especies de Bordetella. Se ha descubierto una gran actividad de adenilatociclase en cultivos en fase I en las tres especies de Bordetella, que liberan esta enzima al fluido, excepto B. pertusis, que produjo más actividad intracelular. Cultivos en la fase III de estas especies no tienen actividad enzimática extracelular (Endoh y cols., 1980).

## 2.5 Participación de Bordetella bronchiseptica en la Rinitis Atrófica

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 y de una manera extensa y precisa se ha involucrado, este microorganismo en la RA (Done, 1975; Giles, 1980; Pedersen y Barfod, 1981; Rutter, 1981; Whittlestone, 1982). Aunque esta opinión es variada en cuanto a la naturaleza exacta de esta relación o asociación.

Este microorganismo esta asociado con infecciones respiratorias en animales, particularmente RA de cerdos en donde la prevalencia de B. bronchiseptica es muy alta en la población de cerdos de los países con alta productividad. Estudios de cultivos de muestras nasales de cerdos jóvenes en Estados Unidos demostraron su presencia en el 25 al 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). En el este de Inglaterra, en los cerdos de engorda, se estimó que el 40% de los mismos cerdos alberga el microorganismos (Anon, 1954).

En México, en un estudio realizado en el periodo comprendido entre Octubre de 1974 a enero de 1977, en 15 granjas localizadas en seis estados diferentes se encontró que del total de animales muestreados el 10.7% resultó positivo a B. bronchiseptica (Valdéz, 1978). De igual manera, un estudio realizado en 30 granjas del

estado de Jalisco, se encontró que el 22% de los reproductores nacionales presentaban B. bronchiseptica en fosas nasales (Anguiano, 1973).

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 distribuirse 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 piara (Giles, 1982).

La patogénesis de B. bronchiseptica en la cavidad nasal ha sido estudiada en detalle, particularmente en cuanto a la naturaleza y el efecto de los factores tóxicos del organismo y el daño osteoblástico producido en el desarrollo del hueso. Sin embargo el mecanismo preciso por el cual el microorganismo produce las lesiones en los cornetes permanece incierto.

Se considera que la colonización de B. bronchiseptica en la cavidad nasal ocurre por adherencia del microorganismo, el cual se une preferentemente a las células del epitelio ciliar (Yokomizu y Shimizu, 1979). Esto es seguido por la multiplicación de la bacteria sobre la superficie de la mucosa y producción de cambios

inflamatorios proliferativos y degenerativos en el epitelio nasal, incluyendo la pérdida de cilios (Duncan y cols., 1966; Endington 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 (Harris y cols., 1971).

Los extractos libres de células en fase I de esta bacteria, contienen una toxina termolábil, dermonecrótica, que es probablemente un factor importante en la patogénesis. 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 toxigenicidad de las diferentes fases de B. bronchiseptica aisladas de cerdos; cepas en fase I son más toxigénicas que las de fase III (Rutter y Collins, 1983), pero aparentemente no existe diferencias entre las cepas de las pjaras con y sin RA (Rutter y Rojas, 1982).

Por largo tiempo se ha considerado que una osteogénesis deficiente, en lugar de una osteólisis marcada, es el mecanismo fundamentalmente básico en el desarrollo de la hipoplasia de los cornetes en cerdos jóvenes. 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 hipoplástica inducida por B. bronchiseptica (Fetter y cols., 1975; Silveira y cols., 1971). 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 disminuída en 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., 1971).

En 1975 se demostró que la rinitis atrófica puede ser inducida 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 no fue sin embargo completamente aclarado (Switzer, 1975). Durante el siguiente año Switzer fué apoyado por otros investigadores alrededor del mundo. Las lesiones dermonecróticas producidas por la DNT, así como las reacciones adversas sistemáticas, han sido observadas en animales de laboratorio, después de inyectar la toxina.

Las observaciones realizadas sin embargo solo permiten especular que la toxina esta involucrada en los mecanismos patogénicos involucrados en la atrofia inducida por B. bronchiseptica en los tejidos de los cornetes nasales de los cerdos (Skelly y cols., 1980).

Recientemente, un investigador realizó estudios "in vivo", usando un extracto sonicado libre de células de B. bronchiseptica, este fue inoculado intranasalmente en cerdos jóvenes que se observaron durante 60 días, y se encontró una variación en la fragilidad de los cornetes nasales de los animales tratados. El

extracto fué fraccionado, en un componente endotóxico y uno dermonecrotóxico termolábil. Al inocular la parte endotóxica a ratones jóvenes, no desarrollaron lesiones de atrofia en los cornetes nasales, mientras que si se desarrolló una severa atrofia de cornetes nasales con la toxina dermonecrotóxica (Nakase y cols., 1985). Harris y cols., (1971) proponen que B. bronchiseptica libera un factor tóxico, que altera la formación normal del hueso del cornete nasal, el daño sería producido por la DNT termolábil en lugar de la endotoxina, además de otros factores tóxicos que son producidos por la B. bronchiseptica.

Otros autores, infectando a ratones lactantes de 2 a 5 días de edad por vía intranasal con un cultivo de B. bronchiseptica obtuvieron lesiones histopatológicas semejantes a las ocasionadas por la rinitis atrófica (Sawata y Kume, 1982; Magyar y cols., 1985). Por otro lado también se detectó una disminución en el peso de los bazo de los ratones infectados y por último, ratones lactantes que fueron inoculados con B. bronchiseptica por vía intracerebral o intravenosa murieron (Eliás, 1982).

## 2.6 Estudios de Inmunidad en Bordetella bronchiseptica

Las bacterinas que se han utilizado 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 una infección con B. bronchiseptica en cerdos vacunados por vía intramuscular, con una

bacterina a base de células completas y sin adyuvante. En estudios posteriores Harris y Switzer (1972) demostraron que reduce la infección nasal en cerdos vacunados subcutáneamente con otra bacterina 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 depender de la inhibición de la adhesión y colonización por la bacteria. Se cuenta con pocos reportes de una infección septicémica, la inhibición de estas infecciones parece ser dependiente de 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 antígeno 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 (Pedersen y Barfod, 1977; Goodnow y cols., 1979; Giles y cols., 1981).

Las células de B. bronchiseptica completas inactivadas, con adyuvante completo de Freund o hidróxido de aluminio, han sido utilizadas exitosamente para inmunizar cuyes contra la muerte, pero no de la bronconeumonía, resultante de una infección natural o inducida en el laboratorio (Little, 1975; Fitzi, 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. pertusis y B. parapertussis. Este anticuerpo protege a ratones de la infección por aerosol 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, intraperitonealmente 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 intraperitonealmente. 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).

### 3. CARACTERISTICAS GENERALES DE Pasteurella multocida

#### 3.1 Morfología

Cuando P. multocida se aísla de los animales que murieron por la infección, se observa como un cocobacilo pequeño, aproximadamente 1.0  $\mu$ m de longitud y 0.5 a 0.8  $\mu$ m 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  $\mu$ m de longitud y 1.0  $\mu$ m de ancho (Buxton y Fraser, 1977; Nicolet, 1985).

Las características bioquímicas que presenta son: O/F - Fermentativo, Catalasa - Positiva, Oxidasa - Positiva, Indol - Positiva, H<sub>2</sub>S - Negativo, Ureasa - Negativo y Citrato - Negativo (Cowan, 1974).

#### 3.2 Antígenos

Las características antigénicas de P. multocida han sido determinadas por estudios inmunológicos empleando pruebas de hemoaglutinación indirecta, de autoaglutinación en presencia de acriflavina y de 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, que corresponden a los antígenos capsulares de Carter como B, A, E y D respectivamente (Roberts,

1947; Carter, 1955; Carter, 1957; Carter y Subronto, 1973; Carter y Rundell, 1975).

Se han estudiado doce tipos de antígenos somáticos denominados 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. Mientras que de origen aviario han sido determinados diez y seis (1-16) tipos somáticos de P. multocida (Heddleston y cols., 1972).

### 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); inoculación intraperitoneal a ratones para estudios de letalidad (Rutter, 1983) o pruebas de toxicidad en cultivos de tejidos (Lastra y Pijoan, 1984). Nakai y cols., (1986), han purificado una toxina DNT(+) a partir de extractos obtenidos por sonicación de P. multocida tipo "D" (cepas SP-72 y 4745a) y de E. 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 E. 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 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, 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, pero ya preformada.

También se ha encontrado en las cepas aviarias una endotoxina (de cepas capsulas y no capsuladas) que se ha relacionado con la virulencia en el Cólera Aviario (Rebers y Heddleston, 1974).

#### 3.4 Material Extracrosomal.

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 d fue la causante de la reacción dermonecrotóxica en la piel de 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 un tamaño de alrededor de 5.2 kb en geles de agarosa, esta banda parece ser responsable de la presencia (DNT) en el plásmido que dió una reacción dermonecrotóxica en la piel de cuye en comparación con la cepa "curada" (tratada con 400 ug de

naranja de acridina), la cual no mostró la presencia de plásmido ni 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 están en el mismo plásmido. En un estudio de Estados Unidos, en donde se aislaron 58 cepas de P. multocida serotipo 3 de pavos, encontraron la presencia de plásmido R, en donde en 7 de estas cepas, se encontró resistencia a estreptomocina, tetraciclinas y sulfonamidas, (Hirsh y cols., 1985). 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 (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).

### 3.5 Importancia de Pasteurella multocida en la Rinitis Atrófica.

Se ha demostrado que las cepas de P. multocida que son importantes en la 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 rinítico se compone en un 80% de P. multocida tipo "D" y un 20% de tipo "A" y mientras que la flora pulmonar del cerdo neumónico es 55% 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 espesa cápsula de ácido hialurónico que las protege de la fagocitosis (Pijoan, 1985). Por otro lado, los macrófagos alveolares no son susceptibles a la acción de la toxina que producen las P. multocida tipo "D" (Pijoan, 1984).

En el caso de la RA, 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 (Pedersen y Barfod, 1981; Martineau, 1982; Runnels, 1982; Rutter y Rojas, 1982). Estudios con cepas toxigénicas de P. multocida inoculadas después de la irritación con ácido acético, han inducido el desarrollo de la rinitis atrófica, asociada con la reabsorción inicial del hueso y con la falla de la 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).

Mediante microscopía electrónica, se ha encontrado la presencia de fimbrias en P. multocida que se han asociado a su patogenicidad, (Comunicación personal 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).

#### 4.0 BIOFISICA DE LAS INFECCIONES RESPIRATORIAS.

##### 4.1 Vías de Entrada.

Es de fundamental importancia la manera en la cual el aparato respiratorio previene la entrada, neutraliza o remueve agentes dañinos que pueden llegar por diferentes vías. Sin embargo, un agente patógeno alcanza el tejido respiratorio principalmente por la vía aerógena y por la vía hematógena, mediante la sangre que llega a los pulmones.

La vía de entrada hematógena ocurre cuando la circulación sanguínea lleva partículas infecciosas al pulmón, pero a pesar de que muchos microorganismos circulantes alcanzan el pulmón, en pocas ocasiones se establece la infección, esto debido a que se necesita que las partículas se fijen al tejido respiratorio y sólo una pequeña fracción (cerca del 1%) de la carga bacteriana es retenida en éste sitio.

La mayoría de las infecciones del aparato respiratorio son por vía aerógena y se originan por partículas en aerosoles que llevan consigo agentes infecciosos (Thomson y Gilka, 1974).

Cuando agentes infecciosos u otras sustancias penetran a los pulmones, encuentran ciertos mecanismos de defensa que previenen su contacto con tejidos vulnerables, y el grado en que éstos mecanismos sean alterados por éstos agentes inhalados, determina el curso de las enfermedades respiratorias. Muchas de las infecciones respiratorias producidas por microorganismos que son inhalados, son a su vez diseminadas por la producción de

partículas conteniendo éstos agentes (aerosoles). Esta diseminación ocurre a través de la tos y el estornudo de animales enfermos y de portadores sanos, los cuales generan aerosoles por éstos mecanismos y esparcen las partículas infecciosas (Mims, 1977), de allí la importancia de los aerosoles en la patogénesis de los problemas respiratorios.

#### 4.2 Aerosoles

La suspensión de partículas en el aire han sido denominadas "aerosoles" y se definen como un sistema de partículas coloidales líquidas o sólidas, suficientemente pequeñas como para tener una disminución lenta de su velocidad y capaces de permanecer estables en el aire por periodos de tiempo relativamente largos (Thomson y Gilka, 1974). Un aerosol puede ser creado por condensación de vapor de agua o por una dispersión de material en partícula. También se generan aerosoles a través del reflejo de la tos, del estornudo, mediante la tos pueden ser expelidas a la atmósfera más de un millón de gotas de un tamaño entre las una y quince micras (Gerone y cols., 1966).

La velocidad del aire en el tracto respiratorio superior es suficientemente elevada para formar aerosoles que pueden ser inspirados o espirados durante la respiración normal, al menos en los animales donde la longitud del aparato respiratorio superior es considerable (Grey y Thomson, 1971).

Las partículas generadas por el tracto respiratorio disminuyen rápidamente de tamaño, a causa de la evaporación, hasta quedar

reducidas a lo que se ha denominado "núcleos de gota", que pueden tener de 0.5 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro; este tamaño permite que puedan permanecer en el aire durante varias horas antes de ser depositadas en el suelo por la fuerza gravitacional (Dunill, 1979).

Experimentalmente pueden crearse aerosoles de distintos tipos, y se han clasificado como: monodispersos, aquellos en los que la mayoría de partículas tienen el mismo tamaño, y polidispersos aquellos que no son homogéneos (Mercer, 1973).

#### **4.3 Inhalación de Partículas**

En la atmósfera se encuentran suspendidas numerosas partículas originadas de diversas fuentes, sus características y concentración en el aire varían continuamente. En el proceso de la respiración la cantidad de aire que penetra a los pulmones es sorprendente, esto unido a la extensa superficie pulmonar y al enorme volumen de aire ambiental cargado de partículas que se inhala constantemente permiten que el aparato respiratorio este expuesto a un gran número de partículas potencialmente patógenas. Esta exposición a diferente tipo de partículas es llevada a cabo también por diferentes especies animales, lo cual ha sido aprovechado para realizar estudios en animales experimentales para conocer la patogénesis de las enfermedades respiratorias. Entre las partículas estudiadas se encuentran: virus, bacterias, hongos, minerales, materiales tóxicos, entre otras. (Green, 1964; Thomson y Gilka, 1974).

#### 4.4 Distribución y mecanismos de depósito de las partículas inhaladas

El lugar donde se depositan las partículas en el aparato respiratorio depende por un lado de las propiedades físicas del material inhalado (tamaño, densidad, forma) y por otro de la profundidad y frecuencia de la respiración. Se ha observado, con respecto al tamaño, que las partículas mayores de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro son retenidas en el aparato respiratorio superior, principalmente en fosas nasales. Partículas menores de 10  $\mu\text{m}$  pero mayores de 5  $\mu\text{m}$  son depositadas en su mayoría en tráquea y bronquios. Las partículas de tamaño entre 2 a 0.5  $\mu\text{m}$  son las que generalmente logran penetrar hasta los alvéolos (Hatch, 1961; Dunnill, 1979).

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 (Dunnill, 1979).

Los mecanismos propuestos para explicar el depósito de partículas en el aparato respiratorio son: impacto o choque, sedimentación y movimiento browniano. La importancia de éstos mecanismos depende del tamaño, forma, densidad, solubilidad, estructura de la superficie y tensión superficial, así como de la velocidad del flujo aéreo y de las características aerodinámicas de las vías respiratorias (Dunnill, 1979), considerándose de mayor importancia el impacto y la sedimentación, ya que el movimiento browniano afecta a partículas menores de 0.1 micras y no es

considerable en el depósito de partículas infecciosas (Dunnill, 1979).

El impacto ocurre primariamente en la nariz y vías 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 sedimentación se produce ha consecuencia de que en el alveolo el flujo de aire disminuye a cero, y las partículas son depositadas por fuerzas gravitacionales. Cuadro No. 1

#### 4.5 Aparatos productores de aerosoles

A partir de la primer descripción sobre aparatos y técnicas de inoculación por aerosol (Stillman, 1923) se han introducido diversos aparatos para el estudio de las infecciones aerógenas (Henderson, 1952), los cuales han sido la base para posteriores modificaciones.

Uno de los modelos básicos y más utilizados es el que consta de una cámara cilíndrica de acrílico (Laurenzi y cols., 1964). En éste sistema el aire era generado por una compresora, el cual pasaba hacia un nebulizador Devilbis que contenía el inóculo bacteriano.

Diversas adaptaciones se han realizado para aerosolizar a grandes especies, así como para controlar las condiciones de aerosolización como son: humedad, temperatura del aire, velocidad de flujo y presión del aire (Beard y Easterday, 1965; Lillie y Thomson, 1972).

CUADRO No. 1

EFFECTO DEL TAMANO DE PARTICULA EN LA  
DISTRIBUCION DE PARTICULAS EN EL  
TRACTO RESPIRATORIO

TAMANO DE PARTICULA	MECANISMO	LUGAR DE DEPOSITO
MAYORES A 10 MICRAS	IMPACTO	APARATO RESPIRATORIO ALTO, FOSAS NASALES, FARINGE Y OCASIONALMENTE ARBOL BRONQUIAL
ENTRE 5 Y 10 MICRAS	IMPACTO	TRAQUEA Y BRONQUIOS (BIFURCACIONES TRAQUEO- BRONQUIALES).
ENTRE 5 Y 0.2 MICRAS	SEDIMENTACION	BRONQUIOS, BRONQUIOLOS Y ALVEOLAS.
MEYORES A 0.1 MICRAS	MOVIMIENTO BROWNIANO	CERCA A BRONQUIOS O PUEDEN SALIR EXPIRADOS.

Cuadro tomado del texto de Dunhill, 1979.

Recientemente se han utilizado nebulizadores ultrasónicos que permiten controlar el tamaño de la partícula y obtener una mayor densidad del aerosol (Saunders y Sebunya, 1983).

## **5. REMOCION BACTERIANA.**

### **5.1 Aerosoles de bacterias**

Uno de los tipos de partículas suspendidas en la atmósfera con mayor importancia biológica es el que integran las bacterias, ya que están distribuidas ampliamente en el medio ambiente y son comúnmente inhaladas. Muchas de éstas bacterias son potencialmente patógenas y su inhalación es determinante en el desarrollo de infecciones del aparato respiratorio.

Los aerosoles de bacterias han sido ampliamente utilizados en investigaciones del aparato respiratorio. Su uso presenta múltiples ventajas sobre otras vías de inoculación, ya que:

a) Asegura una distribución homogénea de las bacterias en el aparato respiratorio.

b) No es necesario el uso de anestésicos para la inoculación.

c) Es posible inocular un gran número de animales simultáneamente.

d) Es el método que más se aproxima a la vía natural de las infecciones del aparato respiratorio. (Martínez y cols. 1986).

La posibilidad de diseminación de una infección bacteriana aerógena, es proporcional a la duración de la bacteria en el aerosol, la cual puede ser afectada por la viabilidad de la misma. Se ha establecido que la viabilidad de las bacterias en aerosoles

disminuye rápidamente debido a diversos factores, tales como: la fase de crecimiento. Se ha encontrado que las bacterias en fase de crecimiento logarítmico son más susceptibles a las influencias ambientales (cambios de humedad relativa y oxígeno) en comparación con las otras fases. La distribución de las bacterias en el aerosol esta relacionada con su concentración, ya que si la concentración del microorganismo en el aerosol es baja, muchas partículas permanecerán libres de bacterias (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 vía aerógena, inducción experimental de neumonía, estudios de la reacción

inflamatoria y respuesta inmune (Lillie y Thomson, 1972; López y cols., 1976; Jericho y Langford, 1977).

## 5.2 Remoción Bacteriana

La remoción bacteriana, es un método "in vivo" que se utiliza para medir la velocidad a la cual, las bacterias inhaladas, desaparecen del tracto respiratorio. Por éste método se puede evaluar la capacidad del pulmón para inactivar las bacterias en él depositadas, puede calcularse el número de microorganismos depositados y los índices de remoción-retención de bacterias a distintos tiempos posexposición. Como desventaja, cabe apuntar que éste método por sí sólo no puede diferenciar que mecanismo de defensa pulmonar, ya sea el aparato mucociliar o el sistema de

fagocitosis, está afectando o actuando y en que proporción (López y cols., 1976; Jones, 1983).

Los factores que se supone determinan la remoción de bacterias y con ello el establecimiento de la infección o por el contrario la eliminación bacteriana son: concentración y volúmen del inóculo, virulencia de la bacteria, el estado de los mecanismos de defensa y del huésped en general (Green, 1978; Nugent y Pesanti, 1982).

# OBJETIVOS

## II. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un modelo experimental en ratón para determinar la interacción de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida en la producción de la Rinitis Atrófica.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer, si el método de aerosolización de bacterias es efectivo en un modelo experimental con ratones de 21 días, para desarrollar la Rinitis Atrófica.
2. Determinar el patrón de remoción de Bordetella bronchiseptica y de Pasteurella multocida en Cornete y Pulmón de ratón de 21 días.
3. Relacionar el daño histopatológico producido en la Rinitis Atrófica con el estudio de Remoción Bacteriana.
4. Analizar la interacción de Bordetella bronchiseptica y de Pasteurella multocida en el desarrollo de la enfermedad.

# MATERIAL Y METODO

### III. MATERIAL Y METODOS

#### 1. Cepas Bacterianas.

Las cepas de B. bronchiseptica y P. multocida, previamente aisladas de casos clínicos y mantenidas en sangre, se sembraron en agar Mc Conkey al 1% de glucosa y en agar gelosa sangre (5% de sangre de bovino v/v), incubándose posteriormente en aerobiosis a 37 C. A las 18 horas, se observaron las características morfológicas de las diferentes colonias aisladas y se subcultivaron en nuevas placas de agar Mc Conkey y agar sangre (Cowan y Steell, 1974). Una vez aisladas las bacterias se prosiguió a realizar las pruebas bioquímicas correspondientes para la identificación de las mismas.

#### 2. Identificación por Pruebas Bioquímicas

En relación a lo publicado por diversos autores, se determinó que las pruebas bioquímicas para la identificación de las especies de Pasteurella y Bordetella deberían incluir: Tinción de Gram, oxidasa, catalasa, oxidación-fermentación, motilidad, crecimiento en agar Mc Conkey, hemólisis en agar sangre al 3%, indol, ureasa, producción de H<sub>2</sub>S, producción de ácido a partir de glucosa, sacarosa, manitol, rafinosa, trehalosa y arabinosa. (Mc Allister y Carter, 1974; Cowan y Steell, 1974; Carter, 1975; Simmons y Simpson, 1977; Thigpen y cols., 1978).

### **3.0 Pruebas Biológicas para la Determinación de la Dermonecrotoxina**

#### **3.1 Producción de la Exotoxina Dermonecrotóxica (DNT)**

Se cultivaron las bacterias en caldo del Infusión Cerebro Corazón (BHI), a 37 C durante 18 horas. Transcurrido éste tiempo el líquido se centrifugó a 3000 x g durante 45 minutos, el sobrenadante obtenido se filtró con membrana millipore de 0.45 micras de diámetro, para su posterior utilización (De Jong y cols., 1980).

#### **3.2 Necrosis en Piel de Cuye**

Los cuyes se rasuraron en la región dorsal, dividiendo el área en seis regiones, en las que se inocularon por vía intradérmica 0.1 ml del sobrenadante filtrado. Se realizaron observaciones de la reacción obtenida a las 24, y 48 horas pos-inoculación, con el fin de evaluar los siguientes parámetros: eritema, edema, induración y necrosis. Considerando como reacciones eritematosas positivas a aquellas en las que el endurecimiento fuera de 1 cm de diámetro y tomándo como dudosas aquellas que dieron de 0.5 cm de diámetro (De Jong, 1980).

#### **3.3 Letalidad en Ratón Lactante**

Ratones lactantes de aproximadamente 3 días de edad, fueron inoculados con 0.1 ml de los líquidos sobrenadantes de las bacterias. Inoculando con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 a un grupo control. Se realizaron observaciones a las 18-24

horas, considerando como reacción positiva la muerte de los ratones inoculados con el líquido sobrenadante (Nakai y cols., 1984).

#### **3.4 Atrofia de Bazo de Ratón**

Un grupo de ratones fueron inoculados vía intraperitoneal con 0.1 ml del sobrenadante bacteriano filtrado. Después de 7 días de la inoculación, los ratones fueron sacrificados, se extrajo el bazo y se midió. Los bazos que presentaban un 25 % de reducción en el tamaño (atrofia), se consideraron como positivos a ésta prueba (Nakai y cols., 1984).

#### **4. Patrón de Remoción de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida en ratones.**

##### **4.1. Cámara de aerosolización**

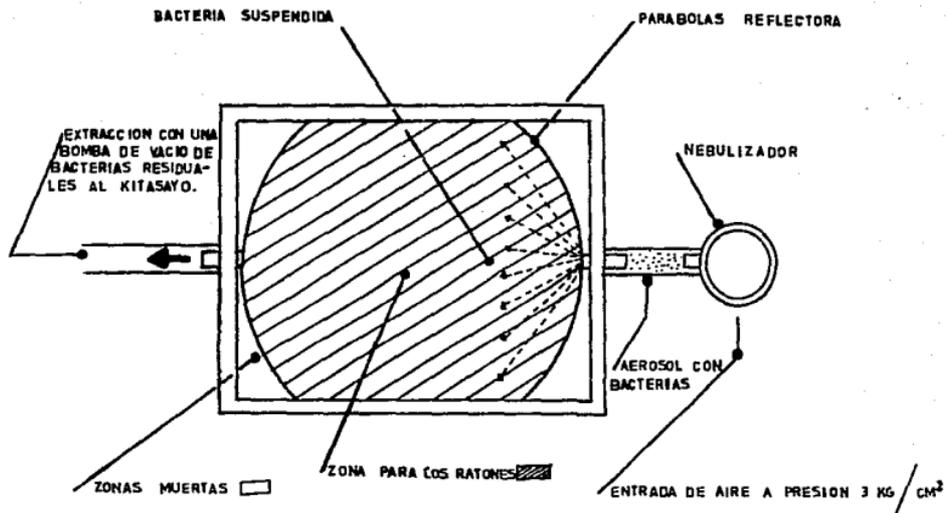
Para la infección por aerolización de los ratones se empleó una cámara rectangular de metal, herméticamente sellada, cuyas dimensiones están especificadas en la Figura No. 1. La cámara esta formada de una tapa de cristal con sello de neopreno, un nebulizador (Devilbis Mod 645) conectado a una perforación lateral por medio de tuberías de látex para entrada y salida del aerosol, rejillas para prevenir accidentes con los ratones y baffles deflectores parabólicos en las esquinas que evitan la acumulación del aerosol en estos lugares. En la parte de salida del aerosol va conectado un matraz kitasato con formaldehído al 10% para

**FIGURA No. 1 Cámara de aerosolización**

**Vista del Plano de la Cámara de aerosolización empleada para el desafío de los ratones con B. bronchiseptica y P. multocida.**

**( Cámara modificada por López y cols., 1976 )**

FIGURA No. 1  
CAMARA DE AEROSOLIZACION.



37

ESCALA: 1:4

inactivar a las bacterias. El flujo de aire para la producción del aerosol se generó con una bomba compresora (Mod B-131 Industria G, Murgía, S. A.) Ajustada a 14.3 PSI 3 kg/cm. Se empleó una bomba de vacío a 3 kg/cm para aliviar la presión generada en la cámara y propiciar la extracción de las bacterias.

#### 4.2 Evaluación y Estandarización del Sistema

La evaluación y estandarización del sistema fue efectuado con anterioridad por Mendoza y cols. (1988) para efectuar un estudios de remoción bacteriana con B. bronchiseptica.

#### 4.3 Animales

Se utilizaron 80 ratones machos de 9 a 14 g de peso mayores de 21 días de edad, cepa NIH-3 obtenidos del bioterio del INIFAP (Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias). De forma aleatoria se formaron 4 grupos de 20 ratones cada uno para efectuar la infección con las bacterias. Los ratones de cada grupo se instalaron en jaulas independientes con agua y comida "ad libitum".

#### 4.4 Preparación del Inóculo

Con un asa metálica se tomarón 5 colonias de la cepa de B. bronchiseptica previamente desarrollada en gelosa sangre, y se inoculó un matraz nefelométrico que contenía 50 ml de caldo BHI. Este se cultivó en agitación a 37 C y 120 rpm, hasta fase estacionaria determinada por nefelometría a 660 nm en un

espectrofotómetro. En la fase estacionaria, el contenido del matraz se centrifugó durante 45 min a 3500 x g. El paquete bacteriano fue lavado dos veces con PBS (Solución amortiguadora de fosfatos) pH=7.2, en el que finalmente se resuspendieron las bacterias para obtener una concentración final de  $5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colonia por ml (UFC/ml).

Procediendo de igual forma para la preparación del inóculo de P. multocida, el cual quedó ajustado a la misma concentración que el de B. bronchiseptica

**5. Estudio de la Infección de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida en ratones por medio de aerosoles.**

**5.1. Aerosolización**

De las suspensiones bacterianas ajustadas y lavadas, se tomaron 5 ml con los que se aerosolizaron los ratones de los diferentes grupos experimentales. Después de 10 min. de nebulización, los animales se sacaron de la cámara y se pusieron en sus cajas con agua y comida. Se formó un grupo de 20 ratones de las mismas características que fueron aerolizados con medio de cultivo estéril (caldo BHI), bajo las mismas constantes ( $t=10$  min. y  $C= 5$  ml.). De igual forma los ratones fueron sacados de la cámara y puestos en su caja correspondiente.

De ésta manera los grupos que se formaron se inocularon con las bacterias de la siguiente manera:

- GRUPO I.** Grupo Control nebulizado con caldo BHI estéril.
- GRUPO II.** Grupo nebulizado con B. bronchiseptica.
- GRUPO III.** Grupo nebulizado con P. multocida.
- GRUPO IV.** Grupo Experimental. Nebulizado con B. bronchiseptica y P. multocida.

Es importante señalar, que a los ratones del grupo IV se les administró B. bronchiseptica previamente (4 días antes) a la aerosolización P. multocida. (Cuadro No.2)

### **5.2 Estudio de remoción en cornete nasal.**

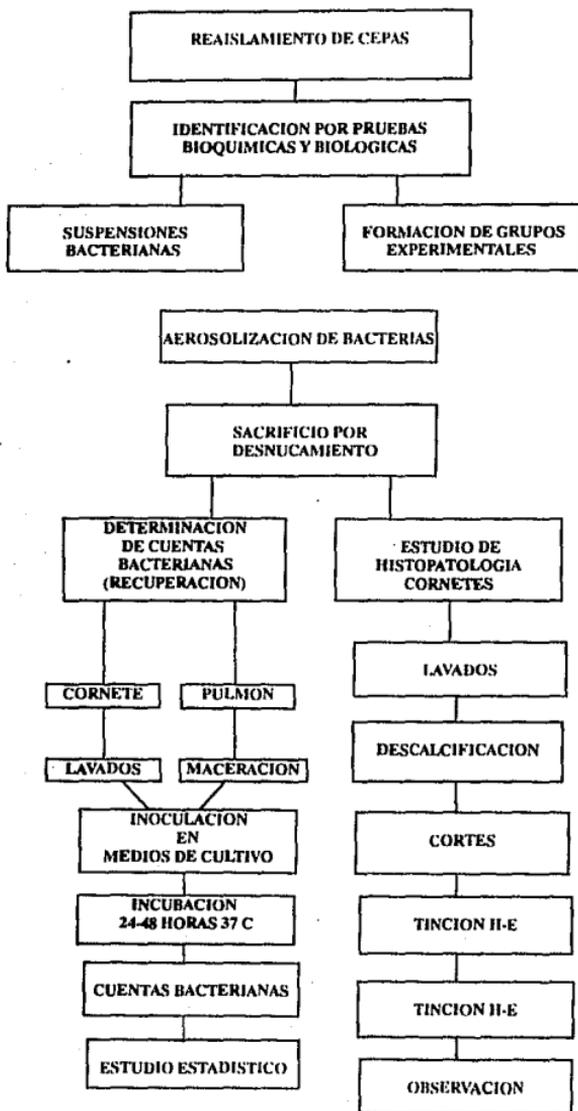
De los 20 ratones de cada grupo se seleccionaron 2 los días 0, 2, 4, 8 y 16 post-inoculación de las bacterias y se sacrificaron, extirpándoles posteriormente los cornetes nasales. Sosteniendo los cornetes con unas pinzas estériles, se lavaron con 1 ml de Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) contenido en una jeringa de 1 ml. Del lavado se realizaron diluciones en base 10 con solución de PBS hasta la dilución  $10^{10}$ .

De cada dilución se sembraron 3 gotas de 10 ul/gota, en placas de agar BHI y agar Mc Conkey, que se incubaron durante 18 horas a 37°C, y se calculó el número de Unidades Formadoras de Colonia por cornete (UFC/órgano).

### **5.3 Estudio de remoción bacteriana en Pulmón**

A los mismos ratones sacrificados los días 0, 2, 4, 8 y 16 post-inoculación de las bacterias, se les extrajo el pulmón, el

CUADRO No. 2 DIAGRAMA DE TRABAJO EXPERIMENTAL



cual fue macerado en morteros Tenbroeck con 5 ml de solución PBS. Una vez que se maceró completamente el tejido se colocó la muestra en un tubo, y de dicha solución se realizaron diluciones en base 10 hasta  $10^6$  con solución de PBS. De cada dilución se sembraron 3 gotas de 10 ul/gota, en placas de agar BHI y agar Mc Conkey, que se incubaron durante 18 horas a 37 C, para que una vez crecidas las bacterias obtener las UFC/órgano.

#### 5.4 Estudio Histopatológico

Dos de los ratones de cada grupo, se sacrificaron los días 0, 2, 4, 8 y 16 post-inoculación y se sacrificaron para el estudio histopatológico de los cornetes nasales.

Una vez cortados los cornetes se conservaron en formaldehído al 10% en solución de PBS durante dos semanas. Después de lavarlos de 4 a 6 veces con agua de la llave, se descalcificaron en solución LORCH (Acido cítrico, NaOH 0.2 N, HCl 0.1 N, ZnSO<sub>4</sub> 1% y CHCl<sub>3</sub> 0.1%), la que se cambiaba cada tercer día durante tres semanas. Los cornetes descalcificados se incluyeron en parafina y se procedió a realizar cortes de 6 um, los cuales se tificaron con hematoxilina-eosina.

Para catalogar el grado de atrofia, hemorragia, inflamación, remoción periostal y adelgazamiento del hueso se estableció un sistema de puntuación por cruces.

Es importante señalar que los cortes de los cornetes se hicieron barajados y la evaluación de las lesiones se realizó a ciegas.

### **5.5 Análisis de los Datos**

Para efectuar el análisis de los datos obtenidos se empleó la técnica de Análisis de Varianza (ANDEVA), utilizando un diseño Factorial con tres factores que fueron las variables Tiempo (Días post-inoculación), Organo (Cornete y Pulmón) y Grupo Experimental. Las comparaciones de medias se realizaron por Contrastes Lineales.

# RESULTADOS

#### IV. RESULTADOS

##### 1. Identificación Bacteriana y Dermonecrototoxicidad

Las bacterias utilizadas en la experimentación fueron identificadas como Pasteurella multocida tipo "D" y Bordetella bronchiseptica, ya que las pruebas realizadas para su identificación mostraron el resultado esperado. Por otra parte, en ambas bacterias se confirmó ser dermonecrotóxicas, ya que produjeron lesiones tales como: la muerte de ratón lactante, atrofia de bazo en ratones, observada como disminución del tamaño del mismo y endurecimiento y necrosis en piel de cuya.

##### 2. Resultados de la Remoción Bacteriana en Cornete y Pulmón.

Los resultados de las cuentas bacterianas de los diferentes grupos experimentales, se muestran en el Cuadro No. 3. En dicho cuadro se encuentran los valores pares de las UFC/órgano recuperadas de ambas bacterias para cada grupo experimental por día de determinación, de acuerdo a las características del desafío. Estos valores se utilizaron para comparar las cinéticas de remoción de B. bronchiseptica y P. multocida tanto en cornete como en pulmón, y para determinar el efecto de la presencia de B. bronchiseptica sobre la remoción de P. multocida, en los mismos órganos.

CUADRO No. 3

RESULTADO DE LAS CUENTAS BACTERIANAS EN UFC/ORGANO DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES. MUESTRAS PARES.

CORNETE

GRUPO EXPERIMENTAL	DIAS POST-INOCULACION				
	0	2	4	8	16
GRUPO II B. bronchiseptica	3.93305 3.18488	11.33232	3.95726	4.32732	3.83249
GRUPO III P. multocida	4.38437 3.99145	2.83288	4.26594	3.31738	3.68983
GRUPO IV EXPERIMENTAL B. bronchiseptica	4.05331 3.63615	18.7463	3.32288	3.26181	3.43215
GRUPO IV EXPERIMENTAL P. multocida	4.14315 3.42332	3.31954	3.33932	3.38785	4.25846

PULMON

GRUPO EXPERIMENTAL	DIAS POST-INOCULACION				
	0	2	4	8	16
GRUPO II B. bronchiseptica	4.40112 4.41101	12.35828	3.82278	4.82284	3.29747
GRUPO III P. multocida	3.89626 3.78819	3.66673	4.35682	3.36678	3.89684
GRUPO IV EXPERIMENTAL B. bronchiseptica	4.84834 4.94838	18.81323	4.32223	3.81841	4.84802
GRUPO IV EXPERIMENTAL P. multocida	3.83276 3.83488	3.84256	3.84319	3.32676	3.89888

NOTA: EL GRUPO EXPERIMENTAL FUE INOCULADO CON B. bronchiseptica Y POSTERIORMENTE CON P. multocida.

## 2.1 Comparación de la Remoción de Pasteurella multocida y de Bordetella bronchiseptica.

Los resultados del comportamiento de las bacterias cuando fueron inoculadas independientemente se muestra en el Cuadro 4.

Las curvas correspondientes para Cornete y Pulmón se muestran en las Figuras 2 y 3, en las cuales puede observarse que en cornete B. bronchiseptica muestra 2 fases. La primera de multiplicación bacteriana y la segunda que corresponde a una fase estacionaria. Por el contrario, P. multocida muestra en la primera fase una remoción y posteriormente sufre un ligero aumento para mantenerse constante en la última fase.

En pulmón, B. bronchiseptica sufre 3 fases que son: 1) de crecimiento, 2) de remoción y 3) estacionaria. Mientras que P. multocida muestra un comportamiento similar al de cornete.

El análisis de los resultados (Cuadro 5), indicó que hay una interacción entre las bacterias y los días significativa. Las comparaciones de medias posteriores al revelaron que no existe diferencia entre las cuentas bacterianas de B. bronchiseptica entre los días 0, 4, 8 y 16 y que sólo existe diferencia entre las cuentas de Bordetella el día 2 post- inoculación con respecto a los demás días. En relación a las cuentas de P. multocida existe diferencia significativa los días 2 y 8 post-inoculación ( $p < 0.05$ ), en donde se encuentran el punto mínimo y máximo de la curva. También se encontró diferencia significativa entre órgano, ya que la cuenta bacteriana en pulmón es mayor que en

CUADRO No. 4

RESULTADOS DE LA REMOCION DE *P. multocida*  
Y DE *B. bronchiseptica* EN CORNETE Y PULMON  
DE RATON. EXPRESADO COMO UFC/ORGANO.

ORGANO	GRUPO EXPERIMENTAL	DIAS POST-INOCULACION				
		0	2	4	6	16
CORNETE	GRUPO II <i>B. bronchiseptica</i>	4. 01680 s= 0. 00642	11. 47021 0. 216311	0. 05321 0. 05404	0. 21392 0. 13472	0. 01733 0. 21607
	GRUPO III <i>P. multocida</i>	4. 33721 s= 0. 32643	3. 20670 0. 20670	0. 52311 0. 52311	0. 14585 0. 14585	0. 24473 0. 24473
PULMON	GRUPO II <i>B. bronchiseptica</i>	4. 40606 s= 0. 00494	11. 66806 0. 009615	0. 01762 0. 29585	0. 02792 0. 20168	0. 40935 0. 26904
	GRUPO III <i>P. multocida</i>	4. 60221 s= 0. 49464	4. 13327 0. 53340	7. 32235 0. 04441	0. 40244 0. 13666	0. 40935 0. 40936

s = SIGNIFICA LA DESVIACION QUE EXISTE ENTRE LOS VALORES DE LAS MISMAS PARES.

CUADRO No. 5

ANALISIS ESTADISTICO  
 COMPORTAMIENTO DE LAS BACTERIAS  
 INOCULADAS INDEPENDIENTEMENTE.

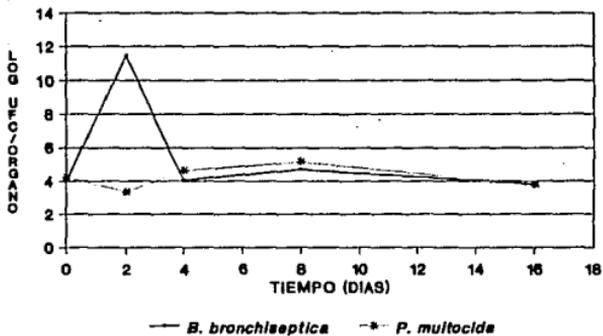
FUENTE DE VARIACION	g.l	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR F	SIGNIFICANCIA
DIAS	4	61.899	15.474	43.75	S
ORGANO	1	4.475	4.475	12.65	S
BACTERIA	1	17.898	17.898	48.33	S
DIAS x ORGANO	4	3.539	0.884	2.58	N.S
DIAS x BACTERIA	4	187.778	26.944	76.19	S
ORGANO x BACTERIA	1	0.389	0.389	0.98	N.S
D x O x B	4	1.394	0.348	0.99	N.S
ERRORES	28				

D x O x B = EFECTO DE INTERACCION ENTRE LOS DIAS, EL ORGANO Y LAS BACTERIAS INOCULADAS.

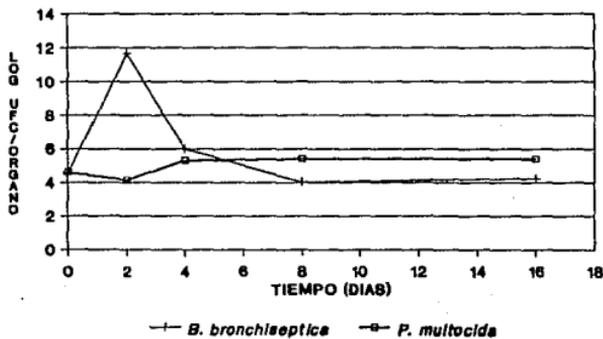
S = EFECTO SIGNIFICATIVO.

N.S = EFECTO NO SIGNIFICATIVO.

**FIGURA 2**  
**REMOCION BACTERIANA**  
*B. bronchiseptica* y *P. multocida*  
**EN CORNETE**



**FIGURA 3**  
**REMOCION BACTERIANA**  
*B. bronchiseptica* y *P. multocida*  
**EN PULMON**



cornete, en donde la diferencia media es igual a  $27 \pm 2$  UFC ( $p < 0.05$ ), independientemente de la bacteria o el día post-inoculación.

## 2.2 Efecto de Pasteurella multocida sobre la remoción de Bordetella bronchiseptica.

En éste análisis, se comparó la cuenta bacteriana de B. bronchiseptica del grupo inoculado con B. bronchiseptica exclusivamente y el grupo inoculado con ambas bacterias (B. bronchiseptica y P. multocida). En éste caso, se obtuvieron los resultados que se muestran en el Cuadro No. 6.

En la Figura 4, se observa el comportamiento de éstos datos, y en la cual se hace evidente que en cornete el día 8 post-inoculación existe una diferencia entre las cuentas bacterianas de éstos grupos, ya que las UFC de B. bronchiseptica disminuyen en el grupo inoculado con ambas bacterias en comparación con el grupo inoculado con la bacteria exclusivamente, este comportamiento no se observa el día 4 y 16 post-inoculación.

Mientras que en pulmón existe diferencia el día 4 post-inoculación, la cual está determinada por el comportamiento de las bacterias del día anterior (día 2 post-inoculación), en donde las cuentas en pulmón fueron más elevadas que en cornete.

El análisis estadístico reveló un efecto significativo de interacción de los tres factores (Bacteria, Organo y Tiempo) es decir, las diferencias entre los grupos dependen del órgano de que se trate y de los días post-inoculación. (Cuadro No. 7).

CUADRO No. 6

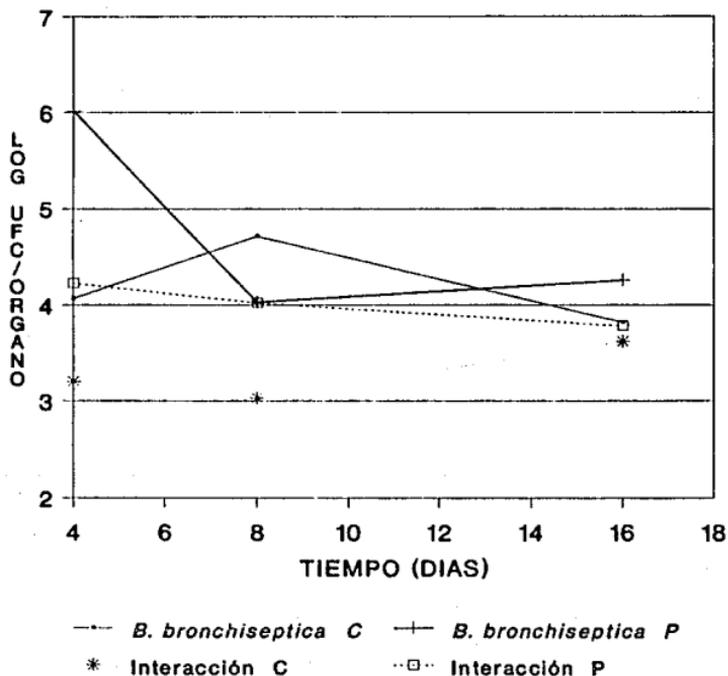
RESULTADOS DE REMOCION BACTERIANA  
EN UFC/ORGANO.

EFFECTO DE *P. multocida* SOBRE LA  
REMOCION DE *E. bronchiseptica*.

ORGANO	GRUPOS EXPERIMENTALES	DIAS POST-INOCULACION		
		4	8	16
CORNEA	GRUPO II <i>E. bronchiseptica</i>	4.06321 s=0.09464	4.71335 0.13476	3.91733 0.21689
	GRUPO IV <i>E. bronchiseptica</i> y <i>P. multocida</i>	3.22988 s=0.29100	3.93285 0.19283	3.51856 0.51856
PULMON	GRUPO II <i>E. bronchiseptica</i>	5.94763 s=0.25563	4.98772 0.28768	3.29733 0.29733
	GRUPO III <i>E. bronchiseptica</i> y <i>P. multocida</i>	4.33482 s=0.38238	4.92858 0.28768	3.78121 0.78121

s= SIGNIFICA LA DESVIACION QUE EXISTE ENTRE LOS DOS VALORES DE  
UFC ENTRE LAS MUESTRAS PARES.

**FIGURA 4**  
**INTERACCION DE *B. bronchiseptica***  
**CON *P. multocida***



C= Cornete  
P= Pulmón

Las pruebas posteriores realizadas para comparar las medias indicaron:

En el día 4 post-inoculación de B. bronchiseptica (día de inoculación de P. multocida), no se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos, en las cuentas bacterianas en cornete, ya que la cuenta del grupo inoculado con ambas bacterias disminuye ligeramente en comparación con la cuenta del grupo que se inculó con B. bronchiseptica sola.

Este comportamiento no se observa en pulmón, ya que la comparación de medias indicó una diferencia significativa en el grupo inoculado con las dos bacterias, esta diferencia se debe a que cuentas bacterianas son más altas ( $p < 0.05$ ) en este grupo en comparación con el grupo inoculado con Bordetella bronchiseptica sola.

El día 8 post-inoculación, se encontró una diferencia significativa entre las UFC de los dos grupos en cornete, ya que la cuenta bacteriana del grupo inoculado con B. bronchiseptica sola, fué más alta ( $p < 0.05$ ) en comparación con las UFC del grupo inoculado con B. bronchiseptica y P. multocida. Este comportamiento no se observó en pulmón, en donde no hubo diferencia significativa entre ambos grupos. (Figura 4).

Por último el día 16 post-inoculación de B. bronchiseptica se encontró que ambos grupos tenían cuentas bacterianas semejantes, es decir, no se encontró diferencia significativa entre grupos, observando el mismo comportamiento en cornete y en pulmón.

CUADRO No. 7

ANALISIS ESTADISTICO  
 COMPARACION DEL COMPORTAMIENTO DE  
B. bronchiseptica EN PRESENCIA DE  
P. multocida

FUENTE DE VARIACION	g.l	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR F	SIGNIFICANCIA
DIAS	2	1.1975	0.5988	3.62	N.S
ORGANO	1	2.5126	2.5126	15.28	S
BACTERIA	1	4.2898	4.2898	25.47	S
DIAS * ORGANO	2	2.1345	1.0672	6.46	S
DIAS * BACTERIA	2	0.9839	0.4919	2.98	N.S
ORGANO * BACTERIA	1	0.8365	0.8364	0.22	N.S
D * O * B	2	1.8395	0.9197	5.57	S
ERROR	12				

D \* O \* B = EFECTO DE INTERACCION ENTRE LOS DIAS, LOS ORGANOS INVOLUCRADOS Y LAS BACTERIAS INOCULADAS.

S = EFECTO SIGNIFICATIVO.

N.S = EFECTO NO SIGNIFICATIVO.

### 2.3 Efecto de Bordetella bronchiseptica en la remoción de Pasteurella multocida.

Por último, se analizaron los resultados obtenidos de las cuentas de P. multocida, del grupo inoculado con P. multocida sola y del grupo inoculado con B. bronchiseptica y P. multocida. Los resultados que se obtuvieron se muestran en el Cuadro 8.

En éstos grupos, se encontró un efecto significativo del factor órgano y de la interacción Bacteria - Día. (Cuadro 9).

Las pruebas posteriores al análisis estadístico revelaron lo siguiente:

La cuenta bacteriana en pulmón es mayor que en cornete (Diferencia Media = 9 +/- 2), independientemente de que P. multocida este sola o combinada con B. bronchiseptica y del tiempo transcurrido desde la inoculación.

En el día 2 post-inoculación de P. multocida el número de UFC es mayor ( $p < 0.05$ ) en el grupo donde había sido inoculada previamente B. bronchiseptica en comparación con el grupo donde se inoculó P. multocida sola.

Por último, no hubo diferencia significativa entre los grupos experimentales ningún otro día post-inoculación.

Estos acontecimientos pueden observarse claramente en la Figura 5, en donde se encuentra el comportamiento general de éstos grupos experimentales y en la cual se hace evidente el aumento en las UFC de P. multocida en cornete, en el grupo al que previamente se le inoculó B. bronchiseptica. Este aumento es más observable el día 2 postinoculación de las bacterias.

CUADRO No. 8

RESULTADOS DE LA REMOCION BACTERIANA  
EXPRESADA COMO UFC/ORGANO.

EFECTO DE *B. bronchiseptica* SOBRE LA  
REMOCION DE *P. multocida*.

ORGANO	GRUPO EXPERIMENTAL	DIAS POST-INOCLUACION				
		0	2	4	8	16
CORNETE	GRUPO III <i>P. multocida</i>	4.23271 s= 0.26646	3.22670 0.68618	4.63114 0.36537	5.14595 0.21557	3.74473 0.13678
	GRUPO IV <i>B. bronchiseptica</i> y <i>P. multocida</i>	3.89318 s= 0.23996	5.17198 0.86144	4.88718 0.25636	5.13755 0.23068	4.14950 0.18181
PULMON	GRUPO III <i>P. multocida</i>	4.60221 s= 0.49484	4.13327 0.53349	5.32295 1.04410	3.48144 0.13666	3.48195 0.48338
	GRUPO IV <i>B. bronchiseptica</i> y <i>P. multocida</i>	4.94378 s= 1.10898	5.24567 0.19610	5.18754 0.18444	4.54328 0.27248	3.51442 0.28256

s = SIGNIFICA LA DESVIACION QUE EXISTE ENTRE LOS VALORES DE LAS MUESTRAS PARES.

CUADRO No. 9

ANALISIS ESTADISTICO  
 COMPARACION DEL COMPORTAMIENTO  
 DE P. multocida EN PRESENCIA  
 DE B. bronchiseptica.

FUENTE DE VARIACION	g.l	SUMA DE CUADRADOS	MEDIA DE CUADRADOS	VALOR F	SIGNIFICANCIA
DIAS	4	4.7165	1.1791	2.78	N.S
ORGANO	1	2.2563	2.2563	5.16	S
BACTERIA	1	0.2158	0.2158	0.49	N.S
DIAS * ORGANO	4	0.5974	0.1493	0.34	N.S
DIAS * BACTERIA	4	5.4788	1.3675	3.13	S
ORGANO * BACTERIA	1	1.3686	1.3686	3.13	S
D * O * B	4	2.3858	0.5764	1.32	N.S
ERROR	28				

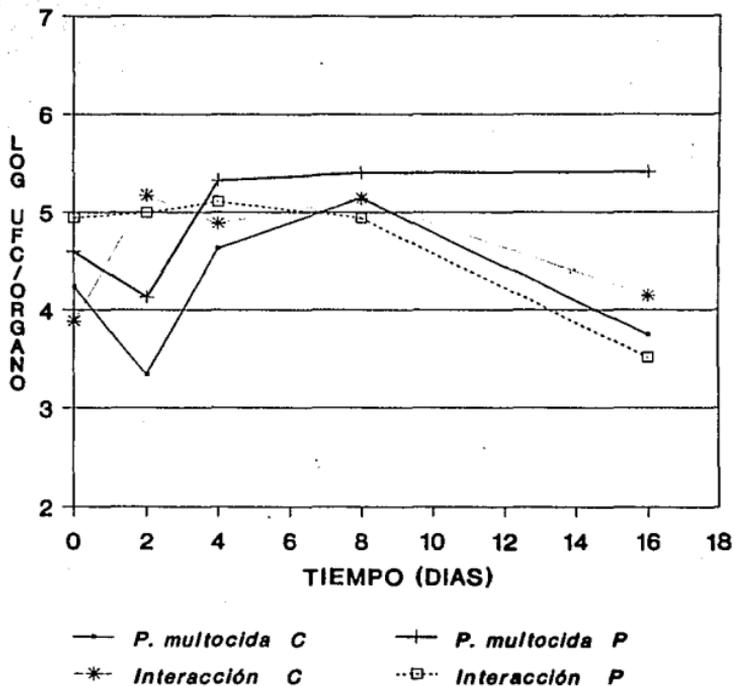
D \* O \* B = EFECTO DE INTERACCION ENTRE LOS DIAS DE EXPERIMENTACION, LOS ORGANOS INVOLUCRADOS Y LAS BACTERIAS INOCULADAS.

S = EFECTO SIGNIFICATIVO.

N.S = EFECTO NO SIGNIFICATIVO.

También se observa en ésta figura, que para el día 16 postinoculación de las bacterias, las cuentas son más bajas en cornete para ambos grupos y en pulmón para el grupo de interacción, y aunque este efecto no es significativo, podría aparecer como un efecto de remoción. No ocurriendo así en pulmón en el grupo inoculado con P. multocida sola, en donde se observa que las UFC se mantienen a partir del día 4 post-inoculación.

**FIGURA 5**  
**INTERACCION DE *P. multocida***  
**CON *B. bronchiseptica***  
**EN CORNETE Y PULMON**



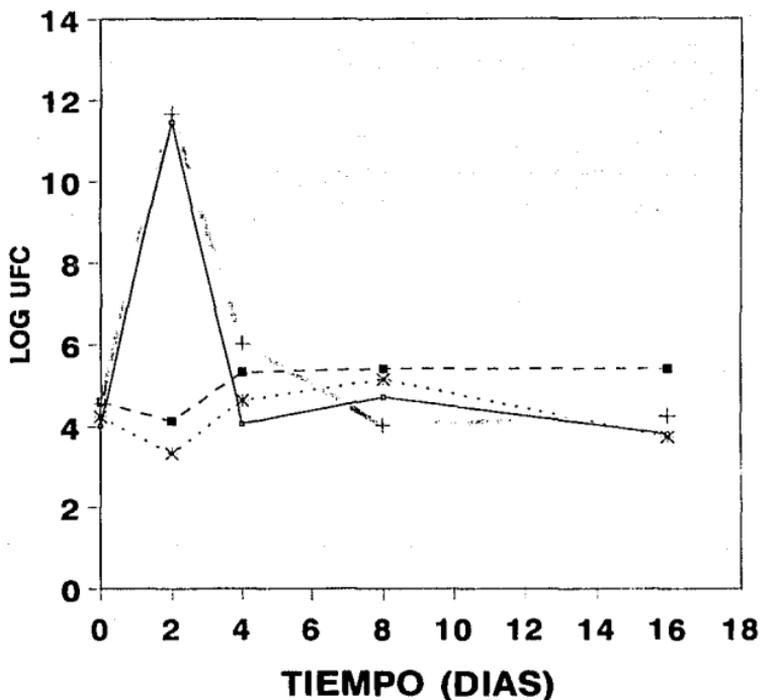
C= Cornete  
P= Pulmón

La Figura 6, muestra el comportamiento de E. bronchiseptica y de P. multocida cuando fueron inoculadas individualmente a los ratones. Se puede observar el comportamiento que se presentó tanto en cornete como en pulmón.

La Figura 7, muestra el comportamiento de las bacterias en cornete, en donde se pueden apreciar las diferencias entre la inoculación con las bacterias solas y la interacción de ambas bacterias.

En la Figura 8, se observa el comportamiento de los mismos grupos experimentales en el Pulmón.

**FIGURA 6. REMOCION BACTERIANA  
*B. bronchiseptica* Y *P. multocida*  
 EN CORNETE Y PULMON.**



—○— *B. bronchiseptica* C    + *B. bronchiseptica* P  
 ···· *P. multocida* C        -·-· *P. multocida* P

C= Cornete  
 P= Pulmon

FIGURA 7  
 INTERACCION DE *B. bronchiseptica*  
 Y *P. multocida* EN CORNETE.

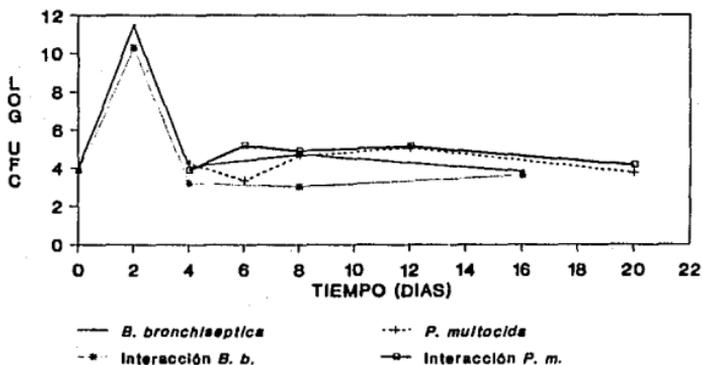
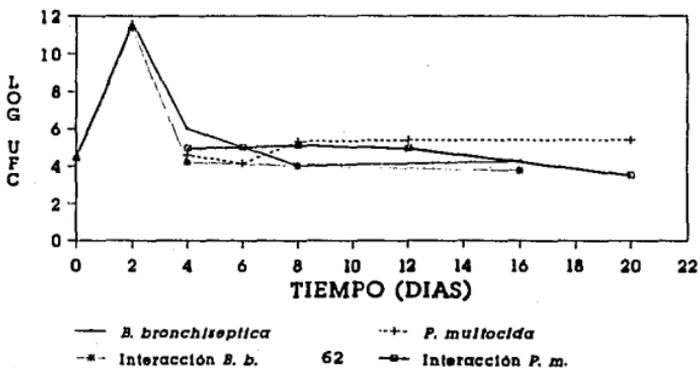


FIGURA 8  
 INTERACCION DE *B. bronchiseptica*  
 Y *P. multocida* EN PULMON.



### 3. Resultados del Estudio Histopatológico

Los resultados de éste estudio revelaron que la infección de los ratones con éstas bacterias propició daños a nivel de cornete nasal, los cuales se produjeron tanto en los grupos con las bacterias solas (Grupos II y III) como en el grupo experimental, en el que se inocularon ambas bacterias.

En el grupo control inoculado con caldo BHI estéril, no se encontró lesión alguna, observando las estructuras intactas, es decir en la mucosa se observa el epitelio cilial y la lámina propia íntegros y el hueso se encuentra sin lesión.

En el grupo II aerosolizado con B. bronchiseptica se encontraron lesiones a partir del segundo día post- inoculación, para posteriormente disminuir hasta que el día 16, las lesiones fueron mínimas. En éste grupo se encontró: inflamación de periosteo, remoción de periosteo, atrofia del hueso (el día 4 post-inoculación), osteoblastos y calcificación del tabique. Estos elementos disminuyeron al transcurrir el tiempo. En el cuadro No. 11, puede observar la forma y progresividad en que fueron presentándose las lesiones.

En el grupo III aerosolizado con P. multocida también se pudieron observar lesiones representativas de Rinitis Atrófica aunque en menor grado. Las lesiones observadas al contrario de las ocasionadas por B. bronchiseptica se encontraron más acentuadas los días 8 y 16 post-infección. Los elementos indicativos de daño que se encontraron fueron: congestión y hemorragia, remoción de periosteo, osteoblastos, atrofia de hueso y calcificación del

tabique nasal. En éste grupo resultaron más afectados los animales del día 4 y 8 post-inoculación ya que se presentó necrosis del tejido.

En el grupo IV aerosolizado con B. bronchiseptica y posteriormente con P. multocida se encontraron lesiones más severas indicativas de la enfermedad. Dichas lesiones se observaron desde el día 2 post-infección y se acentuaron al transcurrir el tiempo, observándose mayor daño los días 8 y 16 post-inoculación.

Un aspecto importante en éste grupo fue que se presentaron lesiones permanentes durante todo el proceso experimental y los elementos indicativos de la enfermedad fueron más severos, encontrando lesiones, tales como: necrosis (en la mayoría de los cornetes), inflamación con la subsecuente infiltración celular por células mononucleadas y por polimorfonucleares, remoción de periosteo, proliferación de osteoblastos y marcada atrofia de hueso.

Es importante señalar, que en éste grupo el día 4 post-inoculación de B. bronchiseptica (día de inoculación de P. multocida) se observó ligera calcificación del tabique, sin embargo, el día 8 post-inoculación ya no se hizo evidente, debido a la inoculación de P. multocida.

También en éste grupo se encontró además de la intensidad de las lesiones un mayor número de animales resultaron afectados en comparación con los otros grupos. (Cuadro 10).

## CUADRO No. 10

RESULTADOS DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO REALIZADO A LOS CORNETES DE  
DE LOS DATONES DE LOS DIFERENTES GRUPOS EXPERIMENTALES.

GRUPO Y DÍA	CONGESTION Y HEMORRAGIA	INFLAMACION DE PERIOSTO	RENOCION DE PERIOSTO	OSTEOLASTOS	ATROFIA DE HUESO	CALCIFICAC. DE TABIQUE	OBSERVA- CION
<b>GRUPO II <u>Bordetella bronchiseptica.</u></b>							
8	+	-	-	-	-	-	AFECTADO.
2	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	
4	+	+	+	-	++	+	
8	+	-	-	+	-	-	
15	-	-	+/-	+	+/-	-	
<b>GRUPO III <u>Pasteurella multocida</u></b>							
0	+	-	-	-	-	-	NECROSIS NECROSIS
2	+	-	-	+	-	-	
4	+	-	+	+	+	+	
8	N.O	-	+	N.O	+	+	
15	N.O	-	+	N.O	+	+	
<b>GRUPO IV Grupo Experimental de Interaccion.</b>							
8	+	+	+	-	+	-	AFECTADO
2	+	N.O	N.O	N.O	+	-	NECROSIS
4	+	N.O	N.O	+	+	+	NECROSIS
8	+	+	+	N.O	+	N.O	NECROSIS
15	+	+	+	-	+	-	AFECTADO

NOTA: LAS ANOTACIONES INDICAN LOS SIGUIENTE:

N.O NO OBSERVABLE DEBIDO A LA NECROSIS.

N.D NO DETERMINADO POR ENCONTRARSE DANADO EL CORNETE.

+ POSITIVO

- NEGATIVO

**FIGURAS DEL DAÑO PRODUCIDO EN LOS CORNETES A NIVEL HISTOPATOLÓGICO.**



**FIGURA 9.** Cornete Normal. Tejido cartilaginoso intacto. Grupo Control Negativo.



**FIGURA 10.** Observación de la congestión, la hemorragia y la infiltración celular producida como respuesta al desafío bacteriano.



FIGURA 11. Observación más nítida y clara de la infiltración celular compuesta principalmente por polimorfonucleares y linfocitos.

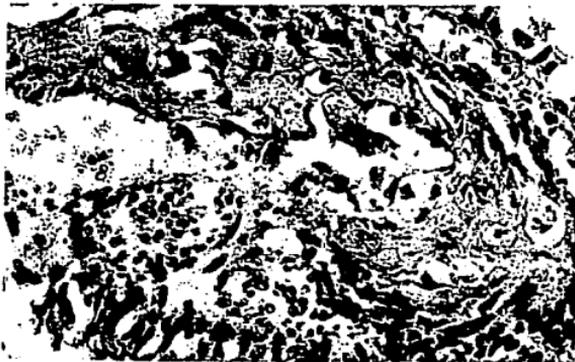


FIGURA 12. Remoción periosteal, infiltración celular y un osteoclasto claramente definido.



**FIGURA 13.** Daño al Cornete. Pérdida e irregularidad en los cilios del epitelio. Readsorción del hueso y remoción periostal.



**FIGURA 14.** Completa atrofia y degeneración del cornete. Presencia de vacuolas y rompimiento de la estructura normal del hueso.

# **DISCUSION Y CONCLUSIONES**

## DISCUSION

La Rinitis Atr6fica ha sido objeto de diversos estudios, en los que se ha encontrado que la condici6n primaria es de car6cter infeccioso (Brown y cols., 1966); por lo que se han involucrado varios agentes etiol6gicos. Sin embargo, solo se han considerado de mayor importancia a Bordetella bronchiseptica dermonecrot6xica y a Pasteurella multocida tipo D (DNT +), con las cuales se han desarrollado un gran n6mero de experimentos tratando de producir la enfermedad. (Sawata y Kume, 1982, De Jong, 1980, Harris y Switzer, 1968). En dichos estudios se han utilizado varios animales tales como: conejos, cerdos, ratas y ratones.

En el presente trabajo, se estudio el papel de dichas bacterias, con el fin de determinar una posible interacci6n de las mismas en el desarrollo de la Rinitis Atr6fica, empleando para ello ratones de 21 d6as, escogiendo 6ste modelo experimental por la habilidad de manejo, la disponibilidad y por que al parecer presenta cierta susceptibilidad hacia P. multocida, y a que ha sido utilizado en otros estudios logrando reproducir la enfermedad (Sawata y Kume, 1982; Magyar, 1985).

En 6ste trabaj6 se demostr6 tambi6n que nebulizaci6n ha mostrado ser un buen m6todo para estudiar y reproducir enfermedades asociadas al tracto respiratorio (Badiola y Pujols, 1984; Montaraz y cols., 1985), en 6ste trabajo para la inoculaci6n de las bacterias se utiliz6 una camara de aerosolizaci6n con la finalidad de desafiar a los ratones de la

misma forma en que se produce la enfermedad en cerdos, es decir por medio de aerosoles infectados, que es la forma natural en que se transmite la enfermedad. (Martineau y cols., 1982; Harris y Switzer, 1968).

Los resultados obtenidos en éste estudio, con respecto a los patrones de remoción-retención de las bacterias indicaron: Que B. bronchiseptica no se remueve del epitelio nasal, ya que la cuenta bacteriana aumenta para el día 2 post-inoculación para posteriormente disminuir y mantenerse en un nivel constante durante la fase intermedia y final del experimento. Este aumento significativo nos indicó que la bacteria colonizó el epitelio, logró multiplicarse y que incluso estuvo liberando su toxina. La adherencia de B. bronchiseptica al epitelio se debió a la presencia de adhesinas que hicieron posible su unión a receptores celulares (Roop, 1987; Jacques, 1986; Ishikawa, 1989; Yokomizu y Shimizu, 1970).

Este comportamiento en su fase inicial fue muy similar al encontrado por Mendoza y cols. (1985), ya que se observó la multiplicación bacteriana. Sin embargo en la fase final éstos investigadores observan un efecto de remoción, lo cual no se hizo evidente en éste trabajo. Las cuentas bacterianas que en pulmón fueron elevadas pudo deberse a que al instalarse la bacteria produjo un factor tóxico, que provocó que los mecanismos inespecíficos de defensa pulmonar fueran insuficientes, sin que se produjera alguna alteración aparente.

Los resultados histopatológicos encontrados, se relacionan

con la falta de remoción de B. bronchiseptica, ya que al colonizar la mucosa y multiplicarse y teniendo el antecedente de su origen dermonecrotóxico, es lógico pensar que el cornete resultará dañado, ésto se hizo evidente en los resultados, ya que B. bronchiseptica daña los cornetes de los ratones produciendo lesiones de tipo transitorias, ya que éstas disminuyeron al transcurrir el tiempo, lo cual concuerda con los resultados de Pijoan, et al. (1988) quienes afirman que B. bronchiseptica produce lesiones leves y transitorias.

Las lesiones producidas por B. bronchiseptica fueron principalmente: inflamación, pérdida de cilios, osteoclastos, atrofia de hueso, reabsorción del mismo y calcificación del tabique. Estos resultados fueron encontrados con anterioridad por otros investigadores quienes afirman que la colonización e B. bronchiseptica es seguida por la multiplicación sobre la superficie de la mucosa, en donde se produce una inflamación del epitelio nasal, cambios proliferativos y degenerativos e incluso pérdida de cilios (Duncan y cols., 1966; Edington y cols., 1976). Por otra parte éstas lesiones son atribuidas a la toxina que libera la bacteria, la cual es producida en mucosa y logra extenderse al tejido óseo provocando osteopatía, con la subsecuente alteración en la formación normal del hueso (Harris y cols., 1971; De Jong, 1980; Nakai y cols., 1985).

Con respecto al patrón de remoción-retención de P. multocida éste fue muy diferente al de B. bronchiseptica, ya que hacia el día 2 post-inoculación se observó una disminución significativa de

la cuenta bacteriana, para posteriormente aumentar a su nivel inicial y mantenerse constante hasta el final de la experimentación, lo cual nos indica que esta bacteria tampoco logra removerse del epitelio nasal.

La disminución en la cuenta bacteriana producida el día 2 post-inoculación, conduciría a pensar que ésta bacteria presenta mayor dificultad para adherirse al epitelio nasal y por consiguiente para su multiplicación en el mismo, además de indicar que esta induce una respuesta inmune acelerada, provocando la disminución de la cuenta. Sin embargo, esta respuesta inmune producida no sería muy efectiva, ya que el tipo capsular estaría impidiendo la fagocitosis efectiva de la bacteria, originando la persistencia posterior de la bacteria. Algunos investigadores han rechazado la idea de que P. multocida pueda adherirse al epitelio por sí sola, asegurando que debe existir un factor predisponente para que ocurre la colonización (Maniats y Johnson, 1980; Rutter, 1983; Rutter y Rojas, 1982; Pedersen y Barfod, 1981). Sin embargo se ha observado en P. multocida la presencia de pilis los cuales serían responsables de la adherencia y colonización de P. multocida, aunque esta no dejaría de ser limitada debido al tipo capsular (Gois, 1983; Pijoan y Trigo, 1988).

Este comportamiento se encontró también en pulmón y aunque este tipo capsular no es patógeno en pulmón (Pijoan, 1985; Ross, 1984), se ha encontrado que después de la adherencia a mucosa nasal y su multiplicación ésta migra a tonsilas, logra llegar a pulmón y regresar a cornete. Sin embargo, su persistencia

indicaría que la bacteria podría liberar alguna sustancia capaz de alterar los mecanismos de eliminación de bacteria del pulmón, es decir que estaría disminuyendo la velocidad de remoción.

Estos resultados de remoción concuerdan con el estudio histopatológico, en donde se encuentra que P. multocida produjo lesiones características de la Rinitis Atrófica, las cuales fueron más severas que las ocasionadas por B. bronchiseptica, además de que las lesiones se produjeron paulatinamente siendo más severas en la parte final del experimento. Esto fue encontrado también por Pijoan et al. (1988), quien reportó que P. multocida produce lesiones progresivas y permanentes y fueron de mayor impacto económico.

Las lesiones producidas por P. multocida fueron principalmente congestión y hemorragia, diferenciación de osteoblastos, remoción de periosteo y atrofia de cornetes, en este grupo no se produjo pérdida de cilios ni el proceso inflamatorio que se presentó en el grupo inoculado con B. bronchiseptica, infiriendo que P. multocida produce como principal mecanismo de lesión el daño a los osteoblastos. Algunos investigadores reportaron este daño a los osteoblastos, afirmando que debido a la inoculación con P. multocida se produce osteólisis de osteoblastos, suprimiendo la síntesis osteoide (osteogénesis) y por consiguiente la disminución de la mineralización (calcificación) (Pedersen y Elling, 1984; De Jong y cols., 1980).

En este grupo se observó la diferenciación y degeneración de osteoblastos, ya que se hizo evidente la vacuolización de los

mismos, estos datos concuerdan con los reportados por Dominick (1988), quien encontró que los osteoclastos presentes a lo largo de la superficie de resorción ósea mostraron mayor cantidad de vacuolas y un borde de microvellosidades más prominentes con mayor número de núcleos por célula.

Al igual que con B. bronchiseptica éstas lesiones han sido atribuidas a la toxina que P. multocida produce al colonizar la mucosa, afirmando que la toxina es el factor que estimula la reabsorción del hueso y la necrosis y degeneración de osteoclastos (Pedersen y Elling, 1984; De Jong, 1980).

Con respecto a la asociación bacteriana, en el grupo inoculado con B. bronchiseptica y P. multocida se encontró un efecto de interacción a nivel de cuenta bacteriana de cornetes, ya que el día 2 post-inoculación de P. multocida se observó un aumento significativo de las UFC de ésta bacteria, lo cual nos indica que B. bronchiseptica ayuda en la colonización y adherencia de P. multocida, confirmando la aseveración de que P. multocida requiere de un factor que estimule que su adherencia y colonización en epitelio nasal sea más rápido (Miniats y Johnson 1980; Rutter, 1983).

Los resultados del estudio histopatológico de éste grupo indicaron un grado de atrofia mayor, lesiones más severas y mayor número de animales afectados desde el inicio hasta el final de la experimentación. Las lesiones que se encontraron fueron: congestión y hemorragia, inflamación, infiltración celular, osteoblastos diferenciados, remoción de periosteo, atrofia de

cornetes nasales, necrosis total del cornete. Estos resultados indican que la asociación bacteriana intensifica y prolonga el daño (Miniats y Johnson, 1980).

En general los resultados obtenidos indican que las bacterias por sí mismas son capaces de causar la atrofia de los cornetes nasales, aunque en diferente grado, pero que la asociación bacteriana va a ocasionar la degeneración total del cornete, la disminución de la osteogénesis y su reemplazo por tejido fibroso, ocasionando la deformación característica de la rinitis atrófica. Por otra parte, nos permitió determinar que el ratón puede ser un modelo experimental adecuado para desarrollar la enfermedad, tal como lo encontraron Sawata y Kume (1982), Magyar (1985) a diferencia que ellos trabajaron con ratones de 2 a 5 días de edad, por lo que el factor edad fue de ser muy importante en las lesiones que se producen y en la severidad de las mismas.

Por último, es importante mencionar que es conveniente continuar con el estudio que permita encontrar un mecanismo por el cual se logre proporcionar inmunidad sobre ésta enfermedad a los cerdos principalmente de edad corta, sugiriendo que se realicen estudios evaluando diferentes inóculos a diferentes edades de los ratones.

# BIBLIOGRAFIA

## CONCLUSIONES

A las conclusiones que se llegaron es éste trabajo son:

- 1) Es posible reproducir la enfermedad (Rinitis Atrófica), en ratones de 21 días.
- 2) La nebulización es un método efectivo de inoculación.
- 3) Los patrones de remoción de B. bronchiseptica y de P. multocida fueron diferentes entre sí en la fase inicial, para posteriormente mantenerse en un comportamiento similar, dichos patrones mostraron principalmente un efecto de retención.
- 4) La retención observada, hizo posible que el daño producido fuera mayor, lo cual se hizo evidente en los resultados de histopatología, en donde se observan claramente lesiones características de atrofia del cornete nasal.
- 5) Con las bacterias utilizadas (B. bronchiseptica y P. multocida) fue posible desarrollar la enfermedad, lo que condujo a reiterar que éstos agentes fueran responsables del cuadro de Rinitis Atrófica.
- 6) Es necesario continuar el estudio para poder llegar a un modelo adecuado que permita evaluar posibles inmunógenos que protegan de la enfermedad.

## BIBLIOGRAFIA

- Anon. (1954). New pig disease in Britain. *Vet. Rec.* 66:316.
- Anguiano, R. (1973). *Porcira*, (23):25-29.
- Beard, C. W. and Easterday, B. C. (1965): An aerosol apparatus for the exposure of large and small animals: Description and operation characteristics. *Am. J. Vet. Res.* 26:174-182.
- Boyce and Marter. (1986). Plasmid profile analysis of bovine isolates of *Pasteurella haemolytica*. *Am J. Vet. Res.* 47:6 1204-1206.
- Brown, W. R.; Krook, L. A. and Pond, W. G. (1966). Atrophic Rhinitis in Swine. Etiology, pathogenesis and prophylaxis. *Cornell Vet.* 56 (Supp 1) 7-108.
- Buxton, A. and Fraser, G. (1977). *Animal Microbiology*. Vol. I; First Edition; Blackwell Scientific Publications. Oxford, London, Edinburgh, Melbourne. Pag. 121-126 y 267-269.
- Carter, G. R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida* I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.* 16: 481-484.
- Carter, G. R. (1957). Studies on *Pasteurella multocida*. III. A serological survey of bovine and porcine strains from various parts of the world. *Am. J. Vet. Res.* 18:437.
- Carter, G.R. and Subronto, P. (1973). Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. *Am J Vet Res.* 34:293-294.
- Carter, G. R. (1975). *Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology*; Second Edition; Charles C. Thomas Publisher; Springfield Illinois, USA.
- Carter, G.R.; Rundell S.N. (1975). Identification of type A strains of *Pasteurella multocida* using a staphylococcal hyaluronidase. *Vet Rec.* 93:393.
- Carter, G. R. (1987). Serological classification of *P. multocida*. *Vet. Rec.* 121:382
- Cowan, S. T. (1974). *Cowan and Steel's for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd edit. New York. Cambridge University Press, Cambridge.
- De Jong, M. F.; Oel, M. L. and Tentenburg, G. J. (1980). Atrophic Rhinitis pathogenicity test for *Pasteurella multocida* isolates. *Proceedings Int. Pig Vet Soc. Congress. Copenhage*, p. 211.

- Done, J. T. (1975). Infectious atrophic rhinitis of pigs: Rational Control at the herd level. *Vet. Annu.* 15:105.
- Doyle, L. P.; Donham, C. R. and Hutchings, L. M. (1944). Report of a type of rhinitis in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 105:132.
- Duncan, J. R.; Ramsey, F. K. and Switzer, W. P. (1966). Pathology of experimental Bordetella bronchiseptica infection in swine: Atrophic rhinitis. *Am. J. Vet. Res.* 27:457-466.
- Dunill, M.S. (1979). Some aspects of pulmonary defence. *J. Pathol.* 128: 221-236
- Eldering, G. (1942). A study of the antigenic properties of Haemophilus pertussis and related organisms. II. Protection test in mice. *Am. J. Hyg.* 36:294-302.
- Eliás, B.; Krüger, M.; Rätz, F. (1982): Epizootiologische Untersuchungen der Rhinitis atrophicans. II. Biologische eigenschaften der von Schweinen isolierten B. bronchiseptica stämme Zentralblatt für Veterinärmedizin B. 29:619-635.
- Endington, N.; Smith, I. M.; Plowright, W. and Watt, R. G. (1976). Relationship of porcine cytomegalovirus and Bordetella bronchiseptica to atrophic rhinitis in gnotobiotics piglets. *Vet. Rec.* 98:42-45.
- Endoh, M.; Toshiyuki, T.; Nakase, Y. (1980). Adenylate cyclase activity of Bordetella bronchiseptica organisms. I.- Its production in liquid medium. *Microbiol. Immunol.* 24: 95- 104.
- Evans, D.G. and Maitland, H. B. (1939). The toxin of Bordetella bronchiseptica and the relationship of this organism to Haemophilus pertussis. *J. Pathol. Bacteriol* 48:67-78.
- 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. Med. Assoc.*, 170: 34-36.
- Ferry, N.S. and Klix H.C. (1918). Studies relative to the apparent close relationship between Bact. pertussis and Bordetella bronchiseptica. II. Complement fixation test. *J. Bacteriol.* 3:309-312.
- Fetter, A. W.; Switzer, W. P. and Capen, C. (1975). Electron microscopic evaluation of bone cells in pigs with experimentally induced Bordetella rhinitis (turbinate osteoporosis). *Am. J. Vet. Res.* 36:15-22.
- Fitzi, M. (1975). Selective isolation of Bordetella bronchiseptica. *Zentralb. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig.* 224:270-272.

Flores, A.O. (1992). Riesgo de introducción de Enfermedades Exóticas de los Cerdos a México. Libro: Avances en Producción Porcina. Vol. I. Ed. AMVEC, A.C.

Franque. (1830). Was ist die schnüffelkrankheit der Schweine?. Dtsch. Z. Tierheilkd 123:75-77.

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

Giles, C. J.; Smith, I. M.; Baskerville, A. J. and Brothwell, E. (1980). Clinical, bacteriological and epidemiological observations on atrophic rhinitis of pigs in southern England. Vet. Res. 106:25-28.

Giles, C. J.; Smith, I. M.; Baskerville, A. J. and Oliphant, J. (1981). Treatment of experimental infection in young pigs with potentiated sulphonamide in the drinking water. Vet. Rec. 2:136-139.

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

Gois, M.; Kukaa, F. and Sisak F. (1977). Experimental infection of gnotobiotic piglets with Mycoplasma hyorhinis and Bordetella bronchiseptica. Zentbl. Vet. Med. 24:89-96.

Gois, M.; Barnes, H. J. and Ross, R. F. (1983). Potentiation of turbinate atrophy in pigs by long term nasal colonization with P. multocida. Am. J. Vet. Res. 4:372-378.

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. 40:58- 60.

Goodlow, R.J. and Leonard, F.A. (1961). Viability and infectivity of microorganisms in experimental airborne infection. Bact. Rev. 25: 182-187.

Goodnow, R. A. (1980). Biology of Bordetella bronchiseptica. Microbiol. Rev. 44:722-738.

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

Green, G. M. and Kaas, E. H. (1964). Factors influencing the clearance of bacteria by the lung. J. Clin. Invest., 43: 769-776.

Grey, C. L.; Thomson, R. G. (1971). Pasteurella haemolytica in the tracheal air of calves. Can. J. Comp. Med. 35:121-128.

Hanada, M. K.; Shimoda, S.; Tomita, Y.; Nakase, Y. and Nishiyama, Y. (1979). Production of lesions 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. (1968). 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, W. P. (1969). Nasal and tracheal resistance of swine against reinfection by Bordetella bronchiseptica. Am. J. Vet. Res. 30:1161-1166.

Harris, D. L.; Switzer, W. P. 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. (1961). Distribution and deposition of inhaled particles in the respiratory tract. Bact. Rev., 25:237-240.

Hatch, M. T. and Dimmick, R. L. (1966). Physiological response of air-borne bacteria to shifts. Bact. Rev. 30:597- 603.

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

Henderson, D.W. (1952). An apparatus for the study of airborne infection. J. Hyg., 50: 53-69.

Hirsh, D.C.; Martin, L.D.; Keith, B'D. and Rhoades, R. (1985). Resistance plasmid of P. multocida isolated from turkeys. Am. J. Vet. Res. 46 (7): 1490-1493.

Iglesias, G. y Pijoan C. (1982). Diagnóstico de las Enfermedades del Cerdo. Ed. Carlos Pijoan Aguade y Ramiro Ramirez N.

Jenkins, E. M.; Anthony, V.; Vance, R.; Cleveland, J. and Gbadamosi, S. G. (1977). Prevalence of Bordetella bronchiseptica infection in swine of south-eastern Alabama. Am. J. Vet. Res. 38-2071.

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

Jericho, K.W.F. (1987). Experimental studies of Infectious respiratory disease. Can. J. Vet. Res. 51:417-418.

Jones, C.D.R. (1983). Mucociliary clearance from the calf lung. Can. J. comp. Med. 47:265-269.

Korenfeld, L. K. (1978). Porcira. (61):17-22.

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

Laurenzi, G.A.; Baerman, L.; First, M. and Kass E.H. (1964). A quantitative study of the deposition and clearance of bacteria in the murine lung. J. Clin. Invest. 43:759-768.

L'Ecuyer, C.; Roberts E.D. and Switzer, W.P. (1961). An outbreak of Bordetella bronchiseptica pneumonia in swine. Vet. Med. 56:420-424.

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

Leman, A. D.; Straw, B.; Glock, R.; Mengeling, W.; Penny, R. H.; Files, C. J. (1985). Diseases of swine. Sixth edition. Cap. 38-40.

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

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

Magyar, T.; Semjén, G. and Osuatch, Z. (1985). Investigation of adhesive and nonadhesive Bordetella bronchiseptica strains in suckling-mouse model. Acta. Vet. Hungárica 33:137-141.

Maqueda, J. A. (1973). Porcira (7).

Martineau, G.; Jesse, M.; Martineau-Doize, B., et al.(1980). Atrophic rhinitis caused by Bordetella bronchiseptica. Determination of the minimum infectious dose on gnotobiotic piglets. In proceedings of the International Pig Veterinary Society.

Martineau, G. P.; Broes, A.; De Jong, M. F.; Martineau-Doize, B. (1982). Experimental reproduction of atrophic rhinitis with Pasteurella multocida on gnotobiotic and conventional piglets. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. México, p.88

Martínez, B.J; López, M.A.; Merino, M. M. Biofísica de las Infecciones Respiratorias. (1986) Vet. Méx. México.

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

Mercadillo, J. R. (1973). Porcira (23): 8-10.

Mercer, T. T. (1973). Production and characterization of aerosols. Arch. Intern. Med., 131:39-49.

- Mims, C.A. (1977). The Pathogenesis of infectious disease. (1977) Academic Press, New York.
- Miniatis, O. P. and Johnson, J. A. (1980). Experimental atrophic rhinitis in gnotobiotic pigs. *Can. J. Comp. Med.* 44:358-365.
- Montaraz, J.A.; Novotny, P. and Ivanyi, J. (1985). Identification of a 68-kilodalton protective antigen from Bordetella bronchiseptica. *Infect. and Immun.* 47:744-751.
- 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.
- Nakai, T.; Kume, K.; Yoshikawa, Y.; Oyamada, T. and Yoshikawa, T. (1986). *Jpn. J. Vet. Sci.* 48: 693-701.
- Nakai, T.; Nagano, H.; Horiguchi, Y. and Kume, K. (1988). Isolation and characterization of non-toxicogenic mutant strains of Bordetella bronchiseptica. *Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Brazil.* p. 35
- Nakase, Y. (1957). Studies on Haemophilus bronchisepticus. I. The antigenic structures of Haemophilus bronchisepticus from guinea pigs. *Kitasato Arch. 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. Copenhagen*, p. 202.
- Namioka, S. and Murata M. (1961). Serological studies on Pasteurella multocida. I. A simplified method for capsule typing of the organism. *Cornell Vet.* 51:498-507.
- Nicolet, J. (1985). Compendio de Bacteriología Médica Veterinaria. Traducido por Muñoz de Arenillas, J. R. Editorial Acribia, S.A.; Zaragoza (España). p.52-56.
- 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, España*, p.231.
- Nielsen, N. C.; Riising, H. J. and Bille, N. (1976). Experimental reproduction of atrophic rhinitis in pigs reared to slaughter weight. *Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Congr. Iowa State Univ.*, p.202.
- Nugent, K.M. and Pesanti, E.L. (1982). Staphylococcal clearance and pulmonary macrophage function during influenza infection. *Infect. and Immun.* 38:1256-1262.
- 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.* 56:11-16.

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. relationship between the disease and bacterial flora of nasal cavity of pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 32:185.

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

Pedersen, K. B. and Barford, K. (1977). Effect of vaccination of sows with Bordetella bronchiseptica on the incidence of atrophic rhinitis in swine. Nord. Vet. Med. 29:369-375.

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

Pedersen, K. B. and Elling, F. (1984). The pathogenesis of rhinitis in pigs induced by toxigenic Pasteurella multocida. J. Comp. Pathol. 94:203-214.

PiJoan, C. (1984). Effects of Pasteurella multocida and Haemophilus supernatants on macrophages. Proceedings 65th. Annu. Meet Conf. Res. Work Anim. Dis. (Chicago), p. 29.

PiJoan, C. (1985). Neumonía del cerdo. En Encuentro sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo. Editado por Correa, G. P. y Morilla, G. A.; Ediciones de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC). p. 85-99.

PiJoan, C. and Morrison, R.B. (1985). Enzootic Pneumonia of pigs: the role of Pasteurella multocida. Swine Consultant (Norden, Smithline CIA), Winter 1985; p. 1 y 6.

PiJoan, C. y Trigo, F. (1986). Pasteurella En: Enfermedades de los Cerdos; Edit. R.R. Necochea y C. PiJoan Aguada. Ed. México; p.327-333.

PiJoan, C.; Trigo and Hogg, A. (1988). Atrophic Rhinitis in pigs associated with a toxigenic strain of Pasteurella multocida serotype A. Proceedings Int. Pig Soc. Congress, Brazil p.32.

Pittman, M. (1974). Genus Bordetella Moreno-López, 1952, p.282-283. In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed)., Bergey's manual of determinate bacteriology, 8th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

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

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

Roop, M.R.; Veit, H.P.; Sinsky, R.J.; Veit, S.; Hewlett, E.L. and Kornegay, E. (1987). Virulence factors of Bordetella bronchiseptica associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine. *infec. and Immun.* 55(1):217-22.

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

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

Runnels, L.J. (1982). Infectious atrophic rhinitis of swine. *Vet. Clin N. Am. Large Anim Pract* 4: 301-319.

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 combined infection with Bordetella bronchiseptica. *Vet. Rec.* 110:531-535.

Rutter, J. M.; Francis, L. 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 Bordetella bronchiseptica in Atrophic Rhinitis of pigs. *Comm. Eur. Communities. Rep. EUR.*, Luxemburg, p.77.

Sawata, A. and Kume, K. (1982). Nasal turbinate atrophy in young mice inoculated with Bordetella bronchiseptica of pig origin. *Am J Vet Res* 43:1845-1847.

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

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 unaffected herds. *Proc. Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Belgium.* p. 94.

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

Simpson, W. and Simmons, D. J. (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 degree of atrophic rhinitis with field isolants of Bordetella bronchiseptica. Proc. Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Copenhagen, p.210.

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

Stillman, E. G. (1923). The presence of bacteria in the lungs of mice following inhalation. J. exp. Med., 38:117-126.

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

Switzer, W.P. and Farrington, D.O. (1972). Progress in the control of atrophic rhinitis caused by Bordetella bronchiseptica in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc., 16:1325.

Switzer, W.P. and Farrington, D.O. (1975). Infectious atrophic rhinitis. In diseases of swine, 4th. ed Ed. H.W. Dunne and D. Leman, A.D. Iowa State Univ. Press, Ames. p.687.

Switzer, W.P. (1981). Bordetellosis. In Leman, A.D., Glock, R.D., Mengeling, W. L. et al. Diseases of Swine. Edition 5. Ames Iowa State Press.

Thomson, R.G. and Gilka, F. (1974). A brief review of pulmonary clearance of bacterial aerosols emphasizing aspects of particular relevance to veterinary medicine. Can. Vet. J. 15:99-107.

Trigo, E.; Pijoan, C. (1988). Presence of pili in Pasteurella multocida strains associates with atrophic rhinitis. Vet. Rec. 122(1):19.

Van der Heyden, P.J.; Kamp, E.M.; Pais, J.M. and Tetenbourg, G.J. (1984). Isolation and characterization of a heat-labile dermonecrototoxin from Pasteurella multocida. Proceedings Int. Pig Vet. Soc. Congress, Belgium.

Whittlestone, P. (1982). Infectious agents associated with porcine respiratory diseases. Pig Vet. Soc. Proc. 9:71.

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

Yokomizo, Y. and Shimizu, T. (1979). Adherence of Bordetella bronchiseptica to swine nasal epithelial cells and its possible role in virulence. Res. Vet. Sci. 27:15-21.