

9
2020



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**



**Efecto de la inmunización activa o pasiva sobre la replicación
de Bordetella bronchiseptica en el pulmón de ratón**

T E S I S
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a

JUAN CARLOS CHONG MELCHOR

Asesor: Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo
M.C. Gabriela Barcenas Morales

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA ACADÉMICA
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN
P R E S E N T E .

AT'N: Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Efecto de la inmunización activa o pasiva sobre la
replicación de Bordetella bronchiseptica en el pulmón
de ratón.

que presenta el pasante: Juan Carlos Chong Melchor

con número de cuenta: 8754091-8 para obtener el TÍTULO de:
Químico Farmacéutico Biotólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 7 de Septiembre de 1900

PRESIDENTE Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo

VOCAL M.V.Z. Luz Ma. Ortega Leyva

SECRETARIO M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

PRIMER SUPLENTE Q.F.I. Andrea Becerril Osnaya

SEGUNDO SUPLENTE Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega

[Handwritten signatures and initials]

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE
INMUNOLOGIA DE LA COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE
POSGRADO DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN, UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo por brindarme su apoyo, guía y amistad durante el desarrollo de este trabajo.

A la M. C. Gabriela Barcenas Morales por el interés y tiempo dedicados a mejorar mi trabajo, y sobre todo por su invaluable amistad.

A los integrantes del Jurado, por la mejor disposición que presento en la revisión de este trabajo.

A todos mis profesores que de una u otra manera contribuyeron en mi formación profesional.

A Maru, Lulú y Edith, por su amistad y compañía en el laboratorio del posgrado.

Y a mis amigos: Paco, Bety y Eli por hacer mi estancia en la facultad más grata.

DEDICATORIAS

A la memoria de mi Padre, que de una forma acertada me llevo por el mejor camino en el desarrollo de mi vida.

A mi Madre, por su cariño y apoyo que me ha dado siempre para salir adelante.

A mi Hermana Carmen Aida por su invaluable apoyo y por el interes que mostro siempre en mí.

A mi Hermano Jorge Alberto, por los grandes momentos compartidos.

A mi amor Angelica, por lograr que mi vida tenga sentido.

I N D I C E

	pag.
INDICE DE TABLAS.....	I
INDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	III
1.0. INTRODUCCION.....	1
1.1. El sistema inmune mucosal.....	1
1.1.1. Sitios de inducción IgA.....	2
1.1.2. Sitios efectores mucosales.....	3
1.1.3. Regulación de la respuesta secretora.....	4
1.1.4. Inducción de linfocitos citotóxicos.....	5
1.1.5. Función de la IgA secretora.....	5
1.2. Modelo de remoción bacteriana en pulmón de ratón.....	6
1.3. <u>Bordetella bronchiseptica</u>	7
1.3.1. Factores de virulencia.....	8
1.3.2. Factores antigénicos.....	10
1.3.3. Aislamiento y cultivo.....	11
1.3.4. Enfermedades asociadas con <u>Bordetella bronchiseptica</u>	12
2.0. OBJETIVOS.....	14
3.0. MATERIAL Y METODOS.....	15
3.1. Cepa bacteriana.....	15
3.2. Preparación del inmunógeno.....	15

3.3.	Elaboración del suero hiperinmune.....	16
3.4.1.	La infección por medio de aerosoles.....	16
3.4.2.	Animales de laboratorio.....	17
3.4.3.	Preparación del inóculo.....	17
3.4.3.1.	Viabilidad bacteriana.....	17
3.4.4.	Aerosolización.....	18
3.4.5.	Evaluación de la infección.....	18
3.5.	Diseño Experimental.....	18
3.5.1.	Experimento de inmunidad pasiva.....	18
3.5.2.	Experimento de inmunidad activa.....	19
3.5.3.	Análisis estadístico.....	20
4.0.	RESULTADOS.....	22
5.0	DISCUSION.....	34
6.0	CONCLUSIONES.....	40
	BIBLIOGRAFIA.....	41

INDICE DE TABLAS

pag.

CUADRO 1.	Protocolo de inmunización para obtener suero hiperinmune contra <u>Bordetella bronchiseptica</u>	21
TABLA 1.	Ratones aerosolizados con <u>B. bronchiseptica</u> durante 15 min con un inóculo de 10 ml (2×10^9 bact/ml).....	24
TABLA 2.	Efecto del peso del ratón en la replicación exp. de <u>B. bronchiseptica</u> en el pulmón.....	26
TABLA 3.	Inmunización pasiva contra la infección experimental de <u>B. bronchiseptica</u> en el pulmón de ratón.....	28
TABLA 4.	Grupos de ratones inmunizados por vía oral y/o intraperitoneal contra la infección experimental de <u>B. bronchiseptica</u>	30
TABLA 5.	Inmunización por aerosol contra una infección experimental de <u>B. bronchiseptica</u>	32

INDICE DE FIGURAS

pag.

- FIGURA 1. Infección por aerosolización.....25
- FIGURA 2. Efecto del peso del ratón sobre la replicación experimental de B. bronchiseptica en el pulmón....27
- FIGURA 3. Inmunización pasiva con suero hiperinmune de conejo contra la infección de B. bronchiseptica.....29
- FIGURA 4. Grupos de ratones inmunizados por vía oral y/o intraperitoneal contra una infección experimental de B. bronchiseptica.....31
- FIGURA 5. Inmunización activa local por medio de aerosoles contra la infección de B. bronchiseptica.....33

RESUMEN

Bordetella bronchiseptica es un microorganismo involucrado en enfermedades respiratorias de diversos animales. Uno de los factores de la patogenicidad de esta bacteria, es la capacidad que tiene para adherirse y colonizar el epitelio ciliado del tracto respiratorio. Anteriormente se describió que en ratones inmunizados por vía intraperitoneal con anticuerpos monoclonales contra antígenos de la membrana, la multiplicación en el pulmón de ratón de esta bacteria se ve disminuida. Además, se conoce que los anticuerpos de tipo secretos se encuentran sobre las mucosas y protegen contra la invasión de diversos patógenos. Con estos datos y usando un modelo de remoción bacteriana en pulmón de ratón, se investigó el efecto que tienen los esquemas de inmunización: A) pasiva, B) activa intraperitoneal/intraperitoneal, C) activa oral/intraperitoneal y D) activa local por medio de aerosoles, sobre la multiplicación y el desarrollo de una infección respiratoria experimental por Bordetella bronchiseptica.

Se formaron grupos de 18 ratones hembra para cada esquema de inmunización investigado. Después de la inmunización, los ratones fueron desafiados con una suspensión de 10^9 UFC/ml de la cepa LBF de Bordetella bronchiseptica por medio de aerosolización. Tres ratones de cada grupo fueron sacrificados a los 0, 3, 5, 7, 15 y 30 días post-infección para determinar la multiplicación bacteriana y el desarrollo de la infección en el pulmón. Se obtuvo una disminución de la infección con la inmunización pasiva, esto sugiere que los anticuerpos del suero hiperinmune pueden llegar al pulmón por medio de trasudados e inhibir la multiplicación bacteriana. Por otra parte los esquemas de inmunización activa no muestran diferencias entre la infección desarrollada y la de los controles, esto puede indicar que dos inmunizaciones no son suficientes para proteger a los ratones contra una infección respiratoria experimental.

1. INTRODUCCION.

1.1 El sistema inmune mucosal.

En las superficies mucosales existen factores humorales inmunes que desempeñan un papel de gran importancia, ya que por aquí entran más patógenos al hospedador, en esas superficies se encuentran anticuerpos del isotipo secretor (22, 12). Este isotipo constituye más del 80% de todos los anticuerpos producidos en tejidos asociados a mucosas, además, es inducido, transportado y regulado por mecanismos marcadamente diferentes a aquellos involucrados en la respuesta sistémica (22, 21, 13). El sistema inmune mucosal puede dividirse en sitios donde el antígeno es encontrado y la respuesta inicial es inducida y en las mucosas donde las células plasmáticas IgA son fijadas y producen anticuerpos IgA-s confiriendo protección inmune local (22, 12, 38). Los antígenos del medio son captados por inhalación o ingestión y pueden ser tomados dentro de los tejidos linforeticulares especializados en el tracto respiratorio superior (URT) y en el tracto gastrointestinal (GI). Estos son denominados tejidos linfoides bronco y gastroasociados (BALT y GALT) respectivamente (22).

La estimulación de células B precursoras de IgA dentro de GALT por antígenos administrados oralmente, produce la diseminación de células B y T hacia las mucosas de los tejidos efectores como son la lámina propia del tracto intestinal.

respiratorio y genitourinario y a varias glándulas secretoras para la respuesta subsecuente antígeno-específico (22, 12).

Diversas vacunas orales inducen una respuesta adecuada en secreciones remotas incluyendo saliva, lágrimas y fluidos obtenidos de lavados gastrointestinales. La inmunización oral es práctica y segura ya que carece de efectos colaterales y puede inducir protección secretora. Sin embargo, la administración oral de proteínas, incluyendo vacunas, puede inducir un estado sin respuesta, denominado tolerancia oral (22, 32).

1.1.1. Sitios de inducción IgA.

Los sitios de inducción en GALT, están representados por las placas de peyer (PP), el apéndice y pequeños nodulos linfáticos aislados. Los BALT comparten algunas similitudes anatómicas con GALT y probablemente presentan las mismas funciones en el URT (22, 12, 32). Las PP contienen una región en domo enriquecida por linfocitos, macrófagos y algunas células plasmáticas. Esta área está cubierta por un sólo epitelio enriquecido por células especializadas que muestrean antígenos, denominadas epitelio foliculo-asociado (FAE) o microdobles (MD) y tienen extensiones delgadas alrededor de células linfoides. Las células FAE o MD tienen microvellos, vesículas citoplasmáticas y algunos lisosomas, están adaptadas para captar y transportar antígenos del lumen, incluyendo proteínas, virus, bacterias y pequeños parásitos (22, 39).

Los antígenos captados por estas células no son degradados, permanecen intactos dentro del tejido linfoide (22).

En la región domo de las PP se encuentran distintos folículos denominados zonas B, que contienen centros germinales en donde se lleva la maduración y afinidad de células B y junto a estas áreas se encuentran las zonas T, que contienen células CD-3, de todas estas células el 60% de ellas son CD-4⁺ y poseen propiedades T-cooperadoras, incluyendo soporte para la respuesta secretora, además, existe un número significativo de células CD-8⁺ que pueden exhibir su efecto citotóxico (22, 14). Todas las células presentes en los sitios de inducción son inmunocompetentes y regulan la inducción de la protección mucosal (22, 14, 7).

1.1.2. Sitios efectores mucosales.

Después de que las células B y T han sido inducidas por un antígeno en las PP, estas migran por la vía linfática eferente y son vaciadas a la circulación sistémica por medio del ducto torácico, entonces estos linfocitos entran a los sitios efectores como son la lámina propia del tracto respiratorio, gastrointestinal, reproductivo y a tejidos glandulares (22, 21, 12, 38). Los mecanismos por los cuales los linfocitos son selectivamente retenidos no están del todo aclarados. Las células B clonan y se expanden por influencia del antígeno, células T y citocinas y maduran en células plasmáticas IgA⁺ (22, 13, 7).

Algunos estudios indican que existe un número significativo de células plasmáticas IgA^+ en la mucosa del tracto GI que pueden ser derivadas de células B Ly-1 ($CD-5^+$), las cuales se encuentran en la cavidad peritoneal y son derivadas del eplón fetal, estas exhiben propiedades fenotípicas y de localización únicas. Ahora se ha establecido que también dan origen a IgM y a una variedad de autoanticuerpos. No se sabe si las células plasmáticas IgA^+ provienen de esas células $CD-5^+$ o si migran a la cavidad peritoneal como células de memoria. Por tanto, las PP y el peritoneo representan sitios de desarrollo para células IgA^+ capaces de repoblar las mucosas de los tejidos (22).

1.1.3 Regulación de la respuesta secretora.

Las células T inducidas presentan marcadores de superficie relacionados con funciones T-cooperadoras y T-citotóxicas, $CD-4^+$ y $CD-8^+$ respectivamente. Estos linfocitos migran de las zonas T de las placas de peyer hacia los sitios efectores representados por el nódulo linfático mesentérico (MLN) y a los sitios linfáticos encontrados entre los epitelios de las mucosas formando una población de linfocitos intraepiteliales (IEL) (10), en donde segregan citocinas apropiadas (IL-4, IL-5 e IL-6) que estimulan a las células B inducidas para la síntesis y secreción de IgA (22, 9).

Estudios realizados en ratón indican que existen dos subclases definidas de linfocitos T cooperador, nombrados TH-1 y TH-2, en ese estudio se observa que los linfocitos TH-2 inducidos

en las PP migran hacia los sitios efectores y favorecen la expresión de la IgA, mientras que la secreción de IgG e IgM es suprimida (32, 22).

El linfocito TH-2 produce IL-4, citocina involucrada en la diferenciación de células B hacia el isotipo B IgA⁺ e IL-5 que es necesaria para que estas células B inducidas se diferencien en células plasmáticas IgA secretoras. Estos datos sugieren que la diferenciación e inmunoregulación de anticuerpos secretores esta mediada por una clase específica de linfocito T-cooperador (27, 13, 9, 7).

1.1.4. Inducción de linfocitos citotóxicos.

Se ha observado que la inmunización oral con virus produce una fuerte respuesta de linfocitos CD-8⁺ específicos, probablemente la inducción de estas células se realiza en las placas de peyer, de donde migran hacia el MLN y se diferencian por exposición a un complejo formado por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y proteínas virales, en donde expresan su efecto citotóxico, lisando a las células infectadas (16, 15, 14, 10).

1.1.5. Funciones de la IgA secretora.

En las secreciones la IgA se encuentra predominantemente en sus formas diméricas y tetraméricas, presentando más afinidad que las formas monoméricas, por estas razones su efectividad para neutralizar virus y aglutinar bacterias es mayor.

Además, los anticuerpos secretores también neutralizan antígenos biológicamente activos como son enzimas y toxinas bacterianas (38, 22, 12).

La IgA secretora es resistente a la proteólisis enzimática, debido a la presencia del componente secretor (SC), este protege las funciones de las inmunoglobulinas y proporciona ventajas funcionales sobre la IgA cuando se compara con otros tipos de anticuerpos que pueden ser encontrados en las mucosas (22).

1.2. Modelo de remoción bacteriana en pulmón de ratón.

Desde hace tiempo se han usado modelos de infección por inhalación de bacterias para investigar la interacción de patógenos sobre el aparato respiratorio, ya que esta forma de inoculación presenta amplias ventajas sobre otras vías de infección experimental (23).

Este modelo de infección por Bordetella bronchiseptica se basa en la exposición de los ratones en una cámara diseñada para este propósito a un aerosol generado a partir de una suspensión bacteriana que contiene de 10^9 a 10^{10} UFC/ml, por lo menos en un lapso de 10 minutos. Treinta minutos después de la infección, se encuentra en los pulmones de los ratones cantidades constantes de esta bacteria, el desarrollo de la infección se sigue por el conteo de las UFC/ml presentes en los pulmones de los ratones durante un tiempo determinado (generalmente 27 días

post-infección). Para esto, se extraen los pulmones de cada ratón en condiciones asepticas y se homogenizan. De los pulmones homogenizados se realizan diluciones en base 10 y de cada dilución se siembra una gota en medio de cultivo apropiado, después de incubar durante 48 hrs a 37°C se realiza el conteo de las UFC/gota (25, 23).

1.3. Bordetella bronchiseptica.

Bordetella bronchiseptica es una bacteria pleomórfica, Gram negativa, cocobacilar, no presenta esporas y tiene motilidad por flagelos peritricos (11, 33). Esta bacteria presenta variación fenotípica, este fenómeno se observa en las características de sus colonias cuando se mantiene en medios de cultivo (31, 34, 11). Las colonias que se obtienen de animales infectados son pequeñas, lisas, en forma de domo y producen hemólisis en medios suplementados con sangre, la presencia de estas características fueron designadas Fase I (34, 31,) Sin embargo, en medios de cultivo estas características se van perdiendo y las colonias se transforman a rugosas, de borde irregular y no hemolíticas, los estudios revelaron la existencia de fases intermedias las cuales presentan esta variación fenotípica y fueron designadas como Fases II, III y IV, en donde la Fase IV es completamente rugosa y no hemolítica (11, 31, 34).

Los estudios realizados por Lacey y Nakase indican que los medios de cultivo afectan o modulan la expresión fenotípica de Bordetella bronchiseptica y esta puede ser reversible al cambiar las condiciones de cultivo (31).

Diversos estudios relacionados con la variación fenotípica y la capacidad de infectar animales en el laboratorio han indicado que las cepas de Bordetella bronchiseptica con colonias en Fase I tienen una alta capacidad para infectar y desarrollar lesiones en animales experimentales (20, 19, 18), aglutinar eritrocitos de diversas especies animales (37, 30) y unirse al epitelio ciliado del tracto respiratorio canino *in vitro* produciendo ciliostasis (5, 6). En cambio, las Fases intermedias están relacionadas con la disminución o pérdida de la virulencia (34, 37, 18).

1.3.1 Factores de virulencia.

Las cepas en Fase I de Bordetella bronchiseptica producen una toxina dermonecrótica (DNT) que se caracteriza por producir eritema, edema, induración y necrosis cuando se inyecta en forma intradérmica en cuyos, esta toxina puede ser inactivada con formalina sin perder su antigenicidad (34, 11).

La toxina dermonecrótica es una cadena polipeptídica con un peso molecular de 190 Kd, cuando se disocia con tripsina se obtienen dos subunidades de 75 y 118 Kd cada una, tiene un punto isoeléctrico entre 6.5 y 6.6, la dosis mínima necrozante para

cuyos es de 2 ng de proteína por 0.1 ml, la DL₅₀ para ratón es de 0.3 µg y la dosis mínima citotóxica para células embrionarias de pulmón de bovino es de 2 ng/ml. Esta toxina se inactiva totalmente con calor (70 °C/30 min) y parcialmente con formaldehído al 0.5% (17).

Los estudios realizados sobre el lipopolisacárido de Bordetella bronchiseptica indican que comparte estructuras con las demás especies de este género y su actividad es comparable con la de otras bacterias Gram negativas (2, 24), mientras que la endotoxina de esta bacteria se encuentra en forma de un complejo proteína-lipopolisacárido en membranas vesiculares, al parecer esta endotoxina interactúa con mitocondrias alterando los procesos enzimáticos (11).

Las especies del género Bordetella producen una enzima adenil ciclasa extracelular, la cual cataliza la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), en Bordetella pertussis esta enzima inhibe la quimiotaxis, la fagocitosis, la generación del superóxido y la muerte bacteriana, además de inhibir la explosión oxidativa en el macrofago alveolar *in vitro* (34, 11).

Por otra parte, la adenil ciclasa de Bordetella bronchiseptica tiene características antigénicas, ya que en un estudio realizado con anticuerpos monoclonales contra una proteína presente en la membrana de dicha bacteria, la actividad adenil ciclasa se veía inhibida (25).

Diversos estudios realizados con cepas en fase I de Bordetella bronchiseptica, indican que tiene una alta afinidad para adherirse al epitelio ciliado del tracto respiratorio de diversas especies animales (34, 18, 11).

Los estudios realizados por Bemis indican que las bacterias muertas, inactivadas y en fases avirulentas de Bordetella bronchiseptica se pueden unir al epitelio ciliado del tracto respiratorio canino *in vitro*, sin causar disminución o alteraciones en la actividad ciliar, en cambio las bacterias viables en Fase I producen una marcada disminución en el ritmo ciliar. Estas observaciones confirman la alta capacidad que tienen estos microorganismos para adherirse al epitelio ciliado del tracto respiratorio y la importancia que tiene en la virulencia de Bordetella bronchiseptica (5, 6).

1.3.2. Factores antigénicos.

Bordetella bronchiseptica es una bacteria con variación fenotípica y antigénica, dependiendo de la fase que presenten sus colonias. En los estudios realizados por Nakase se encontraron tres fases lisas y una rugosa con diferencias antigénicas bien

definidas. Las células lisas en Fase I y II poseen los antígenos K, H, O, O1, O5 y O7 idénticos. En la Fase III se encontraron dos tipos de células con diferencias en los antígenos somáticos, las células en Fase III-1 presentan los antígenos H, O1 y O7 y las células en Fase III-2 poseen H, O5 y O7. La Fase IV (rugosa) solamente posee los antígenos somáticos O1 y O7 (11).

1.3.3. Aislamiento y cultivo.

Bordetella bronchiseptica puede ser aislada del tracto respiratorio de animales infectados por medio de raspado nasal y traqueal, cultivándolo generalmente en medio selectivo que contiene penicilina, estreptomincina y nistatina. Generalmente las placas crecen a 35-37°C durante 40 a 72 h, las colonias resultantes presentan perlescencia y borde liso. A las colonias presuntivas se les realiza la tinción de gram y las reacciones bioquímicas para el género y especie. Para diferenciar a Bordetella bronchiseptica de otros cocobacilos gram negativos, frecuentemente se utiliza 200 µg de nitrofuracina por ml en agar. Esta bacteria crece en medios sólidos y líquidos que contienen un estándar de proteínas (triptosa, fosfato y soya ttripticasa) Para un máximo crecimiento en medio líquido es necesario aerear, temperatura de 35 a 37°C y controlar la liberación de factores de crecimiento con un buffer de sales. Cuando Bordetella bronchiseptica crece en agar sangre sus colonias son generalmente hemolíticas y brillantes, con un diámetro de 1.0 a 2.0 mm (11).

1.3.4. Enfermedades por Bordetella bronchiseptica.

Bordetella bronchiseptica ha sido asociada a enfermedades respiratorias de diversos mamíferos. En el cerdo esta bacteria es considerada como el agente primario de la rinitis atrófica porcina (RAP). Esta enfermedad respiratoria común de cerdos jóvenes puede resultar en la destrucción de los cornetes nasales y tejidos asociados, muchas veces tiene una alta incidencia en neumonía y representa pérdidas significantes para la industria porcina, debido al peso reducido que presentan los animales afectados y por el costo en la profilaxis y el tratamiento de los animales enfermos (11, 34). Existen dos microorganismos involucrados en la RAP, esta se desarrolla primero por el establecimiento y colonización de Bordetella bronchiseptica sobre el tracto respiratorio del cerdo (34, 37, 11), lo que aumenta la susceptibilidad del hospedador para una infección secundaria con Pasteurella multocida, tipo D toxigénica productora de dermonecrotoxina, esta infección mixta reproduce el cuadro clínico con las alteraciones características de la infección de rinitis atrófica porcina en animales experimentales (1).

Además, Bordetella bronchiseptica es considerada el agente primario de la traqueobronquitis canina, enfermedad altamente contagiosa la cual afecta a perros de cualquier edad y esta caracterizada por acumulación de moco excesivo en la traquea, vómito, pérdida de peso y lesiones pulmonares (11).

Esta bacteria ha sido aislada de animales de laboratorio como son conejos, cuyes, ratas, monos y otros mamíferos usados en investigación, con problemas respiratorios. En el hombre Bordetella bronchiseptica no es considerada como un patógeno natural. Sin embargo, se han reportado algunos casos de humanos en condiciones especiales que presentaron enfermedades respiratorias causados por este microorganismo (11).

Se han desarrollado estudios de protección contra Bordetella bronchiseptica, algunos de ellos utilizan vacunas muertas inoculadas por diferentes vías de inmunización en modelos animales (36), con antígenos que poseen actividad hemaglutinante en ratones gestantes (29) y con anticuerpos monoclonales (25); en estos estudios se ha obtenido protección contra infecciones experimentales de esta bacteria. Sin embargo, Novolny estudio el efecto de protección de 7 vacunas comerciales y sólo 2 demostraron un efecto positivo sobre algunas de las manifestaciones de la RAP (28).

Tomando en cuenta la alta afinidad de Bordetella bronchiseptica para adherirse y colonizar el tracto del aparato respiratorio de diversos animales y el papel fundamental de la protección que ejercen los anticuerpos secretores en las mucosas se establecieron los siguientes objetivos.

2.0. OBJETIVOS.

2.1. Objetivo general.

Evaluar en un modelo experimental de remoción bacteriana diversas estrategias de inmunización que resulten en la inhibición de la replicación de Bordetella bronchiseptica en el pulmón de ratón.

2.2. Objetivos particulares.

Estandarizar el modelo de infección por aerosol.

Evaluar la inmunidad activa por diferentes vías de inmunización en este modelo de infección.

Evaluar si la inmunidad pasiva protege el tracto respiratorio en este modelo de infección.

3.0 MATERIAL Y METODOS

3.1. Cepa Bacteriana.

La cepa de Bordetella bronchiseptica usada en este estudio fué la LBF aislada por primera vez por I.M. Smith del Real Colegio de Veterinaria, en Londres (28). Esta cepa se mantiene en un contenedor de nitrógeno líquido a -196°C ., para evitar los cambios morfológicos que presentan las colonias de esta bacteria cuando son mantenidas en medios de cultivo por pases seriados (31).

El medio de cultivo para el crecimiento de esta bacteria es el agar de Mac Conkey, que es esterilizado por autoclave a 15 lb de presión durante 15 min y distribuido en cajas petri.

Cada vez que se requirió de la bacteria, esta se extrajo del contenedor de nitrógeno y se sembró en el medio descrito, incubando durante 48 hrs a 37°C .

En estudios paralelos a este trabajo, realizados en el laboratorio de inmunología de la unidad de posgrado de la FES Cuautitlán, se comprobó que la cepa LBF de Bordetella bronchiseptica se encontraba en Fase I a lo largo de los desarrollos experimentales (4).

3.2. Preparación del Inmunógeno.

Después del tiempo de incubación, la bacteria fué recolectada y ajustada a una densidad óptica de 1.0 utilizando un espectrofotómetro SPECTRONIC 20D a 650 nm de longitud de onda, con solución salina fisiológica estéril (SSFE).

Esta suspensión bacteriana posee alrededor de 10^{12} bacterias/ml y se inactivó con formaldehído al 0.3% y se mantuvo en refrigeración hasta el momento en que fué usada con una dilución previa de 1:1000.

3.3 Elaboración del Suero Hiperinmune.

Con el inmunógeno descrito se inyectó por vía intravenosa a un conejo, de acuerdo al protocolo de inmunización descrito en el CUADRO 1.

En el día 18 posterior a la primera inmunización se realizó el sangrado del conejo para obtener el suero hiperinmune, el título de este se determinó por aglutinación en microplaca, utilizando la cepa LBF inactivada como antígeno.

3.4.1 La infección por medio de Aerosoles.

La infección de los ratones por medio de aerosoles se desarrolló en una cámara de metal con características similares a la descrita por Mendoza y cols (23). La cámara se cerró con una tapa de cristal y fué sellada con aceite mineral o grasa para evitar fugas.

En la entrada de la cámara se conectó un Nebulizador Devilbiss Mod 645 y en la salida se adaptó una trampa con fenol al 10% conectada a la vez a una bomba de vacío.

La producción del aerosol se realizó con una compresora, manteniendo un flujo de aire constante y evitando la sobrepresurización, este aerosol fue mantenido durante 15 min y al término de la exposición la cámara fue desalojada mediante vacío.

3.4.2 Animales de Laboratorio.

Se utilizaron ratones hembras de cuatro semanas de edad, de las cepas NIH y CD-1, se formaron grupos de 18 ratones para cada estrategia de inmunización.

3.4.3 Preparación del inóculo.

Con la bacteria cultivada se preparó una suspensión bacteriana con densidad óptica de 1.0 a 650 nm de longitud de onda usando SSF estéril. Con esta suspensión se preparó un inóculo de 10 ml diluido 1:1000 con SSF estéril, conteniendo aproximadamente 1×10^9 UFC/ml.

3.4.3.1 Viabilidad Bacteriana.

De la suspensión bacteriana con densidad óptica de 1.0 se realizaron diluciones decuples hasta 1×10^{-15} usando SSF estéril. De cada dilución se cultivaron 20 μ l. en medio de Mac Conkey y se incubaron durante 48 hrs a 37 °C.

Se determinó la viabilidad bacteriana expresandose en UFC/ml. Una suspensión bacteriana con densidad óptica de 1.0 adecuada debe tener un título aproximado de 10^{12} UFC/ml.

3.4.4. Aerosolización.

Se colocaron en el interior del nebulizador 10 ml del inóculo y se produjo un aerosol con el cual se expusieron a los ratones durante 15 minutos. Al finalizar el tiempo de aerosolización, los ratones fueron colocados en sus cajas con agua y alimento *ad libitum*.

3.4.5 Evaluación de la Infección.

Después de la infección se sacrificaron tres ratones de cada grupo a los 0, 3, 5, 7, 15 y 30 días por desnucamiento. Cada ratón fué desinfectado con alcohol etílico y por incisión de la cavidad torácica se extrajeron los pulmones, que fueron homogenizados con 3 ml de SSF estéril, usando un rotor Glas-col al 45% de su capacidad. Con los pulmones macerados se prepararon las siguientes series de diluciones:

Concentrado, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

Cada dilución se cultivó en el medio descrito y se determinó el desarrollo de la infección por el número de microorganismos recuperados a lo largo del experimento.

3.5. Diseño Experimental.

3.5.1. Experimento de Inmunidad Pasiva.

Para evaluar este tipo de inmunización se usarón dos grupos de ratones:

Grupo A: Ratones NIH inmunizados por vía intraperitoneal con 0.5 ml de suero hiperimmune de conejo, diluido 1:10 (con un título de 1:256).

Grupo B: Ratones NIH control, inyectados por vía intraperitoneal con 0.5 ml de suero normal de conejo diluido 1:10.

Después de 30 minutos de inmunizar a los grupos, estos fuerón sometidos a la infección por aerosoles y se evaluó el desarrollo de la misma como se describe anteriormente.

3.5.2. Experimento de Inmunidad Activa.

Para evaluar este tipo de respuesta, se formaron 4 grupos de 12 ratones cepa CD-1 cada uno, de la siguiente manera:

Grupo A: Inmunización oral-intraperitoneal.

Grupo B: Inmunización intraperitoneal-intraperitoneal.

Grupo C: Inmunización por medio de aerosol-aerosol.

Grupo D: Testigo.

Los grupos A y B fueron inmunizados los días 1 y 16 con 5×10^8 UFC/ratón; el grupo C fue aerosolizado los días 1 y 16 con 10 ml de una suspensión que contenía 10^9 UFC/ml de bacterias inactivadas durante 15 minutos; el grupo D no recibió tratamiento.

Al día 21 todos los grupos fueron desafiados por medio de aerosoles y la infección se evaluó de la manera descrita.

3.5.3. Análisis Estadístico.

Para la comparación entre los grupos inmunizados y grupos controles se utilizó el análisis de varianza (ANOVA).

CUADRO 1.

PROTOCOLO DE INMUNIZACION PARA OBTENER SUERO HIPERINMUNE CONTRA Bordetella bronchiseptica.

INYECCION	DIA	DOSIS
1	0	0.5 ml*
2	4	1.0 ml
3	8	2.0 ml
4	12	3.0 ml

* SE EMPLEO UNA SUSPENSION CON 10^{12} UFC/ml

4.0. RESULTADOS.

4.1. INFECCION POR AEROSOLES.

En la TABLA 1 y FIGURA 1 se muestra el desarrollo de la infección por aerosoles en ratones normales de la cepa NIH y de 18 gr de peso corporal. Se aprecia que a partir de una carga bacteriana de alrededor de 10^5 UFC/ml a los 30 minutos post-infección, la bacteria inicia su replicación hasta alcanzar un máximo entre el 5° y 7° día post-infección; a partir de ese momento la infección declina pero los ratones no logran eliminar totalmente a la bacteria que persiste hasta por lo menos 30 días post-infección.

Por otra parte, se evaluó el efecto del peso corporal sobre el desarrollo de la infección (TABLA 2 y FIGURA 2) y se observó que esta decrece conforme el ratón gana peso.

4.2. INMUNIDAD PASIVA.

Los resultados presentados en la TABLA 3 y FIGURA 3 muestran que la infección en los animales inmunizados se ve visiblemente disminuida a los 5 días post-infección y esta disminución se mantiene durante todo el desarrollo del experimento.

4.3. INMUNIDAD ACTIVA.

Los resultados se muestran en las TABLAS 4 y 5 y FIGURAS 4 y 5. Se aprecia que el nivel de infección en los grupos controles es menor que en los experimentos anteriores lo que se atribuye a

que en este caso los ratones fuerón de mayor edad y peso corporal, esto se presento por el tiempo esperado durante la inmunización. Por otra parte, el análisis de varianza no muestra diferencias entre los grupos inmunizados y los controles.

TABLA 1.

RATONES AEROSOLIZADOS CON B. bronchiseptica DURANTE 15 min
CON UN INOCULO DE 10 ml (2×10^9 bact/ml).

DIA	UFC/ml
0	2.9×10^5
3	4.3×10^6
5	4.5×10^8
7	5.4×10^8
15	3.5×10^6
30	3.0×10^4

LAS UFC/ml SON PROMEDIO DE 3 RATONES.

FIGURA 1
INFECCION POR AEROSOLIZACION

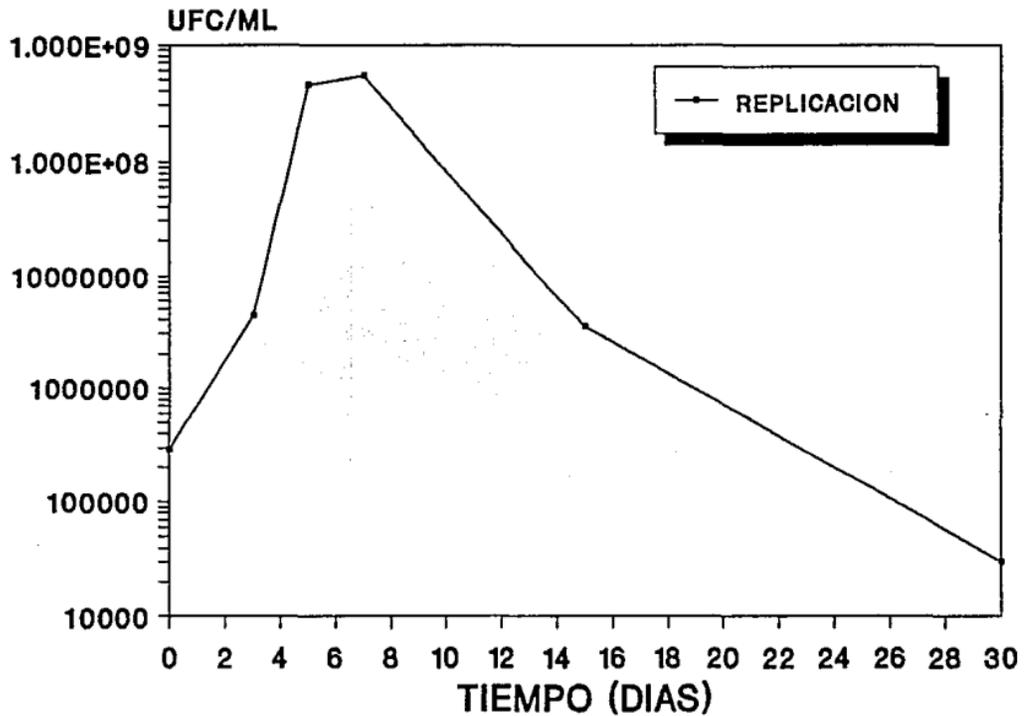


TABLA 2.

EFFECTO DEL PESO DEL RATON EN LA REPLICACION
EXPERIMENTAL DE B. bronchiseptica EN EL PULMON

P E S O D E L R A T O N			
DIA	< 16 g	16 < 22 g	> 22 g
0	2.375×10^2	2.5×10^2	2.91×10^2
3	6.383×10^4	3.458×10^5	1.64×10^4
7	1.0323×10^9	4.25×10^7	1.0816×10^5

LOS VALORES SON UFC/ml, PROMEDIO DE TRES RATONES OBTENIDOS EN LOS DIAS INDICADOS.

FIGURA 2

EFFECTO DEL PESO DEL RATON SOBRE LA REPLICACION
EXPERIMENTAL DE B bronchiaseptica EN EL PULMON

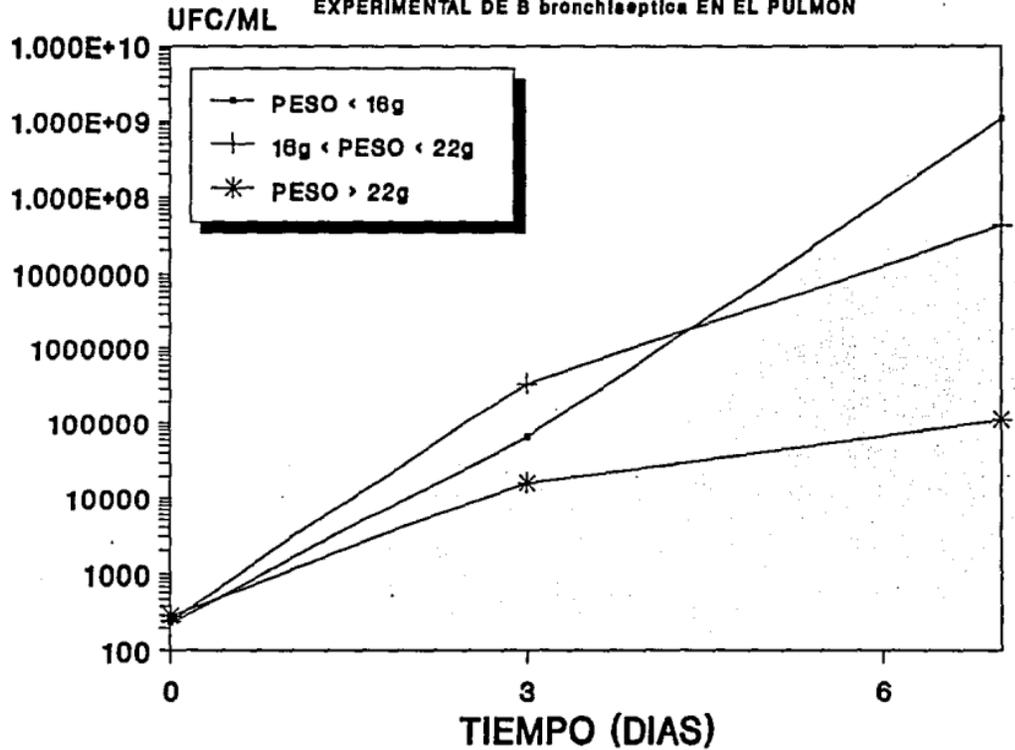


TABLA 3.

INMUNIZACION PASIVA CONTRA LA INFECCION EXPERIMENTAL CON B. bronchiseptica EN EL PULMON DE RATON.

DIA	CONTROL	INMUNIZADOS
0	4.0625×10^4	3.425×10^4
3	1.875×10^6	*
5	2.833×10^8	1.75×10^3
7	1.433×10^8	*
15	1.450×10^6	3.083×10^3
30	7.083×10^3	*

LOS VALORES SON UFC/ml PROMEDIO DE 3 RATONESSACRIFICADOS EN LOS DIAS INDICADOS

* NO SE OBSERVO CRECIMIENTO

FIGURA 3

INMUNIZACION PASIVA CON SUERO HIPERINMUNE DE CONEJO
CONTRA LA INFECCION DE *B. bronchiseptica*.

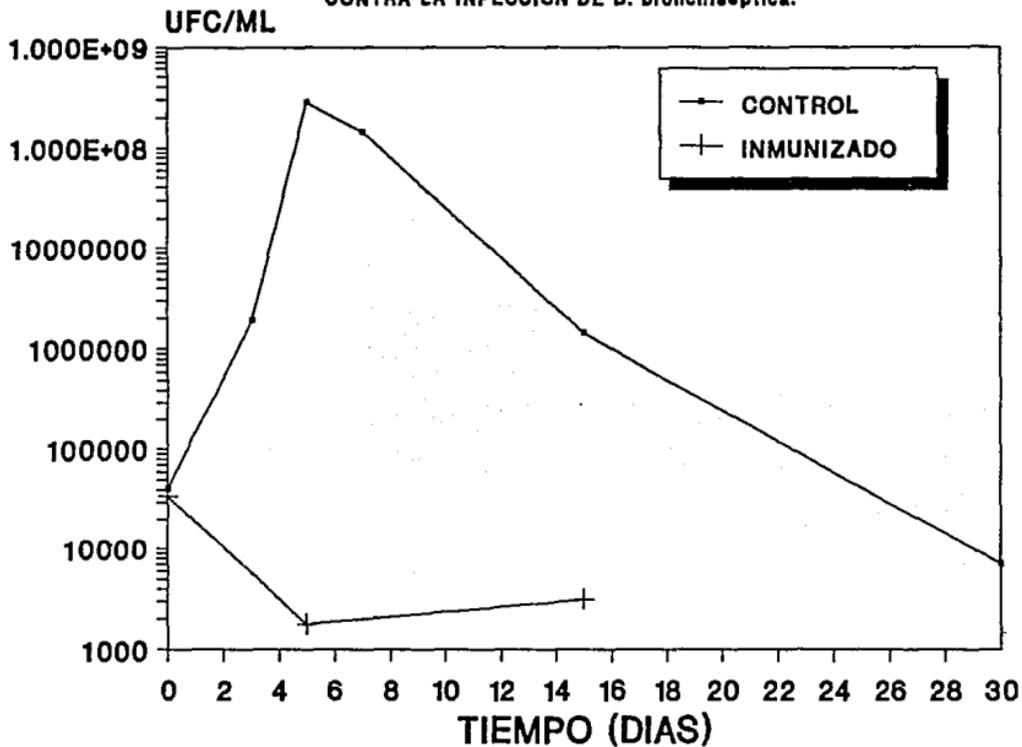


TABLA 4.

GRUPOS DE RATONES INMUNIZADOS* POR VIA ORAL Y/O
INTRAPERITONEAL CONTRA LA INFECCION EXPERIMENTAL
CON B. bronchiseptica.

DIA	CONTROL	IP / IP	ORAL / IP
0	$5.33 \times 10^{2**}$	4.58×10^2	7.50×10^1
3	7.50×10^4	1.102×10^4	9.66×10^5
7	2.9×10^4	3.80×10^4	5.44×10^4
15	2.6×10^4	1.371×10^5	4.34×10^4

* LA DOSIS PARA CADA RATON FUE DE 0.5 ml (10^9 bac/ml) DE UNA SUSPENSION DE LA CEPA LBF INACTIVADA
CON FORMALDEHIDO AL 0.3%

** LOS VALORES SON EL PROMEDIO DE LAS UFC/ml DE 3 RATONES EN LOS DIAS POSTERIORES AL DESAFIO

FIGURA 4

GRUPOS DE RATONES INMUNIZADOS POR VIA ORAL Y/O IP
CONTRA UNA INFECCION EXPERIMENTAL DE *B. bronchiseptica*

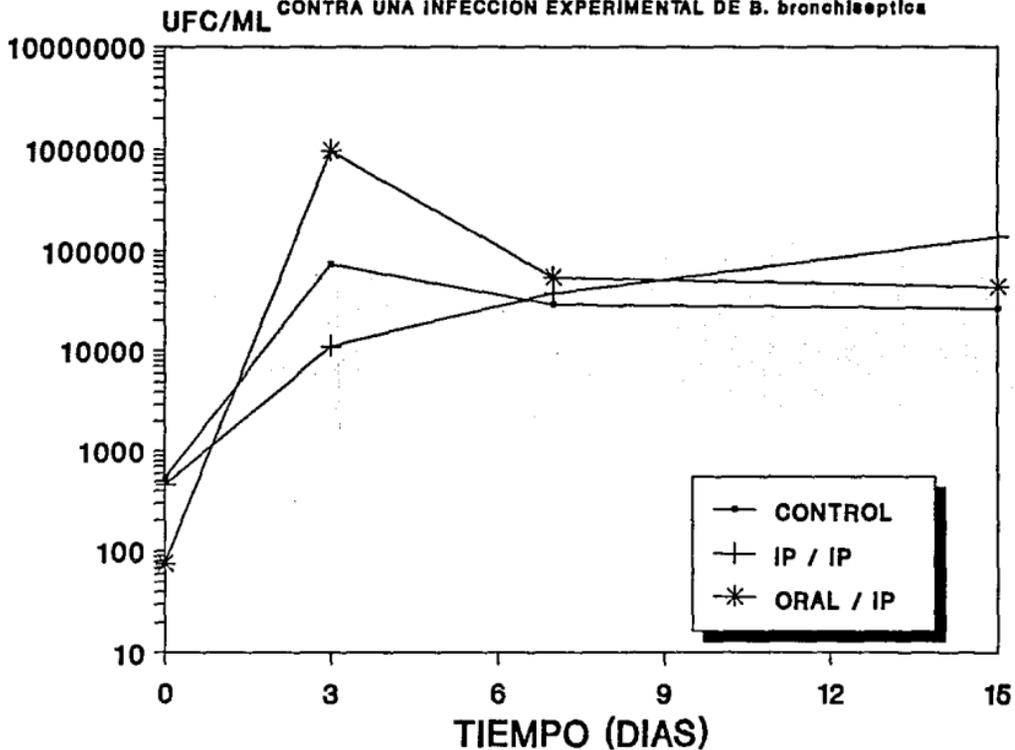


TABLA 5.

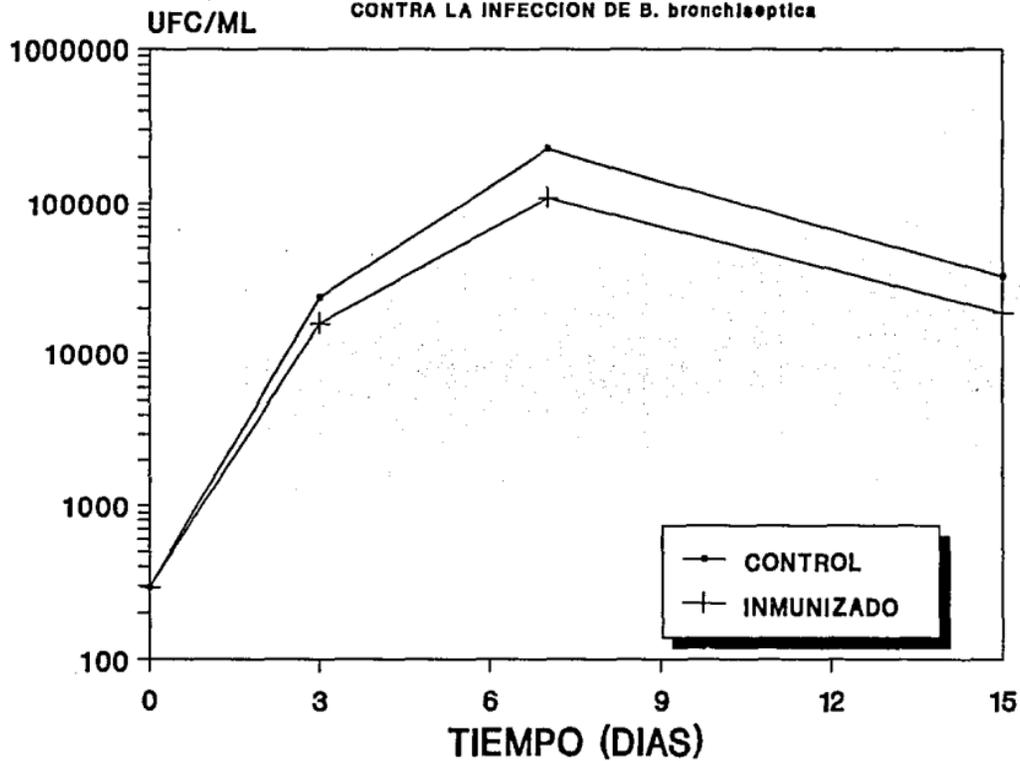
INMUNIZACION POR AEROSOL CONTRA UNA INFECCION
EXPERIMENTAL CON B. bronchiseptica

DIA	CONTROL	INMUNIZADO
0	2.91×10^2 *	2.91×10^2
3	2.36×10^4	1.6×10^4
7	2.275×10^5	1.081×10^5
15	3.24×10^4	1.88×10^4

* LOS VALORES SON EL PROMEDIO DE LAS UFC/ml DE 3 RATONES SACRIFICADOS EN LOS DIAS INDICADOS
DESPUES DEL DESAFIO

FIGURA 5

INMUNIZACION ACTIVA LOCAL POR MEDIO DE AEROSOL
CONTRA LA INFECCION DE *B. bronchiseptica*



5.0 DISCUSION

La infección por medio de aerosoles se ha desarrollado ampliamente en la investigación de enfermedades respiratorias. En años anteriores, Montaraz utiliza este sistema de inoculación en ratones, para estudiar la protección que ejerce una proteína de 68 Kd de Bordetella bronchiseptica (25). Mendoza en 1981 utilizó el modelo de remoción bacteriana en el pulmón de ratón para evaluar el desarrollo de una infección experimental con Bordetella bronchiseptica por medio de aerosoles (23).

Como se ha dicho Bordetella bronchiseptica es un agente causante de enfermedades respiratorias en numerosas especies de mamíferos, incluyendo perros, cobayos, gatos, cerdos y en condiciones especiales en humanos (11, 19, 29).

El propósito de este estudio fué evaluar que tipo de inmunización es capaz de proteger el tracto respiratorio de ratón contra la colonización y replicación de Bordetella bronchiseptica, después de enfrentarlos a un desafío por medio de aerosoles.

Los datos del desarrollo de la infección por medio de aerosoles en ratones de 4 semanas de edad indican que una dosis de aproximadamente 10^2 a 10^5 bacterias/ml es capaz de colonizar la mucosa del tracto respiratorio y pulmones e iniciar su replicación hasta alcanzar un máximo entre el quinto y séptimo

día post-infección, a partir de entonces el número encontrado disminuye debido a la fagocitosis (8) y/o por la presencia de anticuerpos neutralizantes que se producen por una estimulación continua del sistema inmune, sin embargo, los microorganismos se mantienen aún después de 30 días post-infección.

Magyar y Semjén mencionan que la persistencia de los microorganismos pertenecientes al género de Bordetella en el tracto respiratorio se debe a su alta afinidad para unirse a células del epitelio ciliado de animales susceptibles y también a los factores de virulencia que le permiten establecerse y desarrollarse adecuadamente (20, 37).

A lo largo del desarrollo experimental se pudo establecer que la severidad de la infección depende de la edad y el peso de los ratones, en donde los animales más jóvenes y de menor peso corporal son los que presentan un mayor nivel de infección que se observa en el máximo nivel de ufc/ml obtenidos entre los días 5 y 7 después de la aerosolización.

Diversos estudios indican que ratones de 2 a 5 días de edad desarrollan lesiones severas o características de la RAP cuando son inoculados con cepas virulentas de Bordetella bronchiseptica intranasalmente (35, 20).

En el estudio realizado por Mendoza no se observó el desarrollo de las lesiones de la infección de rinitis atrófica, indicando que esto puede deberse a la edad de los ratones que era de 21 días (23).

Por otra parte, se menciona que existe una variación considerable entre las cepas de Bordetella bronchiseptica y su capacidad de colonizar y producir lesiones neumónicas en los cerdos jóvenes, como son deformación facial, retardo en el crecimiento y destrucción de los cornetes nasales, esta variación depende propiamente de las características fenotípicas asociadas con la virulencia (34).

Además, las infecciones experimentales en animales de laboratorio producidas por Bordetella bronchiseptica dependerán de la cepa utilizada, la virulencia de dicha cepa, la dosis empleada y por la resistencia natural de los animales a la infección (20).

Los resultados de inmunización pasiva muestran que la inoculación intraperitoneal de suero hiperinmune contra la cepa LBF de Bordetella bronchiseptica fué capaz de disminuir notablemente la replicación de la cepa virulenta en el pulmón del ratón, esto indica que estos anticuerpos llegan al epitelio mucosal y colaboran en la eliminación de las bacterias neutralizando productos bacterianos como enzimas y tóxicas.

La presencia de anticuerpos del tipo IgG en el pulmón de los ratones se puede explicar como resultado de la respuesta inflamatoria, en donde se produce una extravasación del plasma que incluye células y proteínas.

Se han observado resultados parecidos en ratones recién nacidos de madres que fueron inmunizadas contra este patógeno, en donde las crías presentan resistencia a la infección, ya que los anticuerpos maternos que son transferidos primero por placenta y después por calostro llegan a las mucosas y evitan la adherencia y posteriormente la colonización de las bacterias en el tracto respiratorio. En ese estudio se encuentra una correlación estrecha entre la supresión de la multiplicación bacteriana y los niveles altos de estos anticuerpos, así como la protección contra la atrofia del cornete nasal (29).

En los experimentos desarrollados para evaluar la inmunización activa sobre la replicación de Bordetella bronchiseptica en ratones infectados por medio de aerosoles, se encontró que dos inmunizaciones no fueron capaces de disminuir la replicación de los microorganismos en el pulmón, aunque el nivel de infección observado fuera menor, debido a la edad que presentaban los animales en el momento de la infección como ya se explicó anteriormente.

En estudios desarrollados con Salmonella typhimurium en ratones, se encuentra que la inmunización parenteral (intraperitoneal e intramuscular) es efectiva contra desafíos orales de cepas virulentas de ese patógeno. Sin embargo, la inmunización oral no es evidente y no protege aún después de tres semanas post-inmunización (26).

Se han realizado investigaciones en humanos y se ha observado que después de la administración oral de Streptococcus mutans, se induce la secreción de anticuerpos específicos en saliva, lágrimas y calostro contra este patógeno, haciéndose evidente la vacunación oral efectiva contra enfermedades infecciosas (12).

Steffen en 1991 desarrolló un estudio en ratas inmunizadas localmente con microorganismos formalinizados, para determinar la presencia de anticuerpos de tipo IgA e IgG en saliva, suero y lavados pulmonares contra Mycoplasma pulmonis, en ese estudio se encuentra que los niveles de anticuerpos detectados en la respuesta secundaria tanto en saliva como en lavados pulmonares dependen de la dosis de inmunización. Los anticuerpos del tipo IgG encontrado en secreciones indica que provienen del suero y llegan a las mucosas por medio de trasudados (38).

Diversos autores indican que una estimulación oral adecuada requiere de dosis elevadas de inmunógenos, más de dos inmunizaciones y el uso de adyuvantes, además, se ha

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

establecido que los niveles de anticuerpos contra patógenos del tracto respiratorio, ya sea Bordetella bronchiseptica, dependen de la frecuencia de inmunización (3, 36, 38).

En este trabajo solamente se investigo el efecto de dos inmunizaciones, la dosis empleada fué de 5×10^8 para cada inmunización y se esperó 16 días entre cada una de ellas.

6.0. CONCLUSIONES.

Se concluye que dos inmunizaciones, ya sea sistémica o localmente fueron insuficientes para inducir una inmunidad que resultara en disminución de la replicación de Bordetella bronchiseptica en el pulmón de ratón.

Por otra parte se confirmó que la inmunidad pasiva artificial (con anticuerpos de clase preferentemente IgG) es capaz de suprimir notablemente la replicación de este microorganismo en el tracto respiratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Ackermann, M. R.; Rimler, R. B. and Thurston, J. R. 1991. Experimental model of atrophic rhinitis in gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* 59 (10): 3626-3629.
2. Amano, K. I. 1990. Biochemical and immunological comparison of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J. Gen. Microbiol.* 136 (3): 481-488.
3. An, L.; Pal, T.; Forsum, U.; Lindberg, A. 1992. Safety and immunogenicity of the live oral auxotrophic *Shigella flexneri* SFL124 in volunteer. *Vaccine* 10 (6): 395-404.
4. Barcenas, M. G. 1993. Comparación de la respuesta inmune humoral de cerdos inmunizados con *Bordetella bronchiseptica* y la desarrollada en casos clinicos de rinitis atrófica porcina. Tesis de Maestria, FES-Cuautitlan.
5. Bemis, D. A. and Wilson, S. A. 1985. Influence of potential virulence determinants on *Bordetella bronchiseptica*-induced ciliostasis. *Infect. Immun.* 50 (1): 35-42.

6. Bemis, D. A. and Kennedy, J. R. 1981. An improved system for studying the effect of *Bordetella bronchiseptica* on the ciliary activity of canine tracheal epithelial cell. *J. Infect. Dis.* 144: 349-357.
7. Bond, M. W.; Shrader, B.; Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. 1987. A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. II. Physicochemical characterization. *J. Immunol.* 139 (11): 3691-3696.
8. Cantorna, M. 1990. Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice. *Infect. Immun.* 58 (4): 1093-1100.
9. Coffman, R. L.; Shrader, B.; Carty, J.; Mosmann, T. R. and Bond, M. W. 1987. A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. I. Biologic characterization. *J. Immunol.* 139 (11): 3685-3690.
10. Ernst, P. B.; Clark, D. A.; Rosenthal, K. L.; Befus, A. D. and Bienenstock, J. 1986. Detection and characterization of cytotoxic T lymphocyte precursors in the murine intestinal intraepithelial leukocyte population. *J. Immunol.* 136 (6): 2121-2126.
11. Goodnow, R. A. 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol. Rev.* 44: 722-738.

12. Gregory, R. L. and Filler, S. J. 1987. Protective secretory immunoglobulin A antibodies in humans following oral immunization with *Streptococcus mutans*. *Infect. immun.* 55: 2409-2415.
13. Harriman, G. R.; Kunimoto, D. Y.; Elliott, J. F.; Paetkau, V. and Strober, W. 1988. The role of IL-5 in IgA B cell differentiation. *J. Immunol.* 140 (9): 3033-3039.
14. Issekutz, T. B. 1984. The response of gut-associated T lymphocytes to intestinal viral immunization. *J. Immunol.* 133 (6): 2955-2960.
15. Kagnoff, M. F. 1987. Effects of antigen-feeding on intestinal and systemic immune responses. I. Priming of precursor cytotoxic T cell by antigen feeding. *J. Immunol.* 120 (2): 395-399.
16. Klein, J. R.; Lefrancois, L. and Kagnoff, M. F. 1985. A murine cytotoxic T lymphocyte clone from the intestinal mucosa that is antigen specific for proliferatin and displays broadly reactive inducible cytotoxic activity. *J. Immunol.* 135 (6): 3697-3703.

17. Kume, K.; Nakai, T.; Samejima, Y. and Sugimoto, C. 1986. Properties of dermonecrotic toxin prepared from sonic extracts of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 52 (4): 370-377.
18. Magyar, T. 1990. Virulence and lientotoxicity of *Bordetella bronchiseptica* in mice. *Vet. Microbiol.* 25: 199-207.
19. Magyar, T.; Chanter, N.; Lax, A. J.; Rutter, J. M. and Hall, G. A. 1988. The pathogenesis of turbinate atrophy in pigs caused by *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Microbiol.* 18: 135-146.
20. Magyar, T.; Semjén, G. and Osváth, Z. 1985. Investigation of adhesive and nonadhesive *Bordetella bronchiseptica* strains in a suckling-mouse model. *Acta Vet. Hung.* 33: 137-141.
21. McDermott, M. R. and Bienenstock, J. 1979. Evidence for a common mucosal system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory and genital tissues. *J. Immunol.* 122: 1892-1898.

22. McGhee, J. R.; Mestecky, J.; Dertzbaugh, M. T.; Eldridge, J. H.; Hirasawa, M. and Kiyono, H. 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine*. 10 (2): 75-87.
23. Mendoza, E. S.; Ciprian, C. A.; Sotres, C. F.; Lara, S. V.; Camacho, M. J.; Tórtora, P. J y Montaraz, C. J. 1991. Remoción de *Bordetella bronchiseptica* del aparato respiratorio de ratones, previamente nebulizados. *Vet. Méx.* 22 (1): 57-61.
24. Mitsuru, W. 1990. Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *J. Gen. Microbiol.* 136 (3): 489-494.
25. Montaraz, J. A.; Novotny, P. and Ivanyi, J. 1985. Identification of a 68-kilodalton protective protein antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 47 (3): 744-751.
26. Mukkur, T. K. S. and Walker, K. H. 1992. Development and duration of protection against salmonellosis in mice and shepp immunised with live aromatic-dependent *Salmonella typhimurium*. *Res. Vet. Sci.* 52 (2): 147-153.

27. Murray, P. D.; McKenzie, D. T.; Swain, S. L. and Kagnoff, M. F. 1987. Interleukin 5 and interleukin 4 produced by peyer's patch T cells selectively enhance immunoglobulin A expression. *J. Immunol.* 139 (8): 2669-2674.
28. Novotny, P.; Kobisch, M.; Cownley, K.; Chubb, A. P. and Montaraz, J. A. 1985. Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* vaccines in specific-pathogen-free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 50 (1): 190-198.
29. Ohgitani, T.; Uchida, C.; Okabe, T. and Sasaki, N. 1992. Protective effect by cell-free antigen obtained from culture supernatant of fase I *Bordetella bronchiseptica*. *J. Vet. Med. Sci.* 54 (1): 37-42.
30. Oliveira, A. S. and Gil-Turness, C. 1988. Studies on the antigenic relationships of six adherent isolates of *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Microbiol.* 18: 327-333.
31. Peppler, M. S. and Schrupf, M. E. 1984. Phenotypic variation and modulation in *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* 44 (3): 681-687.

32. Richman, L. K.; Graeff, A. S.; Yarchoan, r. and Strober, W. 1981. Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper T cells and IgG suppressor T cells in the murine peyer's patch after protein feeding. *J. Immunol.* 126 (6): 2079-2083.
33. Richter, G. W. and Kress, Y. 1967. Electron microscopy of a strain of *Bordetella bronchiseptica*. *J. Bacteriol.* 94: 1216-1224.
34. Roop II, R. M.; Veit, H. P.; Sinsky, R. J.; Hewlett, E. L. 1987. Virulence factors of *Bordetella bronchiseptica* associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine. *Infect. Immun.* 55 (1): 217-222.
35. Sawata, A. and Kume, K. 1982. Nasal turbinate atrophy in young mice inoculated with *Bordetella bronchiseptica* of pig origin. *Res. Vet. Sci.* 34: 287-295.
36. Sekiya, K.; Kawahira, M. and Nakase, Y. 1983. Protection against experimental *Bordetella bronchiseptica* infection in mice by active immunization with killed vaccine. *Infect. Immun.* 41 (2): 598-603.

37. Semjén, G. and Magyar, T. 1985. A bovine haemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* responsible for adherence. Acta Vet. Hung. 33: 129-136.
38. Steffen, M. J. and Ebersole, J. L. 1992. Secretory immune responses to *Mycobacterium pulmonis*. Infect. Immun. 60 (2): 337-344.
39. Tomohiro, K. 1990. A study of secretory immunoglobulin A on membranous epithelial cells (M cells) and adjacent absorptive cells of rabbit peyer's patches. Gastroenterol Jpn. 25 (1): 15-23.