

2 11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"

"ESTUDIOS SOBRE LA INTERACCION DEL VIRUS
DE AUJESZKY CON PASTEURÉLLA MULTOCIDA
EN LOS PROCESOS NEUMONICOS DEL CERDO"

T E S I S

Q U E P R E S E N T A N :

JOSE IGNACIO BADIOLA SAIZ

JUAN PUJOLS ROMEU

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

AREA MICROBIOLOGIA

ASESORES DE LA TESIS:

MVZ. MSC. PHD. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN

MVZ. PHD. ALVARO AGUILAR SETIEN

MEXICO, D. F.

2002

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 esta 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.

H. Jurado:

MVZ. PhD. Alvaro Aguilar Setién

MC. José Camacho Machín

MVZ. PhD. Roberto Cervantes Olivares

MVZ. MC. Abel Ciprián Carrasco

MVZ. PhD. Antonio Morilla González

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México); los autores estuvieron becados por la Conselleria d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya (España) y por Intercambio Académico de la UNAM (México).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se inició el mes de mayo de 1983 en el departamento de virología del INIP (Palo Alto) y se continuó, a partir de agosto de 1983, en la sección de Posgrado de la FES-Cuautitlan. Agradecemos a los responsables de estos centros las facilidades prestadas.

Esta investigación fue realizada bajo la dirección del Ph.D. Eliseo Hernández y del Ph.D. Alvaro Aguilar, a ellos debemos el enfoque científico y crítico de este estudio.

Queremos hacer extensiva nuestra gratitud a Abel Ciprián, José Camacho, Jorge Tórtora, Roberto Cervantes, Denis Hurley y a todos los miembros del Posgrado, especialmente a nuestros compañeros Carlos, Susana, Sofía, Felipe, Said y Viky por su estímulo, ayuda y apoyo de sinteresado en todo momento.

A tí mi fiel amiga y compañera, por tu
paciencia y estímulo.

A padres y hermanos por el ser,
guía y apoyo.

A Murphy por sus terribles
enseñanzas.

INDICE GENERAL

	Página
RESUMEN	1
I.OBJETIVOS.	8
II.REVISION DE LA LITERATURA.	9
1.Pulmón, mecanismos de defensa.	9
1.1.Sistemas de transporte de partículas	10
1.2.Sistema de macrófagos alveolares,células fagocitari- arias	12
1.2.1.Efecto de la infección viral sobre la fun- ción del macrófago	16
1.2.2.Factores bacterianos que disminuyen la fun- ción del macrófago alveolar.	18
1.3.Aspectos de la defensa inmune pulmonar	21
1.3.1.Inmunidad celular.	24
2.Inhalación de partículas	27
2.1.Aerosoles.	27
2.2.Distribución y mecanismos de depósito de las par- tículas inhaladas.	28
3.Remoción bacteriana.	30
3.1.Aerosoles de bacterias	30
3.2.Aparatos productores de aerosoles.	31
3.3.Modelos experimentales de remoción bacteriana.	31
3.3.1.Ratón.	32
3.3.2.Bovinos.	35
3.3.3.Cerdos	35
4.Interacción virus-bacteria en el tracto respiratorio	36
4.1.Patogénesis de las neumonías por virus (algunos aspectos).	38
4.2.Mecanismos bactericidas del pulmón afectados por la infección viral	40
5.Infecciones del tracto respiratorio del cerdo.	43
5.1.Importancia económica.	43
5.2.Agentes etiológicos de las neumonías porcinas.	44
5.3.Aujeszky	49

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

	Página
5.3.1. Etiología.	49
5.3.2. Epidemiología.	55
5.3.3. Patogénesis.	59
5.3.4. Síntomas clínicos.	61
5.3.5. Lesiones macroscópicas	63
5.3.6. Lesiones microscópicas	64
5.3.7. Latencia	66
5.3.8. Cepas y marcadores de virulencia	71
5.3.9. Papel del virus de la enfermedad de Aujeszky en los problemas respiratorios del cerdo	75
5.4. <u>Pasteurella multocida</u>	78
5.4.1. Características generales.	78
5.4.2. Caracterización antigénica	79
5.4.3. Patología.	81
III. MATERIAL Y METODOS.	86
1. Colección de muestras en rastro	86
1.1. Clasificación de las muestras.	86
1.2. Material para bacteriología.	86
1.2.1. Pulmón neumónico	86
1.2.2. Pulmón normal.	87
1.3. Material para aislamiento viral.	87
1.3.1. Pulmón neumónico	87
1.3.2. Pulmón normal.	87
1.4. Material para serología.	88
2. Aislamiento bacteriano.	88
3. Identificación bacteriana por pruebas bioquímicas	88
4. Tipificación de las <u>Pasteurella multocida</u>	91
4.1. Prueba de la hialuronidasa estafilocócica.	91
4.2. Prueba de la hialuronidasa testicular bovina	91
4.3. Prueba de la Acriflavina	92
4.4. Producción de exotoxina dermonecrótica	92

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Página

5. Aislamiento del virus de la enfermedad de Aujeszky	93
5.1. Inoculación a conejo	93
5.2. Inoculación a células PK-15.	94
6. Detección de anticuerpos séricos contra el virus de Aujeszky	96
6.1. Estandarización de la técnica (IEOP)	96
6.1.1. Preparación del antígeno	96
6.1.1.1. Extracción con Polisorbato 80.	96
6.1.1.2. Precipitación con sulfato de amonio.	99
6.1.2. Sueros control	99
6.1.3. Soluciones tampón.	101
6.1.3.1. Veronal 0.219 M.	101
6.1.3.2. Veronal 0.149 M.	101
6.1.3.3. Veronal 0.1986 M	101
6.1.4. Otros factores tomados en cuenta	101
6.2. Realización de la prueba tras la estandarización	102
7. Estudio de patogenicidad de las Pasteurelas aisladas	103
7.1. Material	103
7.2. Método	103
8. Patrón de remoción de <u>Pasteurella multocida</u>	104
8.1. Material	104
8.2. Método	105
9. Efecto del sobrenadante de un cultivo de <u>P. multocida</u> VC-Cap sobre la remoción pulmonar de dicha bacteria.	109
9.1. Material	109
9.2. Método	109
10. Remoción pulmonar de <u>P. multocida</u> a diferentes tiempos posinfección con el virus de la enfermedad de Aujeszky	111
10.1. Material.	111
10.2. Método.	111

11. Mortalidad en ratones aerosolizados con virus de la enfermedad de Aujeszky y <u>P.multocida</u>	114
11.1. Material.	114
11.2. Método.	114
12. Estudio histopatológico de los pulmones de ratón tras la aerosolización con VAC-1 y/o <u>P.multocida</u> VC-Cap .	115
12.1. Material.	115
12.2. Método.	115
13. Análisis estadístico	117
13.1. Prueba de Ji-cuadrada	117
13.2. Análisis de varianza.	117
13.3. Prueba de Duncan.	118
13.4. Análisis de varianza de Kruskal-Wallis.	118
13.5. Análisis de covarianza.	118
13.6. Prueba de Tukey	118
13.7. Análisis de regresión	119
Lista de fabricantes (material y reactivos)	120
Abreviaturas empleadas en cuadros y figuras (resultados y apéndices).	121
IV. RESULTADOS.	123
1. Estandarización de la contraelectroforesis.	123
2. Estudio en rastro	126
3. Estudio de patogenicidad de las <u>Pasteurella</u> aisladas.	133
4. Patrón de remoción pulmonar	139
5. Efecto del líquido sobrenadante de un cultivo de <u>P.multocida</u> VC-Cap	148
6. Efecto del tiempo posinfección con virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de <u>P.multocida</u> VC-Cap	161
7. Mortalidad en ratones aerosolizados con virus de la enfermedad de Aujeszky y <u>P.multocida</u>	176
8. Estudio histopatológico de la interacción entre virus de la enfermedad de Aujeszky y <u>P.multocida</u>	179

	Página
9.Otros resultados.	189
9.1.Relación entre peso de pulmón y peso de ratón . .	189
9.2.Relación entre la concentración del aerosol bac- teriano y el depósito en el pulmón.	189
9.3.Estudio del peso pulmonar de los ratones utiliza- dos en el experimento para determinar el efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción de <u>P.multocida</u>	192
V.DISCUSION Y CONCLUSIONES.	197
APENDICE A.	215
APENDICE B.	217
APENDICE C.	219
APENDICE D.	220
APENDICE E.	233
APENDICE F.	239
APENDICE G.	246
APENDICE H.	247
REFERENCIAS	250

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
# 1	:Resultados de la estandarización de la IEOP.....	124
# 2	:Titulación de los antígenos del virus de Aujeszky.....	125
# 3	:Tabla de contingencia para tipo de pulmón y tipo de aislamiento.....	130
# 4	:Tabla de contingencia para serología y tipo de aislamiento.....	130
# 5	:Tabla de contingencia para serología y tipo de pulmón..	130
# 6	:Tabla de contingencia para la combinación de tipo de pulmón-serología y el tipo de aislamiento.....	131
# 7	:Resultados de la tipificación capsular de <u>Pasteurella</u> ..	132
# 8	:Resultados del estudio de patogenicidad para ratón.....	135
# 9	:Relación de bacterias que, en el estudio de patogenicidad para ratón, no mataron al 100% de animales.....	136
#10	:Tabla de análisis de varianza (ANOVA) para las bacterias que, en el estudio de patogenicidad para ratón, mostraron una mortalidad del 100%.....	137
#11	:Prueba de Duncan para el ANOVA del cuadro # 10.....	137
#12	:Tabla de contingencia para tipo capsular y patogenicidad para ratón.....	138
#13	:Medias y desviaciones estandar para las unidades formadoras de colonia (UFC) de la curva patrón de remoción..	144
#14	:Tabla de ANOVA para las bacterias por pulmón (BP) de la curva patrón de remoción.....	145
#15	:Prueba de Duncan para las BP de la curva patrón.....	145
#16	:Prueba de Duncan para las BGP de la curva patrón.....	145
#17	:Medias y desviaciones estandar para los índices de retención (RET) y remoción (REM) de la curva patrón.....	146
#18	:Tabla de ANOVA y prueba de Duncan para RETBP y REMBP de la curva patrón.....	147
#19	:Medias y desviaciones estandar para las UFC del experimento para determinar el efecto del líquido sobrenadante de un cultivo de <u>P.multocida</u> sobre la eliminación pulmonar de <u>P.multocida</u> VC-Cap.....	155
#20	:Tabla de ANOVA para las LBGP del experimento con el que se determinó el efecto de SCPF sobre la eliminación pulmonar de <u>P.multocida</u> VC-Cap.....	156
#21	:Prueba de Duncan para determinar el efecto de tratamiento y hora, realizada con los datos del cuadro #20..	157
#22	:Medias y desviaciones estandar de RET y REM para los diferentes tratamientos del experimento con el que se determinó el efecto de SCPF sobre la capacidad de el pulmón para eliminar la <u>P.multocida</u> VC-Cap.....	158
#23	:Medias y desviaciones estandar de los índices de retención (RETT) y remoción (REMT), transformados por arco tangente, del cuadro # 22.....	159

#24	:Tabla de ANOVA y prueba de Duncan para RETTBGP y REMTBGP del experimento para ver el efecto de SCPF.....	160
#25	:Concentración (UFC/ml) de los diferentes inóculos de <u>P.multocida</u> VC-Cap utilizados para la aerosolización de los animales inoculados previamente, y con diferentes días de intervalo, con la suspensión del virus de la enfermedad de Aujeszky (<u>VAC-1</u>).....	167
#26	:Medias y desviaciones estandar de los diferentes tratamientos y horas en el experimento para determinar el efecto de VAC-1 sobre la remoción pulmonar de <u>P.multocida</u> VC-Cap.....	168
#27	:Tabla de ANOVA para LBP del experimento para determinar el efecto de VAC-1 sobre la remoción.....	169
#28	:Prueba de Duncan para detectar diferencias significativas entre hora para LBP.....	170
#29	:Prueba de Duncan para detectar diferencias significativas entre día para LBP.....	171
#30	:Medias y desviaciones estandar de RET y REM para los diferentes tratamientos del experimento en el que se determinó el efecto de VAC-1.....	172
#31	:Tabla de ANOVA y prueba de Duncan para RETLBP y REMLBP del experimento en el que se determinó el efecto de VAC-1 sobre la capacidad pulmonar para eliminar la <u>P.multocida</u> VC-Cap.....	173
#32	:Medias y desviaciones estandar de RETT y REMT para los diferentes tratamientos del experimento en el que se determinó el efecto de VAC-1.....	174
#33	:Tabla de ANOVA y prueba de Duncan para RETT LBP y REMT LBP del experimento en el que se determinó el efecto de VAC-1.....	175
#34	:Tiempos de muerte de cada uno de los ratones del estudio de mortalidad al combinar la inoculación de VAC-1 y la inoculación de <u>P.multocida</u> VC-Cap.....	178
#35	:Grado de lesión pulmonar, microscópica, de cada uno de los ratones utilizados en el estudio de tiempo de muerte.....	183
#36	:Grado de lesión pulmonar, microscópica, de cada uno de los ratones utilizados en el estudio, exclusivo, de lesiones histopatológicas.....	184
#37	:Tabla de ANOVA para el grado de lesión de los ratones de "tiempo de muerte".....	185
#38	:Prueba de Duncan para el grado de lesión de los ratones de "tiempo de muerte".....	185
#39	:Tabla de ANOVA para el grado de lesión de los ratones de "anatomía patológica".....	186

Cuadro

Página

#40	:Tablas de ANOVA, tras desdoblarse el tipo de lesión, para los ratones de "anatomía patológica".....	187
#41	:Prueba de Duncan realizada con los resultados del ANOVA de Pleuritis del cuadro # 40.....	188
#42	:Tabla de ANOVA para ver el efecto de día y hora sobre la relación entre peso de pulmón observado y peso de pulmón esperado.....	195
#43	:Prueba de Duncan correspondiente al cuadro # 42.....	196

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
# 1 :Histograma con el número de casos de rastro con aislamiento bacteriano negativo y positivo.....	129
# 2 :Medias y desviaciones estandar del número de bacterias (UFC) por gramo de pulmón, transformación logarítmica (LBGP), en relación al tiempo transcurrido tras el aerosol de <u>Pasteurella multocida</u> VC-Cap.....	141
# 3 :Curva patrón de retención (RET), calculado dicho índice a partir de LBGP.....	142
# 4 :Curva patrón de remoción (REM) de la <u>P.multocida</u> VC-Cap.....	143
# 5 :Medias y desviaciones estandar de las LBGP del experimento para determinar el efecto del líquido sobrenadante de un cultivo de <u>Pasteurella multocida</u> VC-Cap, sobre la <u>ca</u> pacidad del pulmón para eliminar dicha bacteria.....	150
# 6 :Indices de retención, en base a LBGP (RET LBGP), del experimento para determinar el efecto del SCPF sobre la eliminación bacteriana del pulmón.....	151
# 7 :Indices de remoción, paralelos a los índices de retención de la figura # 6.....	152
# 8 :Indices de retención, transformados por arco tangente, calculados a partir de los índices de retención con los que se construyó la <u>fi</u> gura # 6.....	153
# 9 :Indices de remoción, transformados por arco tangente, calculados a partir de los índices de remoción con los que se construyó la <u>fi</u> gura # 7.....	154
#10 :Número de UFC por gramo de pulmón, transformación logarítmica (LBGP), a diferentes tiempos posinfección con el virus de la enfermedad de Aujeszky, en los grupos sacrificados inmediatamente después del aerosol bacteriano y en los grupos sacrificados 6 horas más tarde.....	164
#11 :Indices de retención, calculados a partir de LBGP en relación al tiempo transcurrido desde la <u>infec</u> ción con el virus de la enfermedad de Aujeszky.....	165

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura

Página

#12 :Indices de remoción (REM), paralelos a los índices de retención de la figura # 11.....	166
#13 :Estudio de mortalidad, en ratones, al combinar un aerosol de Aujeszky con un aerosol de <u>P.multocida</u> VC-Cap.....	177
#14 :Histograma con el grado y tipo de lesión anatomopatológica media de cada uno de los grupos de animales de "tiempo de muerte".....	181
#15 :Grado y tipo de lesión anatomopatológica media de cada uno de los grupos de animales de "anatomía patológica".....	182
#16 :Recta de regresión lineal entre peso de pulmón y peso de ratón.....	190
#17 :Recta de regresión entre el número de bacterias del aerosol y el número de bacterias depositadas en el pulmón.....	191
#18 :Efecto del tiempo de infección con virus de Aujeszky sobre la relación entre el peso del pulmón/peso del ratón, observada y esperada, en los grupos de ratones sacrificados inmediatamente después del aerosol bacteriano y en los sacrificados 6 horas más tarde del mismo.....	194
Esquema # 1.....	90
Esquema # 2.....	95
Esquema # 3.....	97
Esquema # 4.....	100
Esquema # 5.....	106
Esquema # 6.....	110
Esquema # 7.....	112

RESUMEN

Las enfermedades respiratorias del cerdo han mostrado estar asociadas a una gran variedad de agentes etiologicos, aunque sólo influenza porcina y Haemophilus influenzae han mostrado una patogenicidad definida para el pulmón.

En los últimos años, la atención se ha centrado en el estudio de hipótesis según las cuales la interacción de uno o más agentes etiológicos permita explicar la elevada incidencia y persistencia de este tipo de infecciones.

El virus de la enfermedad de Aujeszky ha sido poco estudiado en cuanto a su participación como agente primario en las neumonias del cerdo, a pesar de su marcado tropismo hacia el sistema nervioso central y el aparato respiratorio.

El objetivo del presente trabajo fue aportar evidencias de la participación de este virus en los procesos neumónicos, mediante un estudio en animales de rastro, así como establecer un modelo experimental, en ratón, para demostrar la interacción del virus y Pasteurella multocida, considerada esta como uno de los agentes secundarios más importantes en la neumonias del cerdo.

En el estudio de rastro se muestrearon 106 pulmones. 72 (67.93%) fueron de tipo neumónico y 34 (32.07%) de tipo normal.

En 47 (67.28%), de los 72 pulmones neumónicos, se observó serología positiva al virus de Aujeszky; mientras que en los 34 casos con pulmón normal, sólo 11 (32.35%) se acompañaron de serología positiva.

De los 72 pulmones neumónicos hubo 37 (51.39%) de los que se aisló algún tipo de Pasteurella, 18 (25%) de los que se aislaron otras bacterias y 17 (23.61%) de los que no se aisló nin

guna bacteria. De los 34 pulmones normales en 7 casos (20.59%) se aislaron Pasteurellas, en 3 (8.82%) otras bacterias y en 24 (70.59%) no se logró ningún tipo de aislamiento.

Tras el análisis estadístico se comprobó una relación altamente significativa entre pulmón neumónico y serología positiva a Aujeszky ($p=0.0015$); entre tipo de pulmón frente a tipo de aislamiento ($p=0.0002$) y entre serología positiva al virus de la enfermedad de Aujeszky frente a tipo de aislamiento ($p=0.0002$).

Estos resultados apoyan la hipótesis de que el virus de la enfermedad de Aujeszky puede estar involucrado como agente primario en las neumonías del cerdo ya que, como hemos dicho, la serología positiva estuvo fuertemente relacionada a pulmones neumónicos y a la colonización pulmonar por Pasteurella, aunque también a otro tipo de agentes bacterianos.

De las Pasteurella aisladas 6 (13.64%) resultaron ser Pasteurella haemolytica y las 38 restantes (83.36%) Pasteurella multocida.

La tipificación capsular de P. multocida arrojó los siguientes resultados: 7 (18.42%) fueron de tipo capsular A, 26 (68.42%) tipo capsular D y las 5 restantes (13.16%) no se pudieron clasificar por las técnicas utilizadas.

El estudio para determinar las P. multocida tipo D productoras de necrotoxina mostró que 7 (26.92%) de las 26 aisladas fueron positivas a la prueba dermatocutánea.

Estos resultados permiten un mejor conocimiento del tipo capsular predominante, en los procesos neumónicos de cerdo, en la República Mexicana, aunque la proporción de los distintos tipos capsulares no es similar a otros estudios reportados en la literatura.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

3

El estudio de patogenicidad para las Pasteurella aisladas se realizó por inoculación intraperitoneal a ratones, con suspensiones de Pasteurella lavadas y ajustadas a una concentración de 0.65 D.O.₄₂₀. En este estudio se inocularon 38 grupos de 4 ratones, distribuidos al azar.

El análisis de varianza demostró que el tiempo de muerte dependió de la bacteria inoculada. No obteniéndose ninguna relación entre tiempo de muerte y tipo capsular, así como tampoco para la producción de necrotoxina.

La curva de remoción pulmonar en ratón para una de las P.multocida tipo D, productora de necrotoxina, fue realizada con 20 ratones distribuidos en cinco grupos, todos los grupos creados al azar, e inoculados por aerosol (15 minutos) en una cámara de acrílico con 2 nebulizadores. Los animales inoculados se sacrificaron a diferentes intervalos de tiempo (0, 6, 12, 24 y 48 horas), realizándose el recuento de bacterias viables (UFC) de los pulmones de los animales sacrificados.

De los resultados obtenidos se observó un patrón de remoción distinto al publicado para otras bacterias, tanto gram-positivas como gram-negativas.

El análisis estadístico sólo demostró diferencias persistentes entre 0 y 6 horas.

En este momento (6 horas) la remoción fue máxima, observándose un marcado enlentecimiento durante las horas siguientes.

Cabe apuntar que el fallo observado en la remoción de esta bacteria no sería suficiente para explicar el desarrollo de neumonías en ratón, ya que seis días después de la inoculación de la bacteria ésta no se logró aislar del pulmón.

Para tratar de dar algún tipo de explicación a lo ocurrido

en la curva de remoción patrón, se estudió el efecto del líquido sobrenadante filtrado de un cultivo de P.multocida tipo D necrotóxica. Este estudio se realizó con tres grupos de 6 ratones, ordenados aleatoriamente.

12 horas antes de la inoculación de Pasteurella, un grupo fue aerosolizado con PBS, otro con caldo BHI y el último con el sobrenadante filtrado de un cultivo de la Pasteurella empleada en el experimento. Los tres grupos fueron inoculados con un aerosol de Pasteurella y se sacrificaron 3 de los 6 animales a las 0 horas y los otros tres seis horas más tarde del aerosol bacteriano.

Se observó que los controles (PBS y BHI) presentaron una remoción normal, mientras que el grupo tratado con sobrenadante presentó una disminución en la eliminación de bacterias. El análisis estadístico por ANOVA y Duncan demostró diferencias entre 0 y 6 horas para los grupos control, no detectándose diferencias para el grupo tratado con sobrenadante.

Estos resultados confirmaron la hipótesis de que la bacteria produce alguna sustancia, a partir de las 6 horas, probablemente la necrotoxina, que disminuye la velocidad de eliminación de la bacteria del pulmón.

Por último se desarrolló un modelo experimental en ratón para demostrar la interacción entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y P.multocida, midiéndose remoción pulmonar, curva de mortalidad y estudio histopatológico de lesiones.

Para el estudio de remoción pulmonar de P.multocida a diferentes tiempos posinfección con el virus de la enfermedad de Aujeszky se utilizaron 56 ratones agrupados en 7 lotes de 8 ratones cada uno.

48 ratones se inocularon en bloque con un aerosol del virus y 8 quedaron como grupo control, sin virus. P.multocida se inoculó en aerosol a los 0, 2, 3, 5, 7, 11 y 15 días posinfección viral.

De los 8 ratones de cada grupo, se sacrificaron 4 a las 0 horas y los otros 4 a las 6 horas del aerosol de Pasteurella multocida. Realizándose en todos los ratones el recuento de bacterias viables de los homogenados pulmonares.

Los resultados obtenidos muestran una marcada disminución de la eliminación bacteriana del pulmón, hacia el día 11 posinfección de Aujeszky. Mostrando todos los grupos diferencia estadística entre el número de bacterias recuperadas a las 0 y 6 horas, excepto para los días 11 y 15 en los que la remoción pulmonar estuvo inhibida.

En el experimento de mortalidad con ratones inoculados con el virus de Aujeszky y P.multocida a distintos intervalos de tiempo, se utilizaron 6 grupos de 4 ratones. Uno de los grupos se inoculó exclusivamente con virus, otro grupo sólo con P.multocida, mientras que los cuatro restantes se inocularon con aerosoles de la bacteria a los 2, 3, 7 y 11 días posinfección del virus.

Resultando que ninguno de los cuatro ratones inoculados únicamente con el virus murió; el grupo inoculado sólo con P.multocida, presentó una mortalidad del 50% e igualmente ocurrió con los ratones del grupo día 2. El resto de grupos inoculados con la bacteria los días 3, 7 y 11 posinfección del virus, murieron el 100% de los animales.

Aunque no se pudo realizar el tratamiento estadístico ya

que no todos los ratones murieron durante el experimento, este estudio sugiere una relación sinérgica entre los dos agentes que es dependiente del intervalo de tiempo en que fueron inoculados.

Por ultimo se realizó un estudio hitopatologico de los pulmones de los ratones inoculados con el virus y la bacteria.

Este trabajo se subdividió en dos, por un lado se procesaron los 24 ratones utilizados para el estudio de tiempo de muerte y de otro lado 24 ratones que constituian el lote para anatomía patológica, estos animales fueron distribuidos al azar en 6 grupos de 4 ratones, uno de los grupos se inoculó solo con el virus y otro unicamente con la bacteria, los cuatro grupos restantes se inocularón con un aerosol de P. multocida a los 2,3,7,y 11 dias pos-infección del virus. Sacrificandose 2 ratones a la hora 0 y los otros 2 a las 48 horas des pues del último aerosol.

La razón de estos dos experimentos se debe a que se intenan medir dos cosas distintas, en el primer caso se dejaron evolucionar las lesiones hasta la muerte de los animales, o bien si sobrevivian eran a los 15 dias despues de la última inoculación. En el segundo caso los animales se sacrificaron a las 0 y a las 48 horas despues del último aerosol.

Este estudio anatomo-patológico dió como resultado que casi todos los ratones de los dos experimentos presentaron edema y migración de celulas leucocitarias hacia la pared alveolar y los espacios aereos del pulmón, mientras que una menor proporción de ratones presentaron además infiltrado perivascular de células leucocitarias así como pleuritis exudativa con predominio de polimorfonucleares.

El análisis estadístico de la puntuación de las lesiones

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

7

arrojó los siguientes resultados: para el estudio de los ratones de "tiempo de muerte", el ANOVA y la prueba de Duncan mostraron diferencias significativas del grado de lesión entre control de virus, D2 y control de Pasteurella, D3, D7 y D11. Cabe señalar aquí que dos de los ratones del control de Pasteurella, y precisamente los que no murieron, se perdió la muestra, lo que probablemente habría supuesto una disminución del grado de lesión media del grupo, haciendo que se diferenciara de los días 3, 7 y 11. Para el estudio del grupo de "anatomía patológica", el ANOVA sólo mostró diferencias significativas con respecto al tipo de lesión, observándose que los grupos D3 y D11, presentaron un marcado desarrollo de pleuritis en comparación a los grupos control y del resto de días.

Por todo el conjunto de resultados hasta aquí expuestos, podemos sugerir la importancia del virus de Aujeszky en el desarrollo de procesos neumónicos en el cerdo.

I OBJETIVOS

El objetivo global de esta investigación fue el de estudiar la interacción entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y Pasteurella multocida en el desarrollo de procesos neumónicos en el cerdo.

Para lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1.-Establecer una prueba inmunológica fiable para la detección de anticuerpos contra el virus de Aujeszky.

2.-Poner de manifiesto la relación existente entre el virus de Aujeszky y P.multocida en pulmones neumónicos obtenidos en rastro, como base para presentar evidencia en el campo de la posible combinación de estos agentes en los problemas respiratorios.

3.-Investigar el tipo capsular de las Pasteurella aisladas en rastro, para conocer que tipos son los más frecuentes en México y proponer un modelo experimental que permita diferenciar la virulencia de las bacterias aisladas.

4.-Establecer el patrón de remoción pulmonar en ratón para Pasteurella, a diferentes intervalos de tiempo, con el tipo capsular aislado más frecuentemente.

5.-Demostrar la interacción del virus de la enfermedad de Aujeszky y P.multocida en un modelo biológico-experimental, mediante un estudio combinado de remoción pulmonar, supervivencia y lesiones histopatológicas.

II REVISION DE LA LITERATURA

1. Pulmón, mecanismos de defensa

Una de las funciones más importantes del pulmón, además de su papel en el intercambio gaseoso y en el metabolismo, es la de actuar como barrera biológica entre el organismo y su medio ambiente. En condiciones normales, el aparato respiratorio previene la entrada, remueve o neutraliza a una gran variedad de agentes que pueden entrar en él durante la inspiración. Estos mecanismos previenen la presencia de microorganismos, y en condiciones normales el pulmón se encuentra estéril (Kass y cols., 1966; Newhouse y cols., 1976).

Actualmente, se considera que muchas de las infecciones respiratorias se originan por inhalación de partículas que llevan asociadas agentes infecciosos, estas partículas pueden originarse tanto en el medio ambiente como en el interior del aparato respiratorio durante la mecánica ventilatoria (Thomson y Gilka, 1974).

Suspendidos en el aire pueden encontrarse una gran variedad de agentes como: toxinas, polvos minerales, humos, partículas infecciosas..., que pueden penetrar en el interior de los pulmones. La medida en que los mecanismos de defensa pulmonares estén alterados, determina la presentación de la enfermedad (Green y cols., 1977). Así como de la capacidad del microorganismo para disminuir su eliminación por el aparato mucociliar, evitar o resistir la fagocitosis, y si es fagocitado sobrevivir y multiplicarse a una velocidad mayor a la que puede ser inactivado y destruido (Mims, 1976).

De forma genérica, los mecanismos de defensa del pulmón pueden subdividirse en no específicos y específicos. Dentro de los no específicos podemos destacar el aparato mucociliar, los

componentes del moco traqueobronquial y el sistema de células fagocitarias; y entre los específicos, las células productoras de anticuerpos y el resto de las células involucradas en la inmunidad celular.

1.1. Sistemas de transporte de partículas

Histológicamente el epitelio traqueobronquial se describe como un epitelio de tipo cilíndrico, que cambia progresivamente a cúbico a medida que avanza hacia los bronquios (Appendini, 1978) y está constituido por células ciliares, caliciformes, células de Clara y de secreción mixta.

Las células ciliares están presentes desde la región terminal de los bronquios hasta la laringe. Una vez la partícula ha impactado en el epitelio traqueobronquial, es atrapada por el moco y, mediante el movimiento ciliar, es desplazada hacia adelante, con un gradiente de menor a mayor velocidad, desde los bronquios terminales hasta ser deglutida e inactivada a nivel de estómago (Asmundsson y Kilburn, 1970).

La funcionalidad de los cílios es importante para la remoción eficiente de partículas y exudados mucosos, y aunque el movimiento ciliar sólo es efectivo en condiciones adecuadas de pH, concentración de iones y temperatura, se considera que diversos factores como: drogas, gases, polución y microorganismos pueden disminuir, o suprimir, la actividad e inclusive producir procesos degenerativos, regenerativos y metaplásicos. Esto explicaría el fallo en la remoción y el que las vías aéreas pequeñas se llenen de exudado (Green, 1970).

La velocidad de remoción de partículas por el aparato mucociliar ha sido evaluada en perros, obteniéndose un índice de 1.6 mm/min en bronquios terminales y 8.3 mm/min en grandes bron

quios (Asmundsson y Kilburn, 1970). En ratones con bacterias inoculadas por aerosol, y marcadas radiactivamente, se obtuvo un índice de remoción del 10%/hora (Harris y cols., 1977). En humanos, las partículas de poliestireno marcadas con ^{51}Cr , cerca de un 50% son eliminadas en horas, mientras que el resto puede permanecer un tiempo medio de 150 días, siendo fagocitadas por macrófagos (Mims, 1976).

El moco traqueobronquial se encuentra formado por secreciones de las células caliciformes, de Clara y de secreción mixta. La distribución y abundancia de estas células varía según la zona del pulmón y la especie animal (Goco y cols., 1963). Esta sustancia presenta la característica de poseer una elevada viscoelasticidad, y se considera como uno de los determinantes principales en la eficiencia del aparato mucociliar. Las características de esta sustancia dependen de la concentración de glicoproteínas, pH, cantidad de sales, presencia o ausencia de proteínas séricas y ADN (King, 1980).

Las funciones propuestas para el moco traqueobronquial son: proteger a la mucosa de la desecación, proveer a los cilios de un medio adecuado para la realización de sus funciones biológicas y evitar la multiplicación de microorganismos (Kilburn, 1967; Veit y Farrel, 1978).

Se han descrito diversas sustancias del moco traqueobronquial con capacidad antimicrobiana, entre ellas: Ig A, lisozi^{ma}, lactoferrina, interferón, peroxidasa, beta-lisina..., y en explantes traqueales de embrión de cerdo se ha observado la secreción de una proteína con actividad bactericida (Pijoan y Ochoa, 1978a; Iglesias, 1981).

El epitelio de las vías aéreas distales se encuentra desprovisto de células ciliares, sin embargo está recubierto de

una sustancia surfactante producida por neumocitos tipo II, y de composición lipoproteica (principalmente colesterol y dipalmitoil lecitina), que impide el colapso de los alveolos durante la espiración por regulación de la tensión superficial (Stoner y cols., 1978). Existen diversas hipótesis acerca de que este fluido tenga un cierto movimiento hacia los brónquios terminales (Green, 1973), y no se ha demostrado que esta sustancia pueda tener acción antimicrobiana por sí misma (Reynolds y Thompson, 1973a), aunque otros autores han señalado que puede favorecer la fagocitosis (La Force y cols., 1972) y actuar como quimiotáctico para macrófago alveolar (Schwartz y Christman, 1979).

Además de estos mecanismos de transporte, también existe en el pulmón un sistema de drenaje linfohemático (Green, 1970).

Los defectos en los mecanismos de transporte pueden ser compensados con reflejos, como la tos y broncoconstricción, que serían importantes contra sustancias inhaladas y para eliminar partículas o secreciones del árbol bronquial (Green, 1970).

1.2. Sistema de macrófagos alveolares, células fagocíticas

Aunque el aparato mucociliar juega un papel importante en la remoción de partículas, las porciones distales del pulmón se encuentran desprovistas de epitelio ciliar. Se considera que estas regiones, en el pulmón normal, están protegidas de diversos agentes particulados por el sistema de macrófagos alveolares, mientras que en los procesos inflamatorios del pulmón se encuentran monocitos, polimorfonucleares neutrófilos y, posiblemente, eosinófilos que proceden del torrente circulatorio (Kass y cols., 1966).

Diversos autores consideran que la capacidad de remoción de bacterias por el pulmón es dependiente de la muerte por fagocitosis, y la eficiencia de este sistema ha sido explicada fundamentalmente en base a la presencia del macrófago alveolar (Rylander, 1966; Green, 1970; Goldstein y cols., 1974).

El macrófago alveolar, así como otras células fagocíticas, procede de la médula osea; la célula precursora del macrófago alveolar es una célula intersticial, derivada a su vez de monocitos circulantes (Hocking y Golde, 1979). Estas células presentan receptores específicos de membrana para la porción Fc de las inmunoglobulinas G y M, así como para el fragmento "b" del tercer componente del complemento (Reynolds y cols., 1975).

Las células fagocíticas móviles encuentran los agentes extraños o blanco por quimiotaxis, que consiste en un proceso por el cual el fagocito se mueve hacia la zona de máxima concentración de sustancia, segregada en la proximidad del organismo invasor (Babior, 1978). La respuesta del macrófago alveolar a sustancias quimiotácticas es selectiva, y no está bien determinado cuales favorecen la migración de estas células; a su vez, parece que el macrófago alveolar es capaz de producir una sustancia quimiotáctica para neutrófilos (Hunninghake y cols., 1978; Dauber y Danielle, 1978). La migración de los polimorfonucleares, por el contrario, es estimulada por una variedad de sustancias quimiotácticas como: C3a, C5a, C5b,6,7, productos del crecimiento bacteriano, moléculas de la vía alterna del complemento, secreciones celulares, linfocinas... (Hunninghake y cols., 1978).

La presencia de neutrófilos en el pulmón ha sido observada después de la inoculación experimental de algunas bacterias (Pierce y cols., 1977); estas células pueden emigrar al alveo

lo a través de las uniones entre neumocitos tipo I y tipo II (Damiano y cols., 1980). El flujo de células al pulmón es variable y parece estar relacionado con el tipo de microorganismo invasor y la dosis, así Toews y cols. (1978) observaron que la inoculación por aerosol de Staphylococcus aureus se correlacionó con un aumento de 5 veces la población de macrófagos alveolares; la aerosolización de Pseudomona aeruginosa produjo un aumento solamente en la población de neutrófilos, del orden de 500-1600 veces según la dosis del inóculo; finalmente la inoculación de Klebsiella pneumoniae aumentó en dos veces la población de macrófagos alveolares, mientras que los neutrófilos se incrementaron varios cientos de veces.

El reconocimiento y adherencia de las células fágicas a microorganismos es dependiente de la opsonización por factores del suero, procedentes de la activación del complemento, tanto por la vía clásica como alterna, y de inmunoglobulinas específicas (Hocking y Golde, 1979). Por otro lado, la adherencia también parece evidente en ausencia de los factores del suero y se ha sugerido que depende de las características de la superficie de la bacteria, así como de las características del potencial de membrana de la célula fagocítica (Mims, 1976); para algunos autores la presencia de glicoproteínas de superficie en el macrófago, y su capacidad para formar enlaces con los carbohidratos de la pared celular del microorganismo o con glicoproteínas virales, podría tener importancia para este propósito (Weir y Ogmundsdóttir, 1977); para otros, en el pulmón, la adherencia y fagocitosis podría verse favorecida al recubrirse el microorganismo con la sustancia surfactante que recubre a los alveolos (La Force y cols., 1972). La fagocitosis de ciertas bacterias sólo se produce en presencia de anticuer

pos (Wilkinson y cols., 1979).

En general se considera que la adherencia estimula la fagocitosis (Weissman y cols., 1978). La fagocitosis se efectúa por activación de una proteína fijadora de actina, que se encuentra en la membrana celular, que conduce a la polimerización de la actina, y en presencia de un cofactor, la miosina produce la contracción necesaria para la formación de pseudópodo y engolfamiento de la partícula (Hocking y Golde, 1979).

Una vez fagocitada y secuestrada la partícula en el interior de una vacuola, formada por la membrana plasmática, la muerte microbiana intracelular se produce por la degranulación y por la "explosión respiratoria". La degranulación consiste en la fusión del fagosoma y los gránulos presentes en el citoplasma del fagocito; estos gránulos contienen enzimas lisosomales como: hidrolasas, lipasas, fosfatasa ácida, catepsina, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, lisozima, beta-glucuronidasa..., y a diferencia de los neutrófilos los macrófagos no tienen proteínas catiónicas. Además, la fagocitosis estimula el metabolismo oxidativo produciendo lo que se ha denominado "explosión respiratoria", que consiste en la producción de radicales químicos derivados del oxígeno, altamente reactivos y con capacidad microbicida, entre ellos: el ion superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales oxidrilos, oxígeno molecular ~~distinto al atmosférico~~ (Babior, 1978; Hocking y Golde, 1979). La "explosión respiratoria" ha sido estudiada detalladamente en monocitos y polimorfonucleares, aunque también se ha demostrado en macrófagos alveolares, pero en estas células presenta ciertas diferencias en cuanto a que el oxígeno molecular no ha sido detectado, no poseen actividad de mieloperoxidasa y también existen diferencias en enzimas relacionados con la produc

ción de estos radicales (Conkling y cols., 1982).

Por último, el macrófago alveolar y otras células fágicas del pulmón pueden ser expulsadas por el aparato mucociliar, esto ha sido observado en perros y gatos en los que al menos 10^7 macrófagos alveolares son expulsados al día hacia la laringe; esto sugiere un posible mecanismo de eliminación de materiales no destructibles por el macrófago (Mims, 1976).

1.2.1. Efecto de la infección viral sobre la función del macrófago alveolar

La función del macrófago alveolar puede ser alterada por diversos factores como irradiación, infecciones, drogas inmunosupresoras y citotóxicas, acidosis metabólica, etanol, cortisona, hipoxia, desnutrición, frío, humo de tabaco... (Kass y cols., 1966; Green, 1970; Pennington, 1977; Thomas y cols., 1978; Hocking y Golde, 1979).

Es bien conocido el hecho clínico de que la infección viral del pulmón, y en particular Influenza en humanos, se complican frecuentemente con infecciones bacterianas (Degre, 1971). Este fenómeno ha sido asociado a la alteración, inducida por el virus, del mecanismo mucociliar; aunque varios estudios han mostrado que la sensibilidad, posinfección viral, a las infecciones bacterianas puede estar también relacionada a la alteración de la actividad bactericida del macrófago alveolar (Jakab y Green, 1976a; Warshauer y cols., 1977; Pijoan y cols., 1980; Goldstein y cols., 1974).

En la infección de ratones con virus influenza, Warshauer y cols (1977) observan, con macrófagos alveolares "in vitro", un retardo del índice de ingestión e inactivación de Staphylococcus epidermidis a los 5 días posinoculación viral; estos

autores detectan, inclusive, por métodos histológicos la multiplicación "in vivo" de la bacteria en el interior del macrófago.

Jakab y Green (1976a) infectaron ratones con dosis subletales de virus Sendai y, 7 días más tarde, con un aerosol de Staph.aureus. Por histología del pulmón observaron grupos de bacterias en el interior del macrófago alveolar, y concluyeron que no se produjo alteración en el índice de fagocitosis pero sí estuvieron alterados los mecanismos bactericidas intracelulares.

Pijoan y cols. (1980), en un experimento en el que inoculan virus vacunal de Colera porcino, a cerdos, observan "in vitro" una marcada disminución de la capacidad bactericida hacia el día 11 posvacunación.

Otros experimentos "in vitro" han demostrado que como consecuencia de la infección viral se produce supresión de la fagocitosis mediada por receptores Fc, inhibición de la formación del fagolisosoma, inhibición de la muerte bacteriana intracelular y de la degradación bacteriana; así como también se han detectado bajos niveles de enzimas lisosomales en el macrófago alveolar (Jakab, 1981).

Otros autores han demostrado que los macrófagos alveolares procedentes de ratones infectados con virus Influenza, no presentan "in vitro" disminución en la capacidad de ingerir e inactivar Staph.aureus (Nugent y Pesanti, 1982b). Estos autores concluyen que la alteración de la remoción pulmonar, debido a la infección viral, no puede ser explicada exclusivamente por la disminución de la capacidad fagocítica y de inactivación del macrófago alveolar.

1.2.2. Factores bacterianos que disminuyen la función del macrófago alveolar

En general se considera que muchos microorganismos pueden interferir con la actividad antimicrobiana de los fagocitos o, en otros casos, escapar a la atención de estas células. Las bacterias, hongos y protozoos presentan actividad metabólica en el medio extracelular y producen ciertas sustancias solubles, algunas de las cuales pueden ser tóxicas para las células fagocíticas.

Las células y sobrenadantes de cultivos de Haemophilus pleuropneumoniae son citotóxicos "in vitro" para macrófagos alveolares de cerdo. La toxicidad del sobrenadante y su resistencia al calor lo hace similar a la endotoxina de las bacterias gramnegativas (Bendixen y cols., 1981).

También se ha observado que Pasteurella haemolytica es capaz de producir una toxina sensible al calor y citotóxica "in vitro" para macrófagos alveolares y neutrófilos bovinos (Markham y Wilkie, 1980). Y se ha observado que esta toxina no presenta citotoxicidad para monocitos sanguíneos de cerdo, caballo o humano (Kaehler y cols., 1980).

Las proteasas purificadas de Pseudomona aeruginosa produjeron en macrófago alveolar, "in vitro", aglutinación y marcada vacuolización; por lo que Leake y cols. (1978) concluyeron que las proteasas pueden inducir cambios a nivel de membrana celular, aunque no estudiaron su efecto sobre la fagocitosis.

La estreptolisina de Streptococcus spp se considera que puede disolver la vacuola fagocítica del macrófago, produciendo la liberación de los enzimas lisosomales y la muerte de la célula (Mims, 1976).

La endotoxina de Salmonella typhimurium produce una mar-

cada disminución de la actividad fagocítica "in vivo" durante las 12 primeras horas de la inoculación a altas dosis en ratas, aunque luego aumentó considerablemente (Gospo y cols., 1977).

Diversos organismos poseen propiedades de superficie que impiden la adsorción y fagocitosis por células. Esta resistencia ha sido asociada a componentes de la pared celular y de la capsula.

Staph.aureus es fagocitado con dificultad por neutrófilos "in vitro", y en ausencia de anticuerpos específicos. Además la activación del complemento no produce una opsonización eficiente; ésto se ha explicado por ocultamiento de la peptidoglucana dentro de la capsula (Wilkinson y cols., 1979). La presencia de proteína A en la pared de esta bacteria, ha sido relacionada con la disminución de la fagocitosis; aunque se ha observado que la presencia, o ausencia, de proteína A no tiene efecto en la ingestión e inactivación de la bacteria, así como la Ig G unida a la proteína tampoco afectó la capacidad bactericida del macrófago alveolar de ratón (Hsieh y cols., 1978).

En un estudio comparativo realizado con neutrófilos de bovino "in vitro", sobre la fagocitosis de tres tipos capsulares de Pasteurella multocida: una tipo A, una tipo B y una cepa no capsulada. Las tres variedades fueron incompletamente fagocitadas en presencia de factores del complemento. La variedad no capsulada fue totalmente fagocitada en presencia de factores termoestables del suero normal, el tipo capsular B sólo fue fagocitada en presencia de factores del suero hiperinmune y el tipo capsular A, tanto en presencia de suero normal como hiperinmune, no fue fagocitada (Maheswaran y Thies, 1979). Estos autores atribuyen la resistencia, a la fagocitosis, del ti

po capsular A a la presencia de ácido hialurónico en la cápsula. Los mecanismos por los cuales la cápsula inhibe la fagocitosis no han sido aclarados.

Experimentos realizados con neutrófilos de cuye y diversas cepas mutantes de S.typhimurium, sugirieron una estrecha relación entre las características de superficie de la bacteria, hidrofobicidad y carga, con resistencia a la fagocitosis. Los autores concluyeron que muchas de estas propiedades estaban proporcionadas por el lipopolisacarido de la bacteria (Magnuson y cols., 1979). En Escherichia coli esta resistencia parece estar relacionada con las características del lipopolisacárido y los antígenos K y O (Stendahl y cols., 1979).

Se han descrito otros mecanismos que pueden disminuir la función de las células fagocíticas como la ausencia en las vesículas fagocíticas de enzimas lisosomales, explicado por la inhibición de la formación del fagolisosoma. Otros microorganismos presentan resistencia a la inactivación y digestión en el interior del fagolisosoma (Mims, 1976).

La resistencia a la digestión y degradación, como método para saturar la capacidad fagocítica del macrófago se ha observado en Streptococcus spp del tipo A. Estas bacterias son rapidamente inactivadas despues de la fagocitosis, sin embargo el mucopeptido de la pared celular no es degradado; experimentos con macrófagos han demostrado que la pared celular de esta bacteria inhibe la fagocitosis de partículas de latex, y no disminuye la viabilidad de los macrófagos (Smialowicz y Schwab, 1978).

1.3. Aspectos de la defensa inmune pulmonar

La defensa inmune del tracto respiratorio depende en gran manera de la Ig A secretada localmente, y los niveles de ésta se correlacionan con la recuperación de enfermedades, especialmente virales. En las secreciones la Ig A se encuentra en forma dimérica, unidos por dos proteínas denominadas "pieza secretoria" y cadena J. Parece ser que el dímero es formado localmente en el pulmón, ya que las células productoras de Ig A se encuentran en el tejido linfoide adyacente a los bronquios o en la submucosa bronquial (Mason y cols., 1977).

Green (1970) considera que en el pulmón normal de humano se encuentran predominantemente Ig A e Ig E, mientras que Ig G e Ig M aparecen, en mayor cantidad, en el pulmón inflamado. En bovino la inmunoglobulina predominante en el tracto respiratorio superior e inferior es la Ig A secretoria, mientras que la Ig G se encuentra en menor proporción, siendo la Ig G-1 predominante (Walker y cols., 1980).

La inmunización parenteral con Pseudomona aeruginosa produjo en conejos la presencia de anticuerpos del tipo Ig G en la secreción nasal, el nivel de Ig G estuvo relacionado con el nivel de ésta en suero. La inmunización intranasal produjo anticuerpos del tipo Ig A e Ig G, la Ig A en estas secreciones se encontró a niveles muy superiores al suero, lo que indica la producción local de esta inmunoglobulina (Reynolds y Thompson, 1973a).

La inoculación del virus Sendai en el tracto respiratorio murino provoca la producción de Ig A secretoria e Ig G a nivel local, y bajo algunas condiciones ligeras cantidades de Ig M. El anticuerpo detectado más tempranamente fue Ig G, seguido de Ig M y posteriormente de Ig A; la aparición retardada de la Ig A

ha sido asociada a una deficiencia temporal de las células que producen el componente secretorio. Como los niveles de Ig A, Ig G e Ig M fueron superiores a los observados en el suero, se sugiere la producción local después de la inoculación nasal de el virus (Charlton y Blandford, 1977).

En lavados traqueobronquiales de pulmón bovino, en condiciones normales, se han obtenido linfocitos B y T, los marcadores de superficie para los linfocitos B fueron tipo Ig A y, en menor cantidad, Ig G e Ig M (Mason y cols., 1977).

La inoculación con virus Influenza en ratón produjo un aumento de la población de linfocitos, con marcador superficial de tipo Ig A e Ig M, a los tres días posinfección; mientras que las células que presentan Ig G en su superficie aparecen días más tarde. Las células con receptor tipo Ig A aparecen en mayor concentración a lo largo de la submucosa bronquial y las células con marcador tipo Ig G aparecen en mayor concentración dentro de las lesiones consolidadas del pulmón (Owens y cols., 1981).

La Ig A presenta menor actividad que la Ig G en cuanto a opsonización para macrófagos alveolares, y es incapaz de activar el complemento. La Ig A se considera que puede impedir la adherencia de bacterias a membranas mucosas e impedir la multiplicación de éstas, y se ha sugerido un cierto papel bactericida de esta inmunoglobulina asociada a lisozima (Reynolds y Thompson, 1973b; Waldman y Ganguly, 1974; Hocking y Golde, 1979).

El mecanismo propuesto para explicar la actividad de la Ig A, en cuanto a impedir la adherencia de las bacterias, es la reducción de la carga negativa y provocar un efecto hidrofílico sobre la bacteria; esto origina una disminución de la fagocitosis, por el efecto antiadherente e hidrofílico, y al mismo

tiempo puede ser de importancia para excluir el antígeno bacteriano de superficies mucosas (Magnusson y cols., 1979).

Es conveniente mencionar algunos aspectos relacionados con la activación del complemento en el pulmón, aunque algunos autores consideran que el complemento no se encuentra en el en cantidades detectables (Reynolds y Thompson, 1973b).

En un experimento con ratones descomplementados, Gross y cols. (1978) vieron que la remoción de Streptococcus pneumoniae y Pseudomona aeruginosa fue más lenta que en ratones normales, pero no estuvo afectada para Klebsiella pneumoniae ni Staphylococcus aureus. También observaron que los animales descomplementados y con deficiencia de C5, presentan mayor sensibilidad a la infección con Streptococcus pneumoniae, sugiriendo un papel importante a C3 (hemos de tener en cuenta que el veneno de cobra, usado para descomplementar, elimina el C3 del suero de los animales). Rehm y Coonrod (1982), con ratas descomplementadas, observaron que la remoción de neumococos a intervalos inferiores a 4 horas no estuvo afectada, lo que sugiere que los macrófagos pueden fagocitar a velocidad normal sin presencia de complemento.

El complemento también ha sido relacionado con la producción de lesiones en pulmón mediadas por mecanismos inmunopatológicos.

La aparición de anticuerpos en el pulmón hacia el día 3 posinfección con virus Sendai, asociado a severas lesiones tisulares, ha sugerido que la Ig G e Ig M pueden participar en fenómenos de hipersensibilidad tipo II (Charlton y Blandford, 1977).

El complemento puede ser activado por la presencia de complejos antígeno-anticuerpo. Kaplan y cols. (1980) inoculan al

búmina sérica bovina intrapleuralmente a conejos previamente inmunizados, esto produjo una inflamación severa en el pulmón.

La activación del complemento por cualquier vía provoca la liberación de polipeptidos activos, como C3a y C5a, que poseen actividad quimiotáctica y de anafilotoxina. Tanto el C3a como el C5a inoculados localmente en el pulmón pueden producir una reacción inflamatoria aguda (Larsen y cols., 1980; Stimler y cols., 1980).

1.3.1. Inmunidad celular

En general se acepta que la inmunidad humoral es responsable de prevenir la reinfección, mientras que la inmunidad celular mediada por linfocitos T o anticuerpos y células que poseen receptor para Fc son importantes en la recuperación de la primoinfección.

El tejido linfoide existente alrededor de las vías aéreas, como se comentó anteriormente, es capaz de responder a la administración local de anticuerpos y de lavado traqueobronquial pueden obtenerse poblaciones celulares de macrófagos alveolares, linfocitos T y B. También se ha demostrado que el macrófago alveolar es capaz de interactuar con linfocitos, esto sugiere que posee receptores para linfocitos y puede presentar el antígeno a éstos (Lussier y cols., 1978).

El linfocito T sensibilizado por el antígeno es capaz de producir y excretar al medio una variedad de mediadores solubles de la respuesta inmune -linfocinas- (Rocklin y cols., 1980). Uno de los factores más estudiados es el factor inhibidor de la migración (MIF), este factor probablemente es idéntico al factor activador de macrófagos (MAF); Johnson y cols. (1975) en un experimento realizado en conejos, observaron que los ma-

crófagos alveolares obtenidos de animales aerosolizados con Listeria monocitogenes o con Streptococcus pneumoniae, presentaron actividad aumentada para ingerir tanto el microorganismo original como otros agentes no relacionados. Los sobrenadantes de linfocitos estimulados con el antígeno presentaron actividad de MIF y MAF, estos dos factores no pudieron diferenciarse por métodos bioquímicos y la activación del macrófago alveolar fue igualmente efectiva para microorganismos intra y extracelulares.

Se considera a su vez que el macrófago alveolar activado puede segregar sustancias como interferon, factores quimiotácticos para neutrófilos, factores reguladores de la respuesta inmune para linfocitos, factor estimulador de la producción de polimorfonucleares y monocitos en médula ósea (Ansfield y cols., 1979; Hocking y Golde, 1979).

La activación del macrófago alveolar también puede producirse por mecanismos no inmunes como la inoculación de endotoxina, BCG, zimosan... (Zwilling y Campolito, 1977).

Diversas células en el pulmón pueden presentar citotoxicidad para células infectadas por virus, células tumorales o células con microorganismos intracelulares; pero la importancia de cada tipo celular parece variar entre las distintas especies animales.

El macrófago alveolar es capaz de presentar citotoxicidad mediada por anticuerpos y por anticuerpos más complemento. En vacuno se ha demostrado que el macrófago alveolar, "in vitro", y en ausencia de factores séricos puede presentar citotoxicidad para células infectadas con virus PI-3 (Probert y cols., 1977).

Los linfocitos T pueden presentar citotoxicidad para cé-

lulas de ratón infectadas con virus Influenza (Wells y cols., 1979).

En vacuno los polimorfonucleares han demostrado ser más eficientes en la respuesta de citotoxicidad dependiente de anticuerpos y anticuerpos más complemento (Grewal y cols., 1980).

En humano los linfocitos K se consideran las células más activas en la respuesta citotóxica (Shore y cols., 1976).

Linfocitos, neutrófilos o macrófagos de cerdos no sensibilizados al antígeno, presentan citotoxicidad mediada por anticuerpos para células homólogas infectadas con virus de la enfermedad de Aujeszky (Baskerville, 1982).

2. Inhalación de partículas

2.1. Aerosoles

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

La suspensión de partículas en el aire han sido denominadas "aerosoles" y estos 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 partículas (Thomson y Gilka, 1974). También se generan aerosoles a través del reflejo de la tos y del estornudo, mediante la tos pueden ser expelidos 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). En este trabajo, el 48% de las partículas que se generan en la cavidad nasal, y recuperadas con cánula traqueal, presentan un tamaño de 1-5 μm .

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 "nucleos de gota",

que pueden tener de 0.5 a 5 μm 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 (Dunnill, 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)

2.2. Distribución y mecanismos de depósito de las partículas inhaladas

El lugar de deposición depende de las propiedades físicas de la partícula, así como de la profundidad y frecuencia de la respiración.

Se ha observado, con respecto al tamaño, que las partículas mayores a 10 μm de diámetro son retenidas en el aparato respiratorio superior, esto se ha explicado en base a los cambios bruscos de dirección y turbulencia del flujo de aire en los cornetes, laringe y bifurcación bronquial. Las partículas entre 10 y 2 μm se depositan en bronquios y bronquiolos, las partículas comprendidas entre 2 y 0.5 μm pueden alcanzar el alveolo y las partículas menores de 0.5 μm tienden a ser retenidas en lugares próximos a bronquios terminales o bien salir espiradas (Hatch, 1961).

Con respecto a la mecánica respiratoria, la velocidad del aire va disminuyendo paulatinamente a lo largo de las vías aéreas, hasta ser prácticamente nula a nivel del alveolo; y sólo un 10% del volumen Tidal -volumen inspirado- es recambiado con el volumen residual del pulmón y se considera que la zona de reemplazo envuelve mínimamente a la zona alveolar (Dunnill, 1979), aunque esto depende de la profundidad y frecuencia respiratoria,

así como de la especie animal, peso corporal, factores ambientales... (Phillis, 1976).

Los mecanismos propuestos para explicar el depósito de partículas en el aparato respiratorio son: impacto inercial, sedimentación y movimiento Browniano. La importancia de estos mecanismos depende de el tamaño, forma, densidad, solubilidad, estructura de la superficie y tensión superficial, así como de la velocidad del flujo aereo y de las características aerodinámicas de las vías respiratorias (Dunnill, 1979).

El impacto ocurre primariamente en la nariz y vías respiratorias superiores, por este mecanismo se depositan el mayor número de partículas y se considera como la fuerza a la que es sometida una partícula, 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 a consecuencia de que en el alveolo el flujo de aire disminuye a cero, y las partículas son depositadas por fuerzas gravitacionales (Newhouse y cols., 1976).

El movimiento Browniano, o deposición por difusión, afecta a partículas menores de 0.1 μm . Mediante este tipo de movimiento las partículas son bombardeadas por moléculas de gas y pueden chocar con la mucosa respiratoria, este mecanismo se considera falto de importancia en el depósito de partículas (Dunnill, 1979).

3. Remoción bacteriana

3.1. Aerosoles de bacterias

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

Experimentos con Pasteurella haemolytica mostraron que la viabilidad de la bacteria sólo se afectó levemente después de la aerosolización, y los porcentajes de recuperación bacteriana más bajos se obtuvieron con cambios de alta a baja temperatura durante la aerosolización (Jericho y cols., 1977).

Hatch y Dimmick (1966) observan que la rehidratación, efectuada con cambios de humedad relativa, puede aumentar la muerte de Serratia marescens y Pasteurella pestis en aerosoles; además el comportamiento de las bacterias estuvo relacionado con la historia del cultivo antes de la aerosolización.

Zentner (1966) con Serratia marescens observa que la sensibilidad de éstas se incrementa con la deshidratación.

Benbought (1967), trabajando con Escherichia coli en aerosol, observa dos mecanismos que pueden producir la muerte de ésta; uno por baja humedad relativa, atribuido a la acción del oxígeno y sus radicales libres sobre enzimas asociados a flavinas, y el otro ocurre por altas humedades relativas, habiéndose explicado por el efecto de la aerosolización sobre la síntesis de RNA.

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, respuesta inmune... (Lillie y Thomson, 1972; Lopez y cols., 1976; Pierce y cols., 1977; Jericho y Langford, 1978).

3.2. Aparatos productores de aerosoles

Los aparatos para producir aerosoles han sido estudiados por distintos autores. El modelo básico a partir del cual se desarrollaron los actuales es el de Laurenzi y cols. (1964), que consta de una cámara cilíndrica de acrílico. En este sistema el aire generado por una compresora 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: humedad y temperatura del aire, velocidad de flujo, presión del aire..., y aparatos para recuperar las bacterias aerosolizadas (Beard y Easterday, 1965; Lillie y Thomson, 1972).

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

3.3. Modelos experimentales de remoción bacteriana

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

Por este método se puede evaluar la capacidad del pulmón para inactivar las bacterias en él depositadas, puede calcularse el número de microorganismos depositados y los índices de retención-remoción de bacterias a distintos tiempos posexposición. Como desventaja, cabe apuntar que este método por sí solo no puede diferenciar que mecanismo de defensa pulmonar, ya sea el aparato mucociliar o el sistema de fagocitos, está afectado, o actuando, y en que proporción (Lopez y cols., 1976; Jones, 1983).

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

Los índices de retención y remoción pulmonares han sido estudiados en diferentes especies animales, usando diversos tipos de bacterias. Aquí revisaremos sólo aquellos estudios en que se haya utilizado ratón, vacuno y cerdo.

3.3.1. Ratón

Laurenzi y cols. (1963 y 1964), utilizando un aerosol de Staphilococcus aureus, determinaron el porcentaje de bacterias eliminadas por el pulmón a distintos intervalos de tiempo y encontraron que el 45% de los microorganismos inhalados fueron eliminados, del pulmón de ratón, en 1 hora; el 70% en 2 horas; el 88% en 4 horas y el 97% en 8 horas. Este patrón de remoción indicó que la eliminación de esta bacteria fue rápida y constante. En este trabajo se vio que la concentración del aerosol no influía, significativamente, en el porcentaje de bacterias

eliminadas y se concluyó que el pulmón de ratones, en condiciones normales, elimina rápidamente los Staph.aureus inhalados sin sufrir daño alguno.

Staphilococcus epidermidis fue removido de forma similar a Staph.aureus (Warshauer y cols., 1977).

Toews y cols. (1978) observaron que el inóculo bacteriano tenía una cierta influencia sobre el índice de remoción. Con inóculos bajos de Staph.aureus, a 4 horas, se obtuvo una remoción del 84%, mientras que a inóculos altos el índice se redujo al 74%. Con Pseudomona aeruginosa a bajo inóculo detectaron un 57.7% de eliminación, mientras que a inóculos altos la bacteria se multiplicó en el parénquima pulmonar. La aerosolización con Klebsiella pneumoniae demostró, al contrario de lo anterior, que la remoción fue mayor a inóculo elevado, 65%, que a inóculo bajo, 38%.

Green y Kass (1965) compararon la remoción de Staph.aureus, Staph.epidermidis y Proteus mirabilis en el pulmón de ratón y encontraron diferencias en los patrones de remoción de estas bacterias: Staph.epidermidis se eliminó muy rápidamente, Staph.aureus más lentamente y la eliminación más lenta se produjo con Proteus mirabilis. Por lo anterior concluyeron que las diferentes bacterias estudiadas tenían una susceptibilidad diferente a la fagocitosis y a la digestión intracelular.

Goldstein y Green (1967), trabajando con aerosoles de Pasteurella pneumotropica, observaron que los ratones eliminaron el 45% en 2 horas, el 65% en 4 horas, el 80% en 6 horas y el 99% a las 24 horas. La eliminación de esta bacteria resulta más lenta que la de Staph.aureus y la variación del índice de remoción, de animal a animal, más amplia.

Lillie y Thomson (1972) realizaron estudios comparativos

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

Jackson y cols. (1967) estudiaron la remoción pulmonar, en ratón, de diferentes bacterias gramnegativas y encontraron que con excepción de Pseudomona spp, las demás bacterias utilizadas (Escherichia coli, Flavobacterium spp y Proteus mirabilis) fueron eliminadas con el mismo patrón y rapidez. Pseudomona spp presentó un marcado incremento tras la primera hora posinoculación y la velocidad de eliminación se normalizó a las 4 horas, resultando a partir de entonces una curva de remoción similar a las otras bacterias utilizadas en el estudio. Este retardo para Pseudomona spp fue asociado a las características tóxicas de la capsula.

Jay y cols. (1976) describieron la remoción de Streptococcus pneumoniae, Klebsiella pneumoniae, E.coli y Staph.aureus en ratones normales. Los índices de remoción a las 4 horas fueron del 73.4% para Staph.aureus, del 92.7% para S.pneumoniae, del 21.5% para E.coli, mientras que K.pneumoniae no sólo no se eliminó sí no que se pudo apreciar una multiplicación en el pulmón.

Smith y cols. (1981) trabajando con ratones inmunizados contra Pasteurella multocida A:3, observan que esta bacteria no fue eliminada del pulmón al menos durante las 50 horas pos aerosolización.

Green y Green (1968) inocularon simultaneamente Proteus mirabilis y Staph.aureus con aerosoles y demostraron que la remoción de ambas bacterias se llevó a cabo con el mismo pa-

trón y rapidez que cuando se inocularon por separado.

Nugent y Pesanti (1982b) en un estudio con Staph.aureus determinaron que el número de bacterias disminuía más rápidamente en los lavados bronquialveolares que en los homogenados pulmonares.

3.3.2. Bovinos

Lillie y Thomson (1972) estudiaron la remoción bacteriana en becerros normales expuestos a un aerosol de Pasteurella haemolytica o de Staph.aureus. Los valores de remoción para Pasteurella haemolytica fueron del 75% a las 2 horas, 90% a las 4 horas y del 92% a las 8 horas. Staph.aureus fue eliminado en un 70% a las 2 horas, en un 90% a las 4 horas y en un 95% a las 8 horas.

3.3.3. Cerdos

Curtis y cols. (1976) después de la administración de E.coli en aerosoles a cerdos de diferentes edades, observaron que a las 3 horas los lechones de un día de edad eliminaron el 50%, los animales de 6 días de edad eliminaron el 82% y, finalmente, los de 18 y 26 días de edad removieron el 95%. Concluyeron de este estudio que la remoción en animales jóvenes tenían menor capacidad para eliminar la bacteria.

Saunders y Sebuya (1983) con aerosoles de Bacillus subtilis vieron que el porcentaje de remoción fue del 54% a las 2 horas, del 53% a las 4 horas, del 77% a las 8 horas y del 88% a las 12 horas. Por lo que sugieren que esta bacteria fue eliminada del pulmón de cerdos normales con un patrón similar a otras bacterias estudiadas en vacuno y ratón.

4. Interacción virus-bacteria en el tracto respiratorio

La importancia de las enfermedades virales como predisponentes para superinfecciones bacterianas y desarrollo de neumonías, ha sido bien documentada tanto en el hombre como en los animales domésticos y de laboratorio (Degre, 1971; Jakab, 1981; Yates, 1982).

La idea de que pudiera existir cooperación entre virus y bacterias en la producción de neumonías fue desarrollada durante las pandemias de Influenza humana, ocurridas durante el presente y pasado siglo. La asociación del virus Influenza tipo A con diversos agentes bacterianos, ha sido reportada en numerosas ocasiones, y aún hoy en día, la neumonía por germen secundarios es una de las complicaciones más comunes de la Influenza (Loosli, 1968; Degre, 1971).

En modelos experimentales la interacción la definimos como un fenómeno por el cual el agente primario está afectando alguna de las funciones del organismo en el cual es inoculado, por ejemplo, en el pulmón, la capacidad para remover agentes particulados. Por lo anterior podemos diferenciar interacción de "sinergismo", definido este último como cualquier situación en la que dos o más agentes producen algún tipo de efecto mayor que el producido por cada agente por separado (Lepper, 1968), y puede ser medido por una gran variedad de formas incluyendo aumento del índice de mortalidad, aumento de la destrucción tisular... (Hamilton y Overall, 1978).

En vacuno se ha sospechado la interacción-sinergismo entre virus y bacterias para la producción de neumonías, sin embargo se han obtenido resultados variables.

Lopez y cols. (1976) observaron que el virus PI-3 disminuye la remoción de Pasteurella haemolytica los días 7 y 11,

pero no así el día 3 posinoculación viral. Aunque la histopatología del pulmón no demostró correlación entre retención bacteriana y desarrollo de cambios histológicos. Diversos autores confirman esta falta de correlación entre la inoculación conjunta de PI-3 y P.haemolytica y lesiones patológicas en pulmón (Lillie, 1974; Thomson, 1974; Sharp y cols., 1978).

Jericho y Langford (1978) observaron que la producción de neumonías en vacuno, mediante aerosoles de IBR y P.haemolytica, fue dependiente del intervalo entre aerosoles, mientras que las condiciones climáticas de la cámara ambiental, antes y después de la aerosolización del virus, así como durante un periodo de adaptación, no estuvo relacionado con la presentación de neumonía. Estos autores concluyeron que no hubo relación entre la muerte de los animales y la extensión de la neumonía, tampoco fueron uniformes las lesiones en los pulmones afectados.

Stockdale y cols. (1979) inocularon a vacuno virus IBR y 4 días más tarde un aerosol de P.haemolytica. Vieron que 4 de 5 animales presentaron neumonía lobar extensa y que 2 de 5 murieron de la enfermedad.

En cerdo Shope (1931) observó que los casos de Influenza porcina se presentaban asociados frecuentemente con Haemophilus influenzae suis.

Pijoan y Ochoa (1978b) comprobaron un marcado sinergismo entre el virus vacunal de Colera porcino, inoculado intramuscularmente, y Pasteurella multocida inoculada intratraquealmente; obteniendo un aumento de lesiones en animales inoculados con un intervalo de 3 a 4 días y efectos menores a los 14 días.

En ratón Degre y Glasgow (1968) observaron una disminución en la remoción pulmonar de Haemophilus influenzae, y ma-

yor afectación de los lóbulos del pulmón, a los 4 días posinfección con virus Sendai.

Hamilton y Overall (1978), utilizando ratones inoculados intraperitonealmente con Citomegalovirus humano y Pseudomona aeruginosa, Staphylococcus aureus o Candida albicans intravenosamente, encuentran un efecto sinérgico de aumento de mortalidad a los días 0 y 3, pero no a intervalos de 4, 5, 7, 9, 15 y 20 días.

Warshauer y cols. (1977) demostraron una disminución en los índices de remoción, y aumento de lesiones en el pulmón, al inocular virus de Influenza y Staphylococcus epidermidis con 5 días de intervalo.

Jakab y Green en 1972 detectaron una rápida disminución de la eliminación de Staph.aureus a partir del día 7 posinoculación del virus Sendai en ratones.

Jakab (1974) al inocular en ratón virus Sendai y un aerosol de Pasteurella pneumotropica a diferentes intervalos, observa una marcada disminución de la remoción bacteriana hacia el día 6 posinoculación del virus.

Nugent y Pesanti (1982b), en ratones inoculados con virus Influenza, demuestran una reducción de la remoción de Staph.aureus hacia el día 7 posinoculación viral.

4.1. Patogenesis de las neumonías por virus (algunos aspectos)

La presencia de virus en el aparato respiratorio puede producir, en las diferentes especies animales, daños variables en el tejido pulmonar que conduce a la disminución o a la pérdida de función respiratoria, ésto ha sido explicado fundamentalmente por la destrucción tisular y por la respuesta inflamatorio-exudativa.

La producción de neumonías en modelos experimentales han demostrado que la severidad y la duración de la enfermedad es tan relacionados con la dosis infectiva del virus; a dosis bajas, probablemente más fisiológicas desde el punto de vista de transmisión de la enfermedad, se produce una enfermedad cacterizada por síntomas respiratorios leves, ésto ha sido observado para diversos virus respiratorios (Degre, 1971; Yates, 1982).

La inoculación del virus Sendai, en ratón, produce, a dosis subletales, una enfermedad caracterizada por neumonía. El virus prolifera rápidamente en el pulmón y alcanza su título máximo entre los 3 y 5 días posinoculación, a partir de entonces el título declina rápidamente y casi no se recupera virus al noveno día posinfección (Jakab y Green, 1976b; Warr y Jakab, 1983).

La respuesta inflamatoria en el pulmón de ratón inoculado con virus Sendai se manifiesta con un aumento hacia el día 2 del número de células polimorfonucleares, esta respuesta fue máxima el día 6 posinfección; los macrófagos alveolares y linfocitos aumentaron de forma más lenta y el número máximo se observó entre los 7-10 días posinoculación (Warr y Jakab, 1983). Los cambios histopatológicos fueron detectados a partir del día 3 y alcanzaron el máximo grado el día 7, las lesiones no complicadas consisten en descamación del epitelio ciliar, engrosamiento de la pared alveolar, hiperemia, edema, diversos grados de infiltración leucocitaria en bronquios y alveolos, trombosis capilar e infiltración perivascular; estas lesiones se resuelven a partir del día 9 y el pulmón aparece normal a las 4 semanas posinfección (Jakab y Green, 1972).

La respuesta inmune en el pulmón, también en ratones in-

fectados con virus Sendai, se asocia en primer lugar con la producción de interferón, éste alcanza su pico máximo hacia el día 5 para declinar después rápidamente. La respuesta de anticuerpos específicos, en las secreciones bronquiales, se detecta al día 3 y es máxima el día 7, mientras que en suero aparece a los 8 días. La presencia de células T citotóxicas ha sido detectada en células de bazo y alcanza su máxima concentración el día 6 (Jakab, 1981).

4.2. Mecanismos bactericidas del pulmón afectados por la infección viral

La disminución en la remoción, como se puede deducir de los apartados anteriores, se correlaciona con la disminución del título viral en el pulmón, máxima respuesta inmune local y celular y con el desarrollo de cambios histopatológicos en el pulmón.

La susceptibilidad del pulmón a agentes bacterianos secundarios se ha propuesto que pudiera ser debido a la destrucción masiva de células del aparato mucociliar (Degre y Solberg, 1971) o a la presencia de exudados inflamatorios en vías aéreas y alveolos, que permitiría la rápida multiplicación bacteriana (Degre y Glasgow, 1968) o a la afectación de las funciones del macrófago alveolar y otras células fágicas (Warshauer y cols., 1977).

Aunque los mecanismos de remoción mecánica estén afectados, se considera que presentan una eficiencia relativamente baja como para explicar el fracaso en la remoción bacteriana producida por el virus. Un experimento en ratón con aerosoles de bacterias marcadas radiativamente demostró que, mientras la viabilidad de las bacterias disminuyó en un 80%, las cuen-

tas radiactivas declinaron en un 20% durante el mismo periodo de tiempo. La retención de radiactividad sugiere que sólo una mínima parte fue transportada al exterior en pulmones normales (Kass y cols., 1966).

Las infecciones virales donde el edema y los cambios histopatológicos fueron mínimos, la capacidad bactericida del pulmón estuvo disminuida y no se diferenció de la de pulmones más afectados. Por otro lado, el edema provocado inmunológicamente en animales sanos no alteró la eliminación bacteriana (Jakab y Green, 1972), contra las opiniones de Green y Kass(1965) y Green(1970) que consideran que el edema puede producir condiciones de hipoxia que afectarían las funciones del macrófago alveolar.

La comparación de mecanismos bactericidas de regiones con solidadas del pulmón, de ratones infectados con virus Sendai, frente a los de las regiones no consolidadas mostró que los mecanismos estaban igualmente suprimidos en ambas zonas, aunque el grado de supresión fue mayor en las consolidadas y la multiplicación bacteriana estuvo limitada a estas areas (Jakab y Green, 1974).

Diversos autores han relacionado la supresión inducida por el virus con defectos en la fagocitosis e inactivación bacteriana en el macrófago alveolar (comentado en el apartado 1. 2.1.).

Es probable que se haya sobreestimado la capacidad bactericida del macrófago alveolar. Un trabajo con Staph.aureus y macrófagos alveolares de ratón demostró, "in vitro", que la capacidad bactericida de estas células es demasiado lenta como para explicar la tasa normal del pulmón para eliminar esta bacteria. En él se observó que sólo un 5% de las bacterias re

cuperadas a las 6 horas fueron resistentes al Lysostaphin (sustancia sintética, bactericida para las bacterias extracelulares en un tiempo mucho menor que para las bacterias intracelulares). Por otro lado se observó que las bacterias intracelulares fueron inactivadas, "in vitro", por el macrófago en tiempo medio de 10.8 ± 2 horas, lo que contrasta con la rápida actividad bactericida intrapulmonar -de 3.07 a 3.14 horas para reducir el número de cocos a la mitad- (Nugent y Pesanti, 1982a).

A modo de conclusión podemos decir que la depresión de los mecanismos bactericidas, inducida por el virus, no puede ser achacada a la alteración de uno solo de los factores, si no más bien a la acción combinada del virus sobre varios al mismo tiempo.

5. Infecciones del tracto respiratorio del cerdo

5.1. Importancia económica

El crecimiento de la población mundial en las últimas décadas no ha venido respaldado por un crecimiento similar en la producción de alimentos, especialmente de la producción de carne y leche. Las limitantes en la producción animal están en gran parte asociadas a las enfermedades infecciosas (Blaxter, 1979).

En el ganado porcino, entre las causas más importantes de mortalidad y morbilidad, en Europa y América, se encuentran las afecciones respiratorias y estas se han visto agravadas especialmente a partir del establecimiento de unidades de producción intensiva (Jericho, 1968; Ochoa, 1978; Muirhead, 1979).

Las infecciones respiratorias están caracterizadas por alta morbilidad, aumento de los índices de mortalidad, múltiples agentes etiológicos, disminución de la tasa de crecimiento y del índice de conversión (Muirhead, 1979).

Las pérdidas económicas por neumonías están asociadas a muerte de animales, gastos de medicamentos, honorarios veterinarios, mayor consumo de alimentos de los sobrevivientes; lo que hace que aumenten los costos y disminuya la disponibilidad de alimento en el mercado. Por lo que actualmente estas afecciones están consideradas como la mayor causa de disminución en la productividad, especialmente entre cerdos de engorde (Little, 1975; Goodwin, 1971; Straw y cols., 1983).

Las pérdidas económicas son difíciles de evaluar si tenemos en cuenta que el número de cerdos afectados por la enfermedad varía de explotación a explotación, y la extensión de la lesión neumónica varía de cerdo a cerdo dentro de una misma

explotación (Burch, 1982).

Diversos investigadores han reportado índices que relacionan la presencia de problemas respiratorios con la disminución de la productividad en las explotaciones porcinas. Madsen (1982) observa un 4.3% de reducción en la ganancia diaria de peso, Goodwin (1971) detecta una reducción de 1.4-5.2%, Burch (1982) encontró una relación lineal entre la extensión del area neumónica y la reducción en el índice de crecimiento y Straw y cols. (1983) demostraron que un aumento del 10% en la superficie neumónica del pulmón reduce la media de ganancia diaria de peso en un 5.3%.

La incidencia de los problemas respiratorios en cerdo parece elevada. Little (1975), en Inglaterra, observa que al menos un 10% de los cerdos sacrificados presentan lesiones de tal severidad como para justificar el decomiso del pulmón, y comenta que el 20-30% de muertes en el posdestete y fase de engorde son por neumonía. Gois y cols. (1980) reportan hasta un 50% de pulmones, en rastros checoslovacos, con lesiones neumónicas. En Brasil, Nogueira y cols. (1982) encontraron en rastro un 17% de pulmones neumónicos. En México, Maqueda (1977) en un estudio, en rastros de distintos estados, halló que un 50% de cerdos sacrificados tenían lesiones pulmonares; y Ochoa (1978) reportó de un 10 a un 12% en el rastro de Ferrería -México D. F.-

5.2. Agentes etiológicos de las neumonías porcinas

La atención, con respecto a los problemas respiratorios, ha sido enfocada en los últimos años hacia Haemophilus pleuropneumoniae y neumonía enzoótica. Aunque la revisión de la literatura nos indica que también otros agentes bacterianos, yi

rales, micoplasmas y parásitos pueden ser importantes en las enfermedades respiratorias (Jericho, 1968; Huhn, 1970; Little, 1975; Watt, 1978).

Aquí nos referiremos a los agentes primarios y secundarios más relevantes. Como agentes primarios incluimos a Haemophilus pleuropneumoniae, Mycoplasma hyopneumoniae, Influenza porcina, Adenovirus, Reovirus, Colera porcino y el virus de la enfermedad de Aujeszky (agente que será revisado con más detalle en el apartado 5.3.).

Haemophilus pleuropneumoniae, una bacteria gramnegativa, ha sido considerada como un problema importante en muchos países, ocasionando graves pérdidas en animales de engorda. En explotaciones no inmunes, la enfermedad se caracteriza por un cuadro pulmonar agudo de rápida evolución y elevada mortalidad, pero también existen evidencias de infecciones subclínicas en explotaciones crónicamente afectadas (Nielsen, 1973; Schultz y cols., 1982; Schultz, 1983; Friendship y cols., 1984). En el examen posmortem de los casos agudos se observan hemorragias pulmonares masivas y también son comunes áreas necróticas circunscritas especialmente a lóbulos diafragmáticos. La pleura y pericardio, con frecuencia, presentan adherencias en las zonas adyacentes a las áreas neumónicas (Schultz, 1983). Es probable que en la infección natural, el cuadro neumónico esté complicado con otros agentes; experimentalmente se ha demostrado que Haemophilus pleuropneumoniae es capaz de producir suficiente daño pulmonar como para permitir la invasión de un agente secundario sin embargo, la inoculación conjunta con Pasteurella multocida no produjo una enfermedad más grave que con la sola inoculación del Haemophilus (Little y Harding, 1980).

La diseminación de esta enfermedad es rápida con elevada morbilidad y de un 20 a un 40% de mortalidad (Hsu y cols., 1982). La severidad de la infección ha sido relacionada con las condiciones medio-ambientales y el estado inmune del huesped (Rosendal y Mitchell, 1982).

Mycoplasma hyopneumoniae se ha considerado como el agente principal de la neumonía enzoótica, aunque la inoculación experimental produce un cuadro más leve que el observado en campo, donde las lesiones son mayores y se observa además un exudado mucopurulento en la luz bronquial, con aislamiento de una gran variedad de bacterias (Pijoan, 1982b).

Este microorganismo es muy común en cerdos con problemas respiratorios (Little, 1975; Yamamoto y Ogata, 1982). La enfermedad se caracteriza por signos y síntomas leves de afectación respiratoria con tos seca, no productiva y esporádica. Las lesiones macroscópicas consisten en áreas de consolidación rojo-oscuro o grisáceas, según la antigüedad de la lesión, en lóbulos apicales y cardíaco, aunque también pueden estar afectados los lóbulos intermedios y la porción anterior de los diafragmáticos (Ross, 1983).

Las infecciones secundarias son extremadamente frecuentes y, especialmente, de Pasteurella multocida (Carter, 1975). En rastro, las lesiones complicadas con P. multocida presentan una mayor extensión que cuando sólo se aisló uno de estos agentes (Morrison y cols., 1984).

La Influenza porcina está producida por un virus de la familia Orthomyxoviridae (Matthews, 1982) y se caracteriza por un cuadro respiratorio agudo, acompañado de fiebre y postración. La instauración de la enfermedad es rápida, presentando una morbilidad cercana al 100% y una mortalidad del 0-3%. Los ani

males se recuperan a la semana de la infección. Las lesiones observadas en el campo consisten en zonas de consolidación rojizas, en lóbulos apicales y cardíaco, pero también pueden estar afectados otros lóbulos; estas lesiones son difíciles de observar ya que es raro la no complicación bacteriana (Hernandez, 1982a).

La infección experimental produce una enfermedad leve, aunque puede ser agravada en condiciones de alta humedad relativa y bajas temperaturas. La incidencia de la enfermedad es marcadamente estacional y se considera que afecta predominantemente a los cerdos de ciertas zonas de Europa y Norteamérica (Easterday, 1975; Hernandez, 1982a).

Los Reovirus son agentes virales clasificados dentro de la familia Reoviridae, género Reovirus (Matthews, 1982). Los tipos I y III se han detectado en cerdos y han sido aislados de explotaciones con problemas respiratorios. La infección experimental de cerdos gnotobióticos sólo produce, en algunos casos una reacción febril transitoria y débiles lesiones exudativas y proliferativas en pulmón (Hernandez, 1982b).

Los Adenovirus porcinos pertenecen a la familia Adenoviridae, género Mastadenovirus (Matthews, 1982) y se han descrito cuatro especies porcinas. La importancia de estos virus como agentes etiológicos de enfermedades respiratorias no está aclarada, pero se ha demostrado que el cerdo es un animal susceptible a la infección y portador del mismo. Las características de persistencia de estos agentes, hacen suponer que pueden ser activados después de presiones externas y desarrollar la enfermedad en combinación con otros agentes (Mc Ferran, 1975).

Kasza y cols. (1969) inocularon simultáneamente Adenovirus tipo IV y M.hyoopneumoniae intranasalmente a cerdos gnoto-

bióticos, y observaron que los dos agentes producían lesiones neumónicas más severas que cuando cada uno se inoculaba por separado.

El Cólera porcino está producido por un virus de la familia Togaviridae, género Pestivirus (Matthews, 1982). Este agente produce una variedad de manifestaciones clínicas (Correa, 1981).

Pijoan y Ochoa (1978b) al inocular cerdos con el virus vacunal de Cólera y P.multocida observaron lesiones pulmonares. En el campo también se observó que la vacunación contra Cólera produjo una enfermedad respiratoria asociada con P.multocida (Bak y Kim, 1982).

Los agentes secundarios que parecen tener más importancia en estos procesos son Haemophilus parasuis en Gran Bretaña (Little, 1975) y P.multocida que se considera predominante en Estados Unidos, México y Japón entre otros (Carter, 1975; Ochoa, 1978; Yamamoto y Ogata, 1982).

5.3. Aujeszky

La enfermedad de Aujeszky o Pseudorrabia es un proceso infeccioso, caracterizado por un cuadro clínico nervioso, curso agudo, y a menudo fatal de los animales domésticos y salvajes, causada por un virus del género Herpesviridae. Se considera una enfermedad primaria del cerdo, en los que presenta un curso en general benigno, salvo en lechones.

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

5.3.1. Etiología

A. Aujeszky, en 1902, ya había sospechado que el agente causal era un virus, sin embargo la evidencia no fue proporcionada hasta 1910 por Schmiedhoffer, quien demostró que el agente podía pasar a través de filtros que retenían a las bacterias (Baskerville y cols., 1973).

Posteriormente el virus fue clasificado por Andrewes dentro de la familia de los Herpes-virus siguiendo los criterios de :tipo de ácido nucleico, tamaño del virión, número de capsómeros, presencia o ausencia de envoltura, lugar de replicación celular y maduración, sensibilidad al eter. En 1966 Melnick y Mc Combs lo sitúan dentro de los Herpes grupo "A", ya que el virus posee, en comparación a otros miembros de esta familia, un ciclo de replicación corto -menor a 24 horas- y es liberado rápidamente de las células infectadas (Kaplan, 1969).

En el cuarto reporte del Comité Internacional para la

Taxonomía de los Virus, el virus de la enfermedad de Aujeszky (VEA) está clasificado como perteneciente a la familia Herpesviridae, subfamilia Alphaherpesvirinae, género: grupo I de los Herpes Virus Suinos, especie: Herpesvirus suis 1 (Pseudorhabdia) (Mattews, 1982).

El virión presenta las siguientes características: peso molecular de 1000×10^6 daltones (Mattews, 1982), densidad boyante en CsCl de 1.278 gr/cm^3 (Kaplan, 1969), mide de 150 a 200 nm de diámetro, visualizado por microscopía electrónica (ME), y morfológicamente es indistinguible de otros miembros de la familia (Kaplan, 1969; Lautie, 1969).

Los elementos estructurales del virión son: corazón o "cuore", cápside, tegumento y envoltura. El corazón se observa por ME como un núcleo denso en el centro de la partícula y que consiste en un ovillo fibrilar, al cual está enrollado el DNA, de naturaleza nucleoproteica; los extremos de las fibras de DNA están anclados en la cara interna de la cápside. Esta se observa por ME como una capa que rodea al cuore y mide de 100 a 110 nm de diámetro, está formada por 162 capsómeros dispuestos en simetría icosaédrica, los capsómeros a su vez están compuestos de subunidades proteicas; 150 son examéricos y 12 pentaméricos. El tegumento rodea a la cápside, se trata de un material globular, que con frecuencia está asimétricamente distribuido y puede presentarse en cantidad variable. La envoltura está formada por una membrana bicapa que rodea al tegumento y tiene proyecciones superficiales de composición glicoproteica -peplómeros- (Luria y cols., 1978; Mattews, 1982).

El ácido nucleico del virión es una molécula lineal de DNA de doble cadena y peso molecular de 92×10^6 daltones (Rubinstein y Kaplan, 1975), con un 72% de G+C (Kaplan, 1969).

El genoma de VEA está formado por dos secuencias únicas, una larga y otra corta, la corta tiene una porción repetida a ambos extremos (palíndrome) (Honest y Watson, 1977; Stevely, 1977; Ben-Porat y Rixon, 1979). Además el genoma puede presentarse en dos formas isoméricas, en las que la secuencia corta se orienta de dos formas diferentes respecto a la secuencia larga; las dos formas isoméricas se encuentran en cantidades equimoleculares en las suspensiones de virus purificados, y las dos poblaciones virales son igualmente infecciosas (Ben-Porat y cols., 1980).

En cuanto a la composición proteica, se ha establecido que más de 50 polipéptidos son sintetizados durante el transcurso de una infección productiva, en un mínimo de tres grupos o fases (Honest y Roizman, 1974). De éstos se considera que 27 son polipéptidos estructurales, de 12000-220000 de PM, algunos de los cuales están glicosilados (Ludwig y cols., 1982; Spear y cols., 1970; Ladin y cols., 1982).

Los lípidos se encuentran localizados en la envoltura viral y son predominantemente fosfolípidos, de origen celular (Mattews, 1982).

El ciclo de replicación del virus es relativamente corto, en comparación a otros miembros de la misma familia, obteniéndose una progenie completa en menos de 12 horas (Kaplan, 1969; Luria y cols., 1978).

El ciclo puede dividirse en distintas fases: la entrada del virus se produce tras la adsorción de las glicoproteínas de la envoltura a receptores específicos de la membrana citoplasmática celular y la cápside se libera al interior del citoplasma como consecuencia de la fusión de ambas membranas; la desnudación tiene lugar en el citoplasma y el complejo de nu-

cleoproteína es transportado al núcleo; el DNA viral es transcrito, en tres fases diferentes, por RNA polimerasas celulares, los mRNA generados son traducidos en el citoplasma y algunas de las proteínas sintetizadas migran al núcleo (estructurales y las necesarias para la replicación del ácido nucleico viral); el ensamblaje de las cápsides se produce en el interior del núcleo y el DNA sintetizado "de novo" se enrolla posteriormente en el interior de las cápsides vacías; la maduración coincide con la adquisición de la envoltura, que se adquiere al atravesar la hoja interna de la membrana nuclear por zonas en las que, previamente, se han incorporado glicoproteínas virales; las partículas víricas se acumulan en el retículo endoplasmático y son liberadas por transporte activo a la superficie de la célula y pinocitosis inversa (Kaplan, 1969; Spear y cols., 1970; Ben-Porat, 1972; Baskerville, 1973b; Luria y cols., 1978; Feldman y cols., 1979; Hall y Almy, 1982).

Respecto a la composición y propiedades antigénicas debemos mencionar que los virus del grupo Herpes tienen una estructura compleja que hace difícil el análisis y caracterización de sus componentes.

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

La caracterización de estas proteínas, en un futuro, podrá aportar datos de cuales de ellas son más importantes en la neutralización del virus, cuales se expresan en células latentemente infectadas y, a efectos profilácticos, la posibilidad de

clonar segmentos del genoma para la producción de antígenos inmunizantes libres de ácidos nucleicos (Doogson y cols., 1982).

Sólo se ha encontrado un serotipo del VEA en los aislamientos de diversos países (Kaplan, 1969), la identidad antigénica del virus ha sido confirmada tanto en aislamientos de campo como en cepas vacunales (Pauli y cols., 1982) y presenta un cierto grado de relación antigénica con otros miembros de la familia Herpesviridae: con el virus B de simios (Kaplan, 1969), con IBR (Aguilar-Setien y cols., 1979a), con Herpesvirus equino 1, Herpes simplex Tipo I y II, Herpesvirus bovino 2 (Killington y cols., 1977). Sin embargo, mediante técnicas de seroneutralización en cultivo de tejidos, el VEA no fue neutralizado por anticuerpos heterólogos de Herpes simplex Tipo I y II, Herpesvirus equino 1, Herpesvirus bovino 2 (Kaplan, 1969; Killington y cols., 1977):

El virus ha sido recuperado de gran variedad de especies animales en la naturaleza como: cerdos, bovinos, ovinos, perros, gatos...; experimentalmente puede ser transmitido a un amplio espectro de mamíferos y pájaros, excepto a monos. Los animales de experimentación usados con mayor frecuencia, para fines de diagnóstico e investigación, son: conejo, ratón; rata, cuye, palomo, perro y gato (Lautie, 1969; Gustafson, 1975):

"In vitro" el VEA puede multiplicarse en una gran variedad de cultivos celulares primarios y de líneas celulares, pero no todos los sistemas son igualmente sensibles ni productivos (Kaplan, 1969; Baskerville y cols., 1973): El cultivo primario de riñón de cerdo y la línea celular PK-15 (Mc Ferran y cols., 1972), junto con los fibroblastos de embrión de pollo (Ursache y cols., 1977), son las células más sensibles a la in

fección, con efecto citopático característico, y por ello las más usadas para el diagnóstico. Como cualidad diferenciadora de este virus, en el primoaislamiento, con otros virus del cerdo cabe apuntar aquí que es el único capaz de prender en cultivo primario de riñón de cerdo al mismo tiempo que en fibroblastos de embrión de pollo (Lautie, 1969).

El tiempo necesario para la adsorción varía con el tipo celular usado (Kaplan, 1969; Lautie, 1969), aunque la mayoría de investigadores utilizan un tiempo de 30-60 minutos.

La formación de placas en distintos tipos de células es una de las características de este virus, y existe una relación lineal entre el título viral y el número de placas producidas (Kaplan, 1969). El tamaño de la placa está relacionado con el tipo celular usado y la cepa del virus (Baskerville y cols., 1973).

En las células del cultivo celular se producen dos tipos de efectos citopáticos (ECP), uno caracterizado principalmente por formación de sincitios y el otro por células redondeadas, altamente refráctiles y ocasionalmente células gigantes; la formación de sincitios ha sido relacionada con mayor virulencia de la cepa (Bitsch, 1980), pero en ausencia de replicación la fusión celular y la aglutinación de las células ocurre rara vez (Matthews, 1982).

Las células infectadas presentan un único y homogéneo cuerpo de inclusión intranuclear, Feulgen positivo, que evoluciona a Feulgen negativo y eosinófilo (Kaplan, 1969).

La sensibilidad de VEA a solventes como etil eter, cloroformo...; detergentes como desoxicolato, Tritón X-100, dodecil sulfato de sodio, Nonidet P-40...; desinfectantes como formalina, fenol... es muy elevada y algunas cepas son sensibles

a tripsina (Lautie, 1969; Bartha y cols., 1969).

La tasa de supervivencia del virus es dependiente de pH y temperatura, a 4°C es relativamente estable entre pH 5 y 9 (Kaplan, 1969). El índice de inactivación a 4°C es de 0.04 log (en base 10) por día, a 37°C es de 0.6 log/día; estas mediciones se realizaron a pH entre 6 y 8. A -13°C el virus es rápidamente inactivado, a cualquier pH, mientras que a -90°C y pH de 6-7 no hay pérdida apreciable de título. El efecto de congelación-descongelación se reduce si el paso a través de temperaturas críticas (0 a -15°C) es rápido. La deshidratación produce la inactivación acelerada a cualquier pH (Davies y Beran, 1981).

Los rayos X y ultravioletas provocan la inactivación exponencial del virus extracelular; son suficientes dosis de 440 ergios/mm² de U.V. para inactivar al 90% de partículas (Kaplan, 1969).

Estudios de supervivencia del virus en diversos materiales como madera, restos de comida, forraje y paja mostraron que ésta es dependiente de la humedad relativa y la temperatura, y puede variar de 10 a 40 días (Baskerville y cols., 1973). Mahnel y cols. (1977) observaron que en agua, a temperaturas de 9 a 15°C, persiste de 20 a 50 días.

5.3.2. Epidemiología

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

Aquí vamos a comentar algunos aspectos relacionados con la transmisión y diseminación del VEA en el ganado porcino.

-La transmisión directa cerdo a cerdo se produce por las secreciones orales y nasales, durante y después de la enfermedad natural (Shope, 1934). En la infección experimental, con cerdos de 6 a 8 semanas, el virus puede ser excretado continuamente durante 10 días, e intermitentemente durante otros 7 días, por las secreciones oronasales (Mc Ferran y Dow, 1965). Además puede ser excretado por la leche materna, semen, contacto venereo, ingestión de carne de animales infectados, y no parece ser transmitido por orina y heces (Kojnok, 1965; Baskerville y cols., 1973; Medveczky y Szabo, 1981).

-Los animales que se han recuperado de la enfermedad pueden pasar a un estadio de infección latente. La reactivación de los virus latentes se considera una de las formas más importantes de transmisión, y persistencia en la explotación porcina, de la enfermedad (Sabo, 1969; Sabo y Grunet, 1971).

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

-El movimiento de objetos también se ha relacionado como factor de transmisión: equipamiento compartido entre explotaciones, vehículos de la granja, camiones de entrega... (Cartwright, 1982).

-El hombre puede actuar como vector mecánico ya que no hay evidencias de que el humano se infecte, y no se han detectado anticuerpos neutralizantes en el suero humano (Gustafson, 1975).

-Otras especies como pájaros, insectos... podrían estar

involucradas en la diseminación local en forma mecánica (Cartwright, 1982). Las ratas y los ratones silvestres parecen animales difíciles de infectar, al menos en experimentos en los que se mantuvieron en contacto con cerdos excretadores de virus, mientras que sí se afectaron por ingestión de restos de animales muertos por la enfermedad (Gustafson, 1975). Esto hace que estos animales puedan estar involucrados en la transmisión, infectando el alimento de los cerdos con secreciones oronasales, pero el hecho de que no desarrollen anticuerpos neutralizantes y el aislamiento no sea positivo durante largos periodos de tiempo, indica que no es demasiado probable su actuación como portadores del virus (Mc Ferran y Dow, 1970; Maes y cols., 1979). En bovinos existe cierta evidencia de excreción nasal del virus, pero el corto curso de la enfermedad y el carácter mortal de ésta hace que se consideren de poca importancia en la transmisión, y algo similar ocurre con perros, gatos, zorros... (Hagemoser, 1979; Cartwright, 1982; Wittman y cols., 1982a).

-El tipo de alimentación se ha relacionado con la incidencia de la enfermedad ya que esta es especialmente elevada en explotaciones que utilizan restos de alimentación humana (Howarth y cols., 1981).

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

-Ciertas cepas de virus, especialmente las de alta patogenicidad, parecen ser excretadas en mayor cantidad y han abierto la duda sobre la posible transmisión aérea (Bitsch y Andersen, 1982).

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

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

A modo de resumen, los aspectos de transmisión de la enfermedad que se consideran más importantes en términos de control e erradicación son eliminación de animales portadores, y evitar el movimiento de cerdos entre explotaciones (Thawley y cols., 1979; Lenihan y O'Connor, 1982).

Existen diversas evidencias acerca de la importancia creciente de la enfermedad; hasta los años 60's los reportes concernían principalmente a bovinos y la incidencia se consideraba como baja. A partir de los años 70's la infección en los cerdos adquiere importancia económica en diversos países a causa del gran número de casos registrados y pérdidas ocasionadas (Baskerville, 1981; Cartwright, 1982; Pittler, 1982).

Un gran número de estudios epizootiológicos muestran la persistencia e incidencia de la enfermedad. Kojnok (1965) encontró un 3.4% de aislamientos, por hisopo nasal y laringeo, en cerdos de engorda que no presentaban sintomatología y procedían de granjas recuperadas de la enfermedad. En California detectaron un 4.8% de sueros positivos sobre 14012, recolectados de rastro durante los años 1977-1980 (Howarth y cols., 1981). En Iowa, de 6010 hisopos faringeos colectados en rastro, se aisló VEA en un 7.17% (Kemeny, 1981). En Francia la enfermedad pasó de un foco en 1969 a 234 en 1977 y 95 en 1979, el autor atribuye la disminución del número de focos a la vacunación aunque el número de departamentos afectados aumentó (Toma, 1980).

En México los estudios realizados muestran persistencia y difusión en los Estados con mayor concentración porcícola. Un

muestreo en varios Estados en el año 1976, sobre 270 sueros, se encontró una positividad entre 2.4 y 87% en los Estados de Michoacán y Guanajuato y negatividad en Sonora, Jalisco, México y D.F. (Medina y Correa, 1977). En otro trabajo con 453 sueros de rastro, un 25.8% del total fueron positivos, siendo Guanajuato (Abasolo) el más afectado con un 38.8%, seguido de Michoacán (La Piedad) con 33.8% y el Estado de México (Atizapán) con un 19% (Orraca, 1978). En 1982, un estudio realizado en granjas de diversos Estados y un total de 453 sueros recolectados mostró una incidencia del 75.68% de sueros positivos en Michoacán, del 19.2% en Guanajuato, del 12.6% en Jalisco; los Estados de Puebla, Querétaro, Sinaloa, Sonora y Veracruz fueron negativos (Mercado y cols., 1982)

5.3.3. Patogénesis

En condiciones naturales se admite que el cerdo es infectado mediante la introducción o inhalación del virus en la cavidad nasal (Baskerville y cols., 1973). En condiciones experimentales la exposición intranasal produce un síndrome más parecido al de la infección natural que la inoculación por otras vías (Olander y cols., 1966).

Una vez el virus entra en la nasofaringe, el sitio primario de replicación parece estar en el tracto respiratorio superior (Mc Ferran y Dow, 1965), puede ser recuperado de las secreciones orales y nasales de 10 a 20 días (Mc Ferran y Dow, 1964; Sabo, 1969; Wittman y cols., 1980). Durante las primeras 24 horas después de la infección la multiplicación del virus estuvo limitada a mucosa nasal, faringe, tonsilas (Mc Ferran y Dow, 1965) y también en pulmón (Wittman y cols., 1980). Poco tiempo después el virus puede ser recuperado de nódulos linfá-

ticos y del sistema nervioso central hacia las 48 horas (Mc Ferran y Dow, 1965; Gustafson, 1975).

Aparentemente el virus migra desde la mucosa nasal, vía nervio olfatorio, a bulbo olfatorio; desde la mucosa faríngea, vía glossofaríngeo, a cuerpo estriado de la médula o por las terminaciones del nervio trigémino en la cavidad nasal y oral a puentes y médula (Mc Ferran y Dow, 1965; Olander y cols., 1966; Alvaldes y cols., 1983). Se ha estipulado que el virus emigra a lo largo de las fibras nerviosas, por el axoplasma, por flujo axonal retrógrado hacia los cuerpos neuronales en gánglios y de allí al sistema nervioso central (Dolivo y cols., 1978).

En el interior del sistema nervioso central el virus se dissemina rápidamente y, hacia el día 7, todas las regiones pueden contener virus; en el cerdo el virus se multiplica de forma limitada y hacia el día 10 posinoculación el virus no pudo ser aislado del sistema nervioso central, la desaparición del virus coincidió con la detección de anticuerpos neutralizantes en sangre (Mc Ferran y Dow, 1965).

El virus ha sido aislado del suero, a bajos títulos, desde el día 1 al día 7 posinfección (Wittman y cols., 1980), pero otros autores consideran que la capacidad del virus para invadir el torrente circulatorio y producir viremia, es una característica de determinadas cepas del virus (Sabó y cols., 1968 y 1969). Esto podría explicar la afectación inconstante de otros órganos además del sistema nervioso central, aparato respiratorio y nódulos linfáticos (Baskerville y cols., 1973).

Wittman y cols. (1980) detectaron el virus en poblaciones de linfocitos y de polimorfonucleares. Se desconoce si estas células pueden permitir la replicación viral "in vivo", aunque "in vitro" estos autores demostraron la replicación viral en células leucocitarias de animales vacunados y no vacunados.

La infección en el aparato respiratorio probablemente ocurre por deposición de gotas en la nariz y paso posterior al pulmón. Experimentos con aerosoles no han reproducido la distribución de lesiones observadas en el campo, por lo que se descarta que la entrada del virus sea por inhalación (Baskerville, 1972a).

Después de la infección experimental el virus puede ser aislado de mucosa traqueal desde el día 1 al día 9, y del pulmón desde el día 3 al día 9 (Dow y Mc Ferran, 1962) o del día 1 al día 7 posinoculación (Wittman y cols., 1980).

5.3.4. Síntomas clínicos

La enfermedad en el cerdo está caracterizada por síntomas clínicos, lesiones macroscópicas y cambios histopatológicos en el sistema nervioso central; pero aunque estas manifestaciones están casi siempre presentes en algunos estadios de la infección natural y experimental, éstas pueden variar considerablemente en severidad (Olander y cols., 1966; Pirtle y Gutekunst, 1978). Algunos autores han señalado que los síntomas respiratorios pueden ser la característica más importante de la enfermedad (Ghenev y Stoyanov, 1958; Lautie, 1969; Baskerville y cols., 1971).

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

Las diferencias observadas en cuanto a las manifestaciones clínicas han sido atribuidas a: edad del cerdo (Baskerville y

cols., 1973), cepas del virus (Baskerville y cols., 1971), dosis de exposición (Baskerville, 1972a), susceptibilidad individual y estado inmune (Gutekunst y Pirtle, 1979; Alva-Valdes y cols., 1983).

Con respecto a la edad se considera que los lechones son los más susceptibles. Hasta las dos semanas de edad presentan una mortalidad del 100%, que disminuye progresivamente para alcanzar un nivel del 5-20% a las cinco semanas de edad (Baskerville y cols., 1973). La forma clínica de la enfermedad puede variar en relación al tiempo de vida de los animales; la inoculación experimental a dosis constantes produce, en cerdos de 4 semanas, síntomas exclusivamente nerviosos mientras que, en los de 10 semanas, se observó rinitis, tonsilitis, neumonía y síntomas nerviosos leves (Bran y cols., 1968).

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

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

Las distintas cepas del virus pueden presentar grados va-

riables de virulencia, y se han descrito variantes que producen altos índices de mortalidad en cerdos de engorde (Howart y de Paoli, 1968; Mc Ferran y cols., 1979); también se han descrito cepas que tienen afinidad por el tracto respiratorio y producen tos, sonido nasal, descarga nasal y ocular, disnea, neumonía y mantienen, en mayor o menor grado, la capacidad de invadir el sistema nervioso central (Becker, 1964; Corner, 1965; Baskerville, 1971; Baskerville y cols., 1971).

La dosis de infección parece estar relacionada con la severidad clínica de la infección, experimentalmente Baskerville (1972a) demuestra dependencia entre dosis y periodo de incubación, tiempo de aparición de fiebre, gravedad de síntomas y lesiones, y el periodo entre infección y muerte.

En relación a diferencias de susceptibilidad de los animales, existen evidencias de que la resistencia a la infección no es debida a la posesión de anticuerpos específicos contra el virus (Pirtle y Gutekunst, 1978; Gutekunst y Pirtle, 1979).

Por último cabe decir que el estado inmune del animal se ha relacionado con formas más leves de la enfermedad (Kojnok, 1965; Mc Ferran y Dow, 1973; Mc Ferran y Dow, 1975; Andries y cols., 1978; Mc Ferran y cols., 1979; Alva-Valdes y cols., 1983).

5.3.5. Lesiones macroscópicas

En general las lesiones macroscópicas son poco marcadas y, tanto en la infección natural como experimental, se observa: rinitis purulenta, faringitis, tonsilitis (Corner, 1965; Bran y cols., 1968), pequeñas hemorragias y congestión periférica débil en nódulos linfáticos, especialmente los de cabeza cuello y aparato respiratorio; ocasionalmente, y en un reducido número de animales, se observan petequias en médula renal, congestión

de cerebro y meninges, acompañado de edema en pulmón y líquido cerebro espinal en exceso (Dow y Mc Ferran, 1962; Gustafson, 1975; Olander y cols., 1966).

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

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

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

5.3.6. Lesiones microscópicas

Mediante inoculación intranasal las lesiones se observaron predominantemente en las regiones anteriores del cerebro y en menor grado en las posteriores, como son: lóbulo olfatorio, frontal y ganglio semilunar; mientras que la inoculación intramuscular produjo lesiones, especialmente, en médula y ganglio espinal cervical (Olander y cols., 1966).

Las lesiones microscópicas, tanto en la infección experimental vía intranasal como en la natural, fueron: meningoencefa

litis no supurativa acompañada de mielitis, ganglioneuritis, in filtración perivascular de células mononucleares, gliosis focal difusa, necrosis neuronal y glial extensa y neuronofagia. Estas lesiones se encuentran principalmente en la materia gris del ce rebro, corteza cerebelar y, con menor intensidad, se observan tam bien en el cerebro primitivo especialmente en las regiones dorsa les, alrededor del conducto cerebral y ventrículos (Dow y Mc Ferran, 1962; Olander y cols., 1966; Gustafson, 1975).

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

La infección experimental, con cepas neu otropas, produce una necrosis no selectiva y extensa que conduce a una bronqui- tis, bronquiolitis y alveolitis necrosante (Baskerville, 1973a; Ducatelle y cols., 1982).

En bronquios, la lesión se extendió frecuentemente desde la membrana basal, con destrucción del tejido muscular liso y tejido conectivo, también hubo exudación de fibrina y hemorra- gia (Baskerville, 1972b; 1973a). A nivel del septo interalveo- lar, el virus se multiplica en todo tipo de células, inclusive los neumocitos tipo I y II fueron comunmente destruidos (Bas- kerville, 1973b).

El estadio agudo de la infección se observó desde las 24 horas hasta el sexto día posinoculación y las células presen- tes en las lesiones fueron predominantemente mononucleares. A partir del día 5 apareció una reacción linfo-reticular en la periferia de las lesiones; los restos celulares y fibrina fue- ron removidos por los macrófagos desde el día 4 posexposición. La reorganización del exudado, continuó desde el día 4 al día

14, y fue llevada a cabo por fibroblastos, colágeno y fibras elásticas; el epitelio fue posteriormente regenerado con células epiteliales mediante mitosis y posterior diferenciación, éste a pesar de las mitosis no se observó hiperplásico; la regeneración de los cilios bronquiales se realizó a partir del día 6 posinfección (Baskerville, 1972b; 1973a; 1973b).

Los cambios exudativos y necrosantes, particularmente los observados en la superficie de los bronquios, así como la presencia de inclusiones intranucleares en las células epiteliales de bronquios y alveolo, hacen que sea posible diferenciar este tipo de neumonía de la producida en la Influenza porcina y neumonía enzoótica (Livingston y cols., 1972; Baskerville, 1973a; Easterday, 1975).

5.3.7. Latencia

La perpetuación de las enfermedades virales, requiere de algún mecanismo que haga posible la supervivencia del virus entre los intervalos de infección huésped a huésped (Mims, 1972).

La latencia ha sido definida como: la relación que se establece entre el virus y el huésped después de la infección inicial, y se caracteriza por la persistencia del virus de por vida (Stevens, 1971). También se ha definido como la capacidad del genoma viral de integrarse en el DNA celular (Smith, 1979), reactivarse en determinadas situaciones y provocar la recurrencia de la enfermedad en el animal o infectar a animales susceptibles a su alrededor (Rouse y Babiuk, 1978).

Las primeras evidencias de la latencia del VEA fueron aportadas por observaciones epizootiológicas acerca de la persistencia y diseminación de la enfermedad.

En general se admitía que los focos ocurren, en granjas aisladas, después del parto de una cerda recién comprada.

Kojnok en 1965 demostró que es posible aislar el virus, cinco meses después de la enfermedad, de cerdas posparto y lechones que aparentemente estaban sanos; estos datos permitieron sugerir la existencia de portadores asintomáticos. La excreción del virus se observó en presencia de inmunidad humoral en las cerdas y calostrales en lechones; el período más largo de excreción fue de 14 días.

En animales de engorda también existen evidencias de infecciones latentes. Howarth (1969) comenta que la enfermedad se produce en ondas epizooticas y que la aparición coincidía con cambios de tipo climático. Gustafson (1975) observa que muchos cerdos, agrupados de distintos orígenes, enferman justo antes de ser distribuidos a otras explotaciones.

Después de la infección natural el virus puede persistir, en las explotaciones de engorda, a pesar de la presencia de anticuerpos neutralizantes (Sabó y Grunet, 1971). En una muestra de 528 cerdos, clínicamente normales, un 3,4% fueron identificados como portadores asintomáticos; el virus fue recuperado, por inoculación a cultivos celulares, de hisopos nasales o faríngeos (Kojnok, 1965).

Simeonov (1973) demostró que cerdos clínicamente recuperados de la enfermedad fueron capaces de infectar a cerdos sanos, puestos en contacto con los primeros, a los 60 días posenfermedad.

Vannier (1982) atribuye la existencia de infecciones latentes, en las unidades de engorda, al sistema de manejo y comenta que el sistema "todo dentro todo fuera" evitaría que el lechón recién destetado entrara en contacto con animales, de distintas edades, potencialmente excretores de virus.

Sabó y Grunet (1971) señalan que el virus puede ser recuperado, después de la infección, al menos durante 10 meses, tan

to en explotaciones vacunadas como no vacunadas; y fue recuperado más a menudo de cerdos destetados, que de reproductores o lactantes.

La posibilidad de que el cerdo destetado introduzca la infección en las unidades de engorda no ha sido demostrada. Kojnok (1965), en un experimento con dos cerdos procedentes de madres que habían excretado el virus durante el periodo de lactación, no mostraron síntomas clínicos, ni se aisló virus, ni presentaron anticuerpos neutralizantes durante los 6 meses de observación.

Si la infección permanece y difunde en las explotaciones después de la enfermedad, cabría preguntarse que mecanismos pueden estar involucrados en la persistencia. La mayoría de autores coinciden en afirmar que el virus deja de aislarse después de 10 a 20 días de la infección, natural o experimental (Sabo, 1969; Beran y cols., 1980; Wittman y cols., 1980; Mock y cols., 1981; Mc Ferran y cols., 1982). Según Sabo (1969) este intervalo podría ser suficiente para infectar a un cierto número de animales susceptibles y mantener la circulación del virus, en la explotación, durante largos periodos.

Otros autores sostienen que el VEA puede ser aislado por periodos relativamente largos después de la infección. Thawley y cols. (1980) lograron el aislamiento de dos cerdas, a los seis meses de la enfermedad, aún habiendo sido vacunadas durante el foco. Simeonov (1973) detecta el virus, en suspensiones de tonsilas, 4 meses después de la recuperación clínica. Nikitin (1961), mediante la inoculación de homogenados de órganos a conejo, recuperó el virus de pulmón y otros órganos los días 60, 103 y 153; y de pulmón, únicamente, el día 186 después de un foco con sintomatología clínica.

Mediante la técnica de cocultivo y cultivo de fragmentos

de tejidos de animales recuperados de la enfermedad, y sacrificados secuencialmente, Beran y cols. (1980) aislaron VEA de tonsilas y de una mezcla de gánglio trigémino+nervio óptico+nervio olfatorio, de forma continua, desde el sexto mes hasta el treceavo después de la inoculación; mientras que, de los homogenados libres de células, sólo lograron el aislamiento hasta el día 13. Sabó y Rajcáni (1976), en un experimento similar al anterior, lo aislaron, al menos, hasta el sexto mes. La observación de que el virus deja de aislarse, por los métodos clásicos de aislamiento viral de forma continua, y a partir de este momento pueda recuperarse de cultivo de fragmentos o cocultivo, sugeriría la capacidad del virus para reactivarse, bajo ciertas condiciones, y producir partículas infecciosas; ésto explicaría la excreción discontinua del VEA.

La evidencia de que el virus puede integrarse en el genoma de las células ha sido demostrada mediante técnicas de hibridización de ácidos nucleicos. Gutekunst (1979) detectó el genoma viral en el DNA celular extraído de gánglio trigémino y tonsilas, en cinco de seis cerdos, a los 7 meses después de la infección experimental; en cerdos vacunados sólo lo detectó en ganglio trigémino a los 5 meses posinoculación.

En otro estudio, la detección del DNA viral se realizó por hibridización de ácidos nucleicos, directamente sobre cortes histológicos, y se demostró la integración en tonsilas y pulmón hasta la sexta semana, mientras que en gánglio trigémino hasta la treceava semana posinoculación; en este mismo estudio también se detectó mRNA viral en tejidos neuronales (Rziha y cols., 1982).

Gutekunst y cols. (1980) demostraron la integración en una cerda, procedente de una explotación afectada, con bajos títulos

de anticuerpos neutralizantes, por técnicas de cocultivo e hibridización.

Hasta aquí, estos trabajos apoyan la integración del virus, especialmente en tejido nervioso, tanto en la infección natural como experimental; pero cabe preguntarse cuales son las condiciones que provocan la reactivación y posterior excreción viral.

Para Kojnok (1965) sería por el efecto del parto y para Howarth (1969) estaría relacionado con cambios climáticos.

Mc Ferran y Dow (1964) fueron incapaces de provocar la excreción del virus, de cerdos plenamente recuperados, por exposición a una variedad de situaciones (anafilaxia, dieta, cambios de temperatura, cortisona...).

Sabó y Rajcáni (1976), después del tratamiento con cortisona, aislaron el virus por cocultivo pero no de la región nasofaríngea; por lo que concluyeron que no se producía excreción por la mucosa nasofaríngea.

Rziha y cols. (1982) reactivaron el virus mediante la inoculación de 1250 mg/animal de prednisolona, durante 3-4 días; el virus se detectó, por cocultivo y cultivo de fragmentos, de diversos órganos y pulmón hasta la semana 32, y del sistema nervioso central hasta sexagésimocuarta semana. Sin embargo no midieron excreción viral.

Wittman y cols. (1982b), en un experimento similar, observaron sintomatología después de la inmunosupresión y el virus se detectó, en exudados nasales, desde el día 3 al día 14 posinoculación de prednisolona.

Algunos de los métodos propuestos para la detección y eliminación de portadores latentes del virus son: biopsia de tonsilas para cocultivo o cultivo de fragmentos (Beran y cols., 1980); remover los cerdos con bajo título de anticuerpos neutralizantes

(Gutekunst y cols., 1980); remover todos los animales seropositivos en explotaciones donde no se vacune (Thawley y cols., 1979); eliminar todos los animales positivos a la prueba de hipersensibilidad retardada (Smith, 1979); hibridización de ácidos nucleicos en biopsias tonsilares (Gutekunst, 1979; Rziha y cols., 1982); inocular corticoesteroides y recuperar el virus de exudado nasal u observar seroconversión (Wittman y cols., 1982b); detectar un polipéptido temprano, que se produce durante la latencia, por inmunofluorescencia de biopsia tonsilar (Green y cols., 1981).

5.3.8. Cepas y marcadores de virulencia

Las primeras sospechas acerca de la existencia de diferentes cepas, proceden de las observaciones en la variación de severidad, cuadro clínico, lesiones macro y microscópicas, tropismo... de la enfermedad natural y experimental (Lautie, 1969).

En el campo se han aislado cepas espontáneamente atenuadas para cerdo como la cepa K (Bartha, 1961), la cepa SUCH-1 (Skoda y cols., 1964) o la cepa aislada por Bodon y cols. (1968) de un foco en cerdos con problemas respiratorios.

Las cepas aisladas en Irlanda del Norte presentan notables diferencias entre ellas. La cepa NIA-1 es neurotrópica y produce un 5-20% de mortalidad en cerdos de siete semanas (Dow y Mc Ferran, 1962); la cepa NIA-2 presenta una mortalidad similar a la anterior y lesiones pulmonares severas (Baskerville, 1973a); la cepa NIA-3, en inoculación experimental, puede provocar una mortalidad entre el 80 y el 100% a cerdos de siete semanas (Mc Ferran y cols., 1979); la cepa NIA-4, aislada de vacuno, muestra virulencia atenuada para cerdo (Mc Ferran y cols., 1979).

Por otro lado, se han producido cepas atenuadas experimentalmente como la obtenida por Toneva (1961), por pases sucesivos en palomo; las atenuadas por pases en embrión de pollo o fibroblastos de embrión de pollo (Skoda y cols., 1964; Zuffa y Polak, 1965; Bran, 1974); las mutantes termosensibles, seleccionadas a partir de placas de pequeño tamaño e incubación a temperaturas progresivamente más bajas (Toma, 1979a); mutantes resistentes al tratamiento con 5 iodo-2 deoxiuridina o con 5 bromo-2 deoxiuridina (Tatarov, 1968; Tatarov y Gergov, 1981). Todas estas cepas son avirulentas para cerdo pero presentan grados de patogenicidad variable para otras especies domésticas y de laboratorio (Tatarov, 1974; Toma, 1979b).

La existencia de cepas de campo con distintos grados de virulencia, y la introducción de cepas atenuadas para la vacunación, ha planteado el interrogante de si se pueden encontrar marcadores para: diferenciar el grado de virulencia, estudios epizootiológicos, control de cepas vacunales...; diversos trabajos mencionan diferencias entre cepas para el tamaño de placa, sensibilidad a temperatura, sensibilidad a la tripsina, virulencia para ratón y conejo o análisis del genoma por enzimas de restricción.

En relación al tamaño de placa, Bartha (1961) observa que la cepa K produce placas de menor tamaño que las cepas virulentas, aunque Skoda y cols. (1964) observaron un fenómeno contrario con distintas cepas. Zuffa y Grigelova (1966) tampoco encontraron relación entre virulencia y tamaño de placa, mientras que Motovsky y Kounev (1979), tratando de seleccionar cepas con baja virulencia, mediante pases consecutivos en cultivo celular y aplicando la prueba de sensibilidad a la temperatura (1 hora a 50°C), observaron que las cepas temperatura-sensibles producían placas grandes (1.2 mm de diámetro) y que las cepas vacunales

(controles) y las identificadas como temperatura-resistentes produjeron placas pequeñas (0.8 mm de diámetro).

Algunos autores coinciden en la observación de que las cepas naturalmente atenuadas y vacunales causan un efecto citopático reducido, que consiste en un redondeamiento celular, mientras que las cepas virulentas producen sincitios (Bartha, 1961; Zuffa y Grigelova, 1966; Bodon y cols., 1968; Bitsch, 1980).

La sensibilidad a la temperatura y a la tripsina parecen ser de utilidad para la diferenciación de cepas. Arnaudov (1975) observa que las cepas aisladas de cerebro de cerdos afectados de encefalitis fueron sensibles a la temperatura (1 hora a 50°C) y a la tripsina (0.5 mg/ml a 37°C durante 1 hora), en tanto que las cepas aisladas de pulmones neumónicos fueron más resistentes a estas pruebas y la cepa vacunal MK (control) fue la más resistente.

Platt y cols. (1979), comparando cepas de campo y vacunales, observaron marcadas diferencias entre ambos tipos, para la prueba de la temperatura y en el mismo sentido al experimento anterior. En otro estudio Platt y cols. (1980) ratificaron lo anterior para la sensibilidad a tripsina, y reportaron que esta prueba detectó diferencias entre cepas indistinguibles por la prueba de sensibilidad a la temperatura. Platt (1981), después de pase seriado, por cavidad nasal de cerdos, de tres cepas de campo y una vacunal, no observó cambios de estas cepas para las pruebas anteriores; por lo que considera que el virus muestra estabilidad genética para estas dos pruebas.

El efecto de temperaturas supraóptimas sobre los cultivos celulares infectados podría ser usado como prueba para la diferenciación de cepas. Golais y cols. (1977) observaron que en células BHK-21 adaptadas e incubadas a 40°C se inhibió la replicación de cepas atenuadas y las virulentas se multiplicaron a ta-

sa normal; los autores señalan que el grado de inhibición de las cepas atenuadas se correlacionó con el grado de atenuación.

Por inoculación a animales de laboratorio, Bartha (1961) reportó que la cepa K no era letal para conejo, Mc Ferran y cols. (1979) observaron que la cepa NIA-4 mataba al conejo pero en baja proporción. Varios autores han encontrado que las cepas atenuadas en fibroblastos de embrión de pollo presentan ausencia de prurito (patognomónico del VEA de campo inoculado a conejo), pero son letales para conejo (Skoda y cols., 1964; Zuffa y Polak, 1965; Bran, 1974). Otros autores han observado que los tiempos de supervivencia, de los conejos inoculados con cepas vacunales o atenuadas naturalmente, son más largos que los de cepas virulentas (Arnaudov, 1975; Platt y cols., 1979; Tozzini, 1982).

En ratón, Platt y cols. (1980) sostienen que el tiempo de supervivencia permite diferenciar cepas vacunales de virulentas, e inclusive cepas virulentas entre sí.

Veselinova (1981), en un estudio anatomopatológico en cerdos, observó que las cepas virulentas fueron predominantemente neurotrópicas, mientras que las atenuadas (cepas K y MK-25) fueron menos neurotrópicas pero fuertemente neumotrópicas.

Otras técnicas usadas no han sido de utilidad para diferenciar cepas. La electroforesis bidireccional de polipéptidos del virión o de células infectadas no mostró patrones definitorios (Gielkens y Berns, 1982); el análisis en geles de poliacrilamida de las bandas obtenidas por inmunoprecipitación indirecta e inmunoelectroforesis cruzada no dio resultados positivos (Pauli y cols., 1982); ni tampoco por isoelectroenfoque de partículas infecciosas (Williams y cols., 1982) o densidad boyante del genoma (Ludwig y cols., 1982).

Los estudios más prometedores para la diferenciación bio-

química de cepas parecen ir encaminados hacia el estudio, por enzimas de restricción, del genoma viral. En este sentido, Gielkens y Berns (1982) observaron que el patrón electroforético, de los fragmentos del genoma de virus y viriones, es idéntico para una misma cepa y distinto entre cepas; aunque algunas de éstas mostraron cierta identidad. Los autores sugieren que los fragmentos que coemigran están muy relacionados, mientras que los que varían pueden ser debidos a deleciones o inserciones en la secuencia de bases.

Ludwig y cols. (1982) dividen los genomas de las distintas cepas analizadas, en cuatro grandes grupos, atendiendo a los patrones electroforéticos resultantes del tratamiento con cinco diferentes enzimas de restricción.

5.3.9. Papel del virus de la enfermedad de Aujeszky en los problemas respiratorios del cerdo

Los datos que podrían apoyar la participación del VEA como agente primario de neumonía, algunos de los cuales ya descritos en apartados anteriores, serían a nuestro modo de ver los que se exponen a continuación.

El virus posee la capacidad de multiplicarse en nasofaringe, traquea y pulmón, produciendo lesiones leves en el tracto respiratorio. Existen cepas neumotropas asociadas a neumonías severas (vease apartados 5.3.5 y 5.3.6.).

En el cerdo de engorda la enfermedad tiende a manifestarse de forma subclínica, pudiendo pasar desapercibida o seguir un curso caracterizado por alteraciones respiratorias de intensidad variable, acompañadas o no de afectación nerviosa ligera (vease apartado 5.3.4.).

Las cepas neumotropas, las atenuadas naturalmente y las va

cunales muestran un comportamiento parecido para los marcadores de virulencia (ver 5.3.8.).

En explotaciones pequeñas, de menos de 50 reproductoras, la enfermedad es autolimitante ya que todos los animales adquieren altos títulos de anticuerpos neutralizantes, en cortos periodos de tiempo; en explotaciones mayores de 100 reproductoras la enfermedad tiende a establecerse de forma enzoótica (Sabo y Grunet, 1971; Akkermans, 1976; Ursache y cols., 1977; Cartwright, 1982). El virus continua circulando en estas últimas bien por roturas en la inmunidad de hato, bien por la capacidad del VEA para establecerse de forma latente (vease 5.3.7.) o ambas situaciones en interacción, lo que explicaría la existencia de ciclos de reinfección que se manifestarían con formas clínicas leves y respiratorias en engorda (Toma y cols., 1981; Pensaert y cols., 1982; Vannier, 1982; Andersen, 1982; Akkermans, 1970).

La reactivación del virus con corticoesteroides produjo una enfermedad leve en cerdos, con fiebre, anorexia, salivación, y uno de los animales presentó neumonía severa (Wittman y cols., 1982b).

En un trabajo realizado en Bélgica, sobre 35 unidades de engorda, con problemas respiratorios, y analizadas para presencia de virus Influenza y Aujeszky, se encontró que en 12 se aisló Aujeszky, en 7 Influenza y en otras 7 ambos virus (Andries y cols., 1981).

Motovski (1975) encuentra el virus en siete de ocho explotaciones, de engorda, con problemas de bronconeumonía.

En los últimos tiempos, la enfermedad ha adquirido importancia debido a la extensión progresiva, a pesar de las medidas de control utilizadas (Toma, 1980; Baskerville, 1981; Frescura y cols., 1982; O'Connor y Lenihan, 1982; Vannier, 1982). La vacu-

nación, con vacuna viva atenuada o inactivada, no protege al cerdo de la infección experimental con virus virulento; aunque sí evita las graves pérdidas económicas, disminuye la sintomatología clínica produciendo formas benignas de la enfermedad y reduce el tiempo de excreción y la cantidad de virus liberada al medio (Sabo, 1969; Mc Ferran y Dow, 1975; Mc Ferran y cols., 1979 y 1982; De Leeuw y cols., 1982). Hasta ahora solo se ha reportado una vacuna, en lo revisado por nosotros, que no presenta excreción viral después del reto con virus virulento (Maes y Schutz, 1983).

La vacunación no previene del establecimiento de la latencia tras la infección con virus virulento (Crandell y cols., 1979; Gutekunst, 1979), pero no se ha demostrado que el virus vacunal pueda pasar a la fase de latencia (Mock y cols., 1981).

Zuffa y Polak (1965) junto con Terpstra y Pol (1982) no excluyen que los virus vacunales no puedan ser excretados, mientras que según Mc Ferran y cols. (1982) la mayoría de cepas vacunales no presentan dicho riesgo.

En relación a lo mencionado hasta aquí, no debe extrañarnos la siguiente observación: el uso de la vacuna inactivada en Francia ha reducido el número de focos anuales y ha disminuido las pérdidas económicas, pero el número de Departamentos afectados ha ido aumentando y permite la evolución de los focos con una sintomatología más discreta, sobre todo pulmonar en cerdos de engorda, que oscurecería el diagnóstico (Toma, 1980); algo similar se ha observado en Bélgica (Pensaert y cols., 1982).

5.4. Pasteurella multocida

Las bacterias del género Pasteurella han sido asociadas a una gran variedad de procesos infecciosos en las distintas especies animales. En el cerdo la Pasteurella más comúnmente observada es P.multocida, aunque no se la considera agente primario de la enfermedad sí no como oportunista en procesos neumónicos y rinitis atrófica.

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

5.4.1. Características generales

Las cepas de P.multocida aisladas de animales que han perecido de la infección, a la tinción de Gram, se observan como bacilos gramnegativos, ovoides, cortos, capsulados y una bipolaridad clásica; midiendo aproximadamente $1 \times 0.5-0.8 \mu\text{m}$. Aunque la morfología y características tintoriales pueden variar, particularmente cuando se aíslan de tracto respiratorio superior y después de subcultivos repetidos en medios artificiales; en esas circunstancias deja de observarse la bipolaridad y pueden tomar forma de bacilos alargados, de hasta $5 \times 1 \mu\text{m}$, con pérdida de cápsula (Buxton y Fraser, 1977; Carter, 1978).

Estos microorganismos son inmóviles, no esporulados, anaerobios facultativos y crecen bien en medios sintéticos, enriquecidos con sangre o suero. Para el aislamiento primario pueden inocularse directamente placas de agar sangre, pero con la inoculación a ratón se mejoran los aislamientos (Carter, 1978).

Pedersen (1982) obtiene 18 aislamientos por cultivo directo frente a 74 tras la inoculación en ratón, de casos de rini-

tis atrófica. Cowart y Backström (1984), también de muestras nasales, encuentran un 16.6% de P.multocida en agar sangre contra un 35.2% de aislamientos en la inoculación paralela a ratón; estos autores demostraron que con la técnica en ratón se aumenta la proporción de bacterias con tipo capsular D. En pulmones neumónicos, Pijoan y cols. (1984) han detectado un 49.6% de aislamientos por cultivo directo y un 58.4% de aislamientos en ratón.

Las colonias bacterianas, en medios sólidos, son de tamaño mediano, redondas, brillantes, grisáceas. Se han observado variantes coloniales lisas-iridiscentes, mucosas-iridiscentes y rugosas-azules (Carter, 1975).

5.4.2. Caracterización antigénica

Los antígenos capsulares han sido estudiados por distintos autores. Roberts (1947) definió cuatro grupos: I, II, III y IV, mediante pruebas de protección cruzada. Carter (1955), por hemaaglutinación indirecta, procedimiento en el cual se adsorben los polisacáridos capsulares a glóbulos rojos, ratificó la existencia de cuatro tipos de cápsula: A, B, C y D; más tarde el serogrupo C se descartó para establecer un nuevo tipo E (Carter, 1961 y 1963). La clasificación de Carter se corresponde con la de Roberts del siguiente modo B/I, A/II, E/III, D/IV.

El grupo de Carter posteriormente encontró dos métodos, no serológicos, rápidos para la determinación de los tipos capsulares A y D. Carter y Subronto (1973) describen un método de aglutinación rápida, con acriflavina, para diferenciar las tipo D. Carter y Rundell (1975) demostraron la sensibilidad de las bacterias tipo A a la decapsulación con hialuronidasa estafilocócica.

Además de los antígenos capsulares se han estudiado los an

**ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA**

tígenos somáticos de pared celular. Namioka y Murata (1961), utilizando un método de aglutinación en tubo con bacterias decapsuladas por tratamiento ácido, observaron 15 tipos antigénicos. La aglutinación de las bacterias tipo A puede estudiarse tras la decapsulación con hialuronidasa testicular o estafilocócica (Carter, 1972). Mediante una técnica de inmunodifusión en gel, para la detección del antígeno termoestable de la pared celular, Hedleston y cols. (1972) reconocieron 16 diferentes antígenos, sin relación al tipo capsular.

Los dos métodos para caracterizar antígenos somáticos producen resultados similares, y se considera que el mayor componente de la especificidad del antígeno somático reside en el lipopolisacárido (Brogden y Rebers, 1978; Shigidi y Mustafa, 1980).

Brogden y Packer (1979) por estudio comparativo de los métodos de tipificación para antígenos capsulares y somáticos, observaron una falta de correlación entre los distintos sistemas.

Bhasin y Lapointe-Shaw (1980a y b), por inmunoelectroforesis cruzada, evidenciaron 55 antígenos citoplasmáticos y 19 de envuelta. Al comparar los distintos métodos de extracción de antígenos capsulares y somáticos, observaron que cada sistema de extracción poseía un cierto número de proteínas diferentes, y esto explicaría la falta de coincidencia en los métodos de tipificación.

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

Se han realizado estudios acerca de los tipos antigénicos más comunes en cerdos, para fines epidemiológicos y de vacuna-

ción.

Carter (1967) publicó los datos de 297 aislamientos, de distintas partes del mundo, a partir de diversos cuadros clínicos en cerdo; 157 se clasificaron como tipo A, 118 tipo D, 3 tipo B y 19 no fueron clasificables. Las bacterias tipo B procedían de cuadros septicémicos.

Buxton y Fraser (1977) señalan que los tipos capsulares, en combinación con los somáticos, más frecuentes en cerdos son: A:1, A:3, A:5, D:1, D:4 y D:10; aunque los autores no comentan el origen nasal o pulmonar del aislamiento.

Pijoan y cols. (1983) encontraron 222 P.multocida en pulmones neuronóxicos de rastro, de las cuales el 97.3% fueron del tipo capsular A y el resto del tipo D. La combinación de antígeno capsular y somático mostró A:3(5) en el 39.1%, A:3(4,5,12) en el 12.2%, A:3(4,5) en el 11.2%, A:3(5,12) en el 10.4%, A:3(6) en el 8%, A:5(6) en el 8%, D:5 en el 33% y D:3(5) en el 33%.

Van Meyeringh y cols. (1977), en aislamientos de cavidad nasal, encontraron un 27 % del tipo A, un 71% del tipo D y un 2% del tipo B; la proporción de los tipos A y D fue similar tanto en explotaciones afectadas, como no, de rinitis atrófica.

5.4.3. Patología

La P.multocida es un comensal frecuente de la nasofaringe y puede persistir allí, sin daño aparente para el huésped (Collins, 1978).

Aunque la adherencia a epitelios no parece ser una característica de esta bacteria, Harris y Switzer (1968) observaron que la colonización nasal se vio favorecida después de la inoculación de Bordetella bronchiseptica; Pedersen y Elling (1984) sólo produjeron la colonización nasal después del tratamiento con

una solución de ácido acético al 1% sobre la mucosa; Gois y cols. (1983) obtuvieron la colonización nasal, a corto y largo plazo, en cerdos obtenidos por cesarea y privados de calostro, por inoculación nasal de la bacteria. Estos resultados sugieren que la bacteria sólo coloniza la mucosa de la nariz bajo determinadas situaciones predisponentes.

La colonización nasal podría explicar el que las bacterias puedan descender hasta el tracto respiratorio inferior del mismo animal, o de animales cercanos libres que se infectarían por inhalación de los aerosoles liberados de los cerdos porreadores.

Pijoan y cols. (1982), en un experimento con P.multocida tipo A inoculada a cerdos, observaron que los animales control, que no estuvieron en contacto directo con los inoculados, desarrollaron anticuerpos una semana después que los demás; por lo que concluyeron que P.multocida es capaz de difundirse rápidamente en las explotaciones.

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

Se ha demostrado que esta bacteria puede producir patología sólo cuando es inoculada en combinación con otros agentes que disminuyen los mecanismos de defensa pulmonares (Kielstein y cols., 1977; Raynaud y cols., 1977; Pijoan y Ochoa, 1978b; Little y Harding, 1980). Bentley y Farrington (1980) son los únicos en producir neumonía, experimentalmente, por inoculación intratraqueal de P.multocida únicamente, pero la bacteria usada

en este caso fue una tipo B; las tipo B se han reportado como causantes de septicemia aguda en cerdos (Murty y Kaushik, 1965) y son extremadamente raras (Carter, 1975).

Los mecanismos de patogenicidad en la infección por Pasteurella no están bien aclarados y se han propuesto diversas teorías.

En las Pasteurella tipo B ha sido descrita una toxina, de composición proteica, a la que se ha hecho responsable del cuadro septicémico (Carter, 1978).

La endotoxina de P.multocida se ha relacionado también con la virulencia (Rebers y Heddleston, 1974; Rebers y cols., 1980).

Por inoculación experimental en ratón, se ha observado que los tipos capsulados son más virulentos que los no capsulados (Carter y Bigland, 1953) y se ha observado resistencia a la fagocitosis de las cepas capsuladas (Maheswaran y Thies, 1979); además la cápsula podría proteger a la bacteria de la acción del complemento y de la opsonización.

La disminución de la eficiencia de las células fagocitarias se ha tratado de explicar por un mecanismo, similar al utilizado por Pasteurella haemolytica, según el cual la bacteria produce un factor citotóxico para macrófagos y neutrófilos (Kashler y cols., 1980; Markham y Wilkie, 1980; Benson y cols., 1978).

Recientemente De Jong y cols. (1980) detectaron la producción de una dermonecrotina por P.multocida tipo D. Estas bacterias productoras de exotoxina han sido asociadas, junto con B.bronchiseptica, como agentes capaces de producir lesiones severas en cornetes nasales (De Jong y cols., 1980; Pedersen y Barfod, 1981; Schöss y Thiel, 1984). La inoculación intranasal de la toxina, a cerdos gnotobióticos, provoca atrofia marcada de cornetes (Martineau y cols., 1982).

Las P.multocida tipo D productoras de toxina colonizan la nariz, de cerdos inoculados con B.bronchiseptica, por tiempos más prolongados que cualquier otro tipo de P.multocida (Rutter, 1983).

La toxina presenta las siguientes características físico-químicas: es inactivada a 56°C durante 30 minutos, sensible a proteasa K y a una solución de formalina, al 0.2%, durante 18 horas a 37°C, parece ser sensible a tripsina, precipita con soluciones del 30-40% de sulfato de amonio, permanece en el sobrenadante tras centrifugación a 150000 x g y tiene un peso molecular aproximado de 20000 daltones (Rutter, 1983; Van der Heyden y cols., 1984).

Los antisueros obtenidos por inoculación de la toxina o de la bacteria a animales, neutralizan los efectos de la toxina (Rutter, 1983; Pennings y cols., 1984; Rutter y cols., 1984).

La toxina puede obtenerse del sobrenadante de un cultivo bacteriano (De Jong y cols., 1980) o por sonicación del medio con bacterias y posterior clarificación por centrifugación (Rutter, 1983).

Para la detección de la toxina se han usado diversos sistemas biológicos: inoculación intradérmica en cuyes (De Jong y cols., 1980), estudio de letalidad para ratón por vía intraperitoneal (Rutter, 1983), toxicidad para cultivos celulares (Rutter y cols., 1984; Pennings y cols., 1984) y medición de la atrofia de cornetes en cerdo (Martineau y cols., 1982).

Recientemente Schöss y Thiel (1984) no encontraron Pasteurella productoras de toxina en los aislamientos de pulmón; mientras que, por el contrario, Pijoan y cols. (1984) encontraron que un 80% de las tipo D aisladas de pulmones neumónicos, producían toxina.

Algunos autores han encontrado P.multocida tipo A producto

ras de necrotoxina (Söderlind y Bergström, 1984).

Los cambios patológicos observados en pasteurelisis pulmonar son muy parecidos a los descritos en casos de infección por Mycoplasma, complicada por agentes secundarios (Carter, 1975).

Macroscópicamente se observa una consolidación rojiza a gris, dependiendo de la antigüedad de la lesión. La extensión es variable, encontrándose generalmente afectados los lóbulos apicales y cardíaco; aunque también pueden estar afectados los lóbulos intermedios y la porción anterior de los diafragmáticos. Es frecuente observar una pleuritis serofibrinosa con o sin adherencias (Pijoan, 1982a).

Microscópicamente se aprecia una bronconeumonía exudativa con distribución lobular. Inicialmente se encuentra una infiltración leucocitaria perivascular y peribronquiolar, engrosamiento del septo alveolar e invasión de neutrófilos en espacio alveolar; a medida que la lesión progresa, se observa la presencia de abundantes neutrófilos, células mononucleares y exudado mucopurulento en alveolos y bronquiolos, acompañado generalmente de una reacción pleural fibrinopurulenta (Schofield, 1956).

III MATERIAL Y METODOS

1. Colección de muestras en rastro

Para estudiar la existencia, en explotaciones porcinas, de interacción entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y Pasteurella multocida, a lo largo de un periodo de 5 semanas se fueron tomando muestras porcinas, en el rastro de Cuautitlan, hasta un total de 106. Estimandose en 20 el número de granjas comprendidas en el estudio.

1.1. Clasificación de las muestras

La clasificación primaria de las muestras se hizo atendiendo al aspecto macroscópico del pulmón. De acuerdo con éste, se etiquetaron como "Pulmón neumónico" 72 muestras recolectadas de casos en los que el pulmón mostró áreas de consolidación rojo-oscura, en lóbulo apical y/o cardíaco; y 34 con la etiqueta "Pulmón normal", correspondientes a otros tantos casos en los que no se apreciaron alteraciones macroscópicas visibles.

En el muestreo no se tomaron en cuenta los pulmones que mostraban signos de "neumonía" por aspiración, atribuible al método de sacrificio.

1.2. Material para bacteriología

1.2.1. Pulmón neumónico

Del área neumónica, con ayuda de tijeras y pinzas estériles, se tomaron cuatro fragmentos de 1 cc que se depositaron en un tubo estéril de 16x150 mm.

1.2.2. Pulmón normal

En estos casos se tomaron, de zonas elegidas al azar, cuatro fragmentos de 1 cc. Las áreas muestreadas se seleccionaron de los lóbulos apicales y cardíaco.

1.3. Material para aislamiento viral

1.3.1. Pulmón neumónico

Se tomaron 8-10 pedazos de pulmón de la zona, macroscópicamente normal, proxima a la lesión neumónica. Cada uno de los fragmentos, de aproximadamente 1 mm^3 , se colectaron en un tubo estéril que contenía 5 ml de MEM Eagle¹³ (con sales de Earle) al que se le habían adicionado un 10% de suero de ternera, 1000 UI/ml de Penicilina³¹ y 1 mg/ml de Estreptomicina³¹.

1.3.2. Pulmón normal

De las mismas zonas de las que se extrajo la pieza para bacteriología, se tomaron entre 8 y 10 fragmentos de 1 mm^3 . Estos fragmentos se pusieron en un tubo estéril que contenía el mismo medio que en el caso anterior.

Los tubos con muestra, tanto los de bacteriología como los de aislamiento viral, se depositaron inmediatamente después de la toma en una caja de "Poliuretano" que contenía una mezcla de hielo y sal. Dentro de esta caja se transportaron y mantuvieron las muestras recolectadas en el rastro hasta su llegada al laboratorio de la Facultad.

^{13, 31}: Para este tipo de anotaciones vease página 120.

1.4. Material para serología

Para evitar equivocaciones a la hora de emparejar las muestras bacterio y virológicas con las destinadas al estudio de anticuerpos séricos, y para incidir lo menos posible en la cadena de matanza del rastro, se recolectaron unos 4 ml de la sangre acantonada en cavidades cardíacas.

Esta sangre se dejó coagular en el tubo de recolección. Tras la retracción del coágulo, y posterior centrifugación a 1500 x g en centrífuga refrigerada durante 30 minutos, el suero se pasó a un nuevo tubo estéril, de 10 x 120 mm, donde se mantuvo congelado (-70°C) hasta su análisis posterior.

2. Aislamiento bacteriano

Las biopsias pulmonares se homogeneizaron, en morteros Ten-Broeck²¹, con solución "A" de Dulbecco (1954) estéril a la relación 1:5 (p/v). Con 0.2 ml del homogenado se inocularon ratones NIH-3 por vía intraperitoneal.

A las 24 horas posinoculación, o antes si el animal moría en menos tiempo, se realizaron siembras a partir de hígado y contenido cardíaco en placas de agar sangre^(a), incubándose éstas en aerobiosis a 37°C.

A las 18 horas, y atendiendo al aspecto colonial, las diferentes bacterias aisladas se subcultivaron en nuevas placas de agar sangre y, paralelamente, en placas de agar Mc Conkey⁴.

3. Identificación bacteriana por pruebas bioquímicas

Tras el estudio comparado de lo publicado por diversos autores (Mc Allister y Carter, 1974; Cowan y Steel, 1974; Carter, 1975; Simmons y Simpson, 1977; Thigpen y cols., 1978) llegamos a la con-

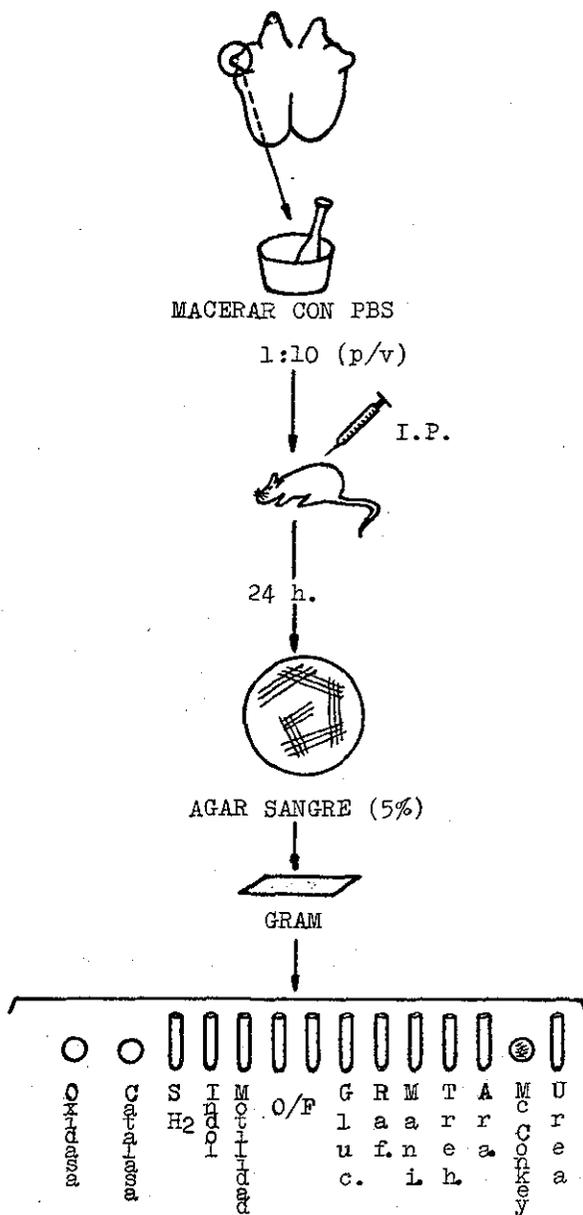
(a): Para este tipo de anotaciones vease página 120.

clusión de que el número mínimo de pruebas para la identificación, hasta especie, de Pasteurella debía incluir las siguientes: tinción de Gram, oxidasa, catalasa, oxidación/fermentación, motilidad, crecimiento en agar Mc Conkey, hemólisis en agar sangre al 3%, indol, ureasa, producción de SH₂, producción de ácido a partir de glucosa, sacarosa, manitol, rafinosa, trehalosa y arabinosa.² Dándose también importancia a características menos objetivas como morfología colonial y olor del cultivo. Todas las pruebas anteriores se realizaron según las técnicas descritas por Cowan y Steel (1974).

Los cocobacilos gramnegativos, bipolares, oxidasa y catalasa positivos, inmóviles, fermentadores de glucosa y sacarosa, sin producción de gas, se consideraron pertenecientes al género Pasteurella. Mientras que las que no cumplieron con alguna de estas características se clasificaron como "otros aislamientos".

La clasificación, hasta especie, de las bacterias del género Pasteurella se hizo teniendo en cuenta lo publicado por Carter(1975), Cowan y Steel(1974) y Thigpen y cols.(1978), resumido en el cuadro siguiente:

	<u>P.multocida</u>	<u>P.pneumotropica</u>	<u>P.ureae</u>	<u>P.haemolytica</u>
Hemólisis()	-	-	-	+
Mc Conkey	-	-	-	+
Indol	+	+	-	-
Ureasa	-	+	+	-
Acido de:				
Glucosa	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+
Manitol	+	-	+	+
Rafinosa	-	+	-	+
Arabinosa	Var	Var	-	Var
Trehalosa	Var	+	-	Var



ESQUEMA # 1: Aislamiento e identificación de Pasteurella.

En el esquema # 1 se resume todo el proceso seguido para el aislamiento e identificación bacteriana.

4. Tipificación de las Pasteurella multocida

La caracterización de las Pasteurella multocida aisladas se hizo atendiendo al tipo capsular y a la producción, o no, de exotoxina dermonecrótica.

4.1. Prueba de la hialuronidasa estafilocócica

La bacteria a investigar se sembró, por estría de agotamiento, en placas de agar sangre al 5%. A continuación, se aplicó el inóculo de Staphylococcus aureus⁽⁴⁾ perpendicular a cada uno de los bloques de estrías de la siembra de la bacteria en estudio. Y se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas.

Se consideró positiva la prueba cuando el área de decapsulación, alrededor de la estría estafilocócica, fue superior a un centímetro.

4.2. Prueba de la hialuronidasa testicular bovina

Con esta prueba se pretendía confirmar los resultados obtenidos con la prueba anterior.

En primer lugar se disolvió en solución salina tamponada (PBS), pH 7.2, hialuronidasa testicular bovina⁴³ para conseguir una concentración final de 1000 UI/ml. Esta solución se esterilizó por filtración con Millipore¹⁷ de 0.22 µm de tamaño de poro.

La Pasteurella a analizar se sembró, en agar de infusión cerebro corazón (BHI)⁵, en una estría recta única. En el centro de dicha estría se depositó un pedazo de papel de filtro estéril, de 4x8 mm, y en él se depositaron 20 µl de la solución de hialuronidasa testicular bovina.

Las placas se incubaron a 37°C y se leyeron a las 24 h.

4.3. Prueba de la Acriflavina

Para la realización de esta prueba nos basamos en lo publicado por Carter y Subronto (1973).

Las diferentes P.multocida a tipificar se cultivaron en caldo BHI y en caldo soya-tripticasa⁵. 24 horas después, los crecimientos se centrifugaron a 1000 x g durante 45 minutos.

El líquido sobrenadante se descartó, dejando una pequeña cantidad del mismo para resuspender las bacterias del botón.

A cada tubo se le añadió un volumen igual de una solución de Acriflavina³³ al 1:1000. Los tubos se agitaron hasta una perfecta mezcla de los componentes.

La lectura se realizó tras 5 y 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. La aparición de un precipitado granular se tomó como resultado positivo.

4.4. Producción de exotoxina dermonecrótica

Para la detección de las P.multocida tipo D productoras de exotoxina dermonecrótica se siguió la técnica descrita por De Jong y cols. (1980).

Se cultivaron las bacterias en caldo BHI durante 18 horas a 37°C. El líquido sobrenadante obtenido por centrifugación a 3000 x g, durante 45 minutos, se filtró con Millipore de 0.45 µm de tamaño de poro.

Los cuyes a inocular se raparon del lomo, y en cada una de las 6 áreas en las que se dividió éste se inocularon 0.1 ml del sobrenadante filtrado a probar, vía subcutanea.

A las 24, y a las 48, horas se leyó la aparición, o no,

de reacción cutánea (eritema, edema, induración o necrosis).

Nota: Las reacciones eritematosas, con induración, de más de 1 cm de diámetro se consideraron positivas. Repitiéndose las que dieron reacciones de 0.5-1 cm.

Para estas pruebas (4.1, 4.2, 4.3 y 4.4) se emplearon 5 Pasteurelas tipo, que formaban parte de la colección de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán:

- Dos tipo capsular A: 1573 y PM-A
- Dos tipo capsular B: PM-LP5 y 656
- Una D/necrotóxica: VC-Cap

5. Aislamiento del virus de la enfermedad de Aujeszky

Los tubos con los fragmentos recolectados en rastro se pusieron a 37°C en una estufa de incubación¹², con atmosfera de CO₂ al 5%, por un lapso de 21 días. La acidificación del medio se fué contrarrestando por la adición de cantidades variables de una solución acuosa de bicarbonato sódico¹⁰ al 3.5 por ciento p/v.

Los días 7, 14 y 21 se tomaron cantidades de 1 ml. del líquido sobrenadante, reponiendo el líquido extraído adicionando un volumen igual de medio de cultivo fresco. Con el mililitro extraído se inocularon conejos y células PK-15.

5.1. Inoculación a conejo

Con una jeringa de tuberculina³ se inyectaron subcutáneamente, a conejos⁽⁶⁾ de 21 días, 0,5 ml. del sobrenadante extraído. Los animales inoculados se mantuvieron en observación durante un lapso de 15 días, a la espera de la aparición de signos clíni-

cos de Aujeszky: rascado, irritabilidad y muerte.

Si bien la sintomatología de la enfermedad de Aujeszky en conejo es sumamente característica, para confirmar el aislamiento los pasos a seguir tras la muerte del animal son: 1) abrir la calota craneal y extraer el cerebro, 2) separar de éste los lóbulos frontales, 3) macerarlos en mortero Ten-Broeck, 4) inocular células PK-15 hasta la aparición de efecto citopático (ECP) y 4) examinar los sobrenadantes por microscopía electrónica (ME)¹⁸ en busca de partículas virales características.

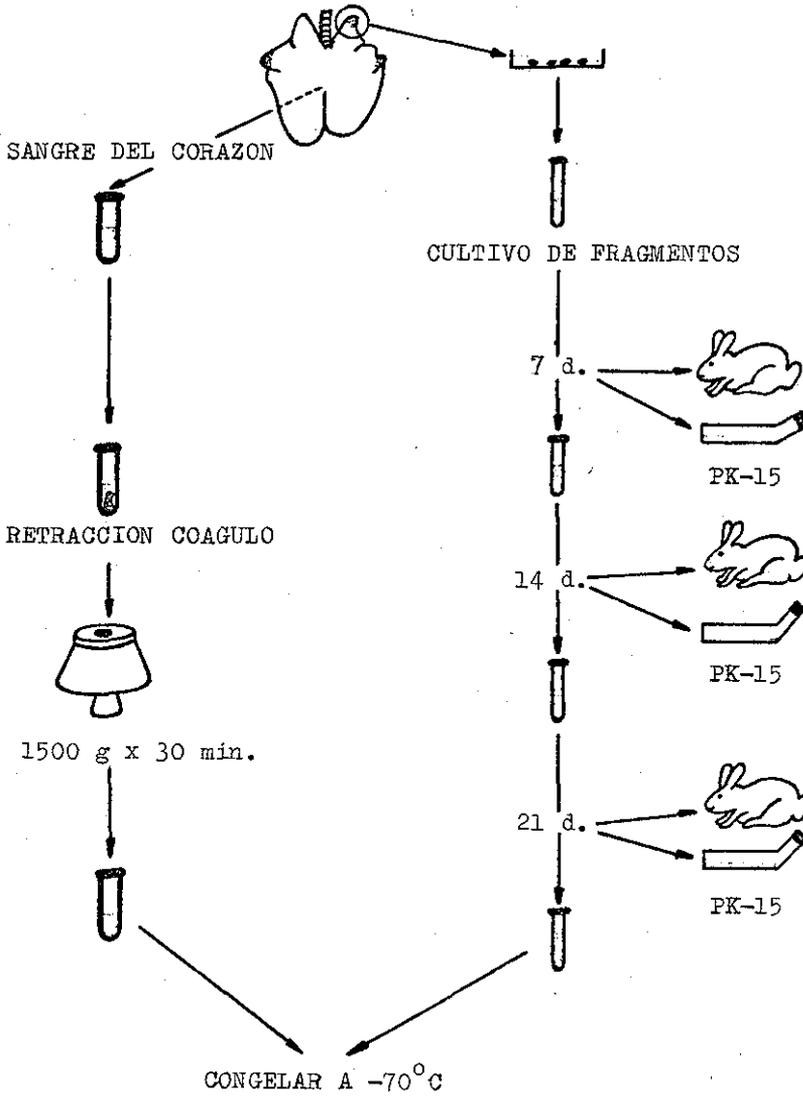
5.2. Inoculación a células PK-15

Se cultivaron células PK-15 con MEM Eagle¹⁹ (con sales de Hanks), en tubos de Leighton⁴ y suplementando el medio de cultivo con piruvato sódico¹⁰ 1 mM, 10% de suero de ternera y antibióticos (penicilina -100 UI/ml- y estreptomycin -100 µg/ml-).

A la formación del monoestrato se retiró el medio de crecimiento, lavó dos veces con solución de fosfatos (PBS), pH 7.2, y se infectaron las células con 0.1 ml del sobrenadante extraído del cultivo de fragmentos. Los tubos con las células se incubaron durante 1 hora, a 37°C, para permitir la adherencia viral a las células y la infección de éstas. Transcurrido este tiempo se añadieron, tras lavar dos veces con PBS, 1.5 ml/tubo de medio de mantenimiento (MEM Eagle con sales de Earle, piruvato sódico 1 mM, antibióticos y 2% de suero de ternera). Los tubos se incubaron a 37°C, durante un máximo de 10 días, chequeándose diariamente para observar la aparición de ECP.

Las muestras negativas, en las tres ocasiones en las que se analizó el líquido sobrenadante del cultivo de fragmentos, tanto para ECP en PK-15 y sintomatología en conejo, se consideraron negativas.

En el esquema # 2 se resumen los procesos anteriores.



ESQUEMA # 2: Muestreo para virus de la enfermedad de Aujeszky.

6. Detección de anticuerpos séricos contra el virus de Aujeszky

De las técnicas inmunológicas para la detección de anticuerpos (Ac), posibles de utilizar en nuestro laboratorio: seroneutralización y reacciones de precipitación en gel; la primera se descartó por dos causas fundamentalmente, la existencia de sueros citotóxicos y el alto grado de hemólisis que muchos sueros presentaron (característica de los sueros porcinos, acentuada seguramente por el método de muestreo).

Consecuentemente quedó como método a usar cualquiera de las variantes de precipitación en gel. Escogiéndose la contra-immunoelectroforesis (IEOP) por nuestra experiencia previa con serología de Peste Porcina Africana y por ser ésta una técnica que permite procesar, en poco tiempo, un número elevado de muestras.

6.1 Estandarización de la técnica (IEOP)

6.1.1. Preparación del antígeno

Basandonos en lo descrito por Pfeiffer y Schipper (1979) se decidió probar dos de las formas diferentes de extracción, a las que se introdujeron ciertas modificaciones. En la primera el antígeno (Ag) se obtuvo por tratamiento con Polisorbato 80⁹ y en la segunda por precipitación con sulfato de amonio.¹⁰

6.1.1.1. Extracción con Polisorbato 80 (Ag 1y2) Esquema #3

Se cultivaron células PK-15, en frascos Roux, con MEM Eagle (con sales de Hanks) + 0.07%p/v de bicarbonato sódico, 10% de suero de ternera, piruvato sódico 1 mM y antibióticos.

Cultivo celular de PK-15 de 24-48 h en botellas Roux

↓
Infección con 10 PFU/cel de VAC-1

↓
1h a 37°C

↓
Añadir 20 ml de MEM

↓
Incubar en Shaker (30 rpm)

↓
48h a 37°C

↓
Añadir Tween 80

↓
Incubar en Shaker (130 rpm)

↓
12h a 37°C

↓
Añadir sulfato de amonio

↓
Centrifugar a 2000 x g (1h)

↓
Dializar la capa cremosa con PBS

↓
24h a 4°C

↓
Dializar contra agua destilada

↓
12h a 4°C

↓
Congelar el dializado a -70°C

ESQUEMA # 3: Preparación del Ag de Aujeszky para IEOP con Tween 80

Los monoestratos confluentes se infectaron, durante 1 hora a 37°C , con 10 unidades formadoras de placa (UFP)/célula del virus VAC-1 (virus de Ajjeszky Cuautitlan #1)⁽⁴⁾.

Tras la hora de adsorción se eliminó el líquido de infección. Las células se lavaron dos veces con PBS, y se añadieron, a cada Roux, 20 ml de MEM Eagle (con sales de Earle) + 0.22% de bicarbonato sódico, piruvato sódico 1 mM i antibióticos. No adicionandose suero de ternera.

Las botellas infectadas se pusieron en un agitador orbital,²⁴ a 30 rpm, con temperatura controlada a 37°C .

Una vez generalizado el ECP se añadieron 0.2 ml de Polisorbato 80 (un detergente no iónico).

Los frascos de Roux, con Polisorbato 80, se incubaron durante 4 horas en el agitador orbital a una temperatura de 37°C y una velocidad de 130 rpm.

Transcurridas estas 4 horas, las células y el líquido sobrenadante se centrifugaron a $2000 \times g$, durante 15 minutos a 4°C .

Por cada 20 ml de sobrenadante se añadieron 8.5 gr de sulfato de amonio y, cuando la sal se disolvió completamente, se volvió a centrifugar, durante 30 minutos, a $3000 \times g$ y 4°C .

Tras esta centrifugación se descartó el líquido situado por debajo de la capa cremosa y se resuspendió ésta en 20 ml de PBS.

Para eliminar completamente el sulfato de amonio del extracto antigénico, se dializó frente a PBS, cambiando repetidamente el líquido de diálisis. La comprobación del estado de la diálisis se realizó adicionando, la misma cantidad de una solución saturada de cloruro de Bario⁴, a una porción del dializado.

El Ag así obtenido se repartió en alicuotas de 1 ml y se conservó a -70°C .

Nota: El antígeno obtenido como se describe arriba se denominó "Ag 1" y como "Ag 2" al resultante de células, no infectadas con virus, tratadas de la misma forma que la descrita.

6.1.1.2. Precipitación con sulfato de amonio (Ag 3 y 4) Esquema #4

Tras la aparición de un ECP generalizado en los Roux, con cultivo confluyente de PK-15, infectados con VAC-1 como se explicó en el apartado anterior, se llevaron a cabo dos ciclos de congelación-descongelación ($-70^{\circ}\text{C}/37^{\circ}\text{C}$).

Las células adheridas al vidrio se desprendieron con la ayuda de un raspador de silicona y se efectuó un nuevo ciclo de congelación-descongelación.

El sobrenadante se clarificó por centrifugación a 2000 x g, durante 15 minutos, a 4°C .

Al líquido recolectado se le añadieron 8.5 gr de sulfato de amonio por cada 20 ml, y se dejó precipitando toda la noche a 4°C .

El insolubilizado proteico se centrifugó a 1500 x g durante 40 minutos, a 4°C , tras lo que se descartó el sobrenadante.

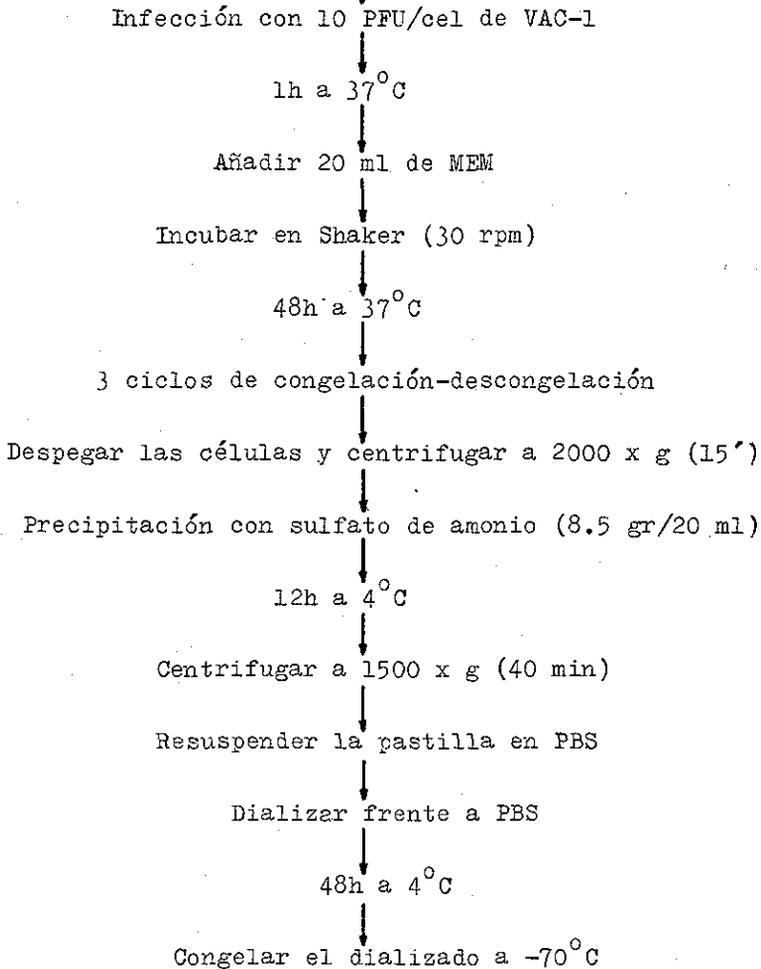
La pastilla formada se resuspendió en 20 ml de PBS. Esta suspensión se dializó y conservó como se hizo con los antígenos anteriores.

Nota: Se catalogó como "Ag 3" al resultante de células infectadas con VAC-1, tratadas por el método anterior, y como "Ag 4" al obtenido de células no infectadas.

6.1.2. Sueros control

Los sueros control, negativo y positivo, fueron cedidos por el departamento de Epizootiología del INIP de Palo Alto (México).

Cultivo celular de PK-15 de 24-48 h en botellas Roux



ESQUEMA # 4: Preparación del Ag de Aujeszky, para IEOP, por precipitación con sulfato de amonio.

6.1.3. Soluciones tampón

Para encontrar las condiciones óptimas de corrida, se probaron tres tipos diferentes de "buffers" de Veronal¹⁵ a pH 8.6:

6.1.3.1. Veronal 0.219 M (Tampón 1)

Tris	8.86 gr
Ac. dietilbarbitúrico	4.48 gr
Azida de sodio	0.13 gr
Lactato cálcico	0.106 gr
Cloruro sódico	7.07 gr
Agua destilada	1000 ml

6.1.3.2. Veronal 0.149 M (Tampón 2)

Tris	13.29 gr
Ac. dietilbarbitúrico	6.72 gr
Azida de sodio	0.195 gr
Lactato cálcico	0.159 gr
Agua destilada	1000 ml

6.1.3.3. Veronal 0.1986 M (Tampón 3)

Tris	17.72 gr
Ac. dietilbarbitúrico	8,96 gr
Azida de sodio	0.26 gr
Lactato cálcico	0.212 gr
Agua destilada	1000 ml

6.1.4. Otros factores tomados en cuenta

Además de las variables arriba descritas se analizaron otras que, por las características de la prueba, podrían in-

fluir de algún modo la resolución final:

- Dos diferentes distancias entre pocillos (5 y 10 mm).
- Dos tipos de agentes gelificantes (Agar Noble al 1% y Agarosa al 0.65%).
- Tres tiempos de corrida (30, 60 y 90 minutos).

6.2. Realización de la prueba tras la estandarización

Se disolvió, en el tampón 2, agarosa a la proporción 0.65: 100 (p/v).

Sobre placas de vidrio perfectamente desengrasadas, de 84 x 94 cm, se distribuyó el gel en cantidades de 20 ml. Tras la gelificación se practicaron con la ayuda de un sacabocados, cortes circulares de 3 mm de diámetro y a una distancia, entre bordes, de 5 mm. Los cilindros de agar del interior de la zona de corte se sacaron, creándose pocillos perfectamente regulares. De esta forma se fabricaron placas con 72 huecos que, organizados de dos en dos contenían 36 "Unidades de contraímmuno electroforesis".

El pocillo, de cada "Unidad", más próximo al polo positivo se llenó con el suero, control o problema, y el más próximo al polo negativo con el antígeno, positivo o negativo.

Las cámaras del aparato de electroforesis se llenaron con el tampón 1, conectándose las placas a aquellas por medio de hojas de papel de filtro empapadas en el mismo buffer de la cámara.

La aparición de bandas de precipitación se analizó tras una corrida de 90 minutos a 200 voltios y 25 miliamperios.

Las placas se lavaron con una solución al 0,85% de cloruro sódico, durante 24 horas, y se tiñeron con azul Coomassie²³ según la técnica descrita por Chrambach y cols. (1967), tras la cual se hizo una última lectura.

7. Estudio de patogenicidad de las Pasteurelas aisladas

7.1. Material

- 192 ratones blancos, cepa NIH-3, obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias de Palo Alto (México), con un peso entre 10 y 24 gramos.

- 3 Pasteurelas controles: PM-LP5, 656 y VC-Cap.
- 44 Pasteurelas aisladas en rastro.
- Balanza digital.*
- Caldo de cerebro corazón (BHI)(Difco).
- Caldo de soya-tripticosa (Difco).
- Centrífuga refrigerada, Damon/IEC Division, modelo DPR 6000.
- Espectrofotómetro "Spectronic 88" de Bausch & Lomb.
- Cloruro de Benzalconio al 1:1000.
- Filtro Millipore de 0.22 μ m de tamaño de poro.
- Formaldehído al 10% en sol. salina tamponada (PBS).
- Jeringas de tuberculina.
- Material de necropsia.
- Matrazes nefelométricos con 50 ml de caldo BHI.
- Micropipetas Eppendorf de 20 μ l.
- Morteros Ten-Broeck.
- Placas de agar sangre (al 3%).

7.2. Método

De forma aleatoria se formaron 48 grupos, de 4 ratones, que se acomodaron en jaulas independientes con agua y comida "ad libitum".

Las diferentes bacterias se cultivaron a 37°C, durante toda la noche, en caldo soya tripticosa. Los crecimientos se centrifugaron a 3000 x g, durante 30 minutos, y el precipita-

do se resuspendió en NaCl^o (al 0.85%) tras lavar dos veces con PBS. La suspensión se ajustó a una D.O.₄₂₀ de).65.

Cada uno de los cuatro ratones de cada grupo fueron inoculados, via intraperitoneal, con 0.1 ml de la suspensión bacteriana "ajustada".

Tras la infección los animales se tuvieron bajo observación continua para poder anotar el tiempo exacto en que sobrevino la muerte de cada uno de los ratones.

Los animales, inmediatamente despues de su muerte, fueron necropsiados y, con muestras tomadas a partir de hígado y corazón se sembraron placas de agar sangre. Los ratones que no murieron como consecuencia directa de la infección, fueron sacrificados a los 5 días de la inoculación y se procesaron de la misma forma que los demás.

8. Patrón de remoción de Pasteurella multocida

8.1. Material

- Bacteria: para éste, y estudios posteriores se eligió la P. multocida VC-Cap por ser la única tipo D de referencia con la que contábamos, y por haber mostrado una patogenicidad media en el experimento anterior.

- Aerosolizador: el aparato, cedido amablemente por el departamento de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la U.N.A.M., estaba constituido por una cámara de acrílico, de 47 x 34.5 x 21.5 cm, con cinco perforaciones circulares, cuatro en las caras laterales y una en la cara superior. En dos de las perforaciones laterales se acoplaron sendos nebulizadores³ y a una de las otras dos se conecto un tubo de goma por el que el aire del interior era extraído por la acción de una bomba de vacío⁴. Entre esta bomba, ajustada a una presión

negativa de 37 cm de Hg, y la cámara se puso un matraz con for_umol al 10% como medida de seguridad.

El cuarto orificio lateral se cerró con tapón de hule.

Los nebulizadores, conectados entre sí por mangueras de hule y una pieza de vidrio en forma de "Y", fueron conectados a una bombaⁿ ajustada a una presión positiva de 0.49 Kg/cm². Ba_ujo estas condiciones se lograba un aerosol con tamaño de partí_ucula dentro de un rangp próximo a 1 μ m (Martinez, 1984).

La abertura superior, de 21 cm de diámetro, se utilizaba para introducir y sacar las jaulas (de malla metálica) en las que se ponian los ratones a aerosolizar. Esta abertura se ce_urraba heméticamente durante el periodo de aerosolización. Este aparato fue usado en este y todos los experimentos siguientes.

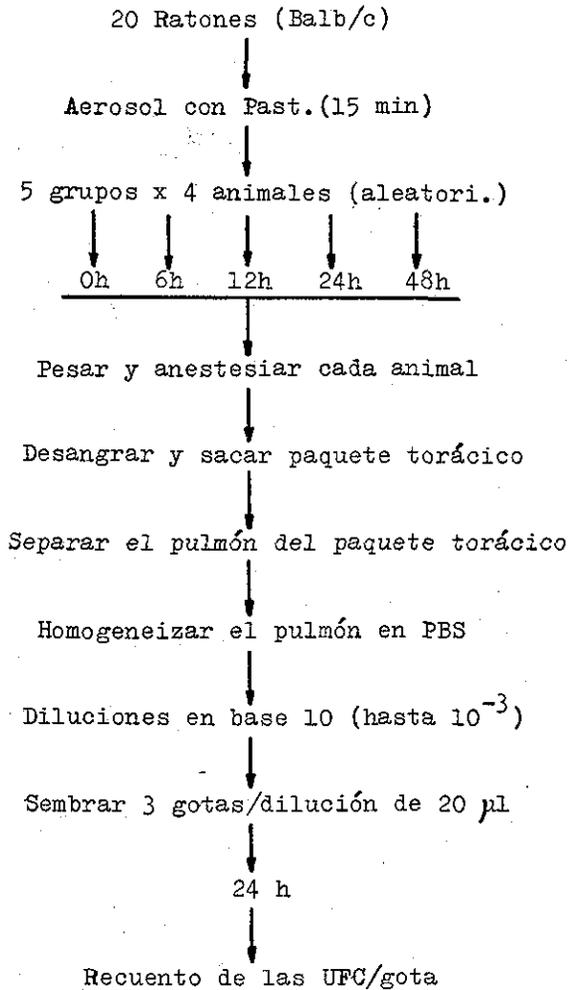
- Ratones: Se emplearon 20 ratones Balb/c, procedentes del bioterio del Centro Médico Nacional, distribuidos al azar en cinco grupos de cuatro animales cada uno.

8.2. Metodo (Esquema # 5)

Con un asa metálica se tomaron cinco colonias de la P. multocida VC-Cap, previamente crecida en agar sangre, con las que se inoculó un matraz nefelométrico que contenía 50ml de caldo BHI. Este se cultivó en agitación a 37°C y 120 rpm, has_u fase estacionaria, que se comprobó por seguimiento del cultivo con el espectrofotómetro.

Alcanzada la fase estacionaria, el contenido del matraz se centrifugó durante 45 minutos a 3500 x g -4°C- y el botón bacteriano obtenido fue lavado dos veces con PBS, pH 7.2; mis_umo en el que, finalmente, se resuspendieron para obtener una concentración final de bacterias de, aproximadamente, 10⁸ uni_udades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

De esta suspensión bacteriana lavada y ajustada (SBLA) se



tomaron los 10 ml con los que, y repartidos equitativamente entre los dos nebulizadores de la cámara, simultáneamente se aerosolizaron los 20 ratones del experimento.

Tras 15 minutos de nebulización los 20 animales se sacaron de la cámara y, con los números aleatorios generados por una calculadora Casio FX-602 P, se asignaron, en bloques de 4, a 5 grupos de sacrificio (0, 6, 12, 24 y 48 horas contadas a partir del final del tiempo de aerosolización).

A la hora correspondiente, cada uno de los cuatro animales fue anestesiado con 7.87 mgr/gr de peso de Pentobarbital, vía intraperitoneal. El peso total del ratón (PR) se midió con una balanza digital, con aproximación a centésima de gramo.

La piel de los ratones, trabajados a partir de este momento en una campana de flujo laminar horizontal, se desinfectó por inmersión en la solución de cloruro de benzalconio[®], durante 10 segundos, de todo el animal con excepción de la región cefálica para evitar aspiraciones del desinfectante.

En una mesa de disección se abrió la cavidad abdominal y, por sección de la arteria renal izquierda, el ratón se exanguinó. Al completarse el desangrado se abrió la caja torácica y de ella se extrajo el paquete cadio-pulmonar, vigilando no seccionar el esófago.

Del paquete extraído se eliminaron el corazón, los grandes vasos, la traquea y la porción extrapulmonar de los bronquios; colocando el resto en un mortero Tem-Broeck, estéril, que contenía 5 ml de PBS. Los pulmones se homogeneizaron con 15 golpes de mortero. Los pulmones se pesaron antes de la homogeneización.

Los homogenados se diluyeron, en base 10, hasta la dilución 10^{-3} . De cada una de las cuatro diluciones se sembraron 3 gotas, 20 μ l/gota, en placas de agar sangre que se incubaron

durante 18 horas a 37°C. Efectuándose el conteo del número de unidades formadoras de colonia por gota (UFC/gota) al cabo de dicho periodo de incubación.

El cálculo del número de bacterias por pulmón (BP) se efectuó aplicando la fórmula siguiente:

$$\left(\frac{\sum \sqrt{n} \times FD}{b} \right)^2 \times \left(\frac{5}{0.02} \right) = BP$$

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

n= número de UFC/gota.

FD= Factor de dilución.

5= ml del Tem-Broeck.

0.02= ml/gota.

$\sqrt{\quad}$ = factor de corrección -Poisson-(Little y Hills,1979)

Con las BP-obtenidas de la forma anterior, se calcularon las bacterias por gramo de pulmón (BGP) y las bacterias por gramo de ratón (BGR), al dividir las BP por el peso del pulmón (en gramos) y por el peso del ratón (en gramos), respectivamente. Todos estos parámetros se transformaron a logaritmos, en base 10. (LBP, LBGP y LBGR).

Con los datos precedentes pudo entonces calcularse los índices de retención (RET) y de remoción (REM), aplicando las fórmulas siguientes:

$$(a) \frac{(C) \text{Ratón "n" T horas}}{(C)\bar{x} \text{ de 0 horas}} \times 100 = \text{Retención (C) de R-"n" a T h.}$$

$$(b) \text{ REM (C) de R-"n" a T h.} = 100 - \text{RET (C) de R-"n" a T h.}$$

donde: "n"= número del ratón dentro del grupo.

T= hora de sacrificio.

C= unidades utilizadas para el cálculo (BP, LBP, BGP, LBGP, BGR y LBGR).

9. Efecto del sobrenadante de un cultivo de P.multocida VC-Cap sobre la remoción pulmonar de dicha bacteria

9.1. Material

-Ratones: 18 ratones Balb/c del bioterio del Centro Médico Nacional.

-Bacteria: P.multocida VC-Cap.

-Aerosolizador: el mismo que en el experimento previo.

-Material vario ya citado anteriormente.

9.2. Método (Esquema # 6)

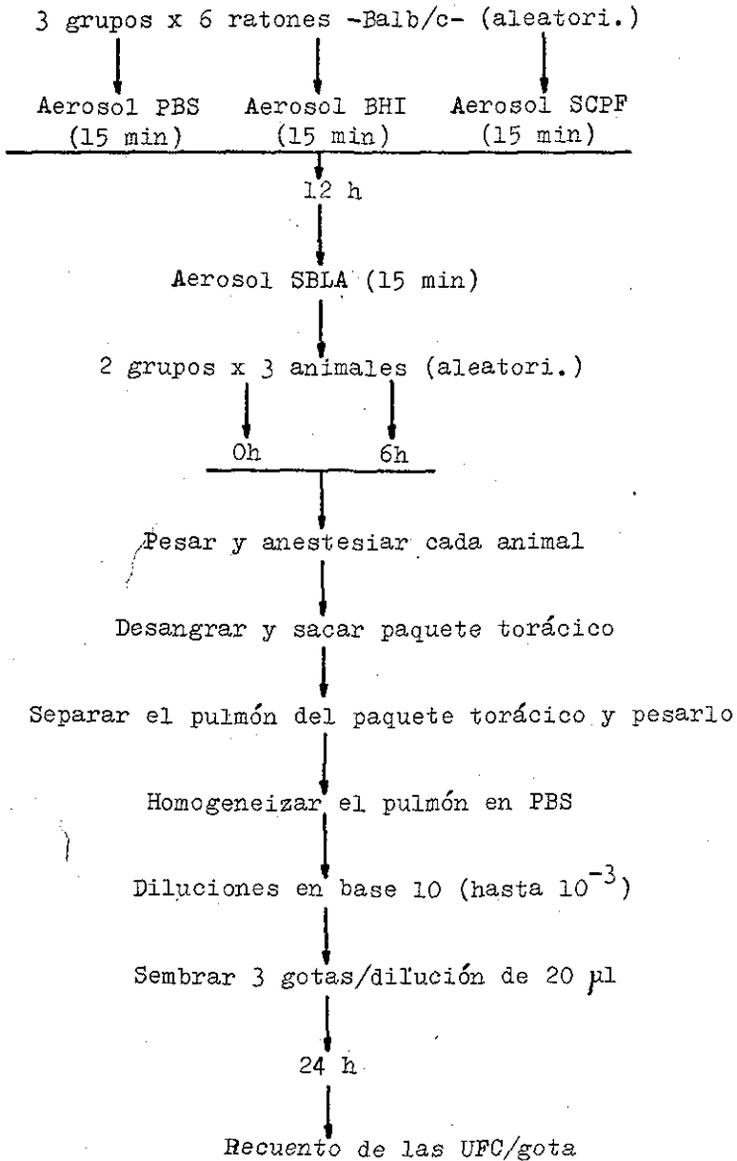
Tras el crecimiento, hasta fase estacionaria, de la P.multocida VC-Cap en caldo BHI y centrifugación del cultivo a 3500 x g, durante 45 minutos y 4°C, el botón bacteriano y el líquido sobrenadante se procesaron separadamente.

El líquido sobrenadante del cultivo de Pasteurella se filtró (SCPF) por filtro Millipore de 0.22 um de tamaño de poro. Por otro lado, el botón bacteriano, tras dos lavados con PBS, se resuspendió en el mismo PBS para dejar una SBLA con, aproximadamente, 10^8 UFC/ml.

En forma aleatoria se crearon tres grupos de ratones que, en forma separada, fueron sometidos a tres tipos de aerosol: (1) con PBS -control 1-, (2) con caldo BHI -control 2- y (3) con el SCPF. Cada grupo se formó con seis animales, y las aerosolizaciones se realizaron con 10 ml de líquido y 15 minutos de duración.

12 horas después de la antedicha aerosolización los diferentes grupos se nebulizaron con la SBLA.

Tras el aerosol bacteriano se subdividieron, aleatoriamente, cada uno de los grupos en dos subgrupos de 3 animales. Los



ESQUEMA # 6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ratones del primer subgrupo se sacrificaron inmediatamente después del último aerosol y los del segundo subgrupo 6 horas más tarde.

El sacrificio, procesamiento de las muestras y el cálculo de parámetros se realizaron como se expuso en el experimento precedente.

10. Remoción pulmonar de P.multocida a diferentes tiempos post-infección con el virus de la enfermedad de Aujeszky

10.1. Material

-Ratones: se utilizaron 56 ratones CFW, obtenidos del biotério del laboratorio de Sanidad Animal de Santa Ana Tecamac (Edo. de México), con peso corporal, al inicio del experimento, entre 10 y 15 gramos.

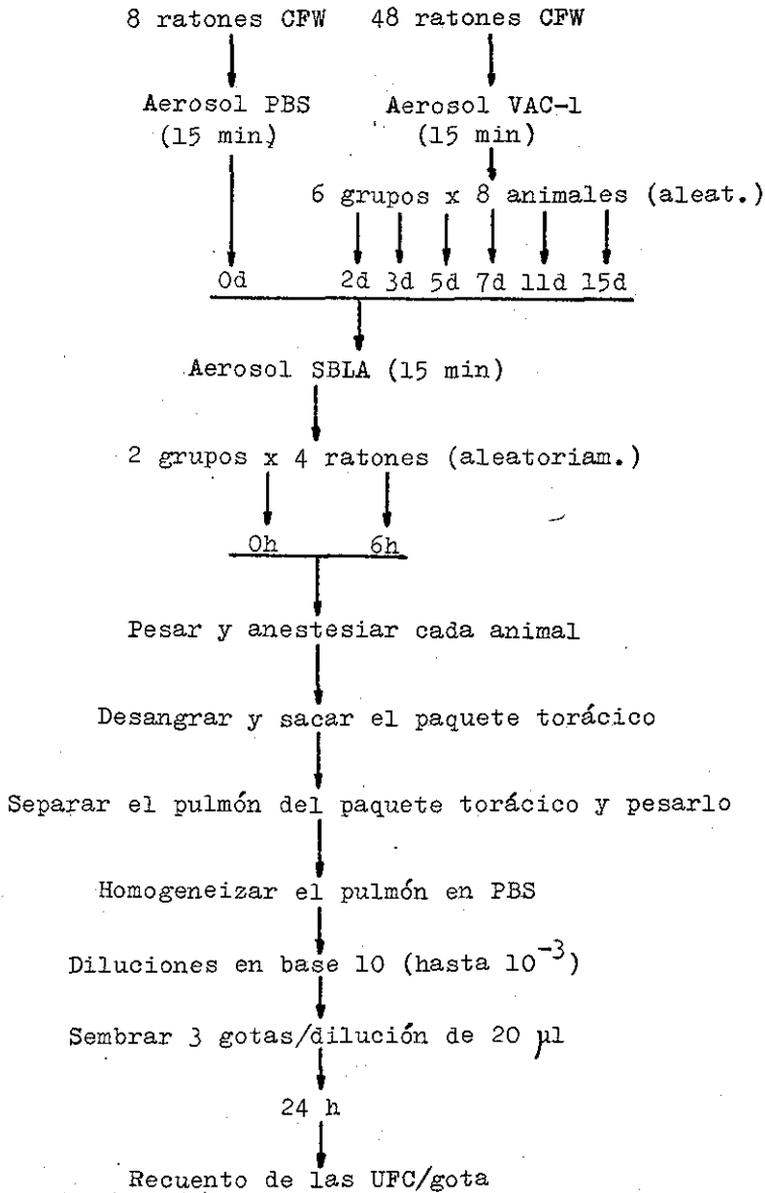
-Virus: cepa de Aujeszky VAC-1. Para la infección se empleó una suspensión vírica (en PBS) con dosis subletal, vía aérea, para ratón (aproximadamente 10^5 UFP/ml).

-El aerosolizador y el resto del material, incluida la bacteria ya se describió anteriormente. La SBLA usada en este experimento se procuró ajustar a, aproximadamente, 10^9 UFC/ml.

10.2. Método (Esquema # 7)

El día 0, tomado de forma arbitraria como el inicio del experimento, 8 de los ratones fueron sometidos a un aerosol con 10 ml de PBS (control 1) y los 48 animales restantes al aerosol con la suspensión de VAC-1.

Inmediatamente después de la aerosolización con virus, los 48 ratones fueron divididos, en forma aleatoria, en 6 lotes de 8 animales cada uno; quedando constituidos de esta for



ma los grupos 2, 3, 5, 7, 11 y 15 días.

Los grupos creados se aerosolizaron, al día correspondiente, con 10 ml de la SBLA durante 15 minutos.

Nota: El día de aerosolización con la SBLA viene expresado por el día que da nombre al grupo, contado a partir de la aerosolización con virus. El grupo control 1 (C1) se sometió al aerosol con la SBLA tres días después de la nebulización con PBS.

Completada la fase de aerosolización con SBLA, a la que se sometieron los 8 animales del grupo conjuntamente, se crearon aleatoriamente dos subgrupos de 4 ratones. El primer subgrupo fue sacrificado de inmediato (0 horas) y el segundo 6 horas después (6 horas).

Nota: Cada animal, por lo tanto, quedó catalogado con tres bloques de cifras: (1) un dígito -del 1 al 4- a continuación de "R-", que representa el orden, dentro del grupo, que ocupó a la hora del sacrificio; (2) una "D" antes de un número -del 2 al 15- con el que se indicaba el día de la aerosolización con la SBLA; (3) una "h" precedida de 0 ó 6 que representaba el lapso de tiempo, en horas, transcurrido entre el aerosol bacteriano y el sacrificio.

El sacrificio, procesamiento de las muestras y el cálculo de parámetros se realizó como en los experimentos precedentes.

11. Mortalidad en ratones aerosolizados con virus de la enfermedad de Aujeszky y P.multocida

11.1. Material

-Ratones: 24 ratones NIH-3 del bioterio del INIP de Palo Alto, con peso corporal entre 9 y 14 gramos al inicio del experimento.

-Virus: suspensión, con dosis subletales para ratón por vía aérea, de VAC-1 en PBS.

-Bacteria: P.multocida VC-Cap en PBS (SBLA).

-Aerosolizador: el mismo que en experimentos anteriores.

-Material para necropsia.

-Formaldehido²⁰ al 10% en PBS.

11.2. Método

En forma aleatoria se crearon seis grupos de 4 ratones. Uno de estos grupos se enfrentó sólo a VAC-1 (CV), otro a SBLA exclusivamente (CB) y los cuatro restantes a un aerosol de VAC-1, el día 0, y con un aerosol de SBLA a los 2, 3, 7 u 11 días (grupos D2, D3, D7 y D11 respectivamente).

Cada grupo de cuatro animales se puso en una jaula independiente con agua y comida "ad libitum".

La variable medida en el presente experimento fue la hora, contada a partir del final de la última nebulización a la que se sometió el grupo, en la que sobrevino la muerte.

Los ratones muertos, o los sacrificados 15 días después del último aerosol efectuado sobre el grupo, fueron necropsiados y sus pulmones fijados por perfusión aérea de formaldehido al 10%. Estos pulmones, junto con los del experimento siguiente, fueron procesados para el estudio anatomopatológico.

12. Estudio histopatológico de los pulmones de ratón tras la aerosolización con VAC-1 y/o P.multocida VC-Cap

12.1. Material

-Ratones: 24 ratones NIH-3 del bioterio del I.N.I.P. de Pa lo Alto, entre 7 y 12 gramos de peso al inicio del experimento. En el presente estudio se incluyeron, como se dijo anteriormente, los ratones del experimento anterior.

-Virus: Cepa VAC-1 del virus de Aujeszky, diluido en PBS, a dosis subletales, para ratón, por vía aérea.

-Bacteria: Suspensión bacteriana lavada de P.multocida VC-Cap, a las mismas concentraciones que en los grupos similares del experimento relatado en el apartado 10.

-Aerosolizador: el utilizado anteriormente.

-Material para necropsias.

-Formaldehído al 10% en PBS.

12.2. Método

Los 24 ratones se dividieron aleatoriamente para crear 6 grupos de cuatro animales cada uno. Dos de esos animales fueron sacrificados a las 0 horas y los dos restantes a las 48 horas, teniendo presente que el tiempo está referido al último aerosol al que los animales del grupo fueron sometidos.

El primero de los grupos (CV) fue aerosolizado únicamente con virus, el segundo (CP) sólo con bacteria y los cuatro restantes (D-2, D-3, D-7 y D-11) con ambos tipos de aerosol. En estos últimos, la designación está referida al intervalo -en días- entre el aerosol de virus y el de bacterias.

Los pulmones se fijaron por perfusión aérea con formaldehído al 10%, se incluyeron en parafina. Se realizaron cortes longitudinales de 1 μ m y éstos fueron teñidos con Hematoxilina-

Eosina.

Para la lectura se estableció un sistema de puntuación -de 0 a 2- para catalogar el grado de pleuritis, alveolitis, perivascularitis, edema y hemorragia.

13. Análisis estadístico

Las diferentes pruebas estadísticas empleadas en el presente trabajo fueron:

13.1. Prueba de Ji-cuadrada

Cuando los resultados supusieron frecuencias de un total, se realizaron pruebas de "independencia" por Ji-cuadrada.

Las hipótesis previas enunciadas fueron del tipo:

H_0 : Los factores A y B son independientes.

H_1 : Los factores analizados son dependientes.

Se rechazó la hipótesis nula (H_0) cuando la "p" calculada fue menor de 0.05.

Para esta prueba nos basamos en lo publicado por Hurley y cols. (1982), Little y Hills (1979) y Kreyszig (1974).

13.2. Análisis de varianza

El análisis de varianza (ANOVA) se aplicó sobre aquellos resultados que venían expresados en unidades de una escala continua.

Las hipótesis previas planteadas fueron del tipo:

H_0 : El factor A no tiene efecto sobre la unidad C de medición.

H_1 : El factor A si tiene efecto sobre C.

Se rechazó H_0 cuando la "p" calculada fue menor de 0.05.

Este análisis se realizó atendiendo a lo publicado por Hurley y cols. (1982), Pimentel (1978), Little y Hills (1979) y Daniel (1980).

13.3. Prueba de Duncan

Para detectar diferencias entre las medias de los diferentes grupos (tratamientos) de un experimento, se llevó a cabo una prueba de Duncan con $\alpha=0.05$.

La diferencia significativa entre grupos la dió la comparación del resultado de la sustracción de las medias de dichos grupos con un cierto valor calculado.

Los grupos que no mostraron diferencia significativa entre sus medias se unieron con barras.

Para esta prueba seguimos las indicaciones publicadas por Pimentel (1978) y Little y Hills (1979).

13.4. Análisis de varianza de Kruskal-Wallis (K-W)

Se realizó cuando las varianzas de los diferentes grupos no fueron homogéneas (analizado ésto con la prueba de Bartlett descrita por Little y Hills, 1979), y para su realización utilizamos el método descrito por Daniel (1980).

13.5. Análisis de covarianza

Se empleó en el experimento para determinar la curva patrón de remoción de P.multocida VC-Cap. En el análisis de resultados se tomó el peso del ratón como covariable.

Para su empleo nos fundamos en lo descrito por Pimentel (1978).

13.6. Prueba de Tukey

Según lo publicado por Pimentel (1978), para ver diferencias entre las medias ajustadas tras el análisis de covarianza.

Esta prueba se realizó con $\alpha=0.05$ y $\alpha=0.01$. Indicándose las diferencias entre grupos como en la prueba de Duncan.

13.7: Análisis de regresión

Se empleó para determinar la relación lineal entre dos características: causa (x, eje de abcisas) y efecto (y, eje de ordenadas).

Para su desarrollo se atendió a lo publicado por Hurley y cols. (1981).

La significancia del coeficiente de correlación (r) se estudió por medio de una prueba "t" como la describe Pimentel (1978):

LISTA DE FABRICANTES (MATERIAL Y REACTIVOS)

1. Anestosal, Norden de México.
2. BBL, Beckton Dickinson & Co. Cockeysville, Maryland (U.S.A.).
3. Beckton Dickinson de México. México D.F.
4. Bellco Glass, Inc. Vineland, New Jersey (U.S.A.).
5. Bioxón de México. Oaxaca, Oaxaca (México).
6. Corning Glass Works. New York (U.S.A.).
7. Damon/IEC División, modelo DPR 6000.
8. Devilbiss Co, modelo 645. Somerset, P.A. (U.S.A.).
9. Difco laboratories. Detroit, Michigan (U.S.A.).
10. E. Merck. Darmstadt (R.F. de Alemania).
11. Equipos Médicos Quirúrgicos. México.
12. Forma Scientific, modelo 3151. Marieta, Ohio (U.S.A.).
13. Grand Island Biological Company. Grand Island, New York (U.S.A.).
14. J.T. Baker de México.
15. LKB. Stockholm (Sweden).
16. Marine Colloids. Rockland, Maine (U.S.A.).
17. Mettler, modelo PC 2000.
18. Microscopio electrónico de transmisión, marca Jeol.
19. Millipore Corporation. Bedford, Massachusetts (U.S.A.).
20. Productos Químicos Monterrey. Monterrey, Nuevo León (México).
21. Química Hoechst de México. México D.F.
22. Sargent-Welch Scientific Company. Skokie, Illinois (U.S.A.).
23. Sigma Chemical Company. Saint Louis, Missouri (U.S.A.).
24. New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison, N.J. (U.S.A.).
- (a) Agar BHI + 5% de sangre desfibrinada de ternera.
- (b) Neozelandes Blanco. Del bioterio del INIP de Palo Alto (México)
- (c) Suministrada por el Dr. Carlos Pijoan.
- (d) Aislado de campo, de un caso clínico en cerdos, y tras 7 pa
ses por PK-15.

ABREVIATURAS EMPLEADAS EN CUADROS Y FIGURAS (RESULTADOS Y APEN-
DICES)

- Ag 1: Antígeno producido por tratamiento, de células infectadas con el virus de la enfermedad de Aujeszky, con Poli sorbato 80.
- Ag 2: Antígeno producido por el mismo procedimiento que el Ag 1 pero con células no infectadas.
- Ag 3: Antígeno producido tras fragmentar células PK-15, infectadas con virus de Aujeszky, y posterior precipitación con sulfato de amonio.
- Ag 4: Antígeno producido por el mismo procedimiento que el Ag 3 pero con células no infectadas.
- ANOVA: Análisis de varianza.
- BHI: Infusión de cerebro-corazón.
- BGP: Bacterias (UFC) por gramo de pulmón.
- BGR: Bacterias (UFC) por gramo de ratón.
- BP: Bacterias (UFC) por pulmón.
- C.M.: Cuadrado medio.
- CMER: Cuadrado medio del error.
- CP: Control de Pasteurella (inoculado sólo con Pasteurella).
- CV: Control de virus (inoculado sólo con el virus de Aujeszky).
- D--: Número de días entre la infección de Aujeszky y la infección con P.multocida VC-Cap.
- D.E.: Desviación estandar.
- DPP : Diferencia entre la relación peso de pulmón/peso de ratón, observada y esperada, en tantos por mil.
- Esp: Valor esperado.
- F: Valor calculado de la F de Fisher.
- G.L.: Grados de libertad.
- H: Lapso de tiempo, en horas, entre la aerosolización con Pasteurella multocida VC-Cap y la muerte del animal por sacrificio.
- IEOP: Contraimmunoelectroforesis.
- LBGP: Transformación logarítmica, base 10, de BGP.
- LBGR: Transformación logarítmica, base 10, de BGR.
- LBP: Transformación logarítmica, base 10, de BP.

Ob: Valor observado.

PBS: Solución salina tamponada, pH 7.2.

P. Neu: Pulmón neumónico.

P.Nor: Pulmón normal (aspecto macroscópico).

PP: Peso del pulmón.

PPE: Peso del pulmón esperado.

PPO: Peso del pulmón observado.

PR: Peso del ratón.

REM ---: Índice de remoción calculado con los datos de las UFC expresados en las unidades "----".

REMT: Índice de remoción transformado por arco tangente.

RET ---: Índice de retención calculado con los datos de las UFC expresados en las unidades "----".

RETT: Índice de retención transformado por arco tangente.

SBLA: Suspensión bacteriana (P.multocida VC-Cap) lavada y ajustada.

S.C.: Suma de cuadrados.

SCPF: Sobrenadante de un cultivo de P.multocida VC-Cap, filtrado.

S(+): Serología positiva al virus de Aujeszky, por IEOP.

S(-): Serología negativa al virus de Aujeszky, por IEOP.

Tampón 1: Tampón de Veronal al 0.219 Molar.

Tampón 2: Tampón de Veronal al 0.149 Molar.

Tampón 3: Tampón de Veronal al 0.1986 Molar.

Tin.: Lectura tras la tinción con azul de Coomassie.

UFC: Unidades formadoras de colonia.

UFP: Unidades formadoras de placa.

VAC-1: Virus de Aujeszky Cuautitlan # 1.

\bar{x} : Media aritmética.

IV RESULTADOS

1. Estandarización de la contraelectroforesis (IEOP)

De las pruebas realizadas para encontrar las condiciones óptimas para la IEOP se vió que las bandas de precipitación obtenidas con los geles de agar Noble(Difco) fueron, en todos los casos, menos intensas que con los geles fabricados con agarosa.

La combinación de tampones que arrojó mejores resultados fue la del tampón 1 en la cámara y el tampón 2 en el gel (cuadro # 1).

La distancia óptima entre bordes de pocillo resultó ser la de 5 mm, y el tiempo de corrida mínimo el de 60 minutos.

Los dos antígenos fabricados dieron bandas muy semejantes (cuadro # 1), pero en la titulación de éstos el antígeno # 1 -extraído con Polisorbato 80- fue superior al antígeno # 3 -extraído por precipitación con sulfato de amonio-. En el cuadro # 2 se puede apreciar que el antígeno # 1 detectó anticuerpos hasta la dilución 1/4 del suero control positivo utilizado, mientras que el antígeno # 2 sólo detectó anticuerpos hasta la dilución 1/2 del mismo suero.

Los antígenos negativos (Ag 2 y 4) no dieron bandas inespecíficas bajo las condiciones óptimas de corrida (cuadro # 1), lo mismo ocurrió con los antígenos positivos enfrentados al suero negativo de referencia (cuadro # 2).

* : Para cualquier abreviatura vease la página 121.

TAMPON (CAMARA)			1				2				3			
(GEL)	Dis.	Ag ^{T°}	30'	60'	90'	Tin	30'	60'	90'	Tin	30'	60'	90'	Tin
1	5mm	1	- ^a	-	-	+ ^b	-	-	-	-	-	-	-	+
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10mm	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	5mm	1	+	++	+++	+++	-	-	+	+	-	-	+	+
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	+	+	++	++	-	-	+	++	-	-	-	+
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10mm	1	-	+	++	+++	-	-	-	+	-	-	-	+
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	+	++	++	+	-	-	+	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	5mm	1	-	+	++	++	-	-	-	+	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	++	++	-	-	-	+	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	10mm	1	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CUADRO # 1: Efecto sobre el resultado de la IEOP del tampón, anti-
geno (Ag), tiempo de corrida (T°) y distancia (Dis.)

a= Reacción negativa.

b= Reacción positiva.

DILUCION (SUERO)		1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	(-) ^d
(Ag)	Ag ^e						
1/1	1	+ ^a	+	+/- ^c	- ^b	-	-
	3	+	+	-	-	-	-
1/2	1	+	+	-	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-
1/4	1	+	+	+	-	-	-
	3	+	-	-	-	-	-
1/8	1	+	+	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
1/16	1	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-

CUADRO # 2: Titulación de los antígenos obtenidos (1 y 3) bajo condiciones óptimas.

a= Reacción positiva.
b= Reacción negativa.
c= Reacción débil.
d= Suero negativo.
e= Antígeno a titular.

2. Estudio en rastro

De los 106 pulmones muestreados 72 (67.93%) fueron de tipo neumónico y 34 (32.07%) de tipo "normal", sin lesiones macroscópicas visibles (cuadros 3 y 5).

De los 72 pulmones neumonicos hubo 37 (51.39%) de los que se aisló algún tipo de Pasteurella, 18 (25%) de los que se aisló alguna otra bacteria y 17 (23.61%) de los que no se aisló ninguna bacteria (cuadro # 3).

De los pulmones normales en 7 casos (20.59%) se aislaron Pasteurelas, en 3 (8.82%) otras bacterias y en los 24 restantes (70.59%) no se logró ningún tipo de aislamiento bacteriano (cuadro # 3).

En 47 (65.28%) de los 72 pulmones neumónicos la serología contra el virus de la enfermedad de Aujeszky fue positiva, y negativa en los 25 (34.72%) restantes. De los 34 pulmones sin lesión macroscópica, 11 (32.35%) se acompañaron de serología positiva mientras que 23 (67.65%) lo hicieron con serología negativa (cuadro # 5).

Hubo 33 aislamientos de Pasteurella (56.90%) en los 58 casos con serología positiva, 14 (24.14%) "otros aislamientos" y 11 con aislamiento negativo (18.96%) del mismo grupo de casos. De los 48 pulmones que se acompañaron de serología negativa, de 11 (22.92%) se aisló Pasteurella, de 7 (14.58%) se aislaron otros tipos de bacterias y, de los 30 restantes (62.5%) no se logró aislar agente bacteriano alguno (cuadro # 4).

La relación de aislamientos con los factores "tipo de pulmón y serología" combinados, arrojó los resultados mostrados en el cuadro # 6 y figura # 1. En ellos se aprecia que el número máximo de aislamientos de Pasteurella se produjo al combinarse pulmón neumónico con suero positivo, y el mínimo con

la combinación pulmón normal-suero negativo. Hechos similares ocurrieron en referencia a "otros aislamientos". En cuanto a aislamientos negativos, parece que la relación depende más de la serología que del tipo de pulmón, puesto que las cifras más altas se dieron cuando la serología fue negativa y la más bajas cuando la serología fue positiva.

6 (13.64%) de las Pasteurelas aisladas resultaron ser Pasteurella haemolytica y las 38 restantes (86.36%) P. multocida. Estas últimas, por la tipificación capsular, se subdividieron en tres bloques: 7 (18.42%) fueron tipo capsular A, 26 (68.42%) tipo capsular D y las 5 restantes (13.16%) quedaron sin poderse clasificar (cuadro # 7).

El estudio para detectar P. multocida tipo D productoras de necrotoxina estableció que 7 (26.92%) de las 26 aisladas fueron positivas a la prueba dermatocutánea, y que las otras 19 (73.08%) fueron negativas (cuadro # 7).

El aislamiento de virus fue negativo, por las técnicas usadas, en todos los casos.

El análisis estadístico de los resultados se hizo por medio de diferentes pruebas de independencia, con Ji-cuadrada, en las que las hipótesis nulas (H_0) enunciadas fueron del tipo: "los factores A y B son independientes". Los valores de Ji-cuadrada, calculados, superiores al valor de tablas con un $\alpha=0.05$ hicieron rechazar la hipótesis nula y concluyéndose, por lo tanto, que los factores A y B no son independientes.

Este tipo de conclusiones, con rechazo de la hipótesis nula, se obtuvieron al analizarse: (a) tipo de pulmón frente a tipo de aislamiento ($p=0.00002$; cuadro # 3), (b) serología frente a tipo de aislamiento ($p=0.00002$; cuadro # 4), (c) serología

frente a tipo de pulmón ($p=0.0015$; cuadro # 5) y (d) serología, más tipo de pulmón, frente a tipo de aislamiento ($p=0.000009$; cuadro # 6).

En el apéndice A se muestran los valores esperados de cada una de las tablas de contingencia aquí mencionadas.

Nota: El valor de "p" indica el tamaño de la cola, cortada por el valor de la Ji-cuadrada calculada, en la distribución Ji-cuadrada con el número adecuado de grados de libertad. Los resultados de "p" inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos (rechazo de la hipótesis nula).

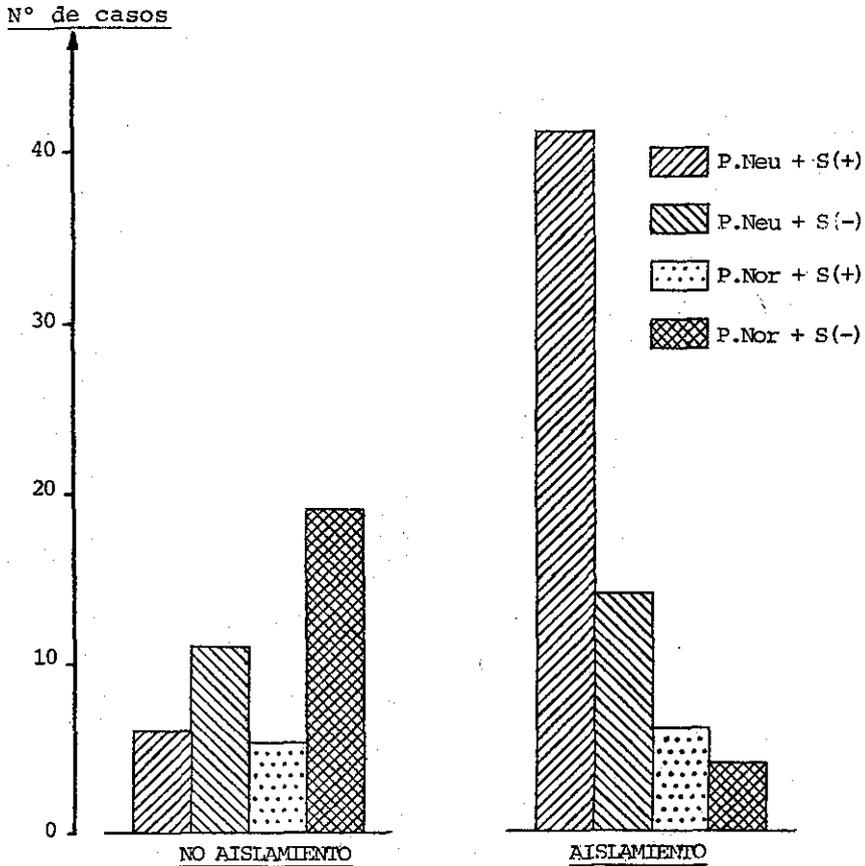


FIGURA # 1: Histograma del número de casos, estudiados en rastro (106 en total), con aislamiento bacteriano negativo -barras de la izquierda- o positivo -barras de la derecha- y su relación con tipo de pulmón+serología al virus de la enfermedad de Aujeszky.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

	AISLAMIENTO DE PASTURELLA	OTROS AISLAMIENTOS	AISLAMIENTO NEGATIVO	
PULMON NEUMONICO	37 (34.91) ^a	18 (16.98)	17 (16.04)	72 (67.93)
PULMON NORMAL	7 (6.60)	3 (2.83)	24 (22.64)	34 (32.07)
	44 (41.51)	21 (19.81)	41 (38.68)	106 (100)

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Ob}-\text{Esp})^2}{\text{Esp}} = 21.509$$

CUADRO # 3: Tabla de contingencia, y resultado de la prueba de χ^2 , en el análisis de tipo de pulmón: tipo de aislamiento. a= Porcentaje.

	AISLAMIENTO DE PASTURELLA	OTROS AISLAMIENTOS	AISLAMIENTO NEGATIVO	
SUERO POSITIVO	33 (31.13) ^a	14 (13.21)	11 (10.38)	58 (54.72)
SUERO NEGATIVO	11 (10.38)	7 (6.60)	30 (28.30)	48 (45.28)
	44 (41.51)	21 (19.81)	41 (38.68)	106 (100)

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Ob}-\text{Esp})^2}{\text{Esp}} = 21.369$$

CUADRO # 4: Tabla de contingencia, y resultado de la prueba de χ^2 , en el análisis de tipo de aislamiento: tipo de suero. a= Porcentaje.

	PULMON NEUMONICO	PULMON NORMAL	
SUERO POSITIVO	47 (44.34) ^a	11 (10.38)	58 (54.72)
SUERO NEGATIVO	25 (23.58)	23 (21.70)	48 (45.28)
	72 (67.92)	34 (32.08)	106 (100)

CUADRO # 5: Tabla de contingencia para el análisis de tipo de pulmón: tipo de suero. ($\chi^2 = 10.094$) a= Porcentaje.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	AISLAMIENTO DE PASTEURELLA	OTROS AISLAMIENTOS	AISLAMIENTO NEGATIVO	
PULMON NEUMONICO + SUERO POSITIVO	29 (27.36) ^a	12 (11.32)	6 (5.66)	47 (44.34)
PULMON NEUMONICO + SUERO NEGATIVO	8 (7.55)	6 (5.66)	11 (10.38)	25 (23.58)
PULMON NORMAL + SUERO POSITIVO	4 (3.77)	2 (1.89)	5 (4.72)	11 (10.38)
PULMON NORMAL + SUERO NEGATIVO	3 (2.83)	1 (0.94)	19 (17.92)	23 (21.70)
	44 (41.51)	21 (19.81)	41 (38.68)	106 (100)

$$\chi^2 = \sum \frac{(\text{Ob}-\text{Esp})^2}{\text{Esp}} = 33.448$$

CUADRO # 6: Tabla de contingencia, y resultado de la prueba de χ^2 , para el análisis de todos los factores tomados en cuenta.

a= Porcentaje.

<u>P. multocida</u> Tipo A.....	7(15.91%)
<u>P. multocida</u> Tipo D.....	19(43.18%)
<u>P. multocida</u> Tipo D/Necrotóxica....	7(15.91%)
<u>P. multocida</u> No Clasificadas.....	5(11.36%)
<u>P. haemolitica</u>	6(13.64%)
	<u>Total:44(100%)</u>

CUADRO # 7: Resultados de la tipificación de las Pasteurella aisladas a partir de los pulmones colectados en rastro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Estudio de patogenicidad de las Pasteurella aisladas

En el cuadro # 8 se muestran los diferentes tiempos medios de muerte, junto a la desviación estandar, especie y tipo capsular de las diferentes Pasteurella que mataron al 100% de los ratones inoculados.

El análisis de varianza (ANOVA) de los tiempos de muerte (cuadro # 10) resultó ser altamente significativo ($p=1.62 \times 10^{-9}$), indicando un efecto del tipo de bacteria inoculada sobre el tiempo de muerte.

Los resultados de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) están reflejados en el cuadro # 11. En él se puede apreciar el gran número de grupos, y solape entre grupos, obtenido; hecho que se modificó como se explicará más tarde.

La realización de una prueba de Bartlett demostró que las varianzas de los diferentes grupos no eran homogéneas. Por ello se realizó una prueba de Kruskal-Wallis (apéndice B), de la que resultó una $p=4.19 \times 10^{-6}$ con la que se rechazó la hipótesis nula de que los tiempos de muerte, para todas las bacterias, fueran iguales.

Debido al número elevado de grupos resultantes de la prueba de Duncan, y al traslape entre ellos, de manera artificiosa se crearon tres bloques; para lo que se tuvo en cuenta la media de las medias de tiempo de muerte ($\mu_{\bar{x}}$) y la varianza de la distribución de medias ($s_{\bar{x}}^2$), aplicando la fórmula para el cálculo del intervalo de confianza por t de Student con, en este caso, 37 grados de libertad y $\alpha=0.0005$:

$$I.C. = \mu_{\bar{x}} \pm 3.573 \sqrt{\frac{s_{\bar{x}}^2}{38}}$$

donde:

-I.C.= Límites del intervalo de confianza.

\bar{y}_x = Media de la distribución de medias de tiempo de muerte.

-3.573= Valor de la t de Student para 37 g.l. y $\alpha=0.05\%$.

s_x^2 = Varianza de la distribución de medias.

-38= Número de bacterias que mataron al 100% de animales.

$$I.C. = 13.56 \text{ h} \pm 3.573 \sqrt{\frac{23.18}{38}}$$

Las bacterias con una media de tiempo de muerte inferior a 10.77 horas se consideraron como de alta patogenicidad para ratón, las superiores en su media de tiempo de muerte a 16.35 horas se tomaron como de baja patogenicidad y las localizadas entre estos dos límites se incluyeron en el bloque de patogenicidad media.

Con estas divisiones, y para determinar la relación entre tipo capsular y patogenicidad para ratón, se realizó una prueba de independencia por χ^2 con las P.multocida tipos D, D/N y A, incluyéndose en el estudio las 3 bacterias tipificadas, que no mataron al 100% de los animales inoculados, dentro del grupo de baja patogenicidad. (Cuadro # 12)

La hipótesis nula planteada fue: la patogenicidad para ratón es independiente del tipo capsular.

La distribución de frecuencias del cuadro # 12 arrojó un resultado en la prueba de "ji-cuadrada" de 1.811, lo que representa una $p=0.77$ de la que se concluye que la patogenicidad es independiente, para ratón y por vía intraperitoneal, del tipo capsular.

La prueba anterior es criticable pues 6 de los 9 valores esperados (cuadro # 1 del apéndice C) son inferiores a 5. Por ello se realizó una nueva prueba tras multiplicar por 3 cada

N ^o BACTERIA	ESPECIE	TIPO CAPSULAR	TIEMPO DE MUERTE x(h)	±D.E.
7	<u>P.multocida</u>	D/N ^a	8.12	0.57
PM-LP5*	<u>P.multocida</u>	NC ^b (B)	8.44	0.33
28	<u>P.multocida</u>	A	9.51	0.46
48	<u>P.multocida</u>	D	9.81	0.72
71**	<u>P.multocida</u>	D	9.93	0.62
76	<u>P.multocida</u>	D/N	9.95	1.53
100	<u>P.multocida</u>	D/N	10.02	1.28
13	<u>P.multocida</u>	D	10.24	0.34
98**	<u>P.multocida</u>	A	10.28	0.79
656*	<u>P.multocida</u>	NC ^b (B)	10.49	2.23
14	<u>P.multocida</u>	D	10.68	1.57
106	<u>P.haemolytica</u>	NC ^b	10.75	0.40
96	<u>P.multocida</u>	D/N	10.89	1.59
107	<u>P.multocida</u>	D	10.98	1.27
61	<u>P.multocida</u>	D	11.12	1.35
75	<u>P.multocida</u>	D/N	11.18	4.26
VC-Cap*	<u>P.multocida</u>	D/N	11.28	1.29
79	<u>P.multocida</u>	D	11.51	2.31
81	<u>P.multocida</u>	D	11.59	1.84
92	<u>P.multocida</u>	A	12.02	2.28
20	<u>P.multocida</u>	D	12.17	1.14
78	<u>P.multocida</u>	A	12.35	5.77
67	<u>P.multocida</u>	D/N	12.64	3.66
83	<u>P.multocida</u>	A	12.70	1.99
15	<u>P.multocida</u>	D	13.98	0.42
49	<u>P.multocida</u>	D	14.43	5.95
72	<u>P.multocida</u>	D	14.58	5.78
90	<u>P.multocida</u>	D	14.58	7.91
85	<u>P.multocida</u>	A	14.69	2.90
105	<u>P.haemolytica</u>	NC ^b	15.76	5.37
103	<u>P.haemolytica</u>	NC ^b	15.94	9.41
89	<u>P.multocida</u>	D	16.61	9.65
101	<u>P.multocida</u>	D	19.34	9.35
65	<u>P.multocida</u>	D	19.78	8.90
12	<u>P.multocida</u>	D	20.14	4.68
6	<u>P.multocida</u>	D	20.40	8.49
99	<u>P.multocida</u>	D	25.05	6.86
87	<u>P.multocida</u>	D/N	31.47	8.23

CUADRO # 8: Tiempos de muerte medios de los grupos de ratones, inoculados con las diferentes Pasteurelas aisladas de ras tro, en los que se produjo un 100% de mortalidad.

a= P.multocida tipo D y productora de necrotóxina.

b= Bacteria no clasificada por las técnicas usadas.

*= Bacterias control.

**= Bacterias no introducidas en los estudios previos por ausencia de la muestra de suero.

N° BACTERIA	ESPECIE	TIPO CAPSULAR	N° ANIMALES	
			INOCULADOS	MUERTOS
17	<u>P.multocida</u>	NC	4	2
22	<u>P.multocida</u>	A	4	2
50	<u>P.haemolytica</u>	NC	4	2
1	<u>P.multocida</u>	NC	4	1
9	<u>P.multocida</u>	NC	4	1
54	<u>P.haemolytica</u>	NC	4	1
60	<u>P.multocida</u>	D	4	1
4	<u>P.multocida</u>	NC	4	0
5	<u>P.haemolytica</u>	NC	4	0
21	<u>P.multocida</u>	A	4	0
26	<u>P.multocida</u>	NC	4	0

CUADRO # 9: Relación de bacterias que no mataron al 100% de los ratones inoculados.

NC= No clasificado su tipo capsular.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Bacterias	37	3430.42	92.71	4.238	1.6×10^{-9}
Error	114	2494.08	21.88		
Total	151	5924.50			

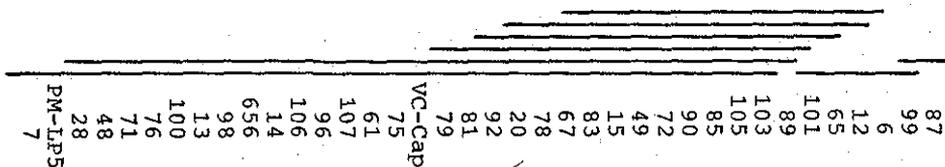
CUADRO # 10: Tabla de ANOVA (Análisis de varianza) para los tiempos de muerte de las 38 bacterias que mataron al 100% de los ratones inoculados.

G.L.= Grados de libertad del factor en cuestión.

S.C.= Suma de cuadrados del factor.

C.M.= Cuadrado medio del factor.

p= Area de la cola cortada por el valor F calculado.



CUADRO # 11: Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para determinar diferencias entre los tiempos de muerte.

La media de los tiempos de muerte, de las bacterias unidas por una misma barra, no fueron estadísticamente diferentes al nivel α utilizado.

TP \ Pr	ALTA	MEDIA	BAJA	
D	4	9	7	20
D/N	3	4	1	8
A	2	4	2	8
	9	17	10	36

CUADRO # 12: Tabla de contingencia para determinar dependencia entre el tipo de P.multocida y la patogenicidad para ratón.

TP= Tipo de P.multocida.

Pr= Patogenicidad para ratón.

una de las frecuencias del cuadro # 12. El desarrollo y resultado de ésta se muestran en el apéndice C.

4. Patrón de remoción pulmonar

La suspensión bacteriana lavada y ajustada (SBLA) usada para la aerosolización de los ratones utilizados en el experimento, dio un título de 5.364×10^7 UFC/ml.

El promedio de bacterias depositadas en el pulmón de los ratones, calculado a partir del número de bacterias por pulmón (BP) de los cuatro animales sacrificados a las 0 h, fue de 3.747×10^4 UFC con una desviación estandar de 0.963×10^4 UFC.

La media y desviación estandar, con respecto al tiempo, de bacterias por pulmón (BP), así como su transformación logarítmica (LBP) y las correcciones teniendo en cuenta el peso del pulmón (BGP y LBGP) y el peso del ratón (BGR y LBGR), se muestran en el cuadro # 13.

En la figura # 2 se representa gráficamente el cambio del número de bacterias - en LBGP - con respecto al tiempo transcurrido tras el aerosol bacteriano.

El análisis de los datos por ANOVA mostró una diferencia estadísticamente significativa cuando éstos se expresaron en BP ($p=0.035$)(cuadro # 14), pero no en los demás casos: LBP ($p=0.07$), BGP ($0.12=p$), LBGP ($p=0.136$), BGR ($p=0.08$) y LBGR ($p=0.10$). Ver el apéndice D para más detalles.

La prueba de Duncan mostró, reiterativamente, diferencia estadística entre los grupos 0 y 6 horas, mientras que las diferencias entre, y con, el resto dependió de las unidades de medida empleadas. Así, en el cuadro # 15 se puede observar que los grupos 6, 12, 24 y 48 horas (en BP) fueron estadísticamente diferentes al grupo de 0 hras e iguales entre si; mientras

que en el cuadro # 16 se puede apreciar que sólo hay diferencia estadística entre 0 y 6 horas. Otros resultados de pruebas de Duncan se muestran en el apéndice D.

Paralelamente al ANOVA anterior realizamos un análisis de covarianza - con el peso de pulmón como covariable- de BP, LBP, BGP y LBGP; encontrando que el efecto hora fue estadísticamente significativo en todos los casos. Los resultados de estos análisis, junto con la posterior corrección de los valores medios y los gráficos de la prueba de Tukey se muestran en el apéndice D.

En el cuadro # 17 se resumen, con los valores medios y la desviación estandar, los porcentajes de remoción (REM) y retención (RET) en relación con el tiempo, y en las gráficas # 3 y # 4 se representan los índices de retención y remoción, respectivamente, de LBGP. (Ver además el apéndice D).

El análisis de varianza de los índices de remoción y retención arrojó resultados similares a los obtenidos con los datos en forma de UFC : RET BP, REM BP, RET LBP y REM LBP ($p=0.035$); RET BGP, REM BGP, RET LBGP y REM LBGP ($p=0.123$); RET BGR, REM BGR, RET LBGR y REM LBGR ($p=0.08$). (Cuadro # 18 y apéndice D).

Los resultados de las pruebas de Duncan fueron, igualmente, similares a los de las pruebas de Duncan realizadas a partir de los datos en UFC (cuadro # 18 y apéndice D).

De la misma forma que con los títulos bacterianos se realizaron análisis de covarianza, para los índices de remoción y retención, tomando el peso del pulmón como covariable. Los cuadros con los resultados de estos análisis se encuentran en el apéndice D (D-19 a D-26), y en el cuadro D-27 las medias ajustadas más, en el cuadro D-28, los resultados de la prueba de Tukey con $\alpha=0.05$.

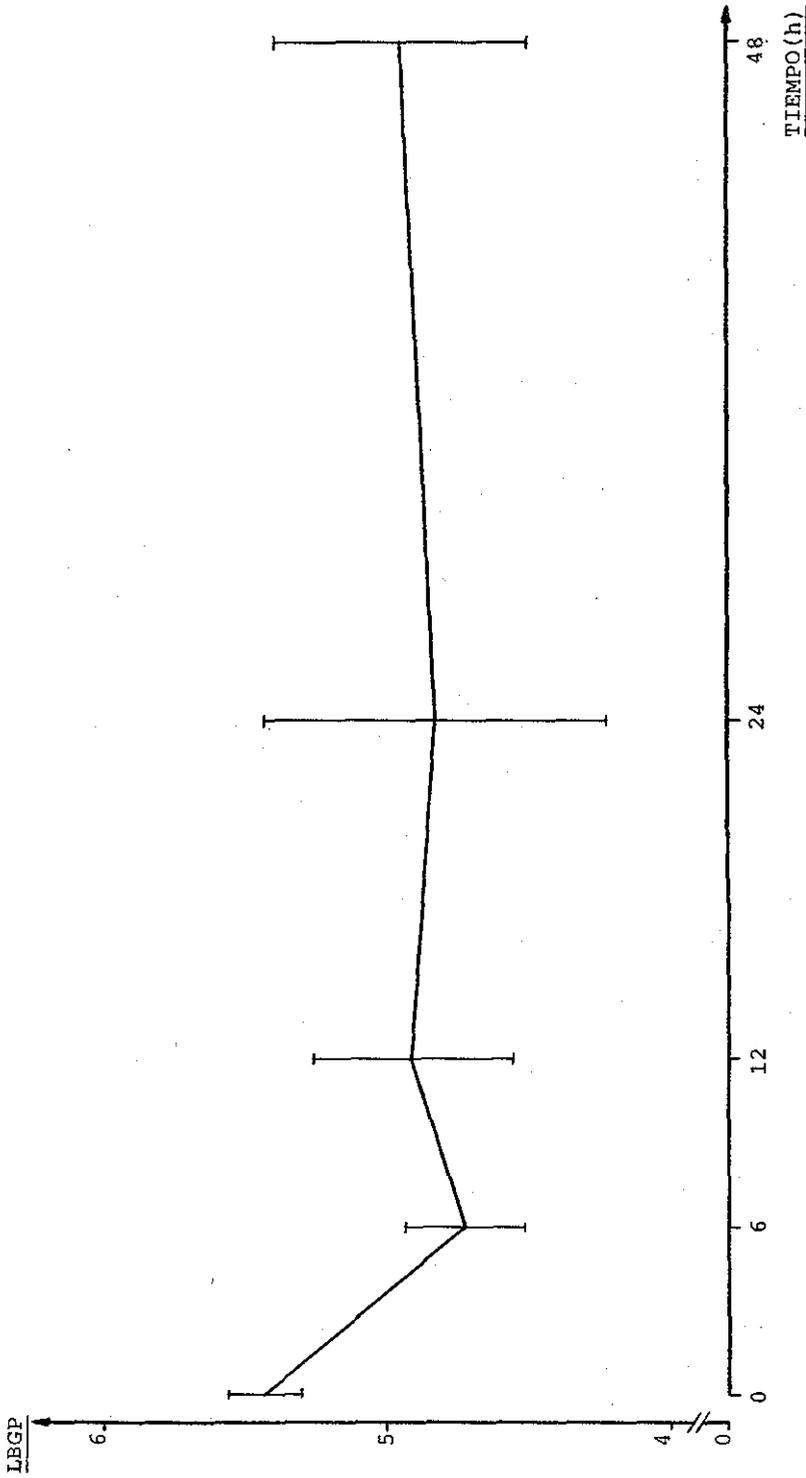


FIGURA # 2: Número de bacterias (UFC) por gramo de pulmón, transformación logarítmica (LBGP), en relación al tiempo transcurrido tras el aerosol de P. multocida VC-Cap. (Media ± Desviación Estandar)

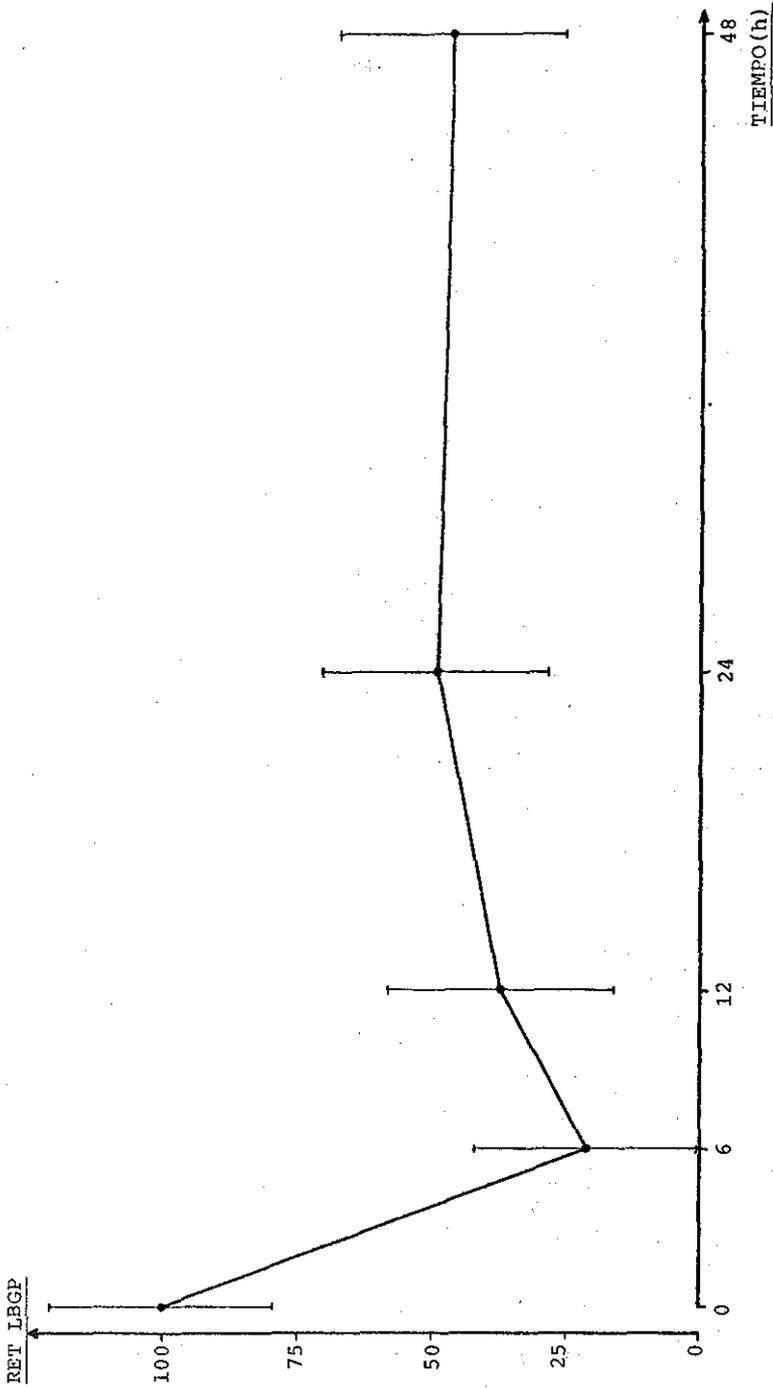


FIGURA # 3: Indices de retención, calculados a partir de LBGP (RET LBGP), en relación con el tiempo transcurrido desde el aerosol con P.multocida VC-Cap. (Media \pm Desviación Estandar)

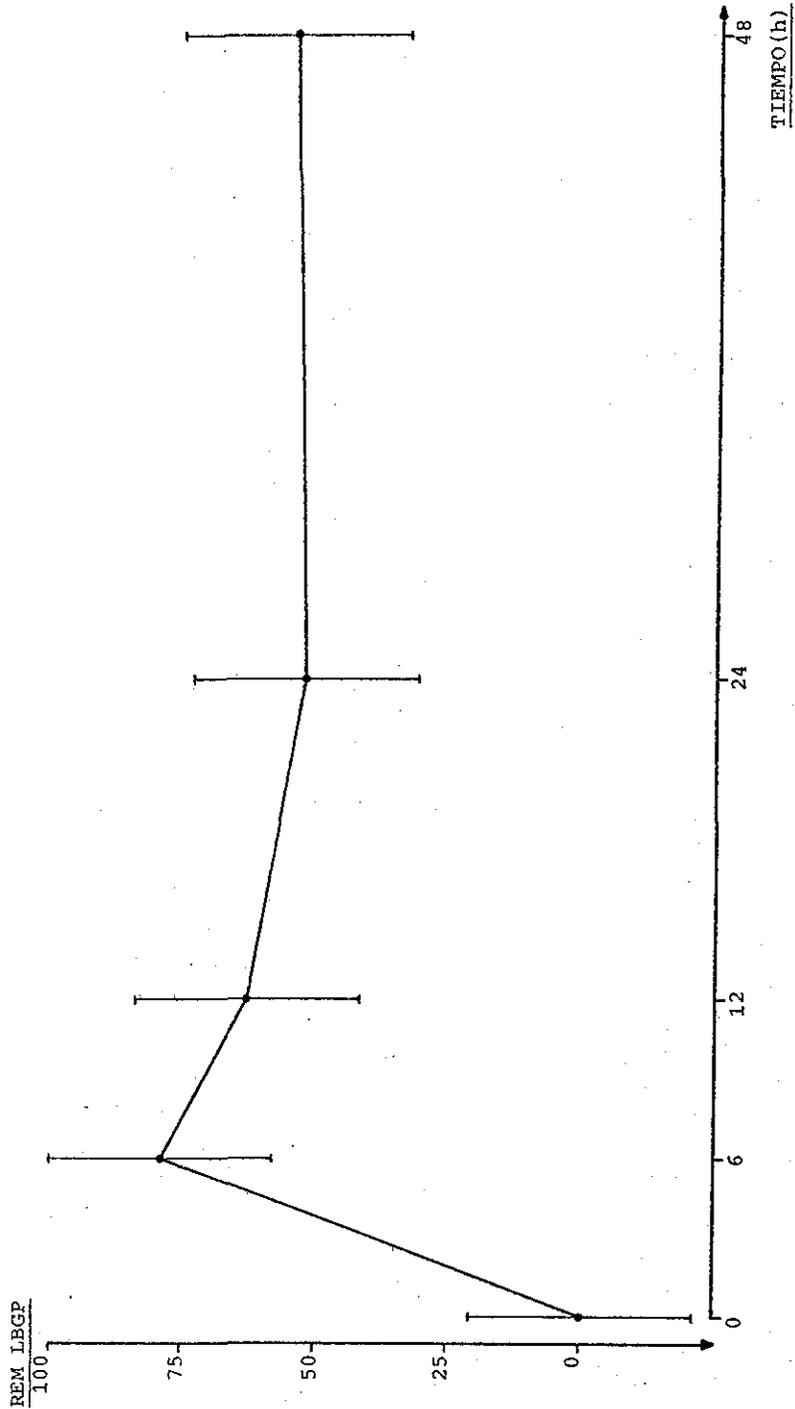


FIGURA # 4: Indices de remoci3n, calculados a partir de LBGP (REM LBGP), en relaci3n con el tiempo transcurrido desde el aerosol con P.multiplicada VC-Cap. (Media \pm Desviaci3n Estandar)

GRUPO		BP	LBP	BGP	LBGP	BGR	LBGR
0h ^a	\bar{x}	$3.747 \cdot 10^4$	4.564	$2.754 \cdot 10^5$	5.427	$1.996 \cdot 10^3$	3.288
	$\pm DE$	$0.963 \cdot 10^4$	0.106	$0.771 \cdot 10^5$	0.124	$0.549 \cdot 10^3$	0.116
6h	\bar{x}	$0.674 \cdot 10^4$	3.805	$0.575 \cdot 10^5$	4.720	$0.391 \cdot 10^3$	2.556
	$\pm DE$	$0.274 \cdot 10^4$	0.162	$0.288 \cdot 10^5$	0.212	$0.196 \cdot 10^3$	0.199
12h	\bar{x}	$1.217 \cdot 10^4$	3.986	$1.014 \cdot 10^5$	4.907	$0.675 \cdot 10^3$	2.739
	$\pm DE$	$0.928 \cdot 10^4$	0.343	$0.773 \cdot 10^5$	0.343	$0.494 \cdot 10^3$	0.328
24h	\bar{x}	$1.535 \cdot 10^4$	3.917	$1.343 \cdot 10^5$	4.814	$0.928 \cdot 10^3$	2.652
	$\pm DE$	$2.005 \cdot 10^4$	0.547	$1.856 \cdot 10^5$	0.596	$1.290 \cdot 10^3$	0.596
48h	\bar{x}	$1.558 \cdot 10^4$	4.035	$1.262 \cdot 10^5$	4.938	$0.870 \cdot 10^3$	2.794
	$\pm DE$	$1.454 \cdot 10^4$	0.435	$1.216 \cdot 10^5$	0.439	$0.791 \cdot 10^3$	0.415

CUADRO # 13: Media (\bar{x}) \pm DE (desviación estandar) de las UFC por pulmón (BP), gramo de pulmón (BGP), gramo de ratón (BGR) y sus transformaciones logarítmicas (LBP, LBGP y LBGR, respectivamente) de los diferentes grupos de que se componía el experimento para determinar la curva patrón de eliminación pulmonar, en ratones aerosolizados con la P.multocida VC-Cap.

a= Hora a la que se sacrificaron los animales del grupo, contada a partir del final de la aerosolización con la suspensión bacteriana lavada y ajustada (SBLA) de P.multocida VC-Cap.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	$2.206 \cdot 10^9$	$5.515 \cdot 10^8$	3.447	0.035
Error	15	$2.401 \cdot 10^9$	$1.600 \cdot 10^8$		
Total	19	$4.605 \cdot 10^9$			

CUADRO # 14: Tabla de ANOVA ; construida a partir de los datos del presente experimento expresados en BP, para determinar la existencia, o no, de un efecto hora sobre el número de bacterias recuperadas del pulmón.

0h^a 6h 12h 24h 48h

CUADRO # 15: Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) de BP. La barra une a los grupos entre los que no se detectó diferencia estadísticamente significativa.

0h^a 12h 24h 48h 6h

CUADRO # 16: Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) de BGP. Entre los grupos unidos por una misma barra no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

a= Hora, contada a partir del final de la aerosolización con SBLA, a la que fueron sacrificados los animales del grupo correspondiente.

GRUPO	RET BP		RET LBP		REM LBP		RET BGP		REM BGP		RET BGR		REM BGR		RET LBGR		REM LBGR				
	\bar{x}	$\pm DE$																			
0h	100.00	25.70	102.27	26.26	-2.27	26.26	99.99	28.01	0.01	28.01	103.01	28.86	-3.01	28.86	99.98	27.51	0.02	27.51	102.82	-2.82	28.28
6h	17.98	7.30	18.39	7.49	81.61	7.49	20.87	10.46	79.13	10.77	21.50	10.77	78.50	9.82	19.62	10.09	80.38	20.17	79.83	10.09	25.46
12h	32.47	24.75	33.19	25.30	66.81	25.30	36.82	28.06	63.18	28.92	37.94	28.92	62.06	24.76	33.84	25.46	66.16	34.81	65.19	25.46	52.16
24h	40.95	53.52	41.91	54.79	58.09	54.79	48.76	67.40	51.24	50.22	49.78	46.52	69.43	64.61	46.52	66.44	53.48	64.61	66.44	52.16	66.44
48h	41.58	38.80	42.52	39.70	57.48	39.70	45.84	44.15	54.16	47.25	45.53	43.58	52.75	45.53	43.58	40.74	56.42	44.81	55.19	40.74	40.74

CUADRO # 17: Media \bar{x} DE de los índices de remoción (\overline{REM})* y retención (\overline{RET})* a diferentes tiempos posaerol de P.multocida VC-Cap. Los índices se calcularon tomando como base los datos expresados en BP, BGP, BGR o sus transformaciones logarítmicas.

* = A las 6 horas.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	15709.78	3927.445	3.446	0.0346
Error	15	17093.90	1139.593		
Total	19	32803.68			

0h 6h 12h 24h 48h

CUADRO # 18: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) de RETBP y REMBP. Los grupos (Hora) unidos por la barra mostraron diferencias estadísticamente no significativas.

5. Efecto del líquido sobrenadante de un cultivo de *P.multocida*

VC-Cap

Para la aerosolización de los ratones expuestos a PBS (control 1) y al sobrenadante filtrado del cultivo de *P.multocida* (SCPF) se usó una SBLA de 6.034×10^7 UFC/ml, mientras que los ratones expuestos a BHI (control 2) se aerosolizaron con una SBLA de 1.319×10^8 UFC/ml.

En el cuadro # 19 se muestran las medias y desviaciones estandar de las UFC por pulmón (BP), gramo de pulmón (BGP), gramo de ratón (BGR) y sus transformaciones logarítmicas (LBP, LBGP y LBGR) de cada tratamiento, tanto a las 0 horas como a las 6 horas. En la gráfica # 5 se representan los datos de la columna LBGP del cuadro # 19, y en el cuadro E-1 del apéndice E se detallan todos los resultados individuales obtenidos.

El ANOVA de LBGP (cuadro # 20) arrojó un efecto estadísticamente significativo de hora ($p=0.005$) y tratamiento ($p=0.048$), así como una interacción significativa entre hora y tratamiento ($p=0.022$).

La prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) indicó que las UFC, expresadas en LBGP, fueron esencialmente iguales a las 0 horas (cuadro # 21,a) y que el grupo SCPF a las 6 horas fue diferente a los grupos, entre los que no se dio una diferencia estadística, C-1 y C-2 a las 6 horas (cuadro # 21,b). Por otro lado hubo diferencia entre horas en los grupos C-1 (cuadro # 21,c) y C-2 (cuadro # 21,d), pero no en el grupo SCPF (cuadro # 21,e).

Las tablas de los ANOVA, y las pruebas de Duncan correspondientes, de LBP y LBGR se encuentran en el apéndice E.

Las medias y desviaciones estandar de los índices de remoción (REM) y retención (RET) a las 6 horas, calculados según lo expuesto en el apartado correspondiente de material y métodos,

se muestran en el cuadro # 22. En las figuras 6 y 7 se representan los índices de RET y REM de LBGP, respectivamente, tanto a las 0 horas como a las 6 horas posaerosol.

Como se puede ver en el cuadro # 22, la desviación estándar -y consecuentemente la varianza- del grupo SCPF fue mucho mayor que la de los grupos control (C-1 y C-2); por ello se decidió hacer un análisis de los datos por el método de Kruskal-Wallis (cuadro E-6) y una transformación de los datos originales.

La transformación utilizada fue la arco tangente (ver el apéndice H) que, como se ve en el cuadro # 23, logró homogeneizar extraordinariamente las varianzas en detrimento de la diferencia, en los índices de REM y RET, entre los controles y el grupo SCPF.

Los valores de estos índices transformados (RETT y REMT) aparecen en el cuadro E-7, así como los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis. Los valores medios y sus desviaciones estándar se muestran en el cuadro # 23.

El ANOVA (cuadro # 24) de RETT BGP, y de REMT BGP, demostró un efecto de tratamiento ($p=0.021$) que, por la prueba de Duncan, se debió a la diferencia entre los índices de los grupos control con el del grupo SCPF.

Las figuras 8 y 9 manifiestan que la diferencia, estadísticamente significativa, se produjo por un valor más alto del índice de remoción, transformado, en el grupo SCPF; y consecuentemente un valor más bajo del índice de remoción, con respecto a los grupos control.

Nótese que las pruebas de Kruskal-Wallis, tanto de datos transformados como no transformados, y el ANOVA de los datos transformados dieron valores de "p" muy similares.

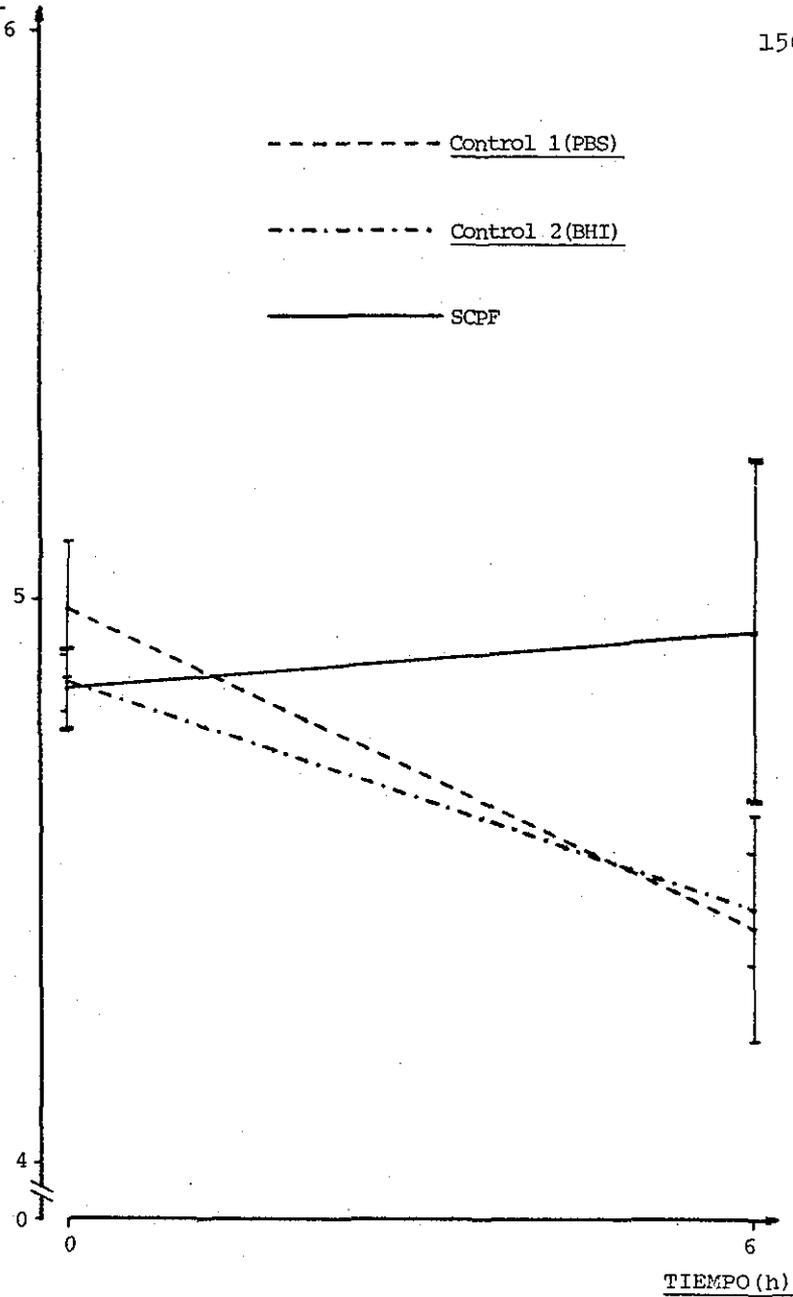


FIGURA # 5: Número de bacterias (UFC) por gramo de pulmón, transformación logarítmica (LBGP), de los grupos sacrificados inmediatamente después del aerosol de SBLA (0h) y a las 6 horas. (Media \pm Desviación Estandar)

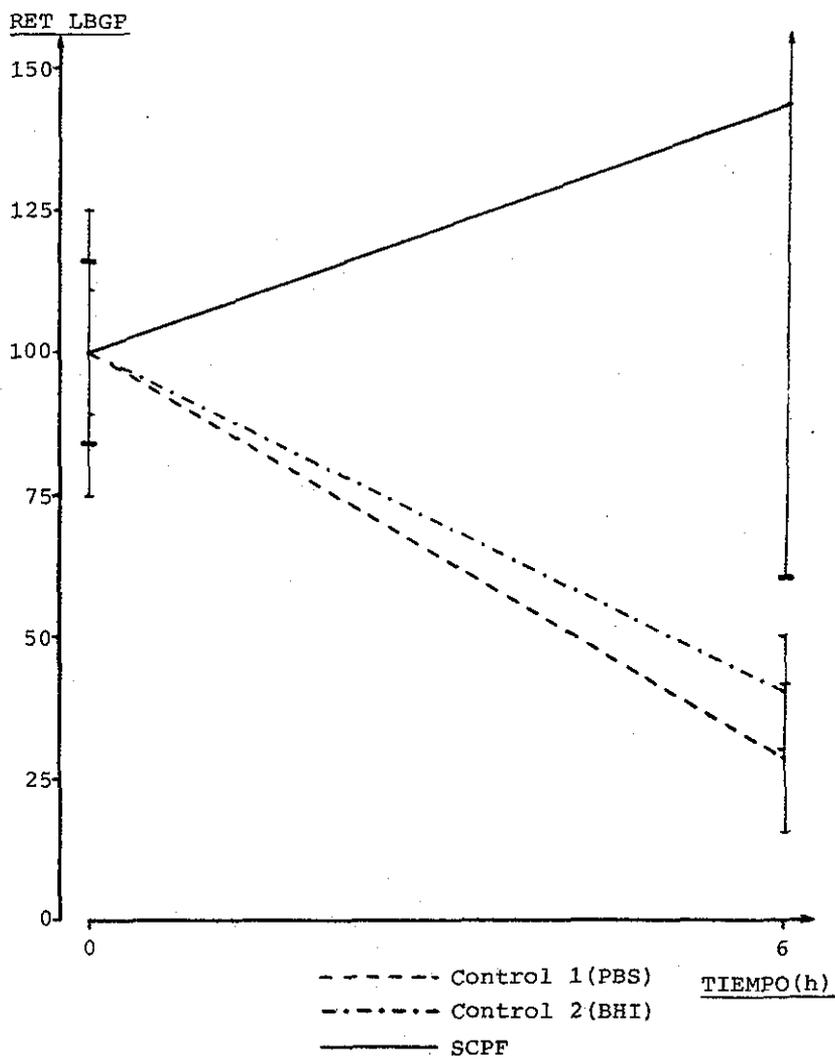


FIGURA # 6: Indices de retención, calculados a partir de LBGP (RET LBGP), en relación con el tiempo transcurrido desde el aerosol con SBLA. (Media \pm Desviación Estándar)

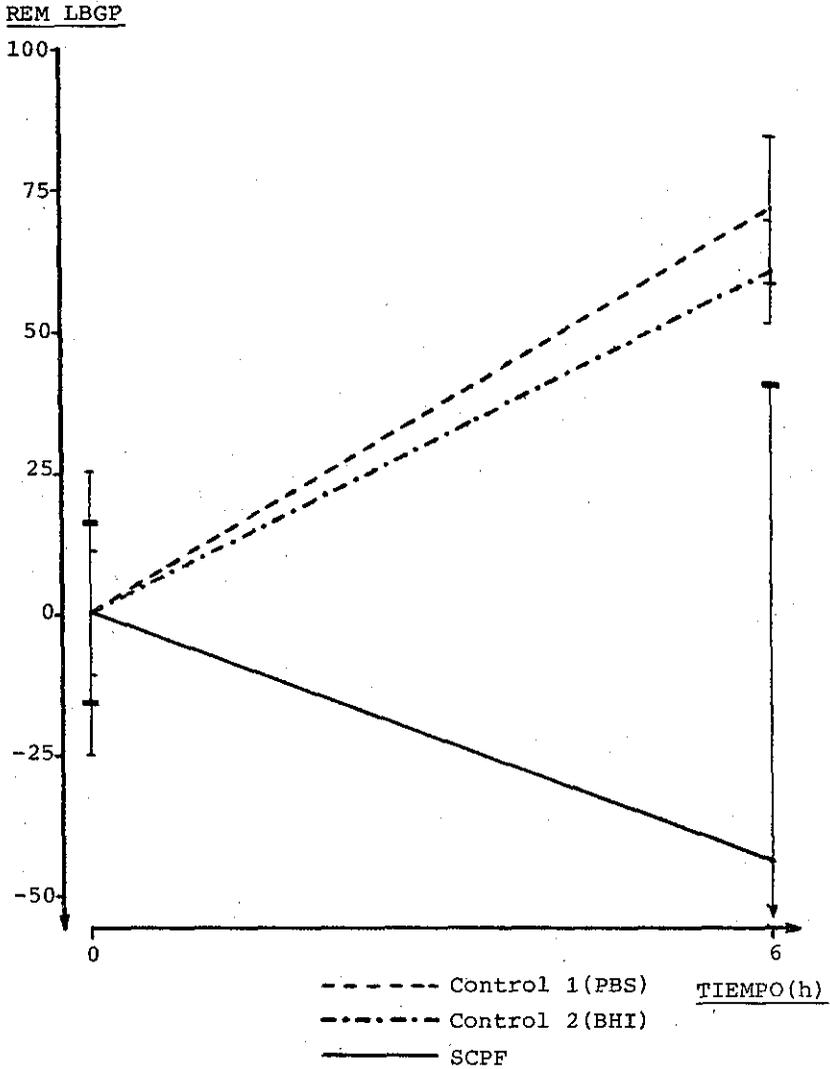


FIGURA # 7: Indices de remoción, calculados a partir de LBGP (REM LBGP), en relación con el tiempo transcurrido desde el aerosol con SBLA. (Media \pm Desviación Estandar)

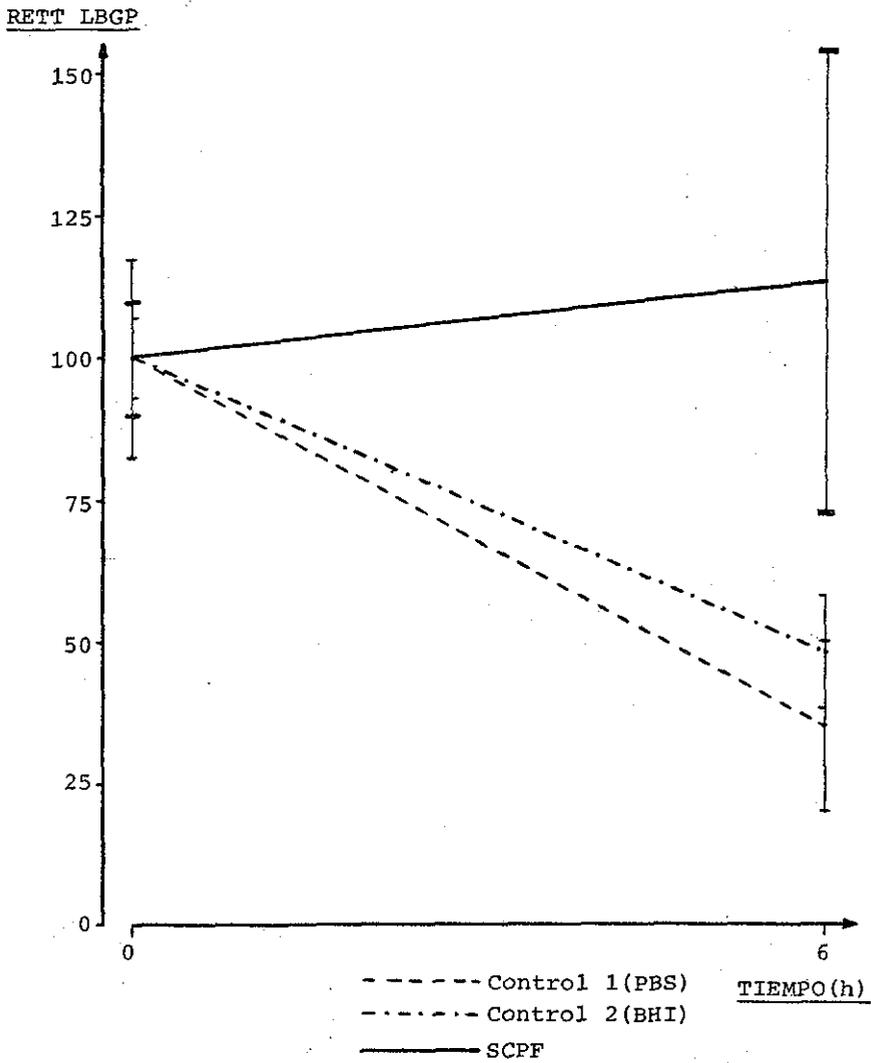


FIGURA # 8: Indices de retención transformados por arco tangente, calculados a partir de RET LBGP (RETT LBGP), en relación al tiempo transcurrido desde el aerosol con SBLA. (Media \pm Desviación Estandar)

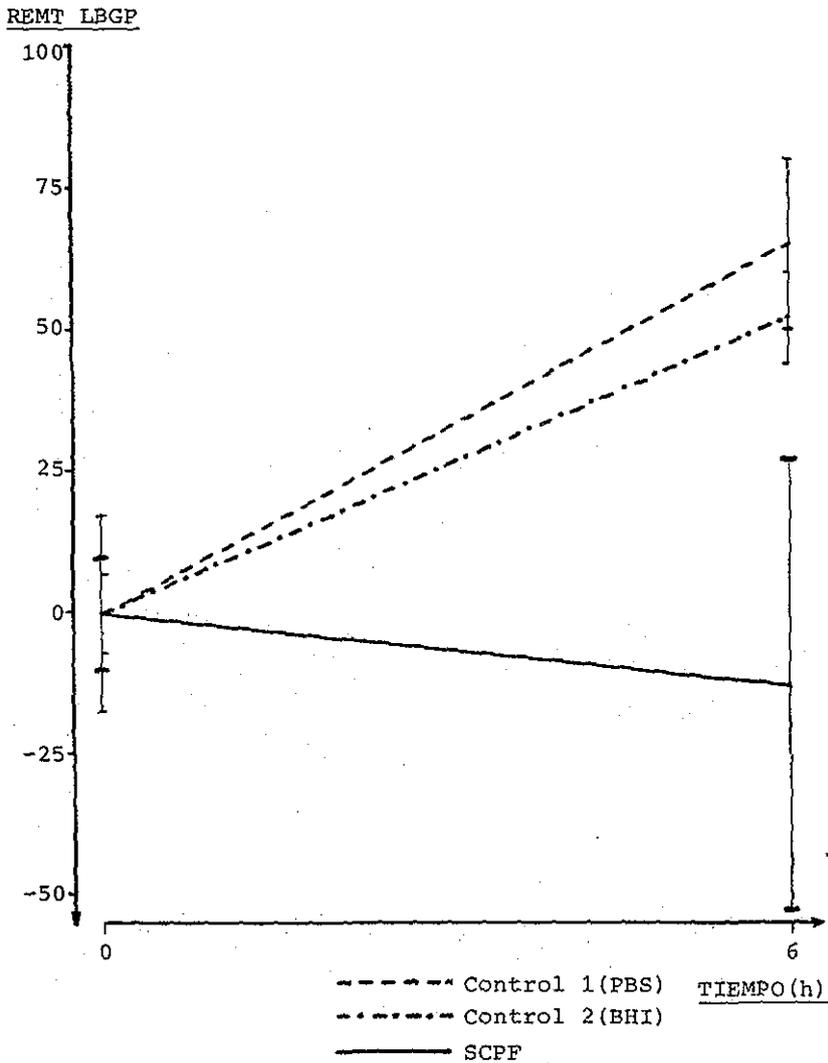


FIGURA # 9: Indices de remoción transformados por arco tangente, calculados a partir de REM LBGP (REMT LBGP), en relación al tiempo transcurrido desde el aerosol con SBLA. (Media \pm Desviación Estandar)

TRAT.	h		BP	LBP	BGP	LBGP	BGR	LBGR
C-1	0	\bar{x}	$1.037 \cdot 10^4$	4.015	$0.983 \cdot 10^5$	4.982	$7.620 \cdot 10^2$	2.880
		$\pm DE$	$0.052 \cdot 10^4$	0.022	$0.252 \cdot 10^5$	0.121	$0.808 \cdot 10^2$	0.047
	6	\bar{x}	$0.657 \cdot 10^4$	3.531	$0.279 \cdot 10^5$	4.414	$2.634 \cdot 10^2$	2.326
		$\pm DE$	$0.197 \cdot 10^4$	0.204	$0.129 \cdot 10^5$	0.207	$2.127 \cdot 10^2$	0.348
C-2	0	\bar{x}	$0.716 \cdot 10^4$	3.854	$0.716 \cdot 10^5$	4.854	$4.825 \cdot 10^2$	2.682
		$\pm DE$	$0.078 \cdot 10^4$	0.047	$0.078 \cdot 10^5$	0.047	$0.616 \cdot 10^2$	0.056
	6	\bar{x}	$0.309 \cdot 10^4$	3.487	$0.285 \cdot 10^5$	4.447	$2.264 \cdot 10^2$	2.345
		$\pm DE$	$0.044 \cdot 10^4$	0.065	$0.062 \cdot 10^5$	0.101	$0.577 \cdot 10^2$	0.115
SCPF	0	\bar{x}	$0.657 \cdot 10^4$	3.811	$0.704 \cdot 10^5$	4.844	$5.003 \cdot 10^2$	2.698
		$\pm DE$	$0.138 \cdot 10^4$	0.098	$0.112 \cdot 10^5$	0.067	$0.534 \cdot 10^2$	0.048
	6	\bar{x}	$1.101 \cdot 10^4$	3.949	$1.009 \cdot 10^5$	4.943	$7.221 \cdot 10^2$	2.755
		$\pm DE$	$0.865 \cdot 10^4$	0.350	$0.589 \cdot 10^5$	0.297	$6.202 \cdot 10^2$	0.361

CUADRO # 19: Medias (\bar{x}) y desviaciones estandar (DE) de las UFC por pulmón (BP), gramo de pulmón (BGP), gramo de ratón (BGR) y sus transformaciones logarítmicas (LBP, LBGP y LBGR), de los tratamientos C-1 (Control 1: aerosolizado primero con PBS), C-2 (Control 2: aerosolizado primero con caldo BHI) y SCPF (Sobrenadante del cultivo de Pasteurella filtrado, con el que los ratones del grupo se aerosolizaron primero); inmediatamente después del aerosol con P.multocida VC-Cap (0h) y seis horas más tarde (6h).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Modelo	5	0.935	0.187	6.388	0.007
Trat.	2	0.238	0.119	4.065	0.048
Hora	1	0.374	0.374	12.776	0.005
H*Tr	2	0.324	0.162	5.534	0.022
Error	11	0.322	0.029		
Total	16	1.257			

CUADRO # 20: Tabla de ANOVA, construida a partir de los datos, obtenidos en el experimento para determinar el efecto del SCPF sobre la remoción pulmonar de P.multocida VC-Cap, expresados en LBGP, para determinar la existencia de un efecto hora y/o un efecto tratamiento sobre el número de bacterias recuperadas de pulmón.

(a)	C-1 (0h)	C-2 (0h)	SCPF (0h)
(b)	C-1 (6h)	C-2 (6h)	SCPF (6h)
(c)	0h (C-1)	6h (C-1)	
(d)	0h (C-2)	6h (C-2)	
(e)	0h (SCPF)	6h (SCPF)	

CUADRO # 21: Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para detectar diferencias significativas entre: (a) tratamientos a las 0 horas, (b) tratamientos a las 6 horas, (c) horas en el tratamiento con PBS, (d) horas en el tratamiento con BHI y (e) horas en el tratamiento con SCPF. Datos en LBGP.

Las barras unen a los grupos entre los que no se dio una diferencia estadísticamente significativa.

TRAT.	RET BP	REM BP	RET LBP	REM LBP	RET BGP	REM BGP	RET LBGP	REM LBGP	RET BGR	REM BGR	RET LBGR	REM LBGR	
													\bar{X}
C-1	\bar{X}	35.38	64.64	35.44	64.56	28.41	71.59	29.11	70.89	34.57	65.43	34.73	65.27
	$\pm DE$	18.03	18.03	18.06	18.06	13.11	13.11	13.43	13.43	27.91	27.91	28.04	28.04
C-2	\bar{X}	43.17	56.83	43.27	56.73	39.74	60.26	39.83	60.17	46.92	53.08	47.08	52.92
	$\pm DE$	6.19	6.19	6.20	6.20	8.62	8.62	8.64	8.64	11.97	11.97	12.01	12.01
SCPF	\bar{X}	167.51	-67.51	170.48	-70.48	143.24	-43.24	144.51	-44.51	144.34	-44.34	144.74	-44.74
	$\pm DE$	131.63	131.63	133.96	133.96	83.62	83.62	84.36	84.36	123.96	123.96	122.31	122.31

CUADRO # 22: Índices de remoción (REM) y retención (RET), a las 6 horas, calculados a partir de los títulos de BP, BGP, BGR y sus transformaciones logarítmicas (LBP, LBGP y LBGR) para cada tratamiento. (Media \pm Desviación Estandar).

TRAT.	RETT*		REMT		RETT		REMT		RETT		REMT		RETT		REMT		RETT		REMT		
	BP	LBP	LBP	LPP	BGP	BGP	LBGP	LBGP	BGP	BGP	LBGP	LBGP	BGP	BGP	LBGP	LBGP	BGP	BGP	LBGP	LBGP	
C-1	\bar{x}	42.50	57.50	42.57	57.43	34.89	65.11	35.68	64.32	40.51	59.49	40.67	59.33								
	DE	19.65	19.65	19.68	19.68	15.28	15.28	15.59	15.59	30.09	30.09	30.19	30.19								
C-2	\bar{x}	51.79	48.21	51.89	48.11	47.98	52.02	48.08	51.92	55.48	44.52	55.64	44.36								
	DE	6.72	6.72	6.74	6.74	9.60	9.60	9.62	9.62	12.57	12.57	12.60	12.60								
SCPF	\bar{x}	115.43	-15.43	116.35	-16.35	112.62	-12.62	113.10	-13.10	105.45	-5.45	105.59	-5.59								
	DE	44.49	44.49	44.30	44.30	40.46	40.46	40.46	40.46	46.82	46.82	46.80	46.80								

CUADRO # 23: Índices transformados de remoción(REMT) y retención(RETT), a las 6 horas, calculados a partir de los índices de remoción(REM) y retención(RET) de BP, BGP, BGR y sus transformaciones logarítmicas (LBP, LBGP y LBGR). (Media \pm Desviación Estandar)

*= Índices transformados por arco tangente.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trata.	2	10392.24	5196.120	7.943	0.021
Error	6	3925.05	654.170		
Total	8	14317.29			

C-1

C-2

SCPF

CUADRO # 24: Tabla de ANOVA, y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$), de los índices de remoción y retención transformados -arco tangente- de BGP. Los tratamientos unidos por la barra mostraron diferencias estadísticamente no significativas.

6. Efecto del tiempo posinfección con virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de P.multocida VC-Cap

Las concentraciones, en UFC/ml, de las diferentes SBLA utilizadas a lo largo del experimento se pueden ver en el cuadro # 25.

En el cuadro # 26 se muestran las medias y desviaciones estándar de las UFC por pulmón (BP), gramo de pulmón (BGP), gramo de ratón (BGR) y sus transformaciones logarítmicas (LBGP, LBGP y LBGR) de cada uno de los días transcurridos entre el aerosol de virus y el aerosol bacteriano, tanto a las 0 horas como a las 6 horas del último aerosol.

El ANOVA de los datos expresados en LBP (cuadro # 27) muestra la existencia de un efecto de día ($p=1 \times 10^{-6}$) y hora ($p=5 \times 10^{-6}$), además de una interacción significativa entre hora y día ($p=0.05$).

La figura # 10 presenta en forma gráfica los valores de LBGP del cuadro # 26, en ella puede apreciarse como va disminuyendo la distancia entre las dos curvas lo que se manifiesta, como se verá más tarde, en una disminución con el tiempo del índice de remoción.

Los resultados de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$), mostrados en los cuadros # 28 y # 29, indicaron que en la cantidad de bacterias depositadas (hora 0), expresadas en LBP, fue igual para todos los grupos salvo entre los grupos D-7 y D-15. A las 6 horas, los grupos D-7, D-5, D-3, D-2 y C-1 no tuvieron diferencias estadísticamente significativas; lo mismo sucedió con los grupos D-11, D-3 y C-1; el día 15 (D-15) fue diferente a todos los demás. Por otro lado, todos los grupos mostraron diferencia estadística entre 0 y 6 horas salvo D-11 y D-15.

Los resultados de cada uno de los ratones se pueden ver en el cuadro F-1 del apéndice F y los ANOVA de LBGP y LBGR en los cuadros F-2 y F-3, respectivamente.

Los índices de remoción y retención, a las 6 horas, de los cuatro ratones de cada uno de los grupos, están reflejados en el cuadro F-4 y las medias, junto con las desviaciones estandar, aparecen en el cuadro # 30.

EL ANOVA de RET LBP y REM LBP (cuadro # 31) mostró un efecto de día ($p=0.027$) estadísticamente significativo que, como se puede ver en la prueba de Duncan del mismo cuadro, se debe a las diferencias entre los grupos D-11 y D-15 con los grupos C-1, D-2, D-5 y D-7.

En el apéndice F se muestran otros ANOVA, junto a las pruebas de Duncan correspondientes ($\alpha=0.05$), que como se puede ver resultaron estadísticamente significativos, con rechazo de la hipótesis nula de que todos los grupos eran iguales. De las pruebas de Duncan se deduce que el día 15 fue, en todos los casos, estadísticamente diferente de los días 2, 5, 7 y del grupo control; mientras que el grupo D-11 no logró diferenciarse en todas las ocasiones del grupo control.

Como se hizo en el experimento anterior, los índices de remoción y retención se transformaron por arco tangente para reducir varianzas. En el cuadro # 32 se presentan los valores medios y las desviaciones estandar de estos índices transformados (RETT y REMT) para cada uno de los grupos. Los datos individuales pueden verse en el apéndice F. Como se ve en el cuadro # 32, la transformación empleada homogeneizó satisfactoriamente las varianzas aunque redujo las diferencias entre los dos últimos grupos (D-11 y D-15) y el resto, fenómeno similar al ocurrido en el experimento anterior.

En la figura # 11 se han representado los valores medios de RETT LBGP así como sus desviaciones estandar, en ella se puede observar como aumenta el índice de retención a partir del día 7.

En la figura # 12 se representaron los valores medios de REMT LBGP y sus desviaciones estandar. En esta figura se observa un efecto, contrario al de la figura # 11, de disminución del índice de remoción a partir del día 7.

El análisis de varianza de los índices de retención y remoción transformados de LEP (cuadro # 33) arrojó un efecto significativo de día ($p=0.03$) debido, como se ve en el resultado de la prueba de Duncan acompañante, a la diferencia entre D-15 y C-1, D-2, D-3, D-5 y D-7; y a la diferencia entre D-11 y C-1.

El resto de análisis de varianza mostraron un efecto significativo de día (ver el apéndice F). Las diferentes pruebas de Duncan ratificaron los resultados anteriores, con los índices no transformados, de que el grupo D-15 fue siempre diferente a los grupos C-1, D-2, D-5 y D-7; mientras que el grupo D-11 no logró diferenciarse en todos los casos del grupo control.

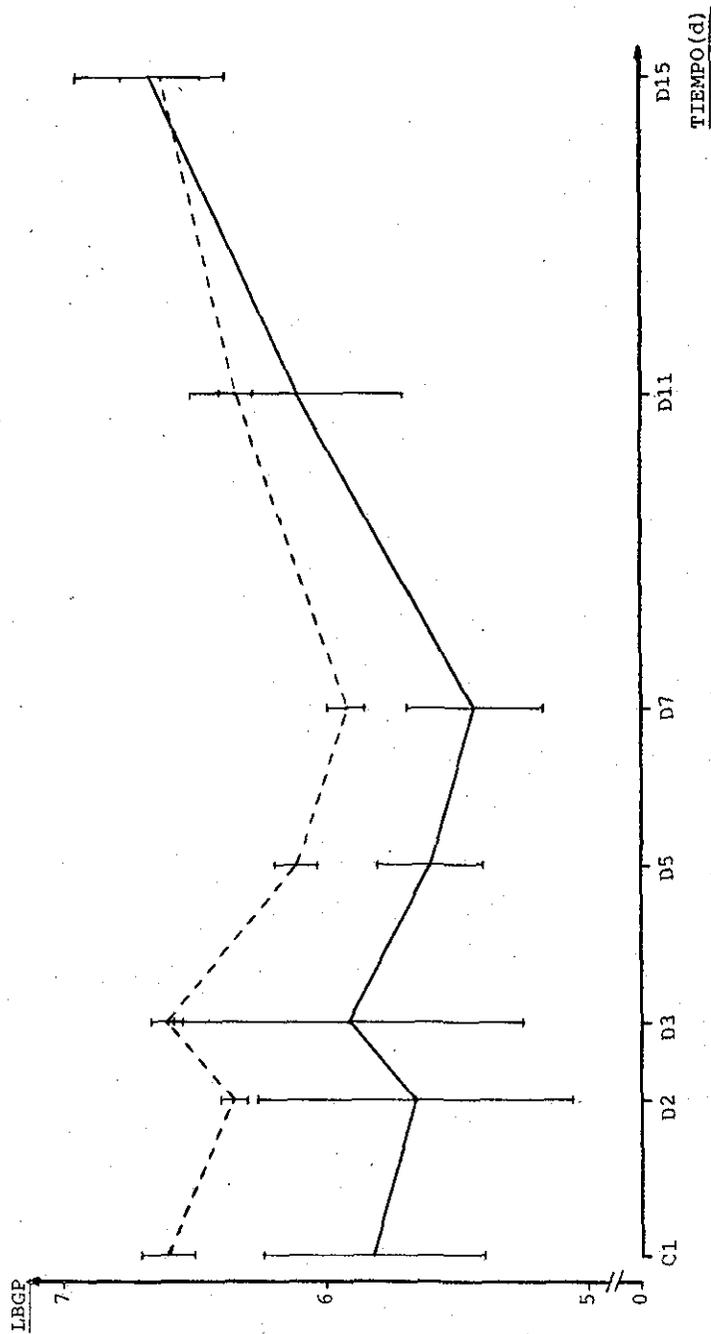


FIGURA # 10: Número de bacterias (UFC) por gramo de pulmón, transformación logarítmica (LBGP), a diferentes tiempos posinfección con el virus de la enfermedad de Aujeszky, en los grupos sacrificados inmediatamente después del aerosol bacteriano (línea de trazos) y en los grupos sacrificados 6 horas más tarde del mismo (línea continua). (Media \pm Desviación Estándar)

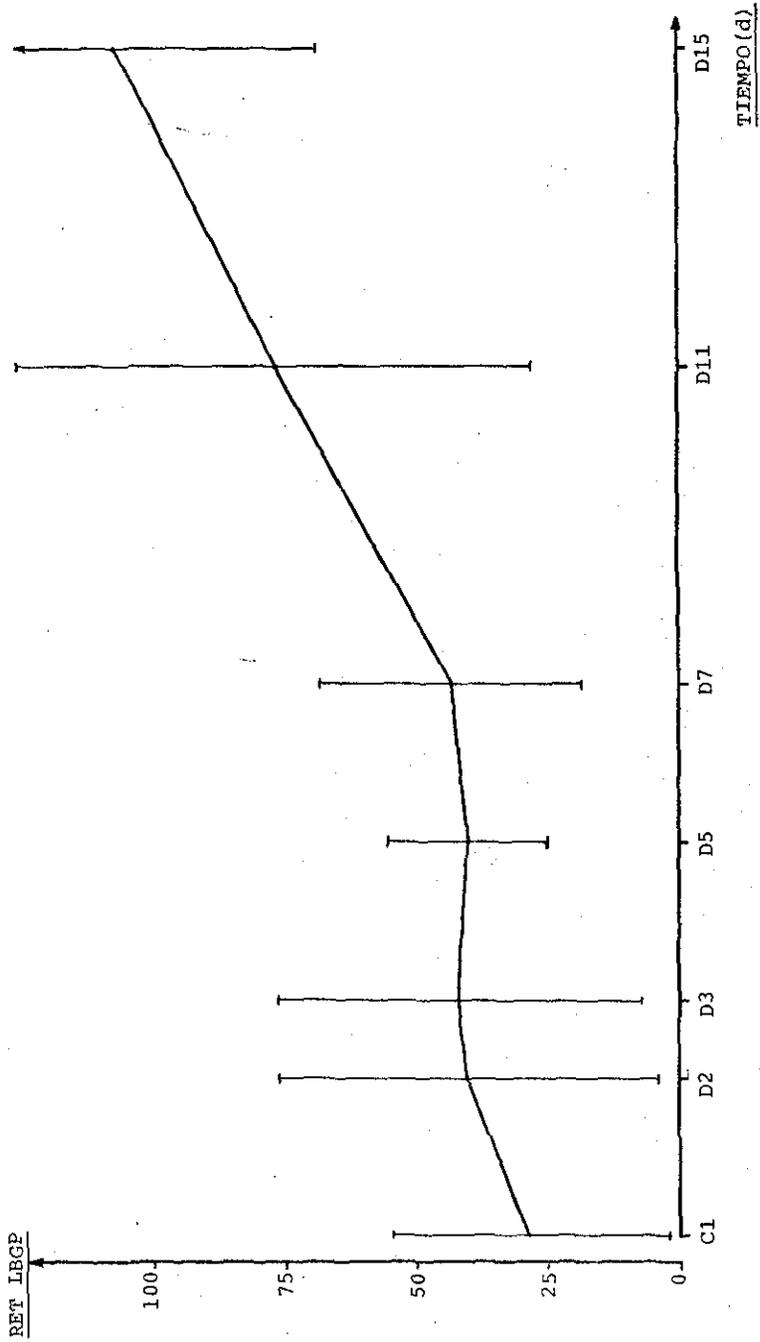


FIGURA # 11: Indices de retención, calculados a partir de IBGP(RET LBGP), a las 6 horas, en relación al tiempo (en días) transcurrido desde la infección con el virus de la enfermedad de Aujeszky. (Media \pm Desviación Estandar)

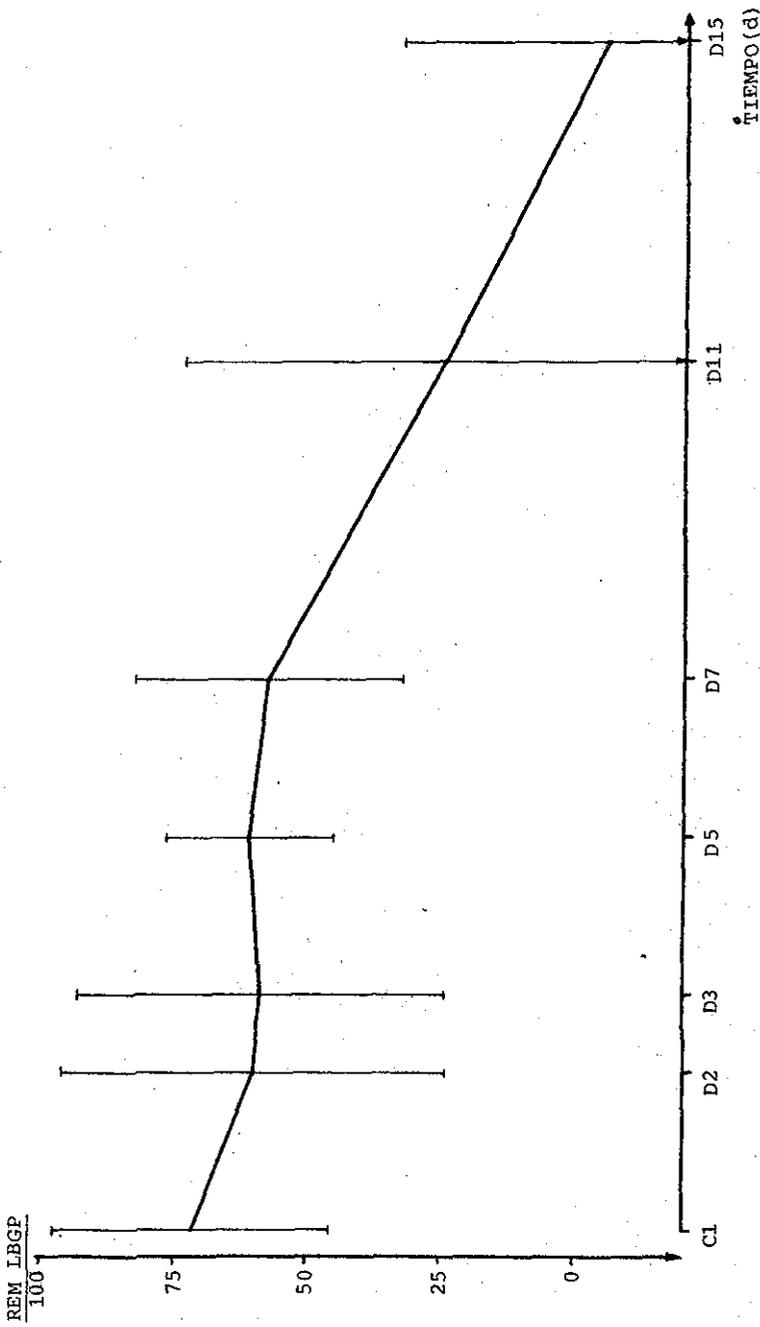


FIGURA # 12: Indices de remoción a las 6 horas, calculados a partir de LBGP (REM LBGP), en relación al tiempo (en días) posinfección con el virus de la enfermedad de Aujeszky. (Media ± Desviación Estandar)

C-1*	D-2**	D-3	D-5	D-7	D-11	D-15
2.014*10 ⁹	1.822*10 ⁹	3.836*10 ⁹	1.989*10 ⁹	3.470*10 ⁸	4.086*10 ⁹	1.299*10 ⁹

CUADRO # 25: Concentración (UFP/ml) de P.multocida VC-Cap en los diferentes inóculos utilizados a lo largo del experimento dirigido a determinar el efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción pulmonar, en ratones, de Pasteurella multocida VC-Cap.

* = Control 1.

** = Días posinfección con el virus de la enfermedad de Aujeszky.

TRAT.	h		BP	LBP	BGP	LBGP	BGR	LBGR
C-1*	0	\bar{x}	$4.261 \cdot 10^5$	5.625	$4.027 \cdot 10^6$	6.597	$2.933 \cdot 10^4$	4.462
		$\pm DE$	$0.710 \cdot 10^5$	0.072	$0.882 \cdot 10^6$	0.098	$0.511 \cdot 10^4$	0.078
C-1*	6	\bar{x}	$0.919 \cdot 10^5$	4.849	$0.944 \cdot 10^6$	5.821	$0.692 \cdot 10^4$	3.708
		$\pm DE$	$0.768 \cdot 10^5$	0.361	$0.899 \cdot 10^6$	0.423	$0.612 \cdot 10^4$	0.392
D-2	0	\bar{x}	$2.441 \cdot 10^5$	5.383	$2.233 \cdot 10^6$	6.347	$1.585 \cdot 10^4$	4.197
		$\pm DE$	$0.186 \cdot 10^5$	0.034	$0.246 \cdot 10^6$	0.046	$0.201 \cdot 10^4$	0.057
D-2	6	\bar{x}	$0.856 \cdot 10^5$	4.723	$0.786 \cdot 10^6$	5.663	$0.580 \cdot 10^4$	3.542
		$\pm DE$	$0.752 \cdot 10^5$	0.568	$0.748 \cdot 10^6$	0.593	$0.522 \cdot 10^4$	0.588
D-3	0	\bar{x}	$4.090 \cdot 10^5$	5.609	$3.993 \cdot 10^6$	6.598	$2.990 \cdot 10^4$	4.469
		$\pm DE$	$0.538 \cdot 10^5$	0.061	$0.524 \cdot 10^6$	0.059	$0.638 \cdot 10^4$	0.090
D-3	6	\bar{x}	$1.888 \cdot 10^5$	5.043	$1.436 \cdot 10^6$	5.907	$1.157 \cdot 10^4$	3.838
		$\pm DE$	$1.611 \cdot 10^5$	0.644	$1.276 \cdot 10^6$	0.662	$1.012 \cdot 10^4$	0.613
D-5	0	\bar{x}	$1.564 \cdot 10^5$	5.188	$1.302 \cdot 10^6$	6.110	$0.939 \cdot 10^4$	3.966
		$\pm DE$	$0.308 \cdot 10^5$	0.083	$0.227 \cdot 10^6$	0.076	$0.192 \cdot 10^4$	0.089
D-5	6	\bar{x}	$0.506 \cdot 10^5$	4.680	$0.420 \cdot 10^6$	5.594	$0.316 \cdot 10^4$	3.473
		$\pm DE$	$0.179 \cdot 10^5$	0.173	$0.175 \cdot 10^6$	0.189	$0.129 \cdot 10^4$	0.176
D-7	0	\bar{x}	$1.132 \cdot 10^5$	5.041	$0.842 \cdot 10^6$	5.922	$0.565 \cdot 10^4$	3.748
		$\pm DE$	$0.332 \cdot 10^5$	0.122	$0.132 \cdot 10^6$	0.070	$0.095 \cdot 10^4$	0.071
D-7	6	\bar{x}	$0.418 \cdot 10^5$	4.578	$0.306 \cdot 10^6$	5.426	$0.219 \cdot 10^4$	3.285
		$\pm DE$	$0.220 \cdot 10^5$	0.222	$0.199 \cdot 10^6$	0.256	$0.135 \cdot 10^4$	0.249
D-11	0	\bar{x}	$2.406 \cdot 10^5$	5.375	$2.131 \cdot 10^6$	6.325	$1.504 \cdot 10^4$	4.172
		$\pm DE$	$0.490 \cdot 10^5$	0.083	$0.320 \cdot 10^6$	0.061	$0.267 \cdot 10^4$	0.072
D-11	6	\bar{x}	$2.560 \cdot 10^5$	5.282	$1.703 \cdot 10^6$	6.108	$1.215 \cdot 10^4$	3.975
		$\pm DE$	$2.009 \cdot 10^5$	0.400	$1.292 \cdot 10^6$	0.396	$0.883 \cdot 10^4$	0.371
D-15	0	\bar{x}	$7.317 \cdot 10^5$	5.847	$4.065 \cdot 10^6$	6.592	$2.825 \cdot 10^4$	4.434
		$\pm DE$	$2.376 \cdot 10^5$	0.153	$1.321 \cdot 10^6$	0.153	$0.941 \cdot 10^4$	0.153
D-15	6	\bar{x}	$7.698 \cdot 10^5$	5.852	$4.970 \cdot 10^6$	6.638	$3.467 \cdot 10^4$	4.482
		$\pm DE$	$3.119 \cdot 10^5$	0.214	$2.548 \cdot 10^6$	0.280	$1.797 \cdot 10^4$	0.278

CUADRO # 26: Medias(\bar{x}) y desviaciones estandar(DE) de las UFC por pulmón(BP), gramo de pulmón(BGP), gramo de ratón(BGR) y sus transformaciones logarítmicas(LBP, LBGP y LBGR), a diferentes días posinoculación del virus de Aujeszky(Tratamiento); inmediatamente después del aerosol con P.multocida VC-Cap (0h) y seis horas más tarde (6h).

* = Grupo aerosolizado con PBS -no con virus- tres días antes de la nebulización con P.multocida VC-Cap (Control 1).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F.	p
Modelo	13	8.866	0.682	7.720	$3 \cdot 10^{-7}$
Día	6	5.178	0.863	9.769	$1 \cdot 10^{-6}$
Hora	1	2.456	2.456	27.801	$5 \cdot 10^{-6}$
H*D	6	1.232	0.205	2.324	0.05
Error	41	3.622	0.088		
Total	54	12.488			

CUADRO # 27: Tabla de ANOVA construida a partir de los datos, obtenidos en el experimento para determinar el efecto de el virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de P.multocida VC-Cap, expresados en LBP, para determinar la existencia de un efecto día y/u hora sobre el número de bacterias recuperadas de pulmón.

C1 H0	C1 H6
D2 H0	D2 H6
D3 H0	D3 H6
D5 H0	D5 H6
D7 H0	D7 H6
<hr/>	
D11 H0	D11 H6
<hr/>	
D15 H0	D15 H6

CUADRO # 28: Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para detectar diferencias significativas entre hora. Datos en LBP.

Las barras unen a los grupos entre los que no se dio una diferencia estadísticamente significativa.

0 Horas: D7 D2 D5 D11 C1 D3 D15

6 Horas: D2 D5 D7 C1 D3 D11 D15

CUADRO # 29: Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para detectar diferencias significativas entre día. Datos en LBP.

Las barras unen a los grupos entre los que no se dio una diferencia estadísticamente significativa.

TRAT.	RET BP		REM LBP		RET BGP		REM BGP		RET BGR		REM BGR		RET LBGR		REM LBGR	
	\bar{x}	$\pm DE$														
C-1	21.57	18.01	78.43	18.20	21.79	18.20	23.45	22.33	76.55	22.33	23.88	22.75	76.12	20.88	23.61	21.14
D-2	35.06	30.83	64.94	30.87	35.10	30.87	35.21	33.51	64.79	33.66	35.36	33.66	64.64	32.95	36.58	33.18
D-3	46.17	39.39	53.83	39.64	46.46	39.64	35.95	31.96	64.05	32.20	36.23	32.20	63.77	33.85	38.71	34.37
D-5	32.34	11.42	67.66	11.59	32.81	11.59	32.28	13.47	67.72	13.47	32.63	13.62	67.37	13.70	33.65	13.91
D-7	36.90	19.40	63.10	19.98	38.01	19.98	36.37	23.59	63.63	23.59	36.67	23.78	63.33	23.83	38.77	24.06
D-11	106.41	83.50	-6.41	84.72	107.96	84.72	-7.96	60.64	20.10	61.14	80.56	61.14	19.44	58.74	80.77	59.45
D-15	105.20	42.62	-5.20	44.36	109.48	44.36	-9.48	62.68	-22.26	65.20	127.16	65.20	-27.16	63.61	122.71	66.15

CUADRO # 30: Medias (\bar{x}) y desviaciones estandar (DE) de los índices de remoción (REM) y retención (RET) pulmonares de P.multocida VC-Cap, a las 6 horas, para los diferentes tratamientos (días posinfección con virus de Aujeszky), calculados a partir de BP, BGP, BGR y sus transformaciones logarítmicas (LBP, LBGP y LBGR).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Día	6	32479.11	5413.19	3.023	0.027
Error	21	37602.06	1790.57		
Total	27	70081.17			

C1 D2 D5 D7 D3 D11 D15

CUADRO # 31: Tabla de ANOVA construida a partir de los datos, obtenidos en el experimento para determinar el efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de P.multocida VC-Cap, expresados en forma de RET LBP y REM LBP, para determinar la existencia de un efecto de día sobre los índices mencionados.

En la parte inferior se muestran los resultados de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) realizada con los datos del ANOVA anterior.

Las barras unen a los grupos entre los que no existió una diferencia significativa.

TRAT.	REMT* BP		RETT LBP		REMT BGP		RETT LBGP		REMT BGR		RETT LBGR	
	REMT* BP	RETT LBP	REMT BGP	RETT LBGP	REMT BGR	RETT LBGP	REMT BGR	RETT LBGR	REMT BGR	RETT LBGR	REMT BGR	RETT LBGR
C-1	\bar{x}	73.63	26.63	73.37	28.21	71.78	28.68	71.32	28.56	71.44	28.88	71.12
	$\pm DE$	21.17	21.36	21.36	25.66	25.66	26.05	26.05	24.14	24.14	24.39	24.39
D-2	\bar{x}	59.49	40.55	59.45	40.18	59.82	40.33	59.67	41.82	58.18	42.06	57.94
	$\pm DE$	33.92	33.95	33.95	35.95	35.95	36.06	36.06	35.55	35.55	35.73	35.73
D-3	\bar{x}	49.21	51.03	48.93	41.30	58.70	41.56	58.44	43.98	56.02	44.53	55.47
	$\pm DE$	39.25	39.41	39.41	34.49	34.49	34.69	34.69	35.92	35.92	36.32	36.32
D-5	\bar{x}	60.50	40.03	59.97	39.30	60.70	39.68	60.32	40.84	59.16	41.42	58.58
	$\pm DE$	13.22	13.37	13.37	15.33	15.33	15.45	15.45	15.37	15.37	15.56	15.56
D-7	\bar{x}	56.03	45.13	54.87	42.86	57.14	43.16	56.84	45.47	54.53	45.84	54.16
	$\pm DE$	20.95	21.39	21.39	24.73	24.73	24.86	24.86	24.71	24.71	24.86	24.86
D-11	\bar{x}	11.03	89.66	10.34	75.84	24.16	76.23	23.77	77.16	22.84	77.75	22.25
	$\pm DE$	51.89	52.00	52.00	48.28	48.28	48.42	48.42	46.19	46.19	46.37	46.37
D-15	\bar{x}	1.13	101.21	-1.21	104.79	-4.79	106.96	-6.96	104.96	-4.96	107.13	-7.13
	$\pm DE$	29.46	29.63	29.63	37.87	37.87	38.00	38.00	37.57	37.57	37.67	37.67

CUADRO # 32: Índices transformados de remoción (REMT) y retención (RETT), a las 6 horas, calculados a partir de los índices de remoción y retención de BP, BGP, BGR y sus transformaciones logarítmicas (LBP, LBGP y LBGR). (Media \pm Desviación Estandar)

*= Índices transformados por arco tangente.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Día	6	18703.99	3117.33	2.957	0.030
Error	21	22140.95	1054.33		
Total	27	40844.94			

C1 D2 D3 D5 D7 D11 D15

CUADRO # 33: Tabla de ANOVA construida a partir de los datos, obtenidos en el experimento para determinar el efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de *P.multocida* VC-Cap, expresados en forma de RETT LBP y REMT LBP, para determinar la existencia de un efecto de día sobre los índices mencionados.

En la parte inferior se muestran los resultados de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) realizada con los datos del ANOVA superior.

Las barras unen a los grupos entre los que no se produjo una diferencia significativa.

7. Mortalidad en ratones aerosolizados con virus de la enfermedad de Aujeszky y P.multocida

Ninguno de los cuatro ratones aerosolizados únicamente con virus murió en el plazo de 15 días que duró el experimento.

En el grupo aerosolizado con Pasteurella sólo se produjo un 50% de mortalidad, sucumbiendo los dos animales a las 82 y 84 horas del aerosol bacteriano.

Un hecho similar ocurrió con el grupo D-2 -aerosolizado con bacterias dos días después de la nebulización con virus- si bien las muertes ocurrieron en este caso a las 38 y 302 horas del último aerosol.

En el resto de grupos (D-3, D-7 y D-11) murieron el 100% de los animales. En el grupo D-3 en un promedio de 49.63 ± 17.5 horas, en el D-7 con 76.5 ± 43.6 horas y en el D-11 con una media de 65.88 horas y una desviación estandar de 34.2 horas.

Como se puede ver existió una notable diferencia entre grupos si tenemos en cuenta el porcentaje de muertes en cada uno de ellos. Esto, por otro lado, dificultó el análisis estadístico de los resultados, prefiriendo representar éstos (figura # 13) en una gráfica de porcentaje de supervivientes en relación al tiempo transcurrido a partir del último aerosol al que se sometieron los animales del grupo. No obstante lo dicho anteriormente, el ANOVA de los grupos D-3, D-7 y D-11 arrojó un resultado no significativo ($p=0.545$) por lo que se aceptó la hipótesis nula planteada de no diferencias entre los tiempos de muerte de estos tres grupos.

Las diferentes horas a las que sobrevino la muerte de cada uno de los ratones pueden verse en el cuadro # 34.

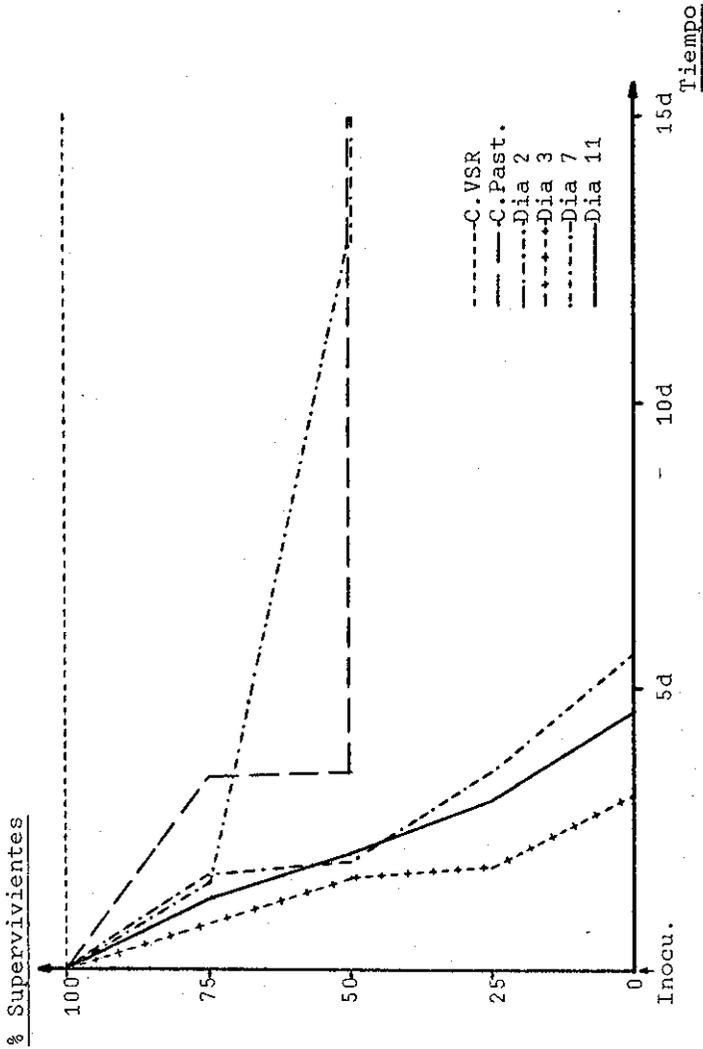


FIGURA # 13: Estudio de la mortalidad, en ratones, al combinar un aerosol de Aujeszky con, a diferentes intervalos, un aerosol de P.multocida VC.Cap. El aerosol de Pasteurella se realizó a los 2, 3, 7 y 11 días del aerosol que contenía virus de Aujeszky.

TRATAMIENTO	RATON	TIEMPO DE MUERTE
CV	1	360*
	2	360*
	3	360*
	4	360*
CP	1	82
	2	84
	3	360*
	4	360*
D2	1	38
	2	302
	3	360*
	4	360*
D3	1	38
	2	40
	3	45
	4	75.5
D7	1	39.5
	2	46.5
	3	85.5
	4	134.5
D11	1	31
	2	49
	3	73.5
	4	110

CUADRO # 34: Estudio de mortalidad. Tiempo de muerte de cada uno de los ratones del experimento, contado a partir del último aerosol al que fueron sometidos los animales de cada uno de los diferentes grupos. (CV= aerosolizados sólo con virus; CP= aerosolizado sólo con Pasteurella; D2, D3, D7 y D11= aerosolizados con virus y, a los días que da nombre al grupo, con P.multocida VC-Cap.)

*= Animales sacrificados a los 15 días del último aerosol al que se sometió el grupo.

8. Estudio histopatológico de la interacción entre virus de la enfermedad de Aujeszky y P.multocida

Como dijimos en el apartado correspondiente de material y métodos, el análisis histológico se realizó sobre los pulmones obtenidos de los ratones utilizados para el estudio de tiempo de muerte y de los ratones empleados únicamente para este menester.

Las puntuaciones de cada uno de los pulmones se detallan en el cuadro # 35 (ratones empleados en tiempo de muerte) y en el cuadro # 36 (ratones utilizados para, únicamente, el estudio histopatológico). El motivo de procesar los resultados por separado estriba en el hecho de que mientras los ratones de los grupos de "anatomía patológica" fueron sacrificados a las 0 y 48 horas del aerosol bacteriano, los ratones de los grupos de "tiempo de muerte" se procesaron al sobrevenir ésta o bien 15 días después del último aerosol.

El análisis de varianza de los resultados obtenidos de los ratones de "tiempo de muerte" (cuadro # 37) mostró la existencia de un efecto de tratamiento ($p=0.005$) sobre el grado de lesión. La prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) permitió concluir que entre los grupos CV -control de virus- y D2 no hubo una diferencia estadísticamente significativa; que entre CP -control de Pasteu-rella-, D3, D7 y D11 tampoco existió una diferencia significativa y que ambos bloques fueron diferentes entre sí (cuadro # 38). Debemos remarcar en este momento que del grupo CP sólo se analizaron dos de los cuatro ratones, pues los pulmones de los dos animales que fueron sacrificados a los 15 días del aerosol se perdieron; estos dos ratones faltantes se puede suponer que habrían arrojado un grado de lesión más bajo que el de los otros

dos, lo que habría supuesto una disminución del grado de lesión medio del grupo. Así las cosas, y de haber arrojado dichos ratones un resultado similar a los dos últimos del grupo D2 -animales sacrificados igualmente a los 15 días- el grupo CP no se habría diferenciado de D2 y habría sido diferente a D3, D7 y D11.

La figura # 14 muestra el histograma de barras, con las medias del grado de lesión, para cada uno de los diferentes tratamientos del grupo de ratones de "tiempo de muerte".

El ANOVA de los resultados obtenidos con los ratones de "anatomía patológica" (cuadro # 39) no logró detectar una diferencia entre tratamientos ($p=0.253$), ni entre hora ($p=0.132$), pero mostró una notable diferencia en cuanto al tipo de lesión ($p=0.008$). Por este último resultado se efectuaron análisis de varianza para cada tipo de lesión por separado (cuadro # 40), de los que se dedujo que el grado de alveolitis y perivascularitis no tuvo relación con tratamiento ni con hora. Sin embargo, el grado de pleuritis fue dependiente del tratamiento ($p=0.019$) y de la hora ($p=0.011$), con una interacción significativa entre ambos ($p=0.019$). Los resultados de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) se muestran en el cuadro # 41.

En la figura # 15 se han representado, en histograma de barras, los grados medios de lesión para cada tratamiento, tanto a las 0 horas y a las 48 horas.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

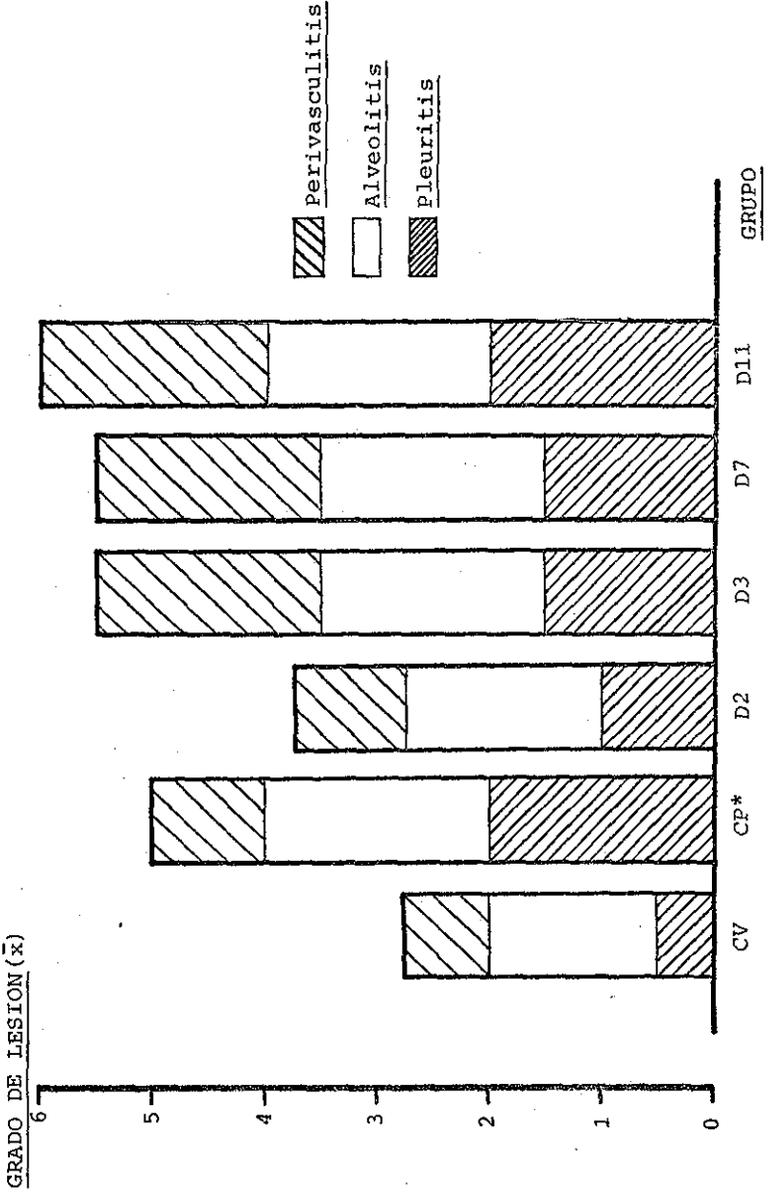


FIGURA # 14: Grado y tipo de lesión (de 0 a 2) anatomopatológica de cada uno de los grupos de animales empleados para el experimento de tiempo de muerte. (4 ratones/grupo)
 * = Grupo formado por sólo los dos ratones que murieron antes de los 15 días.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

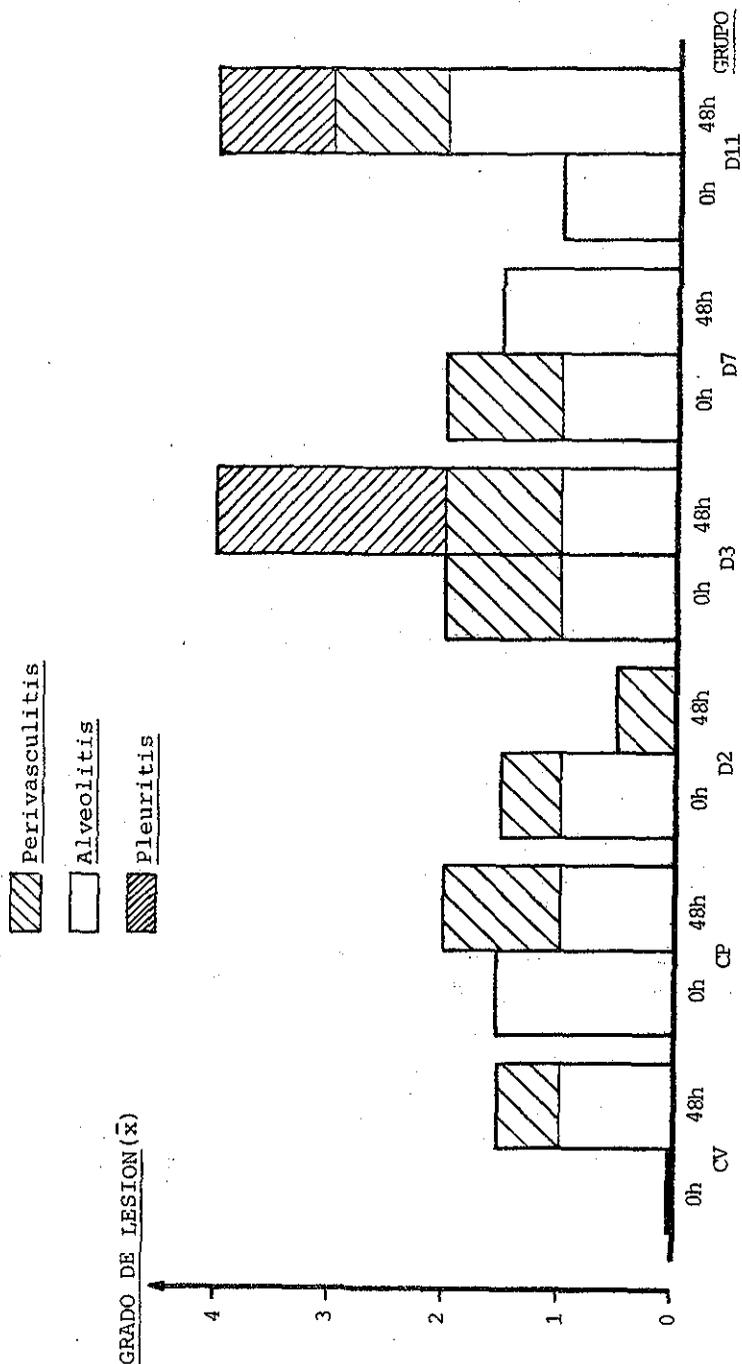


FIGURA # 15: Grado y tipo de lesión anatomopatológica media (de 0 a 2) de cada uno de los grupos de animales de "anatomía patológica" y su relación con la hora de sacrificio, con tuda a partir del aerosol con P.multocida VC-Cap. (2 ratones/grupo y hora)

GRUPO	RATON	PLE	ALV	PER	OTRAS LESIONES
CV	1	0	0	1	H(2), E(2)
	2	0	2	0	
	3	2	2	2	H(2), E(1)
	4	0	2	0	E(1)
CP	1	2	2	2	H(2)
	2	2	2	0	H(2), E(2)
	3*				
	4*				
D2	1	2	2	2	H(2), E(2), B(2)
	2	0	2	0	H(2)
	3	0	1	0	H(1)
	4	2	2	2	H(2), B(2)
D3	1	0	2	2	H(2), E(1)
	2	2	2	2	H(2)
	3	2	2	2	H(2), E(1)
	4	2	2	2	H(2), E(2)
D7	1	2	2	2	H(2), E(1)
	2	2	2	2	H(2)
	3	0	2	2	H(2), E(2)
	4	2	2	2	H(2), E(1)
D11	1	2	2	2	H(2)
	2	2	2	2	H(2), E(2)
	3	2	2	2	H(2), E(2)
	4	2	2	2	H(2), E(2)

CUADRO # 35: Resultados del grado de lesión microscópica de cada uno de los ratones utilizados en el estudio de tiempo de muerte. (Grado de lesión= 0, 1 ó 2)

PLE= Pleuritis.

ALV= Alveolitis.

PER= Perivascularitis.

H= Hemorragia.

E= Edema.

B= Bronquitis o peribronquitis.

*= Se perdió la muestra pulmonar.

GRUPO	HORA	RATON	PLE	ALV	PER	OTRAS LESIONES
CV	0	1	0	0	0	H(1), E(1)
		2	0	0	0	
CV	48	1	0	0	0	H(2), E(1)
		2	0	2	1	
CP	0	1	0	2	0	H(2)
		2	0	1	0	H(2), E(1)
CP	48	1	0	0	2	H(2)
		2	0	2	0	E(2)
D2	0	1	0	0	0	H(2), E(1)
		2	0	2	1	
D2	48	1	0	0	0	E(1)
		2	0	0	1	H(1)
D3	0	1	0	2	2	
		2	0	0	0	H(1), E(1)
D3	48	1	2	2	2	H(2), B(2)
		2	2	0	0	H(2)
D7	0	1	0	2	1	H(1), E(2)
		2	0	1	0	H(1)
D7	48	1	0	1	0	
		2	0	2	0	E(2)
D11	0	1	0	0	0	H(2), E(1)
		2	0	2	0	H(2), E(2)
D11	48	1	2	2	2	H(1)
		2	0	2	0	H(2), E(2)

CUADRO # 36: Resultados del grado de lesión microscópica y su relación con el tiempo transcurrido entre el aerosol vírico y bacteriano (grupo) y con el tiempo de sacrificio tras el último aerosol al que se enfrentaron los animales del grupo (hora).

Las diferentes abreviaturas representan lo mismo que en el cuadro anterior.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Modelo	17	16.62	0.978	1.840	0.050
Día	5	10.29	2.058	3.873	0.005
Lesión	2	2.94	1.470	2.766	0.073
D x L	10	3.39	0.339	0.639	0.773
Error	48	25.50	0.531		
Total	65	42.12			

CUADRO # 37: Tabla de ANOVA para el grado de lesión de los ratones de "tiempo de muerte". El análisis se realizó atendiendo tan solo a los grados de pleuritis, alveolitis y perivasculitis.

CV D2 CP D3 D7 D11

CUADRO # 38: Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$), para determinar diferencias entre grupos, realizada con los resultados de el ANOVA del cuadro # 37.

Las barras unen a los grupos entre los que no se dio una diferencia significativa.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Modelo	35	27.82	0.795	1.122	0.366
Día	5	4.90	0.981	1.384	0.253
Hora	1	1.68	1.681	2.373	0.132
Lesión	2	7.86	3.931	5.549	0.008
D x H	5	3.90	0.781	1.102	0.376
D x L	10	4.31	0.431	0.608	0.797
H x L	2	0.53	0.264	0.373	0.692
DxHxL	10	4.64	0.464	0.655	0.757
Error	36	25.50	0.708		
Total	71	53.32			

CUADRO # 39: Tabla de ANOVA para el grado de lesión de los ratones de "anatomía patológica". El análisis se efectuó atendiendo sólo al grado de pleuritis, al veolitis y perivasculitis.

PLEURITIS

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Modelo	11	8.500	0.773	4.636	0.007
Día	5	3.500	0.700	4.200	0.019
Hora	1	1.500	1.500	9.000	0.011
D x H	5	3.500	0.700	4.200	0.019
Error	12	2.000	0.167		
Total	23	10.500			

ALVEOLITIS

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Modelo	11	7.458	0.678	0.603	0.795
Día	5	4.208	0.842	0.748	0.603
Hora	1	0.042	0.042	0.037	0.851
D x H	5	3.208	0.642	0.570	0.722
Error	12	13.500	1.125		
Total	23	20.958			

PERIVASCULITIS

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Modelo	11	4.000	0.364	0.436	0.910
Día	5	1.500	0.300	0.360	0.866
Hora	1	0.667	0.667	0.800	0.389
D x H	5	1.833	0.367	0.440	0.812
Error	12	10.000	0.833		
Total	23	14.000			

CUADRO # 40: Tablas de ANOVA para el grado de lesión de los ratones de "anatomía patológica" tras desdoblarse el tipo de lesión.

(a)	CV	CP	D2	D3	D7	D11
(b)	CV	CP	D2	D7	D3	D11
(c)	CV H0	CV H48				
	CP H0	CP H48				
	D2 H0	D2 H48				
	D3 H0	D3 H48				
	D7 H0	D7 H48				
	D11 H0	D11 H48				

CUADRO # 41: Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$), realizada con los resultados del ANOVA de Pleuritis del cuadro # 41, para determinar las diferencias entre grupos a las 0 horas (a) y a las 48 horas (b), y para determinar la diferencia entre hora en los diferentes grupos (c).

Las barras unen a los grupos entre los que no se produjo una diferencia significativa.

9. Otros resultados

9.1. Relación entre peso de pulmón y peso de ratón

Con los 39 ratones de los diferentes grupos control, y con los de las 0 horas del último de los experimentos, se construyó la recta de regresión lineal entre peso de pulmón y peso de ratón (figura # 16). La ecuación de esta recta fue:

$$\text{Peso de pulmón} = 0.017 + (0.006 \times \text{Peso de ratón})$$

con un coeficiente de correlación de 0.92. Altamente significativo pues dio un valor de t calculada de 14.32 ($p < 0.001$).

El intervalo de confianza, al 99%, para el peso de pulmón resultó ser de ± 0.027 gramos.

Tanto la recta, como el intervalo de confianza antedicho, se encuentran graficados en la figura # 16.

9.2. Relación entre la concentración del aerosol bacteriano y el depósito de bacterias en el pulmón

Para el estudio de esta relación se tuvieron en cuenta los diferentes inóculos utilizados (transformados logarítmicamente) y la cantidad de bacterias, a las 0 horas, de los diferentes grupos de ratones y expresada en forma de LBGP.

La ecuación de la recta fue:

$$\text{LBGP} = (-1.138) + (0.805 \times \log \text{UFC/ml del aerosol})$$

con un coeficiente de correlación ($r=0.903$) altamente significativo, $t=12.78$ ($p < 0.001$).

El intervalo de confianza, al 95%, para LBGP fue de ± 0.566 .

En la gráfica # 17 se representó la recta con el mencionado intervalo de confianza.

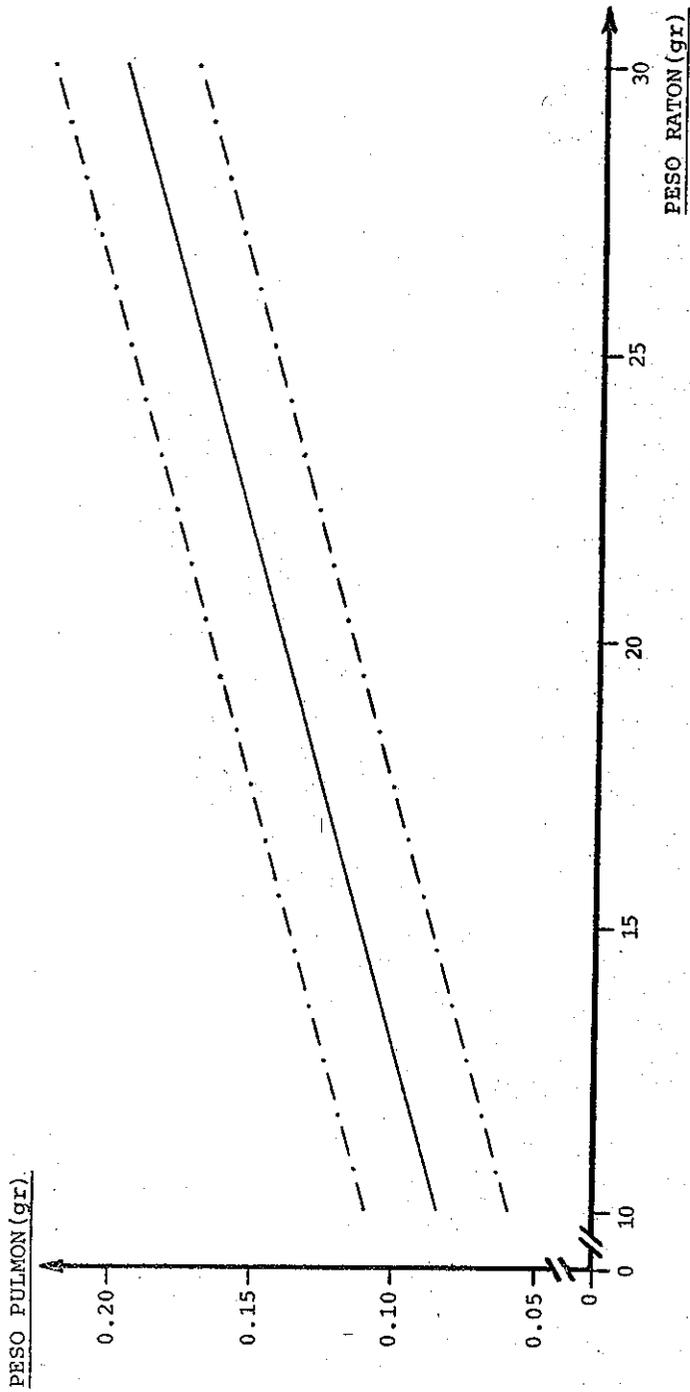


FIGURA # 16: Recta de regresión lineal (con un 99% de confianza) en la que se muestra la relación existente entre el peso del pulmón y el peso del ratón. (Recta construida con los datos de 39 ratones).

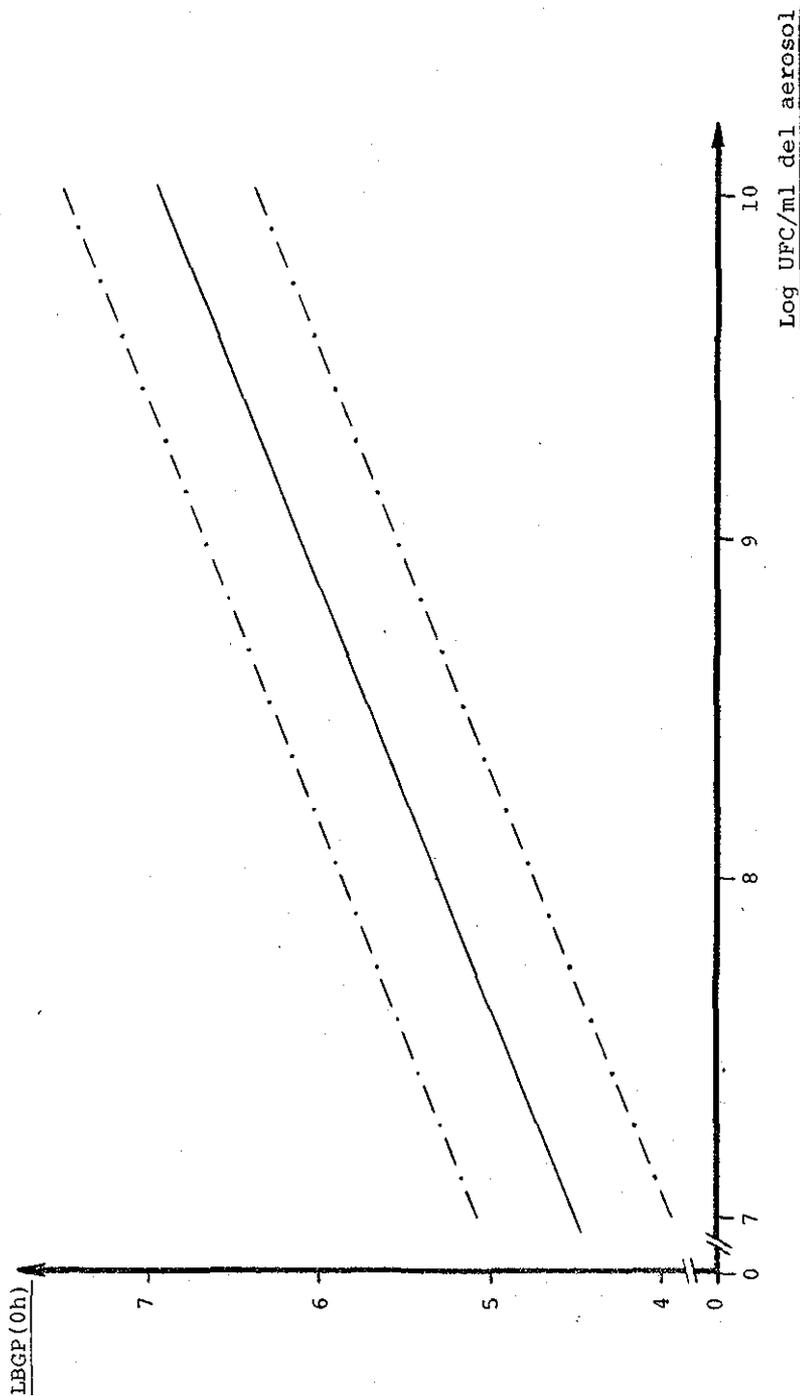


FIGURA # 17: Recta de regresión (con 95% de confianza) en la que se muestra la relación existente entre la cantidad de bacterias en el aerosol (transformada a logaritmos en base 10 -Log UFC/ml-) y la cantidad de bacterias depositadas tras 15 minutos de aerosolización (expresada en LBCP). Las LBCP tomadas en cuenta para este análisis son las resultantes del grupo de ratones sacrificados inmediatamente después del aerosol bacteriano.

9.3. Estudio del peso pulmonar de los ratones utilizados en el experimento para determinar el efecto del virus de la enfermedad de Aujeszky sobre la remoción de P.multocida

Para completar la exposición de resultados obtenidos, queremos resaltar un fenómeno curioso detectado al efectuar el análisis de las variaciones en el peso pulmonar de los ratones utilizados en el último de los experimentos.

En el cuadro G-1 se muestran las variaciones, en peso de pulmón, tomadas como la diferencia entre la relación, en tantos por 1000 de peso corporal, del peso obtenido y el peso esperado; este último calculado a partir de la recta obtenida previamente (vease apartado 9.1. de la presente exposición de resultados).

La formula utilizada para el cálculo fue la siguiente:

$$DPP = \frac{PPO - PPE}{PR} \times 1000$$

donde: DPP= Diferencia entre la relación observada y esperada.

PPO= Peso del pulmón observado.

PPE= Peso del pulmón esperado.

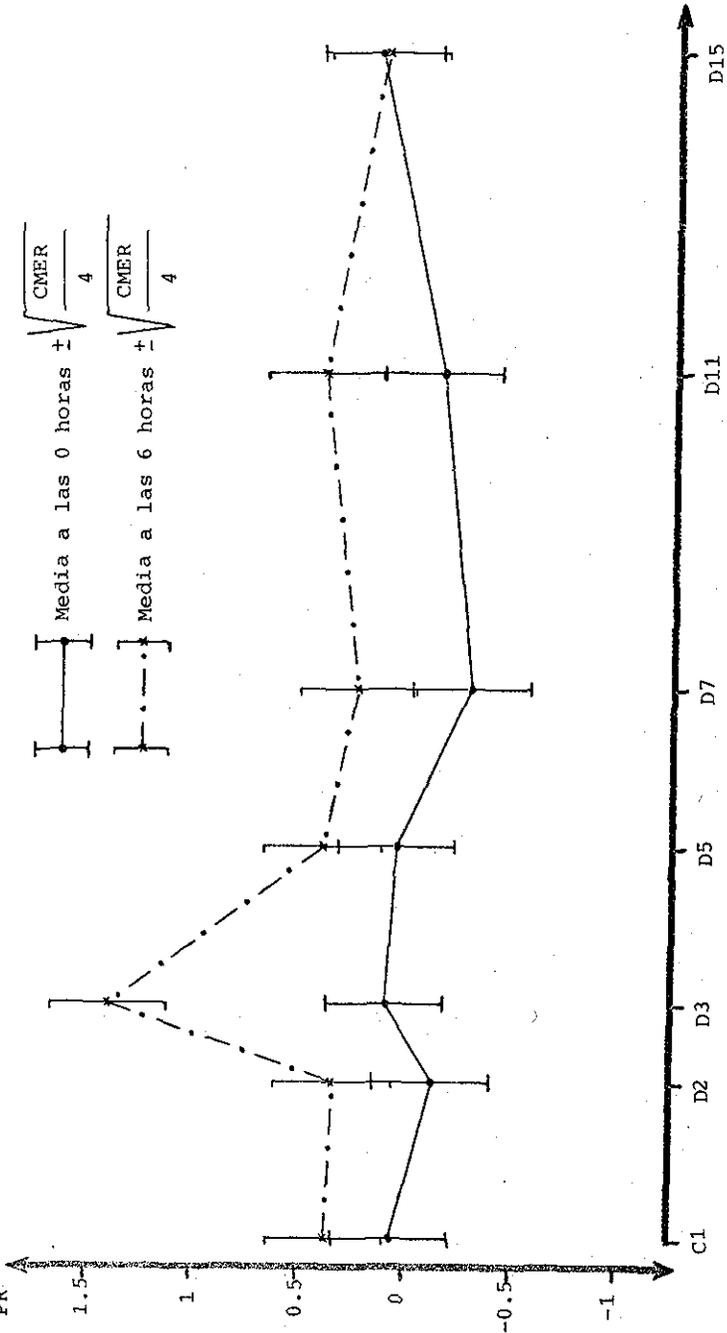
PR = Peso del ratón.

El ANOVA de estos resultados mostró la existencia de un efecto de hora altamente significativo ($p = 0.001$), como puede verse en el cuadro # 42. Debido, como lo demuestra la prueba de Duncan pertinente con $\alpha = 0.05$ (cuadro # 43), a una diferencia del grupo de ratones del día 3 y sacrificado seis horas después del aerosol bacteriano, con el resto de los grupos.

La figura # 18 muestra los valores medios, para cada uno de los días y horas, de DPP junto con el error estandar (raiz cuadrada del CMER -cuadrado medio del error- entre 2). En ésta se puede observar que la DPP a las 6 horas fue siempre mayor

que la DPP a las 0 horas, diferencia estadísticamente no signifi
cativa salvo para el día 3.

$\frac{PPO-PPE}{PR} \times 1000$



TIEMPO (d)

FIGURA # 18: Efecto del tiempo de infección con virus de Aujeszky sobre la relación entre el peso del pulmón/peso del ratón, observada y esperada, en los grupos de ratones sacrificados inmediatamente después del aerosol bacteriado (línea continua) y en los sacrificados 6 horas más tarde del mismo (línea discontinua). (Media ± Error Estandar)

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	P
Modelo	13	8.225	0.633	2.213	0.027
Día	6	2.915	0.486	1.699	0.146
Hora	1	3.450	3.450	12.065	0.001
D x H	6	1.861	0.310	1.085	0.387
Error	41	11.724	0.286		
Total	54	19.949			

CUADRO # 42: Tabla de ANOVA para ver el efecto de día y hora sobre la relación entre peso de pulmón observado y peso de pulmón esperado.

(a) C1 D2 D3 D5 D7 D11 D15

(b) C1 D2 D5 D7 D11 D15 D3

(c) C1 0h C1 6h

D2 0h D2 6h

D3 0h D3 6h

D5 0h D5 6h

D7 0h D7 6h

D11 0h D11 6h

D15 0h D15 6h

CUADRO # 43: Prueba de Duncan ($\alpha=0.05$), realizada con los resultados del ANOVA anterior, para determinar las diferencias entre tratamientos a las 0 horas (a) y a las 6 horas (b), y para determinar la diferencia entre hora en los diferentes tratamientos.

Las barras unen a los grupos entre los que no existió una diferencia significativa.

V DISCUSION Y CONCLUSIONES

La prueba de inmunodifusión, por los trabajos realizados por Gutekunst y cols. (1978), Gutekunst y Pirtle (1979), Pirtle (1982) y Kelling y cols. (1982), ha demostrado ser una técnica muy satisfactoria para la detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky. Por ello, y por la rapidez de la técnica, decidimos implementar la contraimmunoelectroforesis (IEOP) para el estudio de los sueros obtenidos en rastreo.

De las diferentes pruebas realizadas para encontrar las condiciones óptimas de la IEOP, concluimos que la agarosa al 0.65%, al emplearse como agente gelificante, resultó ser más satisfactoria que el agar Noble al 1%. Este resultado es concordante con lo publicado por Gutekunst y cols (1978) para la detección, por microinmunodifusión, de anticuerpos séricos contra el virus de pseudorrabia. Y siendo consecuente también con una de las características propias de la prueba, según la cual la agaropectina del agar Noble influye negativamente en la resolución de la prueba.

La combinación de soluciones tampón que arrojó mejores resultados fue aquella en la que el tampón # 1 se puso en la cámara de electroforesis y el tampón # 2 en el gel. Ello concuerda con lo publicado para el virus de Peste Porcina Africana por Pan y cols. (1972), pero no con lo concluido por Papp-Vid y Dulac (1979) para el virus de pseudorrabia.

La distancia, entre bordes de pocillo, con bandas más intensas y claras, fue la de 5 mm, coincidente con lo publicado por Papp-Vid y Dulac en 1979.

En cuanto al tiempo de corrida, y si bien tras 60 minutos las líneas de precipitación se habían formado completamente, se

prefirió, por motivos de seguridad, prolongar la duración de la prueba hasta los 90 minutos.

En cuanto al tipo de antígeno a emplear, el número 1 (Ag 1 o Ag extraído con Tween 80) resultó ligeramente mejor que el número 3 (Ag 3 o Ag de sulfato de amonio); ya que, mientras el Ag 1 produjo bandas de precipitación hasta la dilución 1:8, el Ag 3 sólo lo hizo hasta la dilución 1:4. En adición a lo anterior, el Ag 1 detectó, consistentemente, diluciones más altas del suero control positivo (cuadro # 2).

La prueba se consideró específica por las reiterativas reacciones negativas al enfrentar los antígenos negativos (Ag 2 y Ag 4) con el suero control positivo, y los antígenos positivos (Ag 1 y Ag 3) con el suero control negativo.

De los 72 pulmones neumónicos analizados en nuestro muestreo, en un 76.4 % se aisló algún tipo de agente bacteriano, siendo negativo el aislamiento en el 23.6 % restante. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Ochoa (1978) en un trabajo similar realizado en México.

Si bien hay concordancia en el porcentaje de aislamientos, nuestros datos difieren de los suyos en el sentido de una incidencia de casi el doble, en comparación con la de este investigador, de pulmones neumónicos con aislamiento positivo de Pasteurella multocida (43.06%); mientras que el de otras bacterias, no pertenecientes al género Pasteurella fue menor (25%), resultando similar el número de Pasteurella haemolytica (8.33%). Estas discrepancias pueden ser debidas a la técnica de aislamiento utilizada por nosotros -inoculación intraperitoneal en ratones- que, como apunta Carter (1978), favorece el aislamiento de este tipo de bacterias.

Por otro lado, el 54.72% de los animales estudiados presentaron anticuerpos, detectables por IEOP, contra el virus de la enfermedad de Aujeszky. Estos resultados fueron coincidentes con lo reportado previamente en la República Mexicana (Medina y Correa, 1977; Orraca, 1978; Mercado y cols., 1982).

Esta serología positiva la consideramos efecto de la puesta en contacto del animal con virus vivo de pseudorrabia. Para ello nos basamos en lo concluido por Mc Ferran y Dow (1973) según los cuales la inmunidad calostrual sólo es efectiva durante "al menos 7 semanas", en lo publicado por Andries y cols. (1978) que concretan la duración de la inmunidad calostrual a 15 semanas, y en lo comunicado por el Dr Morales (comunicación personal) en el sentido de que, en México, no está generalizado el uso de la vacunación contra pseudorrabia para cerdos de engorda.

El aislamiento negativo de virus, a partir de los fragmentos pulmonares cultivados, lo achacamos a las características propias del virus y de la técnica utilizada, que ha resultado no ser siempre efectiva (Alva-Valdes y cols., 1983). Como característica de la familia a la que pertenece, el virus de la enfermedad de Aujeszky (herpes suis tipo I) pasa fácilmente a una fase de latencia, por integración de su ácido nucleico al ADN celular, como lo demuestra Gutekunst (1979) en sus estudios sobre hibridización de ácidos nucleicos.

Kojnok (1965) logra aislar el virus, del tracto respiratorio superior de cerdos aparentemente sanos, cultivando muestras de secreciones nasales, laríngeas y faríngeas, tomadas con escombillón de algodón, en células de riñón de cerdo.

De otro lado Gutekunst (1979), en un interesante estudio, demuestra la integración del ADN viral en el ADN celular, en las células del ganglio trigémino, en cerdos a partir de los cuales

no logró recuperar virus de secreciones nasales, de cultivo de explantes ni por cocultivo de las muestras trigeminales analizadas de forma paralela.

En 1980 Beran y cols., aplicando las técnicas de cocultivo y de cultivo de fragmentos, logran aislamientos virales de cerdos recuperados de la enfermedad, hasta el decimotercer mes pos inoculación con la cepa Iowa del virus de pseudorrabia.

Gutekunst y cols (1980) recuperan el virus, a partir de gán-glio trigémino, de cerdos con bajo título de anticuerpos neutralizantes, tras la inoculación de 200 mg/kg de dexametasona, y aplicando el método de cocultivo. La exaltación de virus latentes por corticoesteroides ha sido demostrada también en IBR, otro miembro de la familia Herpesviridae, (Aguilar-Setien y cols, 1979b).

En la figura # 1 se puede ver claramente que al combinarse los factores Pulmón Neumónico y Serología Positiva, la relación Aislamiento/No aislamiento es máxima (=6.8), y alcanza los niveles mínimos con la combinación Pulmón Normal-Suero Negativo (=0.2). La relación es de casi 1 en Pulmón Neumónico-Suero Negativo (=1.3) y en Pulmón Normal-Suero Positivo (=1.2).

Por todos los resultados anteriores y los resumidos en los cuadros # 3, 4, 5 y 6; así como por las consideraciones previas, hay una razón estadística suficiente ($p < 0.05$) para sospechar relación entre serología positiva al virus de la enfermedad de Aujeszky con el desarrollo de procesos neumónicos en cerdos de engorda, así como entre la serología y el aislamiento bacteriano. Pudiéndose hipotetizar que el virus de pseudorrabia actuaría como agente primario en los procesos neumónicos del cerdo, allanando el camino para que el tracto respiratorio inferior sea colonizado por agentes secundarios de tipo bacteriano, y especialmente P. multocida.

En nuestro estudio, la incidencia de P.multocida tipo capsular D fue mucho mayor (68.42%) que la de P.multocida tipo capsular A (18.42%). Estos resultados no concuerdan con los reportados por otros autores (Lind y cols.,1978; Carter,1955 y 1957; Pijoan y cols.,1983) para muestras del mismo tipo; teniendo la aproximación más cercana en lo publicado por Van H. Meyeringh y cols. (1977) y por De Jong y cols. (1980), los cuales observaron una mayor incidencia del tipo capsular D a partir de muestras nasales de cerdos con rinitis atrófica.

Estos resultados pueden suponer una diferencia de México, con respecto a otros países, en cuanto a la distribución de los diferentes tipos capsulares de P.multocida, o bien una mala interpretación de algunas lecturas por nuestra falta de experiencia con las técnicas de tipificación capsular empleadas; si bien dichas pruebas se repitieron tres veces y siempre, como se dijo en material-métodos, se emplearon cepas control.

En el estudio de patogenicidad para ratón -animal elegido por su disponibilidad, marcada susceptibilidad a diferentes cepas de P.multocida y por presentar cuadros clínicos similares al ser inoculado con bacterias procedentes de aislamientos de diferentes especies (Rimler y Boycott, 1979)- se obtuvieron resultados negativos a la hora de encontrar relación entre el tiempo de muerte y el tipo capsular ($p > 0.75$).

De otro lado, se observaron notables diferencias, en cuanto a la patogenicidad, entre bacterias con el mismo tipo capsular (determinada aquella por el tiempo de muerte tras la inoculación intraperitoneal de una cantidad fija de bacterias), conclusión a la que también arribaron Okerman y cols. (1979) en un trabajo realizado con Pasteurella aisladas de conejo, y Backstrom y cols.

(1982) en casos de rinitis atrófica de cerdos.

Por lo anterior pensamos que posiblemente existan otras características que, por sí solas o en combinación, permitan explicar estas diferencias tan notorias en la patogenicidad (antígenos somáticos, exotoxinas...).

Con los resultados obtenidos del experimento para determinar la curva patrón de la remoción pulmonar de P.multocida se sacaron dos importantes conclusiones.

La primera fue la de que la máxima diferencia entre bacterias inoculadas y recuperadas se produjo con el grupo de las 6 horas. El tratamiento estadístico de los datos (ANOVA y prueba de Duncan) demostró que, entre estas dos horas -0 y 6-, la diferencia fue siempre estadísticamente significativa, sin importar en que unidades viniesen expresados los resultados (cuadros #15, 16, 18 y D2-D7), no ocurriendo lo mismo con el resto de horas estudiadas.

Por otro lado, la varianza del grupo de 6 horas fue mucho menor ($s^2_{BGP}=8.29 \times 10^8$) que la obtenida a las 12 ($s^2_{BGP}=5.97 \times 10^9$), 24 ($s^2_{BGP}=3.44 \times 10^{10}$) y 48 ($s^2_{BGP}=1.48 \times 10^{10}$) horas pos inoculación. La menor varianza del grupo de ratones sacrificado a las 6 horas del aerosol bacteriano, así como el ser el de mayor diferencia con el grupo de las 0 horas, fue un hecho de gran importancia para el procesamiento estadístico de los resultados posteriores, pues el efecto del virus, sobre cada ratón particular, va a suponer un nuevo motivo de variación que, lógicamente, se manifestará en varianzas mayores.

Con todo lo antedicho se pudo determinar, sin género de dudas, cual habría de ser la mejor hora para sacrificar el segundo grupo de ratones con el que se calcularían los índices de remoción y retención.

Como segunda conclusión a la que llegamos con este experimento, fue la del comportamiento peculiar del pulmón murino para remover la P.multocida utilizada para el estudio.

En múltiples reportes de la literatura, el patrón de eliminación bacteriana fue progresivo: "menos bacterias a mayor tiempo transcurrido". A conclusiones de este tipo llegaron Lillie y Thomson (1972) trabajando con Pasteurella haemolytica en ratones y bívinos, Goldstein y Green (1967) con Pasteurella pneumotropica en ratón, Laurenzi y cols. (1963) con Staphylococcus aureus en ratones, Jackson y cols. (1967) con Escherichia coli y Proteus mirabilis en ratones, Jakab (1974) con P.pneumotropica en ratones, Campbell y cols. (1983) con P.haemolytica en ratones y Martínez (1984) con P.haemolytica y S.aureus en ratones.

Jay y cols. (1976), al contrario de los anteriores, observaron un comportamiento anómalo para Klebsiella pneumoniae en ratones, comprobando que no sólo no hubo eliminación de bacterias sí no que hubo una multiplicación activa, detectable, de éstas en el pulmón.

En nuestro experimento observamos una curva (figuras # 2, 3 y 4), a medio camino entre las descritas por esos dos bloques de autores, en la que se aprecia una detención en la velocidad de remoción bacteriana entre las 12 y 48 horas (fase de meseta en la curva). Este efecto se podría explicar por la composición capsular de la bacteria utilizada que impidiese una fagocitosis efectiva de ésta (Maheswaran y Thies, 1979) o porque el microorganismo segregase o liberase alguna sustancia capaz, por sí sola, de alterar los mecanismos de eliminación bacteriana del pulmón (Markham y Wilkie, 1980).

De ser la causa de esta remoción anómala la primera alternativa de explicación, es lógico pensar que en el lapso inicial

de 6 horas no tendría que haberse producido una eliminación efectiva de bacterias, como así sucedió. Por ello, la segunda alterativa explicaría mejor este tipo de curva; ya que, para conseguir una cierta concentración de sustancia, capaz de afectar la remoción bacteriana, sería necesario que transcurriese un cierto intervalo de tiempo; o bien que este periodo de retardo sería el necesario para que los efectos de la sustancia, sobre los mecanismos involucrados en la eliminación de bacterias, fuesen de tal magnitud para que se hiciesen detectables.

Como la bacteria con la que trabajamos es productora de necrotoxina, lo cual podría explicar la remoción anómala, el planteamiento del siguiente experimento se hizo, precisamente, para esclarecer si la causa de la disminución en la velocidad de remoción podría ser explicada de esta manera.

Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis según la cual la bacteria liberaría, o segregaría, una(s) sustancia(s) capaz de minimizar la eficiencia de los sistemas pulmonares de defensa, encargados de eliminar las partículas extrañas que consiguen llegar al tracto respiratorio inferior. Demostrando además que esta sustancia, o grupo de sustancias, se encuentra en el sobrenadante de un cultivo fresco (6-8 horas) de P. multocida D-necrotóxica.

El efecto de esta(s) sustancia(s), no sólo disminuye la velocidad de remoción pulmonar, de bacterias depositadas 12 horas después de aplicar el aerosol con aquellas, sí no que es de tal magnitud que permite observar la multiplicación bacteriana en el pulmón. Lo cual representa que la tasa de remoción (no se puede afirmar que tenga un valor del 0 absoluto) es menor a la tasa de multiplicación bacteriana. (Ver resultados del cuadro # 19).

Con este experimento no podemos concluir que el efecto ob-

servado sea debido a la necrotoxina, si bien es una hipótesis de trabajo que rápidamente se plantea; pero sí concluimos que en el líquido sobrenadante hay "algo" capaz de explicar el efecto de meseta detectado en la curva patrón de remoción. E hipotetizamos que el mecanismo alterado por la sustancia ha de ser el de fagocitosis, en alguna de sus fases, pues es relativamente rápido para que hayan tenido lugar cambios histopatológicos en el epitelio traqueo-bronquial; y además, de haberse producido éstos, el depósito de bacterias en el grupo de ratones aerosolizado con SCPF debería de haber sido significativamente mayor que el de los grupos control.

De sustancias liberadas por bacterias, e involucradas en los procesos patológicos atribuidos a éstas, existen múltiples antecedentes. Aquí podemos citar a la toxina de Bordetella bronchiseptica capaz de inducir rinitis atrófica en cerdo (Goodnow, 1980); la toxina diftérica, causa de la sintomatología clásica de la enfermedad -difteria-, e inducida por un fago (Freeman, 1951); o la toxina de P.multocida, asociada con rinitis atrófica en cerdo, y a muerte en ratones inoculados intraperitonealmente (Rutter, 1983).

Cabría determinar, además de la naturaleza química de esa(s) sustancia(s) y sus características físico-químicas, cual es el momento de máximo efecto y los mecanismos de neutralización, pues observamos (datos no publicados) que a los 7 días posinoculación no se lograron aislar bacterias a partir de macerados pulmonares de los ratones inoculados con P.multocida únicamente. Esto indica que la sustancia liberada no sería suficiente, por sí sola, para provocar el establecimiento de cuadros neumónicos, hecho que coincide con lo reportado, por diversos autores, en el sentido de que las Pasteurellas no son agentes primarios de neumonías (Carter, 1975; Raynaud y cols., 1977).

Como se esperaba después de los resultados obtenidos en el muestreo efectuado en rastro, el último bloque de experimentos confirmó la sospecha de una interacción entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y P.multocida que explicaría, al menos parcialmente, ciertos casos de neumonía enzootica en cerdos.

El efecto del virus sobre la capacidad pulmonar de eliminación bacteriana, se correlacionó con el tiempo transcurrido entre la inoculación del virus y la inoculación de la bacteria, como lo demuestran los análisis de varianza para los índices de remoción y retención.

Las alteraciones pulmonares, causá de la disminución en el índice de remoción, comienzan a hacerse patentes -en forma indirecta pues, en este momento, no nos estamos refiriendo a las alteraciones histopatológicas ocurridas en el pulmón y detectables por técnicas adecuadas, si no a las alteraciones locales o generales que disminuyen la capacidad del pulmón para eliminar bacterias que han logrado adentrarse hasta el tracto respiratorio inferior- a los 11 días de la infección con virus, si bien éstas no son suficientes para que el grupo sea estadísticamente diferente a los grupos con índices de remoción similares a los normales; no pudiendo, por tanto, estar seguros de que la diferencia encontrada sea real o debida al azar. El momento de alteración significativa está situado entre este día y el día 15, fecha en la que el índice de remoción está grandemente disminuído, adquiriendo, inclusive, un valor negativo que, como se dijo anteriormente, sólo indica que la velocidad de multiplicación bacteriana es superior a la velocidad de remoción de bacterias.

Nuestros resultados concuerdan, a groso modo, con lo publicado por otros autores sobre estudios enfocados para determinar el efecto de ciertos virus en la capacidad de eliminación pulmonar

de bacterias (Jakab y Dick, 1973; Jakab, 1981).

Lopez y cols (1976) vieron que el virus parainfluenza-3 de bovino provoca una disminución en los índices de remoción de P.haemolytica en terneros, siendo máximo este efecto a los 7 días posinfección con virus, notándose una recuperación en la capacidad de eliminación pulmonar bacteriana a los 11 días posinfección vírica.

Pijoan y Ochoa (1978b) demostraron interacción entre el virus vacunal de cólera porcino y P.multocida entre los días 3 y 5 posinfección con virus, disminuyendo el efecto el día 14.

Nugent y Pesanti (1982b) observaron la interacción, en ratones, entre el virus de influenza y Staphylococcus aureus a los 7 días posinfección con el virus.

Klein y cols. (1969), con el mismo modelo murino, y trabajando con reovirus y Staph. aureus demuestran interacción en el intervalo comprendido entre los días 7 y 10 posinfección vírica.

De todos estos reportes, y otros muchos no citados aquí (ver introducción para mas detalles), resalta el hecho de la necesidad de un periodo más largo entre la infección con virus y la afectación notoria de la remoción pulmonar en el presente caso. Esto pudiera deberse a la baja dosis de virus empleada, en este estudio, para la infección de los ratones (calculamos que llegaron al pulmón del orden de 100-1000 unidades formadoras de placa -UFP-, pues la suspensión de virus empleada en la aerosolización tenía una concentración de 10^6 UFP/ml), mientras que otros autores emplearon dosis más altas.

Degré y Glasgow (1968) demuestran, corroborando la explicación anterior, que el sinergismo entre el virus de parainfluenza y Haemophilus influenzae, en ratones, es dependiente de dosis además de serlo de día.

Las diferentes transformaciones utilizadas para expresar los resultados del número de bacterias (EP, LBP, BGP, LBGP, BGR y LBGR) recuperadas del pulmón, no supuso un cambio relevante en el análisis estadístico de estos, y por tanto en las conclusiones a las que se pudieran llegar; si bien, consideramos que la forma más fisiológica para la expresión de éstos sea la de bacterias por gramo de pulmón (BGP) o su transformación logarítmica (LBGP).

Sobre la transformación arco tangente, empleada sobre los índices de remoción y retención, cabe decir que no hemos encontrado ningún reporte en la literatura que la mencione (si bien nuestra revisión en este sentido no fue exhaustiva) y puede considerarse una variante de la transformación arco seno, transformación aconsejada (Daniel , 1980) para el tratamiento de datos expresados como un porcentaje, aunque el efecto de la transformación arco tangente sobre los índices es muy diferente al de la transformación arco seno. Esta última no fue factible de ser utilizada pues sólo es capaz de trabajar en la escala del 0 al 100 por ciento y, como puede verse en nuestros resultados, obtuvimos cifras superiores al 100% en el índice de retención e inferiores al 0% en el índice de remoción.

La transformación arco tangente empleada produjo un efecto poco marcado sobre los grupos con varianzas pequeñas, aquellos con índices de remoción y retención próximos al control, y redujo notoriamente la varianza de los grupos con valores altos de ésta. Fenómeno que permitió homogeneizar varianzas, condición indispensable para llevar a cabo el ANOVA. La transformación fue satisfactoria no sólo en el presente experimento, sí no también en el planteado para determinar el efecto del líquido sobrenadante de un cultivo de P.multocida sobre la remoción pulmonar de dicha bacteria.

La explicación del porqué de estas varianzas elevadas en ciertos grupos lo creemos indicativo de que "algo" está ocurriendo, y si se observa detenidamente en que grupos la varianza es mayor que lo normal, ese algo no es otra cosa que bien el SCEF bien el virus de pseudorrabia están produciendo una alteración, a nivel pulmonar, suficientemente marcada para ser detectada por la técnica empleada; siendo notoria, en este momento, la variación de cada uno de los animales del grupo en cuanto a sensibilidad-resistencia a dicho agente perturbador.

El ANOVA de RET BGP y REM BGP mostró un efecto de día significativo ($p=0.045$) debido, como lo demuestra la prueba de Duncan pertinente, con $\alpha=0.05$, a la diferencia entre el día 15 y los grupos: control, D2, D3, D5 y D11. Resumiendo, y justificando, con esto todo lo dicho más arriba.

Entre la cantidad de bacterias del aerosol utilizado para la inoculación de los ratones y la cantidad de bacterias depogitadas por gramo de pulmón, ambas transformadas logarítmicamente, existió una correlación positiva ($r=0.903$) estadísticamente significativa ($p<0.001$). Esta correlación positiva es consistente con lo publicado por Goldstein y Green (1967) pero no con lo publicado por Martínez (1984), autor este último que atribuye dicha correlación negativa a haber usado, para la aerosolización, bacterias en fase logarítmica de crecimiento. Por este motivo, nosotros decidimos trabajar con bacterias que hubiesen conseguido llegar a la fase estacionaria de su curva de crecimiento, lavar y resuspender éstas en PBS, para evitar posibles aglomeraciones de bacterias a la hora de aerosolizar, otra de las causas de correlación negativa entre dosis/depósito. El resultado obtenido justifica, y tal vez muestre, el método a seguir.

Antes de continuar comentando los resultados, diremos que existió una correlación positiva ($r=0.92$), altamente significativa ($p<0.001$), entre el peso del ratón y el peso del pulmón -ambos en gramos-. Este resultado permite predecir cual sería el peso del pulmón esperado conociendo el peso del ratón, hecho de gran importancia pues nos condujo a descubrir que en el grupo de ratones sacrificados 6 horas después de ser aerosolizados con Pasteurella, y 3 días después de la infección con virus, se produjo un aumento del peso del pulmón observado, respecto del esperado, estadísticamente diferente al resto de los grupos (figura # 18). Esto demuestra un efecto sinérgico -denotándose con este término lo que Lepper (1968) define como "cualquier situación en la que dos o más agentes producen algún tipo de efecto mayor que el producido por cada agente por separado"- entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y P.multocida; con producción de un estado, aparentemente transitorio, con producción de edema, o congestión pulmonar, que pudiera ser reflejo de una primera fase de replicación del virus y que, por la baja dosis empleada, no se viera reflejada en una disminución del índice de remoción pero sí en ciertos cambios de los mecanismos homeostáticos pulmonares, que conducirían al aumento del peso del pulmón detectado.

Un efecto sinérgico se detectó también en el experimento para la determinación del tiempo de muerte, en los animales inoculados con virus, bacteria o ambos agentes. El efecto sinérgico fué dependiente del intervalo transcurrido entre el enfrentamiento con virus y el desafío con la bacteria. El efecto sinérgico quedó demostrado por el 0% de mortalidad en el grupo de ratones aerosolizados solamente con virus y el 50% de mortali-

dad en el grupo de animales inoculados sólo con bacterias, mientras que los grupos D3, D7 y D11 tuvieron una mortalidad del 100%. La relación con el tiempo, de este efecto sinérgico, nos la da el hecho de que el grupo D2 no presentó, como el resto con inoculación conjunta de virus y bacteria, una mortalidad del 100% sí no una del 50%, resultado similar al del grupo aerosolizado con bacteria únicamente.

El grupo D3 fue el que registró tiempos de muerte más cortos, lo cual se deba en parte al edema producido -como ya se apuntó con anterioridad- el cual, según Harford y Hara (1950), actuaría como un medio de cultivo bacteriano y, además, interferiría con la fagocitosis de macrófagos y neutrófilos. El efecto del edema no es suficiente, ni necesario, para explicar el sinergismo ya que no se detectó un fenómeno similar en los grupos D7 y D11.

Los resultados del estudio anatomopatológico demostraron un efecto sinérgico, de virus y bacteria sobre el grado de lesión, similar, en los ratones utilizados para determinar el tiempo de muerte, al observado para dicho tiempo de muerte. El ANOVA detectó un efecto de día muy significativo ($p=0.005$) debido, como lo demuestra la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$), a una similitud entre CV y D2, con diferencia entre aquellos y el resto. Ya se comentó (ver resultados) la peculiaridad del grupo CP.

De los resultados obtenidos cabe destacar la gran variación individual dentro de los grupos D2 y CV.

Como puede verse en la gráfica # 14, el componente de alveolitis en el conjunto del grado de lesión fue bastante constante para todos los grupos, mientras que no ocurrió lo mismo para el componente de perivascularitis y pleuritis. Siendo el pri

mero similar en los grupos CV, CP y D2 por un lado, y D3, D7 y D11 por el otro; con un grado mayor en el conjunto último.

El grado de lesión en el grupo de ratones de "anatomía patológica" resultó depender, no de día ni de hora, sí no que presentó un efecto marcado del tipo de lesión ($p=0.008$), por lo que se analizaron cada una de las lesiones por separado. De esto resultó que solamente el grado de pleuritis fue dependiente de día ($p=0.019$) y hora ($p=0.011$), con una interacción día x hora muy significativa ($p=0.019$). El efecto sinérgico tuvo lugar los días 3 y 11 posinoculación del virus. Lo anterior, junto al hecho de la ausencia de sinergismo el día 7, pudiera apoyar la hipótesis de que la multiplicación del virus tiene lugar en forma bifásica, una el día 3 localizada a los puntos infectados por las partículas contenidas en el aerosol y otra, a partir del día 11, más generalizada e intensa capaz de hacer visible el efecto sobre la capacidad de remoción bacteriana del pulmón.

Los grados de perivascularitis y alveolitis, como se pueden ver en la gráfica # 15 y lo demuestra los análisis de varianza, fueron muy similares para todos los días y horas.

Con los resultados obtenidos del estudio histopatológico, no podemos determinar cual de los mecanismos de defensa pulmonares es el principalmente involucrado por el efecto de la infección vírica. No obstante, la ausencia prácticamente completa de bronquitis-peribronquitis (tan solo dos de los ratones del grupo "tiempo de muerte" y uno de los del grupo de "anatomía patológica, los tres de D3, la presentaron) nos hace pensar en que las principales células afectadas sean las fagocitarias, bien los macrófagos alveolares bien las células fágicas de origen sanguíneo.

Por todo el conjunto de resultados, hasta aquí expuestos y discutidos, creemos haber demostrado la importancia y el papel que el virus de la enfermedad de Aujeszky pueda estar teniendo en el desarrollo de procesos neumónicos en el cerdo.

A P E N D I C E S

APENDICE A

	AISLAMIENTO DE PASTEURILLA	OTROS AISLAMIENTOS	AISLAMIENTO NEGATIVO	
PULMON NEUMONICO	29.89	14.26	27.85	72
PULMON NORMAL	14.11	6.74	13.15	34
	44	21	41	106

CUADRO A-1: Valores esperados del cuadro # 3 utilizados para el cálculo de la Ji-cuadrada.

	AISLAMIENTO DE PASTEURILLA	OTROS AISLAMIENTOS	AISLAMIENTO NEGATIVO	
SUERO POSITIVO	24.08	11.49	22.43	58
SUERO NEGATIVO	19.92	9.51	18.57	48
	44	21	41	106

CUADRO A-2: Valores esperados del cuadro # 4.

	PULMON NEUMONICO	PULMON NORMAL	
SUERO POSITIVO	39.40	18.60	58
SUERO NEGATIVO	32.60	15.40	48
	72	34	106

CUADRO A-3: Valores esperados del cuadro # 5.

	AISLAMIENTO DE PASTEURELLA	OTROS AISLAMIENTOS	AISLAMIENTO NEGATIVO	
PULMON NEUMONICO + SUERO POSITIVO	19.51	9.31	18.18	47
PULMON NEUMONICO + SUERO NEGATIVO	10.38	4.95	9.67	25
PULMON NORMAL + SUERO POSITIVO	4.57	2.18	4.25	11
PULMON NORMAL + SUERO NEGATIVO	9.54	4.56	8.90	23
	44	21	41	106

CUADRO A-4: Valores esperados del cuadro # 6.

APENDICE BAnálisis de varianza, con un solo criterio de clasificación por rangos, de Kruskal-Wallis

Para la realización de esta prueba los tiempos de muerte de cada ratón se ordenan de menor a mayor y las observaciones se reemplazan por rangos, desde 1 (asignado a la observación menor) hasta "n" (que se asigna a la observación mayor, 152 en nuestro caso). Teniendo en cuenta que cuando dos o más observaciones tienen el mismo valor, a cada observación se le da la media de los rangos en los cuales empató.

A continuación se suman los rangos de cada una de las 38 bacterias y se calcula el estadístico de prueba:

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(n+1)$$

donde:

- K = Número de grupos(38 en nuestro caso).
- n_j = Número de observaciones en el j-ésimo grupo(4/grupo).
- n = Número total de observaciones (152 en nuestro caso).
- R_j = Suma de rangos en el j-ésimo grupo.

Finalmente el estadístico H se compara con el valor de tablas de la distribución χ^2 con K-1 grados de libertad.

Se acepta la hipótesis nula de que no hay diferencia entre los tiempos de muerte de las diferentes bacterias cuando $H < \chi^2$ de tablas.

El cuadro B-1 muestra los tiempos de muerte de cada uno de los ratones inoculados con cada bacteria y los rangos (de 1 a 152) que les corresponden.

Por los datos de la tabla se obtiene que: $H=88.499$, de lo que se deduce el rechazo de la hipótesis nula ($p < 0.001$).

BACTER.	Tiempo de muerte(h)				Rango			
	Rat-1	Rat-2	Rat-3	Rat-4	Rat-1	Rat-2	Rat-3	Rat-4
7	7.73	7.73	8.07	8.95	2.5	2.5	6	16
PM-LP5	7.98	8.42	8.68	8.68	5	11	12.5	12.5
28	9.03	9.23	9.73	10.05	17	24.5	33.5	45.5
48	9.32	9.37	9.70	10.87	27	28	32	67
71	9.22	9.60	10.37	10.52	23	31	54	56
76	7.75	10.27	10.55	11.25	4	50	61	78
100	8.38	9.75	10.53	11.40	10	35	59	82
13	9.95	10.03	10.28	10.70	41	44.5	51	65
98	9.28	10.00	10.90	10.93	26	42	69.5	71
656	7.48	10.52	11.13	12.82	1	56	76.5	98.5
14	9.18	10.05	10.63	12.87	21.5	45.5	63.5	101
106	10.33	10.63	10.75	11.28	53	63.5	66	79
96	9.23	9.93	11.72	12.68	24.5	40	85	94
107	9.87	10.02	11.50	12.53	39	43	83	93
61	9.48	10.88	11.35	12.75	29	68	81	96.5
75	9.05	9.06	9.07	17.57	18	19	20	128
VC-Cap	9.83	10.53	12.33	12.40	37.5	59	91	92
79	10.03	10.52	10.53	14.95	44.5	56	59	118
81	8.90	11.88	12.75	12.82	15	87	96.5	98.5
92	10.23	10.90	11.60	15.33	48	69.5	84	120
20	11.13	11.27	12.85	13.42	76.5	80	100	106
78	9.18	9.50	9.73	21.00	21.5	30	33.5	136
67	9.83	10.97	11.75	18.00	37.5	73	86	129
83	10.57	11.90	13.10	15.25	62	88	103	119
15	13.45	13.83	14.20	14.42	108	110	114	115
49	8.83	12.73	13.32	22.83	14	95	105	138
72	10.25	11.10	14.08	22.90	49	75	113	139
90	8.27	10.95	13.03	26.08	8	72	102	143
85	12.20	13.83	13.83	18.88	90	110	110	131
105	10.32	11.98	20.10	20.65	52	89	133	135
103	8.30	9.78	16.73	28.93	9	36	123	144
89	8.20	10.98	17.37	29.88	7	74	127	145
101	14.00	14.53	15.50	33.33	112	116	121	150
65	13.15	15.98	17.07	32.90	104	122	124	149
12	14.70	19.60	20.13	26.13	117	132	134	142
6	13.43	17.16	18.27	32.75	107	125	130	148
99	17.35	23.45	25.45	33.95	126	140	141	151
87	21.80	30.67	31.50	41.92	137	146	147	152

CUADRO # B-1: Tiempos de muerte de cada uno de los ratones inoculados, vía intraperitoneal, con cada una de las bacterias y los rangos (de 1 a 152) que les corresponden.

APENDICE C

En el cuadro C-1 se muestran los valores esperados correspondientes al cuadro # 12.

TC \ P	ALTA	MEDIA	BAJA	
D	5	9.44	5.56	20
D/N	2	3.78	2.22	8
A	2	3.78	2.22	8
	9	17	10	36

CUADRO C-1: TC=Tipo capsular. P=Patogenicidad.

En el cuadro precedente se observa que 7 de las frecuencias esperadas son inferiores a 5 y que tras multiplicar por 3 todas las frecuencias son superiores a 5. En los cuadros C-2 y C-3 se muestran las frecuencias observadas y esperadas, respectivamente, tras la antedicha multiplicación de cada una de las frecuencias originales.

	ALTA	MEDIA	BAJA	
D	12	27	21	60
D/N	9	12	3	24
A	6	12	6	24
	27	51	30	108

CUADRO C-2

	ALTA	MEDIA	BAJA
D	15	28.33	16.67
D/N	6	11.33	6.67
A	6	11.33	6.67

CUADRO C-3

Tras este cambio resulta una Ji-cuadrada calculada de:

$$\chi^2_c = \sum \frac{(Ob - Esp)^2}{Esp} = 5.453$$

con la que se acepta la hipótesis nula de que la patogenicidad es independiente del tipo capsular. Misma conclusión a la que se llegó con los datos originales, pero con los que no se cumplían los supuestos obligados para el análisis por Ji-cuadrada.

APENDICE D

		PP	PR	BP ($\times 10^4$)	LBP	BGP ($\times 10^5$)	LBGP	BGR ($\times 10^3$)	LBGR
R-1	0h	0.14	18.56	5.094	4.707	3.639	5.561	2.745	3.438
R-2	0h	0.14	17.72	3.241	4.511	2.315	5.364	1.829	3.262
R-3	0h	0.15	20.23	2.903	4.463	1.935	5.287	1.435	3.157
R-4	0h	0.12	19.01	3.751	4.574	3.126	5.495	1.973	3.295
R-1	6h	0.15	19.40	0.468	3.670	0.312	4.494	0.241	2.382
R-2	6h	0.12	18.54	0.504	3.702	0.420	4.623	0.272	2.434
R-3	6h	0.11	15.88	1.065	4.028	0.969	4.986	0.671	2.827
R-4	6h	0.11	17.25	0.658	3.818	0.598	4.777	0.382	2.582
R-1	12h	0.12	17.42	0.416	3.619	0.347	4.540	0.239	2.378
R-2	12h	0.12	18.33	1.335	4.125	1.112	5.046	0.728	2.862
R-3	12h	0.12	18.36	2.478	4.394	2.065	5.315	1.350	3.130
R-4	12h	0.12	16.58	0.638	3.805	0.532	4.726	0.385	2.585
R-1	24h	0.14	19.12	0.485	3.686	0.347	4.540	0.254	2.405
R-2	24h	0.14	20.85	0.235	3.371	0.168	4.225	0.113	2.052
R-3	24h	0.12	18.11	0.904	3.956	0.753	4.877	0.499	2.698
R-4	24h	0.11	15.85	4.514	4.655	4.103	5.613	2.848	3.454
R-1	48h	0.13	18.28	1.738	4.240	1.337	5.126	0.951	2.978
R-2	48h	0.13	16.38	0.502	3.701	0.386	4.587	0.307	2.487
R-3	48h	0.12	16.90	0.445	3.648	0.371	4.569	0.263	2.420
R-4	48h	0.12	18.12	3.547	4.550	2.956	5.471	1.958	3.292

CUADRO D-1: Número de bacterias (UFC) a diferentes tiempos pos-aerosolización con P.multocida VC-Cap. (PP= Peso de pulmón en gramos; PR= Peso del ratón en gramos; BP= Bacterias por pulmón; LBP= Transformación logarítmica de BP; BGP= Bacterias por gramo de pulmón; LBGP= Transformación logarítmica de BGP; BGR= Bacterias por gramo de ratón y LBGR= Transformación logarítmica de BGR.)

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

221

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	1.383	0.346	2.684	0.072
Error	15	1.932	0.129		
Total	19	3.315			

0 48 24 12 6

CUADRO D-2: Tabla de ANOVA de LBP y resultado de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	1.074×10^{11}	2.680×10^{10}	2.165	0.123
Error	15	1.860×10^{11}	1.240×10^{10}		
Total	19	2.934×10^{11}			

0 48 24 12 6

CUADRO D-3: Tabla de ANOVA de BGP y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	1.200	0.300	2.068	0.136
Error	15	2.177	0.145		
Total	19	3.378			

0 48 24 12 6

CUADRO D-4: Tabla de ANOVA de LBGP y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	5.940×10^6	1.485×10^6	2.585	0.080
Error	15	8.618×10^6	5.745×10^5		
Total	19	1.456×10^7			

0 48 24 12 6

CUADRO D-5: Tabla de ANOVA de BGR y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	1.292	0.323	2.347	0.100
Error	15	2.064	0.138		
Total	19	3.356			

0 48 24 12 6

CUADRO D-6: Tabla de ANOVA de LBGR y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	pp ²	PP x BP	BP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	p
Hora	4	0.00073	1192.37	2.206x10 ⁹	4	2.666x10 ⁹	6.65x10 ⁸	4.819	0.012
Error	15	0.00233	-1039.56	2.401x10 ⁹	14	1.936x10 ⁹	1.38x10 ⁸		
Total	19	0.00306	152.806	4.605x10 ⁹	18	4.597x10 ⁹			

CUADRO D-7: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y BP. * indica que se realizó el ajuste relativo a la regresión; b -coeficiente de regresión=-447122.58; r -coeficiente de correlación=-0.440; t -valor del "test t" para el valor de r=-1.8333, resultado no significativo (p=0.087).

FACTOR	G.L.	pp ²	PP x LBP	LBP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	p
Hora	4	0.00073	0.0278	1.383	4	1.814	0.454	4.251	0.019
Error	15	0.00233	-0.0319	1.932	14	1.494	0.107		
Total	19	0.00306	-0.0041	3.314	18	3.308			

CUADRO D-8: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y LBP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. b=-13.720; r=-0.476; t=-2.025 (p=0.06).

FACTOR	G.L.	PP ²	PP x BGP	BGP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	p
Hora	4	0.00073	8341.68	1.074x10 ¹¹	4	1.550x10 ¹¹	3.88x10 ¹⁰	3.960	0.024
Error	15	0.00233	-10673.39	1.860x10 ¹¹	14	1.370x10 ¹¹	9.77x10 ⁹		
Total	19	0.00306	-2331.71	2.934x10 ¹¹	18	2.920x10 ¹¹			

CUADRO D-9: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y BGP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. $\hat{\beta} = -4.6x10$; $r = -0.513$; $t = -2.238$ ($p = 0.042$).

FACTOR	G.L.	PP ²	PP x LBGP	LBGP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	p
Hora	4	0.00073	0.0253	1.200	4	1.810	0.453	4.221	0.019
Error	15	0.00233	-0.0397	2.177	14	1.501	0.107		
Total	19	0.00306	-0.0144	3.378	18	3.311			

CUADRO D-10: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y LBGP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. $\hat{\beta} = -17.05$; $r = -0.56$; $t = -2.529$ ($p = 0.024$).

GRUPO	\hat{y} BP	\hat{y} LBP	\hat{y} LBP	\hat{y} LBP	\hat{y} BGP	\hat{y} BGP	\hat{y} LBGp	\hat{y} LBGp
0h	3.747 10^4	4.261 10^4	4.564	4.722	2.754 10^5	3.283 10^5	5.427	5.623
6h	0.674 10^4	0.518 10^4	3.805	3.757	0.575 10^5	0.414 10^5	4.720	4.660
12h	1.217 10^4	0.949 10^4	3.986	3.904	1.014 10^5	0.738 10^5	4.907	4.805
24h	1.535 10^4	1.602 10^4	3.917	3.938	1.345 10^5	1.412 10^5	4.814	4.840
48h	1.558 10^4	1.513 10^4	4.035	4.021	1.262 10^5	1.216 10^5	4.938	4.921

CUADRO # D-11: Medias ajustadas (\hat{y}) y originales (\bar{y}), en relación con el tiempo transcurrido tras la exposición de los animales al aerosol de P.multocida VC-Cap, de bacterias por pulmón (BP), bacterias por gramo de pulmón (BGP) y sus transformaciones logarítmicas (LBP y LBGp, respectivamente).

0	24	48	12	6	0	48	24	12	6	0	48	24	12	6
---	----	----	----	---	---	----	----	----	---	---	----	----	----	---

(a)

(b)

(c)

(d)

CUADRO # D-12: Resultados de la prueba de Tukey para (a) \hat{y} BP, (b) \hat{y} LBP, (c) \hat{y} BGP y (d) \hat{y} LBGp, aplicando la fórmula: $\Delta = q \sqrt{1/2 V (\hat{z}_1^2)}$, con $\alpha = 0.05$ (barras superiores) y $\alpha = 0.01$ (barras inferiores).

Los grupos unidos por una misma barra no mostraron una diferencia, estadísticamente significativa, entre sus medias de UFC después del ajuste realizado tras el análisis de covarianza.

	RET BP	REM BP	RET LBP	REM LBP	RET BGP	REM BGP	RET LBGP	REM LBGP	RET BGR	REM BGR	RET LBGR	REM LBGR
R-1 0h	135.95	-35.95	139.00	-39.00	132.14	-32.14	136.14	-36.14	137.53	-37.53	141.43	-41.43
R-2 0h	86.50	13.50	88.51	11.49	84.06	15.94	86.50	13.50	91.63	8.37	94.24	5.76
R-3 0h	77.48	22.52	79.25	20.75	70.26	29.74	72.44	27.56	71.89	28.11	73.94	26.06
R-4 0h	100.11	-0.11	102.33	-2.33	113.51	-13.51	116.95	-16.95	98.85	1.15	101.65	-1.65
R-1 6h	12.49	87.51	12.76	87.24	11.33	88.67	11.67	88.33	12.07	87.93	12.42	87.58
R-2 6h	13.45	86.55	13.74	86.26	15.25	84.75	15.70	84.30	13.63	86.37	14.01	85.99
R-3 6h	28.42	71.58	29.11	70.89	35.19	64.81	36.22	63.78	33.62	66.38	34.57	65.43
R-4 6h	17.56	82.44	17.95	82.05	21.71	78.29	22.39	77.61	19.14	80.86	19.68	80.32
R-1 12h	11.10	88.90	11.35	88.65	12.60	87.40	12.97	87.03	11.97	88.03	12.31	87.69
R-2 12h	35.63	64.37	36.39	63.61	40.38	59.62	41.59	58.41	36.47	63.53	37.51	62.49
R-3 12h	66.13	33.87	67.61	32.39	74.98	25.02	77.27	22.73	67.64	32.36	69.56	30.44
R-4 12h	17.03	82.97	17.42	82.57	19.32	80.68	19.91	80.09	19.29	80.71	19.84	80.16
R-1 24h	12.94	87.06	13.24	86.76	12.60	87.40	12.97	87.03	12.73	87.27	13.09	86.91
R-2 24h	6.27	93.73	6.41	93.59	6.10	93.90	6.28	93.72	5.66	94.34	5.82	94.18
R-3 24h	24.13	75.87	24.66	75.34	27.34	72.66	28.18	71.82	25.00	75.00	25.71	74.29
R-4 24h	120.47	-20.47	123.31	-23.31	148.98	-48.98	153.46	-53.46	142.69	-42.69	146.74	-46.74
R-1 48h	46.38	53.62	47.42	52.58	48.55	51.45	50.00	50.00	47.65	52.35	49.00	51.00
R-2 48h	13.40	86.60	13.71	86.29	14.02	85.98	14.45	85.55	15.38	84.62	15.82	84.18
R-3 48h	11.88	88.12	12.13	87.87	13.47	86.53	13.87	86.13	13.18	86.82	13.55	86.45
R-4 48h	94.66	5.34	96.83	3.17	107.33	-7.33	110.66	-10.66	98.10	1.90	100.88	-0.88

CUADRO D-13: Índices de retención (RET) y remoción (REM) calculados a partir de BP, BGP, BGR y sus transformaciones logarítmicas (LBGP, LBGP y LBGR).

Nota: El índice de retención se calculó dividiendo el título (UFC) de cada uno de los ratones por la media de las UFC de los cuatro animales sacrificados a las 0 horas -inmediatamente después del aerosol bacteriano-, y multiplicando el valor obtenido por 100.
El índice de remoción se calculó restando de 100 el índice de retención.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	16431.39	4107.85	3.444	0.035
Error	15	17891.27	1192.75		
Total	19	34322.66			

0 48 24 12 6

CUADRO D-14: Tabla de ANOVA de RET LBP y REM LBP. Resultado de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	14156.29	3539.07	2.165	0.123
Error	15	24524.08	1634.94		
Total	19	38680.37			

0 12 24 48 6

CUADRO D-15: Tabla de ANOVA de RET BGP y REM BGP. Resultado de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	15022.73	3755.68	2.164	0.123
Error	15	26037.44	1735.83		
Total	19	41060.17			

0 12 24 48 6

CUADRO D-16: Tabla de ANOVA de RET LBGP y REM LBGP. Resultado de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	14907.20	3726.80	2.584	0.080
Error	15	21630.00	1442.00		
Total	19	36537.20			

0 24 48 12 6

CUADRO D-17: Tabla de ANOVA de RET BGR y REM BGR. Resultado de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Hora	4	15766.71	3941.68	2.585	0.080
Error	15	22873.78	1524.92		
Total	19	38640.49			

0 24 48 12 6

CUADRO D-18: Tabla de ANOVA de RET LBGR y REM LBGR. Resultado de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	Pp ²	PP x RET BP	RET BP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	P
Hora	4	0.00073	3.182	15709.78	4	18966.72	4741.68	4.816	0.012
Error	15	0.00233	-2.775	17093.90	14	13782.54	984.47		
Total	19	0.00306	0.408	32803.68	18	32749.26			

CUADRO D-19: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y RET BP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. $\hat{\beta} = -1193.415$; $r = -0.44$; $t = -1.8333$ ($p = 0.087$).

FACTOR	G.L.	Pp ²	PP x REM BP	REM BP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	P
Hora	4	0.00073	-3.182	15709.78	4	18966.72	4741.68	4.816	0.012
Error	15	0.00233	2.775	17093.90	14	13782.54	984.47		
Total	19	0.00306	-0.408	32803.68	18	32749.26			

CUADRO D-20: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y REM BP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. $\hat{\beta} = 1193.415$; $r = 0.44$; $t = 1.8333$ ($p = 0.087$).

FACTOR	G.L.	PP ²	PP x RET LBP	RET LBP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	p
Hora	4	0.00073	3.255	16431.39	4	19841.93	4960.48	4.815	0.012
Error	15	0.00233	-2.839	17891.27	14	14424.15	1030.30		
Total	19	0.00306	0.416	34322.66	18	34266.08			

CUADRO D-21: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y RET LBP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. $\hat{b} = -1221.16$; $r = -0.44$; $t = -1.8333$ ($p = 0.087$).

FACTOR	G.L.	PP ²	PP x REM LBP	REM LBP ²	G.L.	S.C.*	C.M.*	F	p
Hora	4	0.00073	-3.255	16431.39	4	19841.93	4960.93	4.815	0.012
Error	15	0.00233	2.839	17891.27	14	14424.15	1030.30		
Total	19	0.00306	-0.416	34322.66	18	34266.08			

CUADRO D-22: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y REM LBP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. $\hat{b} = 1221.16$; $r = 0.44$; $t = 1.8333$ ($p = 0.087$).

FACTOR	G.L.	PP ²	PP x RET BGP	RET BGP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	p
Hora	4	0.00073	3.028	14156.29	4	20379.97	5094.99	3.948	0.024
Error	15	0.00233	-3.875	24524.08	14	18065.75	1290.41		
Total	19	0.00306	-0.847	38680.37	18	38445.72			

CUADRO D-23: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y RET BGP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. $b = -1666.666$; $r = -0.513$; $t = -2.238$ ($p = 0.042$).

FACTOR	G.L.	PP ²	PP x REM BGP	REM BGP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	p
Hora	4	0.00073	-3.028	14156.29	4	20379.97	5094.99	3.948	0.024
Error	15	0.00233	3.875	24524.08	14	18065.75	1290.41		
Total	19	0.00306	0.847	38680.37	18	38445.72			

CUADRO D-24: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y REM BGP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. $b = 1666.666$; $r = 0.513$; $t = 2.238$ ($p = 0.042$).

FACTOR	G.L.	PP ²	PP x RET LBGP	RET LBGP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	p
Hora	4	0.00073	3.119	15022.73	4	21627.73	5406.93	3.946	0.024
Error	15	0.00233	-3.992	26037.44	14	19183.18	1370.23		
Total	19	0.00306	-0.873	41060.17	18	40810.91			

CUADRO D-25: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y RET LBGP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. $\hat{b} = -1716.99$; $r = -0.513$; $t = -2.238$ ($p = 0.042$).

FACTOR	G.L.	PP ²	PP x REM LBGP	REM LBGP ²	G.L.*	S.C.*	C.M.*	F	p
Hora	4	0.00073	-3.119	15022.73	4	21627.73	5406.93	3.946	0.024
Error	15	0.00233	3.992	26037.44	14	19183.18	1370.23		
Total	19	0.00306	0.873	41060.17	18	40810.91			

CUADRO D-26: Tabla del análisis de COVARIANZA para PP y REM LBGP. Mismas anotaciones que en el cuadro D-7. $\hat{b} = 1716.99$; $r = 0.513$; $t = 2.238$ ($p = 0.042$).

GRUPO	\hat{Y}_{RET} BP	\hat{Y}_{REM} BP	\hat{Y}_{RET} LBP	\hat{Y}_{REM} LBP	\hat{Y}_{RET} BCP	\hat{Y}_{REM} BCP	\hat{Y}_{RET} LBCP	\hat{Y}_{REM} LBCP								
0h	100.00	113.72	0.00	-13.72	102.27	116.31	-2.27	-16.31	100.00	119.17	0.00	-19.17	103.01	122.76	-3.01	-22.76
6h	17.98	13.80	82.02	86.20	18.39	14.12	81.61	85.88	20.87	15.04	79.13	84.96	21.50	15.49	78.50	84.51
12h	32.47	25.31	67.53	74.69	33.19	25.86	66.81	74.14	36.82	26.82	63.18	73.18	37.94	27.64	62.06	72.36
24h	40.95	42.74	59.05	57.26	41.91	43.74	58.09	56.26	48.76	51.26	51.24	48.74	50.22	52.80	49.78	47.20
48h	41.58	40.39	58.42	59.61	42.52	41.30	57.48	58.70	45.84	44.17	54.16	55.83	47.25	45.53	52.75	54.47

CUADRO # D-27: Medias ajustadas (\hat{Y}) y originales, en relación con el tiempo transcurrido desde el aerosol de P.múltocida VC-Cap, de los índices de retención (RET) y remoción (REM) calculados a partir de los datos de UFC expresados en BP, LBP, BCP y LBCP.

0	24	48	12	6	0	24	48	12	6	0	24	48	12	6
---	----	----	----	---	---	----	----	----	---	---	----	----	----	---

(a)

(b)

(c)

(d)

0	24	48	12	6	0	24	48	12	6	0	24	48	12	6
---	----	----	----	---	---	----	----	----	---	---	----	----	----	---

(e)

(f)

(g)

(h)

CUADRO # D-28: Resultados de la prueba de Tukey para (a) \hat{Y}_{RET} BP, (b) \hat{Y}_{RET} LBP, (c) \hat{Y}_{REM} BP, (d) \hat{Y}_{REM} LBP, (e) \hat{Y}_{RET} BCP, (f) \hat{Y}_{RET} LBCP, (g) \hat{Y}_{REM} BCP y (h) \hat{Y}_{REM} LBCP, aplicando la fórmula $A = q \sqrt{1/2 \hat{V}(\hat{Z}_i)}$, con $\alpha=0.05$ (barras sobre los grupos) y $\alpha=0.01$ (barras abajo de los grupos).

Los grupos unidos por una misma barra no mostraron una diferencia, estadísticamente significativa, entre sus medias de RET o REM con el nivel de confianza 1- α .

APENDICE E

			PP	PR	BP (x10 ³)	LBP	BGP (x10 ⁴)	LBGP	BGR ₀ (x10 ⁶)	LBGR
R-1	C1	0h	0.14	14.38	9.774	3.990	6.982	4.844	6.797	2.832
R-2	C1	0h	0.09	12.57	10.570	4.024	11.750	5.070	8.413	2.925
R-3	C1	0h	0.10	14.07	10.760	4.032	10.760	5.032	7.650	2.884
R-1	C1	6h	0.16	24.65	2.570	3.410	1.606	4.206	1.043	2.018
R-2	C1	6h	0.14	11.54	5.828	3.766	4.163	4.619	5.050	2.703
R-3	C1	6h	0.10	14.42	2.609	3.417	2.609	4.417	1.810	2.258
R-1	C2	0h	0.10	15.06	6.610	3.820	6.610	4.820	4.389	2.642
R-2	C2	0h	0.10	14.66	7.711	3.887	7.711	4.887	5.260	2.721
R-3	C2	0h	Murió al comienzo del aerosol bacteriano.							
R-1	C2	6h	0.12	15.56	2.580	3.412	2.150	4.322	1.658	2.220
R-2	C2	6h	0.10	11.85	3.328	3.522	3.328	4.522	2.808	2.448
R-3	C2	6h	0.11	14.48	3.366	3.527	3.060	4.486	2.325	2.366
R-1	SCPF	0h	0.08	11.36	4.983	3.697	6.229	4.794	4.387	2.642
R-2	SCPF	0h	0.09	14.10	7.484	3.874	8.316	4.920	5.308	2.725
R-3	SCPF	0h	0.11	13.63	7.245	3.860	6.586	4.819	5.315	2.726
R-1	SCPF	6h	0.08	18.10	8.121	3.910	10.150	5.006	4.487	2.652
R-2	SCPF	6h	0.13	14.48	20.073	4.317	15.950	5.203	14.320	3.156
R-3	SCPF	6h	0.10	14.60	4.170	3.620	4.170	4.620	2.856	2.456

CUADRO # E-1: Número de bacterias (UFC) a las 0 y 6 horas posaerosolización con P.multocida VC-Cap. Los diferentes grupos se diferencian por el tratamiento previo (12 horas antes del aerosol bacteriano) al que se sometieron los animales del grupo: C1 se aerosolizó con PBS, C2 con caldo BHI y SCPF con el sobrenadante de un cultivo de P.multocida VC-Cap filtrado.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Modelo	5	0.707	0.141	4.332	0.023
Trat.	2	0.165	0.083	2.531	0.125
Hora	1	0.249	0.249	7.619	0.020
H*Tr	2	0.293	0.147	4.490	0.038
Error	11	0.359	0.033		
Total	16	1.066			

CUADRO E-2: Tabla de ANOVA de LBP.

(a)	C-1		C-2	SCPF
(b)	C-1		C-2	SCPF
(c)		0h(C-1)	6h(C-1)	
(d)		0h(C-2)	6h(C-2)	
(e)		0h(SCPF)		6h(SCPF)

CUADRO E-3: Resultados de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para: (a) tratamientos a las 0 horas, (b) tratamientos a las 6 horas, (c) horas en el tratamiento con PBS, (d) horas en el tratamiento con caldo BHI y (e) horas en el tratamiento con SCPF. Datos en LBP.

Las barras unen a los grupos entre los que no se dió una diferencia estadísticamente significativa.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Modelo	5	0.768	0.154	3.122	0.059
Trat.	2	0.166	0.083	1.692	0.230
Hora	1	0.349	0.349	7.085	0.024
H*Tr	2	0.253	0.126	2.569	0.120
Error	11	0.541	0.049		
Total	16	1.309			

CUADRO E-4: Tabla de ANOVA para LBGR.

(a)	C-1	C-2	SCPF
(b)	C-1	C-2	SCPF
(c)	0h(C-1)	6h(C-1)	
(d)	0h(C-2)	6h(C-2)	
(e)	0h(SCPF)	6h(SCPF)	

CUADRO E-5: Resultados de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para: (a) tratamientos a las 0 horas, (b) tratamientos a las 6 horas, (c) horas en el tratamiento con PBS, (d) horas en el tratamiento con caldo BHI y (e) horas en el tratamiento con SCPF. Datos en LBGR.

Las barras unen a los grupos entre los que no se dió una diferencia estadísticamente significativa.

	RET BP	REM BP	RET LBP	REM LBP	RET BGP	REM BGP	RET LBGP	REM LBGP	RET BGR	REM BGR	RET LBGR	REM LBGR
R-1 C1	24.78	75.22	24.83	75.17	16.54	83.66	16.74	83.26	13.69	86.31	13.75	86.25
R-2 C1	56.20	43.40	56.30	43.70	42.35	57.65	43.39	56.61	66.27	33.73	66.57	33.43
R-3 C1	25.16	74.84	25.20	74.80	26.54	73.46	27.19	72.81	23.75	76.25	23.86	76.14
R-1 C2	36.03	63.97	36.11	63.89	30.02	69.98	30.09	69.91	34.36	65.64	34.48	65.52
R-2 C2	46.47	53.53	46.58	53.42	46.47	53.53	46.58	53.42	58.20	41.80	58.40	41.60
R-3 C2	47.00	53.00	47.11	52.89	42.73	57.27	42.83	57.17	48.19	51.81	48.35	51.65
R-1 SCPF	123.59	-23.59	125.78	-25.78	144.09	-44.09	145.37	-45.37	89.69	10.31	89.94	10.06
R-2 SCPF	315.48	-215.48	321.07	-221.07	226.43	-126.43	228.43	-128.43	286.23	-186.23	287.04	-187.04
R-3 SCPF	63.46	36.54	64.59	35.41	59.20	40.80	59.72	40.28	57.09	42.91	57.25	42.75
K-W	p=0.05		p=0.05		p=0.01		p=0.02		p>0.10		p>0.10	

CUADRO # E-6: Índices de retención (RET) y remoción (REM), a las 6 horas, calculados a partir de bacterias por pulmón (BP), bacterias por gramo de pulmón (BGP), bacterias por gramo de ratón (BGR) y sus transformaciones logarítmicas (LBP, LBGP y LBGR respectivamente). En la parte inferior se muestran los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis.

		REIT BP	REIT LBP	REIT LBP	REIT BGP	REIT LBGP	REIT BGP	REIT LBGP	REIT BGR	REIT LBGR	REIT BGR	REIT LBGR	REIT LBGR
R-1	C1	30.93	69.03	30.99	69.01	20.62	79.38	21.12	78.88	17.32	82.68	17.40	82.60
R-2	C1	65.19	34.81	65.29	34.71	51.01	48.99	52.12	47.88	74.52	25.48	74.78	25.22
R-3	C1	31.38	68.62	31.43	68.57	33.03	66.97	33.80	66.20	29.69	70.31	29.82	70.18
R-1	C2	44.03	55.97	44.12	55.88	37.13	62.87	37.21	62.79	42.14	57.86	42.28	57.72
R-2	C2	55.39	44.61	55.50	44.50	55.39	44.61	55.20	44.80	67.11	32.89	67.30	32.70
R-3	C2	55.94	44.06	56.06	43.94	51.42	48.58	51.52	48.48	57.18	42.82	57.34	42.66
R-1	SCPF	113.38	-13.38	114.48	-14.48	122.75	-22.75	123.28	-23.28	93.09	6.91	93.26	6.74
R-2	SCPF	160.92	-60.92	161.56	-61.56	147.05	-47.05	147.46	-47.46	157.20	-57.20	157.32	-57.32
R-3	SCPF	72.00	28.00	73.02	26.98	68.06	31.94	68.55	31.45	66.05	33.95	66.20	33.80
K-W		p=0.05		p=0.05		p=0.01		p=0.02		p 0.10		p 0.10	

CUADRO # E-7: Índices detención (REIT) y remoción (REMT) transformados por arco tangente, a las 6 horas, calculados a partir de los resultados mostrados en el cuadro #E-6.

En la parte inferior se presentan los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	2	9456.41	4728.21	5.883	0.039
Error	6	4822.46	803.74		
Total	8	14278.87			

C-1 C-2 SCPP

CUADRO E-8: Tabla de ANOVA de RETT BP y REMT BP. Resultado de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	2	6937.78	3468.89	3.197	0.110
Error	6	6510.82	1085.14		
Total	8	13448.60			

C-1 C-2 SCPP

CUADRO E-9: Tabla de ANOVA de RETT BGR y REMT BGR. Resultado de la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

A P E N D I C E . F

	PP	PR	BP (x10 ⁵)	LBP	BGP (x10 ⁶)	LBGP	BGR (x10 ⁴)	LBGR
R-1 C1 0h	0.09	12.33	3.803	5.580	4.226	6.626	3.085	4.489
R-2 C1 0h	0.10	14.49	5.082	5.706	5.082	6.706	3.508	4.545
R-3 C1 0h	0.12	15.55	3.549	5.550	2.957	6.471	2.282	4.358
R-4 C1 0h	0.12	16.15	4.611	5.664	3.843	6.585	2.855	4.456
R-1 C1 6h	0.12	14.80	0.348	4.542	0.290	5.463	0.235	3.372
R-2 C1 6h	0.12	14.69	0.372	4.571	0.310	5.492	0.253	3.404
R-3 C1 6h	0.10	13.09	0.968	4.986	0.968	5.986	0.740	3.869
R-4 C1 6h	0.09	12.89	1.987	5.298	2.208	6.344	1.542	4.188
R-1 D2 0h	0.12	18.55	2.456	5.390	2.047	6.311	1.324	4.122
R-2 D2 0h	0.10	14.65	2.594	5.414	2.594	6.414	1.771	4.248
R-3 D2 0h	0.10	12.73	2.176	5.338	2.176	6.338	1.709	4.233
R-4 D2 0h	0.12	16.54	2.538	5.404	2.115	6.325	1.534	4.186
R-1 D2 6h	0.10	14.32	1.752	5.244	1.752	6.244	1.224	4.088
R-2 D2 6h	0.12	15.39	1.180	5.072	0.984	5.993	0.767	3.885
R-3 D2 6h	0.12	16.40	0.095	3.976	0.079	4.896	0.058	2.761
R-4 D2 6h	0.12	14.64	0.397	4.598	0.331	5.519	0.371	3.433
R-1 D3 0h	0.11	17.18	4.292	5.633	3.902	6.591	2.498	4.398
R-2 D3 0h	0.10	14.12	4.482	5.651	4.482	6.651	3.174	4.502
R-3 D3 0h	0.10	11.25	4.291	5.633	4.291	6.633	3.814	4.581
R-4 D3 0h	0.10	13.31	3.295	5.518	3.295	6.518	2.475	4.394
R-1 D3 6h	0.14	13.61	0.132	4.121	0.094	4.975	0.097	2.987
R-2 D3 6h	0.16	20.50	1.352	5.131	0.845	5.927	0.660	3.819
R-3 D3 6h	0.13	16.38	3.980	5.600	3.062	6.486	2.430	4.386
R-4 D3 6h	0.12	14.48	2.089	5.320	1.741	6.241	1.443	4.159
R-1 D5 0h	0.12	15.93	1.306	5.116	1.088	6.037	0.820	3.914
R-2 D5 0h	0.12	18.07	1.350	5.130	1.125	6.051	0.747	3.873
R-3 D5 0h	0.11	15.95	1.624	5.210	1.476	6.169	1.018	4.008
R-4 D5 0h	0.13	16.86	1.975	5.296	1.519	6.182	1.171	4.069
R-1 D5 6h	0.11	14.67	0.708	4.850	0.644	5.809	0.483	3.684
R-2 D5 6h	0.12	15.75	0.549	4.740	0.458	5.660	0.349	3.542
R-3 D5 6h	0.12	14.26	0.276	4.441	0.230	5.362	0.194	3.287
R-4 D5 6h	0.14	20.48	0.490	4.690	0.350	5.544	0.239	3.379
R-1 D7 0h	0.13	20.90	1.083	5.035	0.833	5.921	0.518	3.714
R-2 D7 0h	0.16	23.04	1.598	5.204	0.999	6.000	0.694	3.841
R-3 D7 0h	0.12	18.00	1.032	5.014	0.860	5.934	0.573	3.758
R-4 D7 0h	0.12	17.10	0.813	4.910	0.678	5.831	0.475	3.677
R-1 D7 6h	0.16	21.28	0.460	4.663	0.287	5.459	0.216	3.335
R-2 D7 6h	0.15	21.10	0.238	4.377	0.159	5.200	0.113	3.052
R-3 D7 6h	0.12	17.35	0.711	4.852	0.593	5.773	0.410	3.613
R-4 D7 6h	0.14	19.04	0.262	4.418	0.187	5.271	0.137	3.138
R-1D11 0h	0.11	15.71	2.104	5.323	1.912	6.282	1.339	4.127
R-2D11 0h	0.12	17.17	2.335	5.368	1.946	6.289	1.360	4.133
R-3D11 0h	0.10	14.61	2.066	5.315	2.066	6.315	1.414	4.150
R-4D11 0h	0.12	16.40	3.120	5.494	2.600	6.415	1.902	4.279
R-1D11 6h	0.17	25.98	4.870	5.688	2.865	6.457	1.874	4.273
R-2D11 6h	0.14	18.22	0.763	4.883	0.545	5.736	0.419	3.622
R-3D11 6h	0.13	17.37	3.610	5.558	2.777	6.444	2.078	4.318
R-4D11 6h	0.16	20.44	0.998	4.999	0.624	5.795	0.488	3.688
R-1D15 0h	0.18	26.85	7.744	5.889	4.302	6.634	2.884	4.460
R-2D15 0h	0.18	25.30	9.451	5.975	5.251	6.720	3.736	4.572
R-3D15 0h	0.18	25.62	4.756	5.677	2.642	6.422	1.856	4.269
R-4D15 0h	Murió	a los dos minutos del comienzo del aerosol bact.						
R-1D15 6h	0.20	28.21	3.538	5.549	1.769	6.248	1.254	4.098
R-2D15 6h	0.17	24.45	7.264	5.861	4.273	6.631	2.971	4.473
R-3D15 6h	0.15	22.22	9.238	5.966	6.159	6.789	4.157	4.619
R-4D15 6h	0.14	19.60	10.750	6.031	7.678	6.885	5.484	4.739

CUADRO F-1: Resultados individualizados de peso de pulmón (PP), peso de ratón (PR) y UFC del experimento para ver el efecto del virus sobre la remoción de Pasteurella.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Modelo	13	8.5035	0.654	6.614	1.69×10^{-6}
Día	6	4.2870	0.715	7.225	2.64×10^{-5}
Hora	1	3.0040	3.004	30.371	2.30×10^{-6}
D x H	6	1.2126	0.202	2.044	0.082
Error	41	4.0550	0.099		
Total	54	12.5580			

CUADRO F-2: Tabla de ANOVA para LBGP.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Modelo	13	8.1706	0.629	6.955	9.165×10^{-7}
Día	6	4.3822	0.730	8.082	8.628×10^{-6}
Hora	1	2.6712	2.671	29.559	2.918×10^{-6}
D x H	6	1.1172	0.186	2.061	0.079
Error	41	3.7050	0.090		
Total	54	11.8758			

CUADRO F-3: Tabla de ANOVA para LBGR.

	RET BP	REM BP	RET LBP	REM LBP	RET BGP	REM BGP	RET LBGP	REM LBGP	RET BGR	REM BGR	RET LEGR	REM LEGR
R-1 C1	8.17	91.83	8.26	91.74	7.21	92.79	7.34	92.66	8.02	91.98	8.12	91.88
R-2 C1	8.74	91.26	8.83	91.17	7.71	92.29	7.85	92.15	8.64	91.36	8.75	91.25
R-3 C1	22.72	77.28	22.96	77.04	24.04	75.96	24.49	75.51	25.22	74.78	25.53	74.47
R-4 C1	46.63	53.37	47.12	52.88	54.83	45.17	55.85	44.15	52.57	47.43	53.22	46.78
R-1 D2	71.77	28.23	71.87	28.13	78.46	21.54	78.80	21.20	77.22	22.78	77.76	22.24
R-2 D2	48.34	51.66	48.40	51.60	44.05	55.95	44.24	55.76	48.38	51.62	48.72	51.28
R-3 D2	3.87	96.13	3.88	96.12	3.53	96.47	3.54	96.46	3.64	96.36	3.66	96.34
R-4 D2	16.25	83.75	16.27	83.73	14.80	85.20	14.87	85.13	17.09	82.91	17.21	82.79
R-1 D3	3.23	96.77	3.25	96.75	2.37	97.63	2.38	97.62	3.25	96.75	3.30	96.70
R-2 D3	33.06	66.94	33.26	66.74	21.16	78.84	21.32	78.68	22.06	77.94	22.40	77.60
R-3 D3	97.31	2.69	97.92	2.08	76.68	23.32	77.27	22.73	81.27	18.73	82.53	17.47
R-4 D3	51.08	48.92	51.40	48.60	43.60	56.40	43.93	56.07	48.26	51.74	49.01	50.99
R-1 D5	45.26	54.74	45.92	54.08	49.42	50.58	49.95	50.05	51.38	48.62	52.18	47.82
R-2 D5	35.10	64.90	35.61	64.39	35.14	64.86	35.51	64.49	37.12	62.88	37.70	62.30
R-3 D5	17.65	82.35	17.91	82.09	17.67	82.33	17.86	82.14	20.62	79.38	20.94	79.06
R-4 D5	31.34	68.66	31.80	68.20	26.89	73.11	27.18	72.82	25.48	74.52	25.88	74.12
R-1 D7	40.63	59.37	41.85	58.15	34.12	65.88	34.39	65.61	38.24	61.76	38.61	61.39
R-2 D7	21.02	78.98	21.66	78.34	18.84	81.16	18.99	81.01	19.96	80.04	20.15	79.85
R-3 D7	62.84	37.16	64.72	35.28	70.36	29.64	70.93	29.07	72.55	27.45	73.25	26.75
R-4 D7	23.11	76.89	23.80	76.20	22.17	77.83	22.36	77.64	24.31	75.69	24.55	75.45
R-1 D11	202.41	-102.4	205.37	-105.4	134.44	-34.44	135.56	-35.56	124.60	-24.60	126.12	-25.12
R-2 D11	31.72	68.28	32.18	67.82	25.58	74.42	25.79	74.21	27.85	72.15	28.19	71.81
R-3 D11	150.04	-50.04	152.23	-52.23	130.31	-30.31	131.39	-31.39	138.16	-38.16	139.84	-39.84
R-4 D11	41.46	58.54	42.07	57.93	29.26	70.74	29.50	70.50	32.45	67.55	32.84	67.16
R-1 D15	48.35	51.65	50.32	49.68	43.52	56.48	45.26	54.74	44.39	55.61	46.16	53.84
R-2 D15	99.28	0.72	103.32	-3.32	105.12	-5.12	109.33	-9.33	105.17	-5.17	109.37	-9.37
R-3 D15	126.25	-26.25	131.39	-31.39	151.51	-51.51	157.58	-57.58	147.15	-47.15	153.03	-53.03
R-4 D15	146.92	-46.92	152.90	-52.90	188.88	-88.88	196.45	-96.45	194.12	-94.12	201.88	-101.9

CUADRO F-4: Resultados individualizados de los índices de retención y remoción del experimento para ver el efecto del virus de la enfermedad de Avjeszky sobre la eliminación pulmonar de P.multocida.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	6	30389.10	5064.85	2.925	0.031
Error	21	36367.01	1731.76		
Total	27	66756.11			

 C1 D2 D5 D7 D3 D11 D15

CUADRO F-5: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para RET BP y REM BP.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	6	30807.47	5134.58	3.271	0.020
Error	21	32961.44	1569.59		
Total	27	63768.92			

 C1 D2 D5 D7 D3 D11 D15

CUADRO F-6: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para RET BGP y REM BGP.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	6	33521.63	5586.94	3.422	0.016
Error	21	34282.93	1632.52		
Total	27	67804.56			

 C1 D2 D3 D5 D7 D11 D15

CUADRO F-7: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para RET LBGP y REM LBGP.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	6	30169.59	5828.27	3.224	0.021
Error	21	32756.97	1559.86		
Total	27	62926.56			

 C1 D2 D3 D5 D7 D11 D15

CUADRO F-8: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para RET BGR y REM BGR.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	6	32860.29	5476.72	3.359	0.018
Error	21	34238.26	1630.39		
Total	27	67098.55			

 C1 D2 D3 D5 D7 D11 D15

CUADRO F-9: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan ($\alpha=0.05$) para RET LBGR y REM LBGR.

	RETT BP	REMT BP	RETT LBP	REMT LBP	RETT BGP	REMT BGP	RETT LBGP	REMT LBGP	RETT BGR	REMT BGR	RETT LBGR	REMT LBGR
R-1 C1	10.38	89.62	10.49	89.51	9.16	90.84	9.33	90.67	10.19	89.81	10.32	89.68
R-2 C1	11.10	88.90	11.21	88.79	9.80	90.20	9.97	90.03	10.97	89.03	11.11	88.89
R-3 C1	28.45	71.55	28.74	71.26	30.04	69.96	30.58	69.42	31.46	68.54	31.83	68.17
R-4 C1	55.55	44.45	56.07	43.93	63.86	36.14	64.85	35.15	61.62	38.38	62.27	37.73
R-1 D2	79.26	20.74	79.34	20.66	84.71	15.29	84.97	15.03	83.72	16.28	84.15	15.85
R-2 D2	57.33	42.67	57.39	42.61	52.83	47.17	53.03	46.97	57.37	42.63	57.72	42.28
R-3 D2	4.92	95.08	4.94	95.06	4.49	95.51	4.51	95.49	4.63	95.37	4.66	95.34
R-4 D2	20.51	79.49	20.54	79.46	18.71	81.29	18.80	81.20	21.55	78.45	21.70	78.30
R-1 D3	4.11	95.84	4.14	95.86	3.02	96.98	3.03	96.97	4.14	95.86	4.20	95.80
R-2 D3	40.65	59.35	40.88	59.12	26.55	73.45	26.75	73.25	27.64	72.36	28.06	71.94
R-3 D3	98.26	1.74	98.66	1.34	83.29	16.71	83.76	16.34	86.89	13.11	87.85	12.15
R-4 D3	60.13	39.87	60.45	39.55	52.35	47.65	52.70	47.30	57.25	42.75	58.02	41.98
R-1 D5	54.11	45.89	54.81	45.19	58.44	41.56	58.98	41.02	60.43	39.57	61.23	38.77
R-2 D5	42.98	57.02	43.56	56.44	43.03	56.97	43.44	56.56	45.26	54.74	45.90	54.10
R-3 D5	22.24	77.76	22.56	77.44	22.27	77.73	22.50	77.50	25.89	74.11	26.28	73.72
R-4 D5	38.67	61.33	39.20	60.80	33.45	66.55	33.79	66.21	31.77	68.23	32.24	67.76
R-1 D7	49.14	50.86	50.47	49.53	41.87	58.13	42.17	57.83	46.50	53.50	46.91	53.09
R-2 D7	26.38	73.62	27.16	72.84	23.71	76.29	23.89	76.11	25.08	74.92	25.32	74.68
R-3 D7	71.43	28.57	73.14	26.86	78.07	21.93	78.55	21.45	79.91	20.09	80.50	19.50
R-4 D7	28.92	71.08	29.75	70.25	27.78	72.22	28.01	71.99	30.36	69.64	30.65	69.35
R-1 D11	141.57	-41.57	142.31	-42.31	118.57	-18.57	119.08	-19.08	113.89	-13.89	114.64	-14.64
R-2 D11	39.11	60.89	39.64	60.36	31.89	68.11	32.14	67.86	34.58	65.42	34.98	65.02
R-3 D11	125.15	-25.15	126.00	-26.00	116.66	-16.66	117.17	-17.17	120.23	-20.23	120.96	-20.96
R-4 D11	50.04	49.96	50.70	49.30	36.24	63.76	36.52	63.48	39.95	60.05	40.40	59.60
R-1 D15	57.34	42.66	59.36	40.64	52.26	47.74	54.11	45.89	53.19	46.81	55.06	44.94
R-2 D15	99.54	0.46	102.08	-2.08	103.18	-3.18	105.67	-5.67	103.21	-3.21	105.69	-5.69
R-3 D15	114.71	-14.71	117.17	-17.17	125.72	-25.72	128.00	-28.00	124.00	-24.00	126.30	-26.30
R-4 D15	123.91	-23.91	126.25	-26.25	138.00	-38.00	140.05	-40.05	139.43	-39.43	141.44	-41.44

CUADRO F-10: Resultados individuales de los índices de remoción y retención transformados por arco tangente.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	6	17944.18	2990.70	2.863	0.034
Error	21	21939.52	1044.74		
Total	27	39883.70			

C1 D2 D5 D7 D3 D11 D15

CUADRO F-11: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan($\alpha=0.05$) de RETT BP y REMT BP.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	6	17638.14	2939.69	2.654	0.045
Error	21	23256.16	1107.44		
Total	27	40894.30			

C1 D2 D3 D5 D7 D11 D15

CUADRO F-12: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan($\alpha=0.05$) de RETT BGP y REMT BGP.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	6	18414.75	3069.13	2.745	0.040
Error	21	23482.03	1118.19		
Total	27	41896.78			

C1 D2 D3 D5 D7 D11 D15

CUADRO F-13: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan($\alpha=0.05$) de RETT LBGP y REMT LBGP.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat.	6	17088.22	2848.04	2.648	0.045
Error	21	22587.17	1075.58		
Total	27	39675.39			

C1 D2 D3 D5 D7 D11 D15

CUADRO F-14: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan($\alpha=0.05$) de RETT BGR y REMT BGR.

FACTOR	G.L.	S.C.	C.M.	F	p
Trat	6	17843.04	2973.84	2.732	0.040
Error	21	22860.87	1088.61		
Total	27	40703.91			

C1 D2 D3 D5 D7 D11 D15

CUADRO F-15: Tabla de ANOVA y prueba de Duncan($\alpha=0.05$) de RETT LBGR y REMT LBGR.

APENDICE G

		R*	\bar{x}	\pm DE			R	\bar{x}	\pm DE
R-1	C1 0h	-0.195			R-1	C1 6h	0.838		
R-2	C1 0h	-0.393			R-2	C1 6h	0.892		
R-3	C1 0h	0.502	0.043	0.41	R-3	C1 6h	0.222	0.375	0.63
R-4	C1 0h	0.260			R-4	C1 6h	-0.450		
R-1	D2 0h	-0.571			R-1	D1 6h	-0.321		
R-2	D2 0h	-0.451			R-2	D2 6h	0.572		
R-3	D2 0h	0.401	-0.128	0.46	R-3	D2 6h	0.158	0.331	0.53
R-4	D2 0h	0.109			R-4	D2 6h	0.915		
R-1	D3 0h	-0.710			R-1	D3 6h	2.917		
R-2	D3 0h	-0.241			R-2	D3 6h	0.849		
R-3	D3 0h	1.262	0.108	0.84	R-3	D3 6h	0.775	1.384	1.03
R-4	D3 0h	0.120			R-4	D3 6h	0.994		
R-1	D5 0h	0.345			R-1	D5 6h	0.218		
R-2	D5 0h	-0.421			R-2	D5 6h	0.419		
R-3	D5 0h	-0.288	0.054	0.48	R-3	D5 6h	1.108	0.407	0.52
R-4	D5 0h	0.581			R-4	D5 6h	-0.117		
R-1	D7 0h	-0.718			R-1	D7 6h	0.597		
R-2	D7 0h	0.082			R-2	D7 6h	0.180		
R-3	D7 0h	-0.400	-0.284	0.35	R-3	D7 6h	-0.184	0.232	0.33
R-4	D7 0h	-0.099			R-4	D7 6h	0.336		
R-1	D11 0h	-0.197			R-1	D11 6h	-0.239		
R-2	D11 0h	-0.122			R-2	D11 6h	0.626		
R-3	D11 0h	-0.438	-0.150	0.25	R-3	D11 6h	0.386	0.411	0.48
R-4	D11 0h	0.159			R-4	D11 6h	0.871		
R-1	D15 0h	-0.056			R-1	D15 6h	0.358		
R-2	D15 0h	0.316			R-2	D15 6h	0.131		
R-3	D15 0h	0.234	0.165	0.20	R-3	D15 6h	-0.140	0.126	0.20
R-4	D15 0h	Murió			R-4	D15 6h	0.153		

CUADRO G-1: Resultados individuales de la relación (R) entre el peso del pulmón observado y el esperado.

$$* : R = \frac{PP \text{ observado} - PP \text{ esperado}}{PR} \times 1000$$

APENDICE H

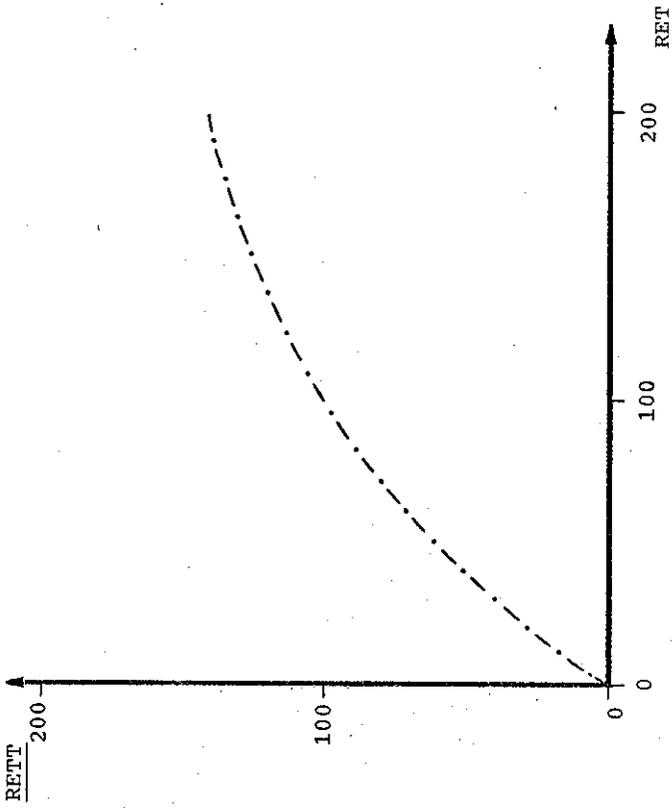


FIGURA H-1: Efecto de la transformación arco tangente sobre el índice de retención.

$$RETT = \left(\text{Arc Tan } \frac{RET}{100} \right) \times 2$$

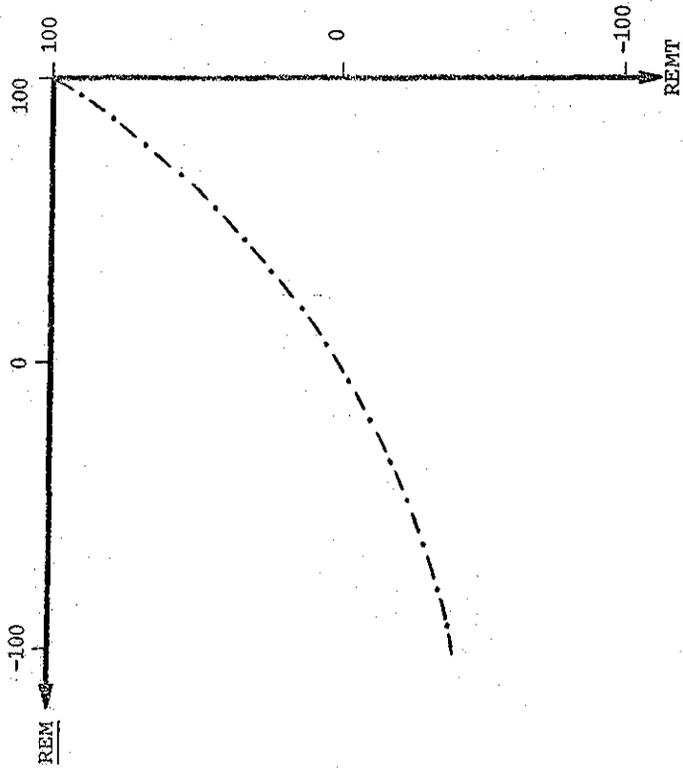


FIGURA H-2: Efecto de la transformación arco tangente sobre el índice de remoción.

$$REMT = \left(\left(\text{Arc Tn} \left(\frac{REM}{100} - 1 \right) \right) \times 2 \right) + 100$$

REFERENCIAS

- Aguilar-Setién, A.; Pastoret, P.P.; Burtonboy, J.; Goignoul, F.; Jetteur, P.; Vandeputte, J.; Schoenaers, F.: Communauté antigénique entre le virus de la rhinotrachéite bovine (Bovid herpesvirus 1, BHV-1) et le virus de la maladie d'Aujeszky (Sus herpesvirus 1, SHV-1) démontrée, chez le bovin, par un test d'hypersensibilité retardée. Ann. Méd. Vet., 123:55-61 (1979a).
- Aguilar-Setién, A.; Pastoret, P.P.; Jetteur, P.; Burtonboy, G.; Schoenaers, F.: Excretion du virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine (Bovid herpesvirus 1) après infection de dexaméthasone, chez un bovin réagissant au test d'hypersensibilité retardée, mais dépourvu d'anticorps neutralisant le virus. Ann. Méd. Vét., 123:62 (1979b).
- Akkermans, J.P.W.M.: Serum prophylaxis in Aujeszky's disease in pigs. Neth. J. Vet. Sci. 3:12-17 (1970).
- Akkermans, J.P.W.M.: Aujeszky's disease. Ann. Méd. Vét. 120(5):295-306 (1976).
- Alva-Valdes, R.; Glock, R.D.; Kluge, J.P.; Keune, C.M.: Effets of vaccination on lesion development in pseudorabies virus challenged swine. Am. J. Vet. Res. 44(4):558-595 (1983).
- Andersen, J.B.: Danish legislative measures for the control of Aujeszky's disease. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds.), Luxembourg, (1982).
- Andrewes, C.H. (1962). Citado por: A.S. Kaplan en: Herpes simplex and pseudorabies viruses, Virology Monographs 5. Springer-Verlag, New York, (1978).
- Andries, K.; Pensaert, M.; Vandeputte, J.: Effect of experimental infection with pseudorabies virus on pigs with maternal immunity from vaccinated sows. Am. J. Vet. Res. 39(8):1282-1285 (1978).
- Andries, K.; Pensaert, M.; Vandeputte, J.: Virological examination of pigs with acute respiratory disorders. Vlams. Dier. Tijds. 50:236-241 (1981).
- Ansfield, M.J.; Kaltreider, H.B.; Caldwell, J.L.; Hersko-

witz, F.N.: Hyporesponsiveness of canine bronchoalveolar lymphocytes to mitogens: inhibition of lymphocyte proliferation by alveolar macrophages. J. Imm. 122(2):542-548 (1979).

Appendini, T.C.M.: Morfología del aparato respiratorio de los cerdos, Memorias del I curso Latinoamericano de actualización sobre neumonías de los cerdos. ENEP-C, UNAM-AMVEC, México (1978).

Arnaudov, K.: Use of a temperature, trypsin and a biologic test for the intraspecific differentiation of field strains of the Aujeszky's disease virus. Vet. Med. Nauki. 12(6):57-61 (1975).

Asmundsson, T.; Kilburn, K.H.: Mucociliary clearance rates at various levels in dog lungs. Am. Rev. Resp. Dis. 102: 388-397 (1970).

Aujeszky, A. (1902). Citado por: A. Baskerville; J.B. Mc Ferran; C. Dow en: Aujeszky's disease in pigs. Vet. Bull. 43(9):465-480 (1973).

Babior, B.M.: Oxygen dependent microbial killing by fagocytes. New Engl. J. Med. 298:659-668 (1978).

Bachtold, H. (1945). Citado por: M. Martell, R. Alcocer, F. Cerón, J.L. Lozano, P. Valle, A.M. Auró en: Aislamiento y características del virus de la enfermedad de Aujeszky o pseudorabia en México. Tec. Pec 18:27-31 (1971).

Backstrom, L.; Hoefling, D.; Morkoc, A.; Winson, R.; Smith, A.R.: Atrophic rhinitis in swine. II Bacteriology, Pasteurella multocida serotypes and pathogenicity in mouse virulence tests, preventive medications and vaccinations. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. México, p.122 (1982).

Bak, U.B.; Kim, Y.O.: A herd outbreak of Pasteurella pneumonia of the pigs, pathological and epidemiological field studies. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. México, p.84 (1982).

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

Bartha, A.; Belak, S.; Benyeda, J.: Tripsin and heat-resis-

Tance of some strains of the herpes virus group. Acta Vet. Hung. 19:97-99 (1969).

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

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

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

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

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

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

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

Baskerville, A.: Aujeszky's disease: Recent advances and current problems. N. Z. Vet. J. 29(10):183-185 (1981).

Baskerville, A.: Cellular immunity in Aujeszky's disease. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds), Louxembourg, (1982).

Beard, C.W.; Easterday, B.C.: An aerosol apparatus for the exposure of large and small animals: Description and operation characteristics. Am. J. Vet. Res. 26:174-182 (1965).

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

Benbought, J.H.: Death mechanisms in airborne Escherichia coli. J. Gen. Microbiol. 47:325-333 (1967).

Bendixen, P.H.; Shewen, P.E.; Rosendal, S.; Wilkie, B.N.: Toxicity of Haemophilus pleuro Pneumoniae for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes, and testicular cells. Infect. Immun. 33(3):673-676 (1981).

Ben-Porat, T.: Studies on the biogenesis of herpesvirus envelope. Nature 235:165-166 (1972).

Ben-Porat, T.; Rixon, F.J.: Replication of herpesvirus DNA. IV Analysis of concatemers. Virology 94:61-70 (1979).

Ben-Porat, T.; Veach, R.A.; Ladin, B.F.: Replication of herpesvirus DNA. VI Virions containing either isomer of pseudorabies virus DNA are infectious. Virology 102:370-380 (1980).

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

Bentley, E.D.; Farrington, D.O.: Evaluation of an induced Pasteurella multocida swine pneumonia model. Am. J. Vet. Res. 41(11):1870-1873 (1980).

Beran, G.W.; Davies, E.B.; Arambulo, P.V.; Will, L.A.; Hill, H.T.; Rock, D.L.: Persistence of pseudorabies virus in infected swine. J.A.U.M.A. 176:998-1003 (1980).

Bhasin, J.L.; Lapointe-Shaw, L.: Antigenic analysis of Pasteurella multocida (serotype 1) by crossed immunoelectrophoresis: Characterization of cytoplasmic and cell envelope associated antigens. Can. J. Microbiol. 26:676-689 (1980a).

Bhasin, J.L.; Lapointe-Shaw, L.: Antigenic analysis of Pasteurella multocida (serotype 1) by crossed immunoelectrophoresis: Characterization of whole cell associated antigens. Can. J. Microbiol. 26:1392-1402 (1980).

Bitsch, V.: Correlation between the pathogenicity of field strains of Aujeszky's disease virus and their ability to cause cell fusion -syncytia formation- in cell cultures.

Acta Vet. Scand. 21:708-710 (1980).

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

Blaxter, K.: The limits of animal production. Vet. Rec. 105:5-9 (1979).

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

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

Bran, L.: Le vaccin roumain a virus avianisé contre la maladie d'Aujeszky. Cah. Méd. Vét. 43:330-333 (1974).

Brogden, K.A.; Rebers, P.A.: Serologic examination of the Westphal type lipopolysaccharides of Pasteurella multocida. Am. J. Vet. Res. 39:1680-1682 (1978).

Brogden, K.A.; Packer, R.A.: Comparison of Pasteurella multocida serotyping systems. Am. J. Vet. Res. 40(9): 1332-1335 (1979).

Burch, D.: The incidence and distribution of lung lesions associated with enzootic pneumonia. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. México, (1982).

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

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

Carter, G.R.; Bigland, C.M.: Dissociation and virulence in strains of Pasteurella multocida isolated from a variety of lesions. Can. J. Comp. Med. 18:473-478 (1953).

Carter, G.R.: Studies on Pasteurella multocida. I A hema

agglutination test for the identification of serological types. Am. J. Vet. Res. 16:481-484 (1955).

Carter, G.R.: Studies on Pasteurella multocida. III, A serological survey of bovine and porcine strains from various parts of the World. Am. J. Vet. Res. 18: 437-440 (1957).

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

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

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

Carter, G.R.: Simplified identification of somatic varieties of Pasteurella multocida causing fowl cholera. Avian Dis. 16:1169-1114 (1972).

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

Carter, G.R.; Rundell, S.W.: Identification of type A strains of Pasteurella multocida using staphylococcal hyaluronidase. Vet. Rec. April 12, p.343 (1975).

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

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

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

Charlton, D.; Blandford, G.: Immunoglobulin class-speci-

fic antibody response in serum, spleen, lungs, and bronchoalveolar washings after primary and secondary Sendai virus infection of germ free mice. Infec. Immun. 17(3): 521-527 (1977).

Chrambach, A.; Reisfeld, R.A.; Wickoff, M.; Zaccari, J.: A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 20:150-154 (1967).

Collins, F.M.: Mechanisms of acquired resistance to Pasteurella multocida infections: A review. Cornell Vet. 67: 103-108 (1978).

Conkling, P.; Papermaster-Bender, G.; Whitcomb, M.; Sagone, A.L.: Oxygen dependence of human alveolar macrophage mediated antibody dependent cytotoxicity. Infec. Immun. 38(1):114-121 (1982).

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

Correa, P.: Enfermedades virales de los animales domesticos, monogasticos. Ed. F.H., México, pp.7-28, (1981).

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

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

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

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

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

bourg, (1982).

Damiano, V.V.; Cohen, A.; Tsang, A.; Batra, G.; Petersen, R.A.: A morfologic study of the influx of neutrophils into dog lung alveoli after lavage with sterile saline. Am. J. Path. 100(2):349-354 (1980).

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

Dauber, J.H.; Danielle, R.P.: Chemotactic activity of guinea pig alveolar macrophages. Am. Rev. Respir. Dis. 117: 673-684 (1978).

Davies, E.B.; Beran, G.W.: Influence of environmental factors upon the survival of Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 31(1):32-36 (1981).

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

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

Degre, M.; Solberg, L.A.: Synergic effect in viral-bacterial infection. III Histopathological changes in the trachea of mice following viral and bacterial infection. Acta Path. Microbiol. Scand. Section B, 79:129-136 (1971).

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

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

Delivo, M.; Beretta, F.; Bonifas, V.; Foroglou, C.: Ultrastructure and function in sympathetic ganglia isolated from rats infected with pseudorabies virus. Brain Res. 140(1):111-124 (1978).

- Doogson, J.B.; Maes, R.K.; Ruiz, J.C.: Cloning and characterization of pseudorabies virus DNA sequences. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. México, p.152, (1982).
- Dow, C.; Mc Ferran, J.B.: The neuropathology of Aujeszky's disease in the pig. Res. Vet. Sci. 3:436 (1962).
- Ducatelle, R.; Coussement, W.; Hoorens, J.: Etiopathology of Aujeszky's virus pneumonia in young pigs. An immunoperoxidase and histopathologic study. Vlams. Dier. Tijds. 51(1):1-10 (1982).
- Dulbècco, D. (1954). Citado por: Product catalogue, Gibco Europe Ltd., Scotland, (1980).
- Dunnill, M.S.: Some aspects of pulmonary defence. J. Pathol. 128:222-236 (1979).
- Easterday, B.C.: Swine influenza. In: Diseases of swine, H.W. Dunne and A.D. Lemman (eds.) 4th. Iowa State Univ. Press, Iowa, pp.141-167 (1975).
- Feldman, L.; Rixon, F.J.; Hojean, J.; Ben-Porat, T.; Kaplan, A.S.: Transcription of the genome of pseudorabies virus (a Herpesvirus) is strictly controlled. Virology 97: 316-327 (1979).
- Freeman, V.J.: Studies on virulence of bacteriophage infected strains of Corynebacterium diphtheriae. J. Bacteriol. 61:675 (1951).
- Frescura, T.; Cessi, D.; Vivoli, P.; De Simone, F.: Immunoprophylaxis of Aujeszky's disease in Italy. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds.), Luxembourg, (1982).
- Friendship, R.P.; Hacker, R.; Mc Millan, I.; Pieper, R.; Swaminathan, S.S.; Takov, R.; Wilson, M.R.: Haemophilus pleuropneumoniae effect on growth rate and related parameters in naturally occurring disease. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Belgium (1984).
- Gerone, P.J.; Couch, R.B.; Keefer, G.V.; Douglas, R.G.; De-rembacher, E.B.; Knight, V: Assesment of experimental and natural viral aerosols. Bact. Rev. 30:576-584 (1966).

Ghenev, C.; Stoyanov, V.: Recherches sur les infections pulmonaires a virus du porc dans les fermes d'engraissement en Bulgarie. Bull. Off. Int. Epiz. 49:373-382 (1958).

Gielkens, A.L.J.; Berns, A.J.M.: Differentiation of Aujeszky's disease virus strains by restriction endonuclease analysis of the viral DNA's. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds.), Louxembourg, (1982).

Goco, R.V.; Kress, M.B.; Brantigan, O.C.: Comparison of mucus glands in the tracheobronchial tree of man and animals. Ann. N.Y. Acad. Sci. 106:555-571 (1963).

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

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

Golais, F.; Ciampor, F.; Sabó, A.: The effet of supraoptimal temperature on the formation of pseudorabies virus particles. Acta Virol. (Prague) 21(6):463-468 (1977).

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

Goldstein, E.; Lippert, W.; Warshauer, D.: Pulmonary alveolar macrophage. Defender against bacterial infection of the lung. J. Clin. Invest. 54:519-528 (1974).

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

Goodnow, R.A.: Biology of Bordetella bronchiseptica. Microbiol. Rev. 44:772-738 (1980).

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

Gospos, C.H.; Freudenberg, N.; Bank, A.; Freudenberg, M.A.: Effect of endotoxin-induced shock on the reticuloendothelial system. Phagocytic activity and DNA-synthesis of reticuloendothelial cells following endotoxin treatment. Beitr. Path. 161:100-106 (1977).

Green, G.M.; Kass, E.H.: The influence of bacterial species on pulmonary resistance to infection in mice subjected to hypoxia, cold, stress and ethanolic intoxication. Br. J. Exp. Path. 46:360-366 (1965).

Green, G.M.: Pulmonary clearance of infectious agents. Ann. Rev. Med. 119:167-176 (1968).

Green, L.H.; Green, G.M.: Differential suppression of pulmonary antibacterial activity as the mechanism of selection of a pathogen in mixed bacterial infection of the lung. Am. Rev. Respir. Dis. 98:814-824 (1968).

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

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

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

Green, M.T.; Courtney, R.J.; Dunkel, E.C.: Detection of an immediate early herpes simplex type 1 polipeptide in trigeminal ganglia from latently infected animals. Infect. Immun. 34:987-992 (1981).

Grewal, A.S.; Rouse, B.T.; Babiuk, L.A.: Mechanisms of recovery from viral infections. Destruction of infected cells by neutrophils and complement. J. Immunol. 124:312-319 (1980).

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

Gross, G.N.; Rehm, S.R.; Pierce, A.K.: The effect of complement depletion on lung clearance of bacteria. J. Clin. Invest. 62:373-378 (1978).

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

Gutekunst, D.E.; Pirtle, E.C.; Mengeling, W.L.: Development and evaluation of a microimmunodiffusion test for detection of antibodies. Am. J. Vet. Res. 39(2):207-210 (1978).

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

Gutekunst, D.E.: Latent pseudorabies virus infection in swine detected by RNA-DNA hybridization. Am. J. Vet. Res. 40(11):1568-1572 (1979).

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

Hagemoser, W.A.: Studies on the pathogenesis of pseudorabies in domestic cats following oral exposure. Dissertation Abstracts International 40:113 (1979).

Hall, J.D.; Almy, R.E.: Evidence for control of herpes simplex virus mutagenesis by the viral DNA polymerase. Virology 116:535-543 (1982).

Hamilton, J.R.; Overall, J.C.: Synergistic infection with murine cytomegalovirus and Pseudomonas aeruginosa in mice. J. Infect. Dis. 137:775-782 (1978).

Harford, C.G.; Hara, M.: Pulmonary edema in influenzal pneumonia of the mouse and the relation of fluid in the lung to the inception of pneumococcal pneumoniae. J. Exp. Med. 91:245-259 (1950).

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

Harris, G.D.; Johanson, W.G. Pierce, A.K.: Determinants of

lung bacterial clearance in mice after acute hypoxia. Am. Rev. Respir. Dis. 116:671-677 (1977).

Hatch, T.F.: Distribution and deposition of inhaled particles in the respiratory tract: Conference on airborne infection. Bact. Rev. 25:237-240 (1961).

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

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

Hernandez, E.M.: Influenza porcina. En: Diagnóstico de las enfermedades del cerdo. Ed. R.R. Necochea y C. Pijoan, México, pp.459-466, (1982a).

Hernandez, E.M.: Reovirus. En: Diagnóstico de las enfermedades del cerdo. Ed. R.R. Necochea y C. Pijoan, México, pp.471-472, (1982b).

Hocking, W.G.; Golde, D.W.: The pulmonary alveolar macrophage, N. Engl. J. Med. 301:580-587 (1979).

Honess, R.W.; Roizman, B.: Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. J. Gen. Virol. 14:8-19 (1974).

Honess, R.W.; Watson, D.H.: Unity and diversity in the herpesviruses. J. Gen. Virol. 37:15-37 (1977).

Howarth, J.A.; De Paoli, A.: An enzootic of pseudorabies in swine in California. J.A.V.M.A. 152:114-118 (1968).

Howarth, J.A.: A serologic study of pseudorabies in swine. J.A.V.M.A. 154:1583-1589 (1969).

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

Hsieh, S.; Golstein, E.; Lippert, W.; Margulies, L.: Effect of

protein A on the antistaphylococcal defense mechanisms of the murine lung. J. Infect. Dis. 6:754-759 (1978).

Hsu, F.S.; Hu, H.; Ro, H.: Pathogenesis of pleuropneumoniae in swine caused by Haemophilus pleuropneumoniae: Pathologic, immunofluorescent and bacteriological studies. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. México, p.78, (1982).

Huhn, R.G.: Swine enzootic pneumonia: Incidence and rate of body weight gain. Am. J. Vet. Res. 31:1097-1108 (1970).

Hunninghake, G.W.; Gallin, J.I.; Fauci, A.S.: Immunologic reactivity of the lung. The in vivo and in vitro generation of a neutrophil chemotactic factor by alveolar macrophages. Am. Rev. Respir. Dis. 117:15-23 (1978).

Hurley, D.P.; Aguilar, A.; Garibay, J.R.; Landers, J.: Estadística, curso CINVESTV-SEP. Dept. Matemáticas, FES-Cuautitlan, México (1981).

Hurley, D.P.; Aguilar, A.; Garibay, J.; Landeros, J.: Técnicas de diseño experimental, curso CINVESTAV-SEP. Dept. Matemáticas, FES-Cuautitlan, México (1982).

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

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

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

Jakab, G.J.; Dick, E.C.: Synergistic effect in viral-bacterial infection: Combined infection of the murine respiratory tract with Sendai virus and Pasteurella pneumotropica. Infect. Immun. 8:762-768 (1973).

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

Jakab, G.J.; Green, G.M.: Pulmonary defense mechanisms in

consolidated and nonconsolidated regions of the lungs infected with Sendai virus. J. Infect. Dis 129:263-270 (1974).

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

Jakab, G.J.; Green, G.M.: The effect of sendai virus infection on bactericidal and transport mechanisms of the murine lung. J. Clin. Invest. 57:1989-1998 (1976b).

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

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

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

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

Jericho, K.W.F.; Langford, E.V.: Pneumonia in calves produced with aerosols of bovine Herpesvirus 1 and Pasteurella haemolytica. Can. J. Comp. Med. 42:269-277 (1978).

Johnson, J.D.; Hand, W.L.; King, N.L.; Hughes, C.G.: Activation of alveolar macrophages after lower respiratory tract infection. J. Immunol. 115:80-84 (1975).

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

Kaehler, K.L.; Markam, R.J.F.; Muscoplat, Ch.C.; Johnson, D.W.: Evidence of cytotoxic effects of Pasteurella haemolytica on bovine peripheral blood mononuclear leukocytes. Am. J. Vet. Res. 41(10):1690-1693 (1980).

Kaplan, A.S.: Herpes simplex and pseudorabies viruses. Virology monographs 5. Springer-Verlag, New York, (1969).

Kaplan, R.L.; Schocket, A.L.; King, T.E.; Maulitz, R.M.; Good, J.T.; Stanford, R.E.; Sahn, S.A.: A model of immune complex pleuropulmonary injury. Am. J. Path. 100: 115-125 (1980).

Kass, E.H.; Green, G.M.; Goldstein, E.: Mechanisms of antibacterial action in the respiratory system. Bact. Rev. 30:448-496 (1966).

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

Kelling, C.L.; Staudinger, W.L.; Rhodes, M.B.: Immune response of pigs inoculated with virulent pseudorabies virus and pigs inoculated with attenuated or inactivated pseudorabies virus vaccine before and after challenge exposure. Am. J. Vet. Res. 43:2114-2120 (1982).

Kemeny, L.J.: Isolation of transmissible gastroenteritis virus, pseudorabies virus, and porcine enterovirus from pharyngeal swabs taken from market-weight swine. Am. J. Vet. Res. 42:1987-1989 (1981).

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

Kilburn, K.H.: Cilia and mucus transport as determinants of the response of lung to air pollutants. Arch. Environ. Health 14:77-91 (1967).

Killington, R.A.; Yeo, J.; Hones, R.W.; Watson, D.H.; Duncan, B.E.; Halliburton, L.W.; Mumford, J.: Comparative analyses of the proteins and antigens of five herpesviruses. J. Gen. Virol. 37:297-310 (1977).

King, M.: Viscoelastic properties of airway mucus. Federation Proc. 39:3080-3085 (1980).

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

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

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

Kreyszig, E.: Introducción a la estadística matemática. Ed. Limusa, México, (1974).

Ladin, B.F.; Ihara, S.; Hampl, H.; Ben-Porat, T.: Pathway of assembly of herpesvirus capsids: An analysis using DNA temperature-sensitive mutants of pseudorabies virus. Virology 116:554-561 (1982).

La Force, F.M.; Kelly, W.; Huber, G.: Stimulation of bactericidal activity of alveolar macrophages with surfactant. Clin. Res. 20:579 (1972).

Larsen, G.L.; Mc Carthy, K.; Webster, R.O.; Henson, J.; Henson, P.M.: A differential effect of C5a and C5a-des-Arg in the induction of pulmonary inflammation. Am. J. Path. 100:179-188 (1980).

Laurenzi, G.A.; Guarneri, J.J.; Endriga, R.B.; Carey, J.P.: Clearance of bacteria by the lower respiratory tract. Science 142:1572-1573 (1963).

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

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

Leake, E.S.; Wright, M.J.; Kreger, A.S.: In vitro effect of purified proteases of Pseudomonas aeruginosa on rabbit lung macrophages. Exp. Mol. Path. 29:241-252 (1978).

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

Lepper, M.H.: Potential interactions between multiple etiologies and pathogenesis of experimental diseases. Yale J. Biol. Med. 40:541-549 (1968).

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

Lillie, L.E.: The bovine respiratory disease complex. Can. Vet. J. 15:233-242 (1974).

Lind, B.; Schimelpfennig, H.; Meyeringh, H.: Studies on the etiology of atrophic rhinitis in pigs. III Serotyping of Pasteurella multocida - cultures isolated from nasal swabs. Tierärztl. Wschr. 91:424-425 (1978).

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

Little, T.W.A.; Harding, D.J.: The interaction of Haemophilus parahaemolyticus and Pasteurella multocida in the respiratory tract of the pig. Br. Vet. J. 136:371-383 (1980).

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

Livingston, C.W.; Stair, E.L.; Underdahl, N.R.; Mebus, C.A.: Pathogenesis of Mycoplasmal pneumonia in swine. Am. J. Vet. Res. 33(11):2249-2258 (1972).

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

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

Ludwig, H.; Heppner, B.; Herrmann, S.: The genomes of different field isolates of Aujeszky's disease virus. In: Aujeszky's disease. Current topics in veterinary medicine and animal science, Vol. 17 Ed. G. Wittmann and S.A. Hall (1982).

Luria, S.E.; Darnell, J.E.; Baltimore, D.; Campbell, A.: Animal virus multiplication, DNA viruses and retroviruses. In: General Virology, 3th ed. John Wiley and sons, Toronto, pp.343-389 (1978).

Lussier, L.M.; Chandler, D.K.F.; Sybert, A.; Yeager, H.: Human alveolar macrophages antigen-independent binding of lymphocytes. J. Appl. Physiol. 45(6):933-938 (1978).

Madsen, P.: A revaluation of the role of Mycoplasma suis-pneumoniae s. hyopneumoniae in regard to swine herd health. IPVS Congr. México, p.97 (1982).

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

Maes, R.K.; Schutz, J.C.: Evaluation in swine of a subunit vaccine against pseudorabies. Am. J. Vet. Res. 44(1): 123-125 (1983).

Magnusson, K.E.; Stendhal, O.; Stejerneström, I.; Edebo, L.: Reduction of phagocytosis, surface hydrophobicity and charge of Salmonella typhimurium 395 MR-10 by reaction with secretory Ig A (S Ig A). Immunology 36:439-447 (1979).

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

Mahnel, H.; Ottis, K.; Herlyn, M.: Stability in drinking and surface water of nine virus species from different genera. Zen. Bak. Parasi. Infek. Hyg. Erste. Abt. Orig. Reihe B. Hyg. Betriebs hyg. Praev. Med. 164(1/2):64-84 (1977).

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

Markham, R.J.F.; Wilkie, B.N.: Interaction between Pasteurella haemolytica and bovine alveolar macrophages. Cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. Am. J. Vet. Res. 41(1):18-22 (1980)

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

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

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

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

Mason, R.J.; Williams, M.C.; Greenleaf, R.D.; Clements, J.A.: Isolation and properties of Type II alveolar cells from rat lung. Am. Rev. of Resp. Dis. 115:1015-1026 (1977).

McAllister, H.A.; Carter, G.R.: An aerogenic Pasteurella-like organism recovered from swine. Am. J. Vet. Res. 35 (7):917-922 (1974).

McFerran, J.B.; Dow, C.: The excretion of Aujeszky's disease virus by experimentally infected pigs. Res. Vet. Sci. 5:405 (1964).

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

McFerran, J.B.; Dow, C.: Experimental Aujeszky's disease. Br. Vet. J. 126:173-179 (1970).

McFerran, J.B.; Clarke, J.K.; Knox, E.R.; Connor, T.J.: A study of the cell lines required to detect a variety of veterinary viruses in routine diagnostic conditions. Br. Vet. J. 128(12):627 (1972).

McFerran, J.B.; Dow, C.: The effect of colostrum derived antibody on mortality and virus excretion following experimental infection of piglets with Aujeszky's disease

virus. Res. Vet. Sci. 15:208-214 (1973).

McFerran, J.B.: Reoviruses. In: Disease of swine, H.W. Dunne and A.D. Leman (eds). 4th. Iowa State Univ. Press, Iowa, pp.141-167 (1975).

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

McFerran, J.B.; Dow, C.; McCracken, R.M.: Experimental studies in weaned pigs with three vaccines against Aujeszky's disease. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 2: 327-334 (1979).

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

Medina, L.R.; Correa, P.: Presencia de Ac contra la enfermedad de Aujeszky en sueros de cerdos de diferente procedencia. Téc. Pec. Méx. 32:93-96 (1977).

Medveczky, I.; Szabo, I.: Isolation of Aujeszky's disease virus from boar semen. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 29(1): 29-36 (1981).

Melnick, J.L.; McCombs, R.M. (1966). Citados por: A.S. Kaplan en: Herpes simplex and pseudorabies viruses. Virology monographs 5. Springer-Verlag, New York, (1969).

Mercado, S.; Rosales, J.C.; Martell, M.D.: Avances de los resultados serológicos en el estudio epizootiológico de la enfermedad de Aujeszky en México. Memorias de la reunión de investigación pecuaria en México (1982).

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

Mims, C.A.: Host defences against viruses and the latter's ability to counteract them. In: Pathogenicity in man and animals, 22th Symposium of the Society for General Microbiology, H. Smith and J.H. Pearce (eds). Cambridge University Press, pp.333-358 (1972).

Mims, C.A.: The pathogenesis of infectious disease. Aca-
ademic Press, New York (1976).

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

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

Motovski, A.: The role of Aujeszky's disease virus in the
respiratory diseases of swine. Vet. Med. Nauki 12(8):40-
44 (1975).

Motovsky, A.; Kounev, Zh.: Experimental selection of slight-
ly virulent strains of Aujeszky's disease virus. Vet.
Sci. 16(7):83-90 (1979).

Muirhead, M.R.: Respiratory diseases of pigs. Br. Vet. J.
135:497 (1979).

Murty, D.K.; Kaushik, R.K.: Studies on an outbreak of acu-
te swine pasteurellosis due to Pasteurella multocida ti-
pe B (Carter 1955). Vet. Rec. 77(15):411-416 (1965).

Namioka, S.; Murata, M.: Serological studies on Pasteurella
multocida. II Characteristics of somatic (O) antigen of
the organism. Cornell Vet. 51:507-521 (1961).

Newhouse, M.; Sanchis, J.; Bienenstock, J.: Lung defense me-
chanisms. N. Engl. J. Med. 295:990-998 (1976).

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

Nikitin, M.C.: The role of pigs that survived natural in-
fection with Aujeszky's disease virus in the epizootiolo-
gy of this disease. Veterinariya, Moscow, 9:32-36 (1961).

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

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

Nugent, K.M.; Pesanti, E.L.: Staphylococcal clearance and pulmonary macrophage function during influenza infection. Infec. and Immun. 38(3):1256-1262 (1982b).

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

O'Connor, P.J.; Lenihan, P.: Assesment of Aujeszky's vaccination programe in the Republic of Ireland. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds.), Louxembourg, (1982).

Okerman, L.; Spanoghe, L.; Bruycker, R.M.: Experimental infections of mice with Pasteurella multocida strains isolated from rabbits. J. Comp. Path. 89:51-55 (1979).

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

Orraca, J.: Continuación de los estudios epizooticos de la enfermedad de Aujeszky's. Tesis licenciatura, FMVZ-UNAM, México, (1978).

Owens, S.L.; Osebold, J.W.; Zee, Y.C.: Dynamics of B-lymphocytes in the lungs of mice exposed to aerosolized Influenza virus. Infect. Immun. 33:231-238 (1981).

Pan, I.C.; De Boer, C.J.; Hess, W.R.: African swine fever: Application of immunoelectrosmophoresis for the detection of antibody. Can. J. Comp. Med. 36:309-316 (1972).

Papp-Vid, G.; Dulac, G.C.: Pseudorabies: Adaptation of the countercurrent immunoelectrophoresis for the detection of antibodies in porcine serum. Can. J. Comp. Med. 43: 119-124 (1979).

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

Pedersen, K.D.; Barfod, K.: The aetiological significan-

ce of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida in atrophic rhinitis of swine. Nord. Vet. Med. 33: 513-522 (1981).

Pedersen, K.B.: The occurrence of toxin-producing strains of Pasteurella multocida in SPF herds. Proc. Int. Pig Vet. Cong. México p.82 (1982).

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

Pennings, A.M.M.A.; Storm, P.K.; Baars J.C.: Porcine atrophic rhinitis: Use of vero cell line monolayer for demonstration of thermolabile toxins and toxin-neutralizing capacity antisera. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Belgium (1984).

Pennington, J.E.: Bronchoalveolar cell response to bacterial challenge in the immunosupressed lung. Am. Rev. Respir. Dis. 116:885 (1977).

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

Pfeiffer, E.; Schipper, I.A.: Evaluation of pseudorabies viral antigens in the agar gel immunodiffusion test. Am. J. Vet. Res. 40:595-598 (1979).

Phillis, J.W.: Veterinary physiology. W.B. Saunders (eds.) Philadelphia, (1976).

Pierce, A.K.; Reynolds, R.C.; Harris, G.D.: Leucocytic response to inhaled bacteria. Am. Rev. Respir. Dis. 116: 679-684 (1977).

Pijoan, C.; Ochoa, G.: A bactericidal substance against Pasteurella multocida produced by pig embryo tracheal explants. Rev. Lat-Amer. Microbiol 20:1-3 (1978a).

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

Pijoan, C.; Campos, M.; Ochoa, G.: Effect of a hog cholera

vaccine strain on the bactericidal activity of porcine alveolar macrophages. Rev. Lat-Amer. Microbiol. 22:69-71 (1980).

Pijoan, C.: Pasteurellosis. En: Diagnostico de las enfermedades del cerdo. Ed. R.R. Necochea y C. Pijoan, México pp.511-514, (1982a).

Pijoan, C.: Micoplasmosis. En: Diagnostico de las enfermedades del cerdo. Ed. R.R. Necochea y C. Pijoan, México, pp.527-531, (1982b).

Pijoan, C.; Larios, F.; Iglesias, G.; Monroy, J.: Epidemiology and immunity in locally infected pigs with Pasteurella multocida. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. México, p. 83 (1982).

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

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

Pimentel, F.: Curso de estadística experimental. Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, (1978).

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

Pirtle, E.C.: Pseudorabies virus antibodies in swine slaughtered in Iowa. Can. J. Comp. Med. 46:128-129 (1982).

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

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

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

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

Probert, M.; Stott, E.J.; Thomas, L.H.: Interactions between calf alveolar macrophages and parainfluenza-3 virus. Infect. Immun. 15:576-585 (1977).

Raynaud, J.P.; Brunault, G.; Maire, C.; Renault, L.; Perreau, D.: Pouvoir pathogene de pathogene de Pasteurella multocida pour le jeune porc. Essai de realisation d'un mode le de pneumonie ague experimentale. Journées Rech. Porcine en France, pp.165-169 (1977).

Rebers, P.A.; Heddleston, K.L.: Immunologic comparison of Westphal-type lipopolysaccharides and free endotoxins from a encapsulated and a nonencapsulated avian strain of Pasteurella multocida. Am. J. Vet. Res. 35:555-560 (1974).

Rebers, P.A.; Phillips, M.; Rimler, R.; Boykins, R.A.; Rhoades, K.R.: Immunizing properties of lipopolysaccharide from an avian strain of Pasteurella multocida. Am. J. Vet. Res. 41:1650-1654 (1980).

Rhem, S.R.; Coonrod, J.D.: Early clearance of pneumococci from the lungs of decompemented rats. Infect. Immun. 36:24-29 (1982).

Reynolds, H.Y.; Thompson, R.E.: Pulmonary host defenses. I Analysis of protein and lipids in bronchial secretions and antibody responses after vaccination with Pseudomonas aeruginosa. J. Immunol. 111:358-368 (1973a).

Reynolds, H.Y.; Thompson, R.E.: Pulmonary host defenses. II Interaction of respiratory antibodies with Pseudomonas aeruginosa and alveolar macrophages. J. Immunol. 111:369-380 (1973b).

Reynolds, H.Y.; Atkinson, J.P.; Newball, H.H.; Frank, M.M.:

Receptors for immunoglobulin and complement on human alveolar macrophages. J. Immunol. 114:1813-1819 (1975).

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

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

Rocklin, R.E.; Benditzen, K.; Greineder, D.: Mediators of Immunity: Lymphokines and monokines. Advances Immunity 29:55-136 (1980).

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

Rosendal, S.; Mitchell, W.R.: Factors associated with spread and effect of pleuropneumonia in pigs caused by haemophilus pleuropneumoniae. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. México, p.77 (1982).

Ross, R.F.: Mycoplasmal pneumonia of swine. Proc. 23 Ann. Nebraska SPF Conference, Nebraska, (1983).

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

Rubinstein, A.S.; Kaplan, A.S.: Electron microscope studies of the DNA of defective and standart pseudorabies virions. Virology 66:385-392 (1975).

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

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

Rylander, R.: Measurement of different mechanisms for elimination of bacteria from the lung. Bact. Rev. 30:514-516 (1966).

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

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

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

Sabó, A.: Persistence of perorally administered virulent pseudorabies virus in the organism of non immune and immunized pigs. Acta Virol. (Praha), 13:269-277 (1969).

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

Sabó, A.; Rajcáni, J.: Latent pseudorabies virus infection in pigs. Acta Virol. (Praha), 20:208-214 (1976).

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

Scmiedhoffer, J. (1910). Citado por: Baskerville, A.; Mc Ferran, J.B.; Dow, C.: Aujeszky's disease in pigs. Vet. Bull. 43:465-480 (1973).

Schofield, F.W.: Virus pneumonia like (V.P.P.) Lesions in the lungs of canadian swine. Can. J. Comp. Med. 20: 252 (1956).

Schös, P.; Thiel, L.P.: Occurrence of toxin producing strains of Pasteurella multocida and Bordetella bronchiseptica in pigs herds with atrophic rhinitis and in unaffected herds. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Belgium (1984).

Schultz, R.A.; Ross, R.F.; Young, T.: Incidence of antibodies to Haemophilus pleuropneumoniae in Iowa swinw.

Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. México, p.107 (1982).

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

Schwartz, L.W.; Christman, C.A.: Lung lining material as a chemotactant for alveolar macrophages. Chest 75(S):284-288 (1979).

Sharp, J.M.; Gilmour, N.J.L.; Thompson, D.A.; Rushton, B.: Experimental infection of specific pathogen-free lambs with parainfluenza virus type 3 and Pasteurella haemolytica. J. Comp. Pathol. 88:237-243 (1978).

Shigidi, M.T.A.; Mustafa, A.A.: Serological relationship between strains of Pasteurella multocida. Cornell Vet. 70:27-36 (1980).

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

Shope, R.E. (1934). Citado por: Baskerville, A.; Mc Ferran, J.B.; Dow, C. in: Aujeszky's disease in pigs. Vet. Bull. 43:465-480 (1973).

Shore, S.L.; Black, C.M.; Melweicz, F.M.; Wood, P.A.; Nahmias A.J.: Antibody dependent cell mediated cytotoxicity to target cells infected with type 1 and type 2 herpes simplex virus. J. Immunol. 116:194-201 (1976).

Simeonov, S.: Carriage and excretion of Aujeszky's disease virus by pigs. Vet. Med. Nauki (Sofia), 10:67-72 (1973).

Simmons, D.J.C.; Simpson, W.: The biochemical and cultural characteristics of Pasteurella pneumotropica. Med. Lab. Sci 34:145-148 (1977).

Skoda, R.; Brauner, I.; Sadcky, E.; Mayer, V.: Immunization against Aujeszky's disease with live vaccine. 1 Attenuation of virus and some properties of attenuated strains Acta Virol. (Praha), 8:1-9 (1964).

Smialowicz, R.J.; Schwab, J.B.: Inhibition of macrophage phagocytic activity by group A streptococcal cell walls. Infect. Immun. 20:258-261 (1978).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Smith, P.C.: Research and diagnostic techniques used in chronic pseudorabies virus infections of swine. Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc. 83:432-443 (1979).

Smith, R.H.; Babiuk, L.A.; Stockdale, P.H.G.: Intranasal immunization of mice against Pasteurella multocida. Infect. Immun. 31:129-135 (1981).

Söderling, O.; Bergström, G.: Bacteriological investigations as a background for vaccination in hirs. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Belgium (1984).

Spear, G.P.; Keller, J.M.; Rizman, B.: Proteins specified by herpes simplex virus. II, Viral glycoproteins associated with cellular membranes. J. Virology 5:123-131 (1970).

Stendhal, O.; Normann, B.; Edebo, L.: Influence of O and K antigens on the surface properties of escherichia coli in relation to phagocytosis. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B 87:85-91 (1979).

Stevely, W.S.: Inverted repetition in the chromosomes of pseudorabies virus. J. Virology 22:232-234 (1977).

Stevens, J.G.: Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. Science 173:843-845 (1971).

Stimmler, N.P.; Hugli, T.E.; Bloor, C.M.: Pulmonary injury induced by C3a and C5a anaphylotoxins. Am. J. Path. 100:327-340 (1980).

Stockdale, P.H.G.; Langford, E.V.; Darcel, C.Q.: Experimental bovine pneumonic pasteurellosis. I, Prevention of disease. Can. J. Comp. Med. 43:262-271 (1979).

Stoner, G.D.; Hallman, M.; Troxell, M.C.: Lecthin biosynthesis in a clonal line of lung adenoma cells with type II alveolar cell properties. Exp. Mol. Path. 29:102-114 (1978).

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

Szweda, W.; Koncicki, A.; Myszkowski, J.; Gajecki, M.; Baczecki, W.:

The role of asymptomatic infections in the epizootiology of Aujeszky's disease. Med. Veter. 36:391-393 (1980).

Tatarov, G.: Apathogener mutant des Aujeszky-virus, induziert von 5iodo-2-deoxyuridin. Zentbl. Vet. Med. 15(B): 847-853 (1968).

Tatarov, G.: Le vaccin bulgare MK-25 contre le maladie d'Aujeszky. Cah. Méd. Vét. 43:347-352 (1974).

Tatarov, G.; Gergov, P.: An Avirulent mutant of the Aujeszky's disease virus obtained under the effect of 5-bromo-deoxyuridine. Vet. Med. Nauki 18:3-12 (1981).

Terpstra, C.; Pol, J.M.A.: Influence of vaccination with modified live vaccine on the diagnosis of Aujeszky's disease. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds.), Louxembourg, (1982).

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

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

Thigpen, J.E.; Clements, M.E.; Gupta, B.N.: Isolation of Pasteurella aerogenes from the uterus of a rabbit following abortion. Lab. Animal Sci. 28:444 (1978).

Thomas, W.R.; Holt, P.G.; Keast, D.: Cigarette smoke and phagocyte function: Effect of chronic exposure in vivo and acute exposure in vitro. Infect. Immun. 20:468-475 (1978).

Thomson, R.G.: Pathology and pathogenesis of the common diseases of the respiratory tract of cattle. Can. Vet. J. 15:249-251 (1974).

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

Toews, G.B.; Gross, G.N.; Pierce, A.K.: The relationship of inoculum size to lung bacterial clearance and phagocytic cell response in mice. Am. Rev. Respir. Dis. 120:559-566 (1978).

Toma, B.: Obtention et caractérisation d'une souche thermosensible de virus de la maladie d'Aujeszky (souche Alfort 26). Rec. Méd. Vét. 155:131-137 (1979a).

Toma, B.: Propriétés biologiques d'une souche thermosensible (Alfort 26) de virus de la maladie d'Aujeszky. Rec. Méd. Vét. 155:245-252 (1979b).

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

Toma, B.; Ursache, R.; Rose, R.; Lorant, J.M.; Metianu, T.; Vigoroux, A.; Duee, J.; Prave, M.; David, C.: Aujeszky disease in France in 1980. Rec. Méd. Vét. 157:515-518 (1981).

Toneva, V.: Obtention d'une souche non-virulente du virus de la maladie d'Aujeszky au moyen de passages et de l'adaptation des pigeons. C.R. Acad. Bulgare Sci. 14:187-190 (1961).

Tozzini, F.: Characteristics of field and modified disease virus strains. In: Aujeszky's disease. G. Wittmann S.A. Hall (eds), Luxembourg (1982).

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

Van der Heyden, P.J.; Kamp, E.M.; Pals, J.W.; Tetenbourg, G.J.: Isolation and characterization of a heat-labile dermonecrotic from Pasteurella multocida. Proc. Int. Pig Vet. Soc. Cong. Belgium, (1984).

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

Van Meyering, H.; Dirks, G.; Schoss, P.; Schimmeipfennig, H.: Untersuchungen sur Aetiology der rhinitis atrophicans des schweines. Dtsch. Tierarztl. Wschr. 84:266-268 (1977).

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

Veit, P.H.; Farrel, L.R.: The anatomy and physiology of the bovine respiratory system relating to pulmonary disease. Cornell Vet. 68:555-581 (1978).

Veselinova, A.: Comparative morphologic studies of pigs infected with different strains of the pseudorabies virus. Vet. Med. Nauki 18:17-24 (1981).

Waldman, R.H.; Ganguly, J.: Immunity to infections on secretory surfaces. J. Infect. Dis. 130:419-440 (1974).

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

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

Warshauer, D.; Goldstein, E.; Akers, T.; Lippert, W.; Kim, M.: Effect of influenza viral infection on the ingestion and killing of bacteria by alveolar macrophages. Am. Rev. Respir. Dis. 115:269-277 (1977).

Watt, R.G.: Virological study of two commercial pig herds with respiratory disease. Res. Vet. Sci. 24:147-153 (1978).

Weir, D.M.; Ogmundottir, H.M.: Non-specific recognition mechanisms by mononuclear phagocytes. Clin. Exp. Immunol. 30:323-329 (1977).

Weissmann, G.; Hoffstein, S.; Korchak, H.; Smolen, J.E.: The earliest membrane responses to phagocytosis; membrane potential changes and Ca^{++} human Granulocytes. Trans. Assoc. Am. Physicians 41:90-103 (1978).

Wells, M.A.; Ennis, F.A.; Daniel, S.: Cytotoxic t-cell and antibody responses to influenza infection of mice. J. Gen. Virol. 43:685-690 (1979).

Wilkinson, B.J.; Peterson, P.K.; Quie, P.G.: Cryptic peti-
doglican and the antiphagocytic effect of bacterial cell
surface polymers. Infect. Immun. 23:502-508 (1979).

Williams, P.P.; Pirtle, E.D.; Moria, M.F.: Isoelectric focu-
sing of infectious particules of porcine pseudorabies vi-
rus strains in granulated dextran gels. Can. J. Comp.
Med. 46:65-69 (1982).

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

Wittman, G.; Hohn, U.; Weiland, F.; Böhm, H.O.: Experimental
nasal infection of cattle with Aujeszky's disease virus
(ADV). In: Aujeszky's disease. G. Wittman S.A. Hall (eds.)
Louxembourg, (1982a).

Wittman, G.; Rziha, H.J.; Döllner, P.C.: Ocurrence of cli-
nical Aujeszky's disease in immunosupressed latently in-
fected pigs. In: Aujeszky's disease. G. Wittman S.A.
Hall (eds.), Louxembourg (1982b).

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

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

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

Zentner, R.J.: Physical and chemical stresses of aero-
solisation. Bact. Rev. 30:551-557 (1966).

Zuffa, A.; Polak, L.: immunoprophylaxie de certaines mala-
dies a virus du porc et des volailles en Tchecoslovaquie
Bull. Int. Epizoot. 64:297-307 (1965).

Zuffa, A.; Grielova, K.: Immunisierung gegen die Aujez-
kysche krankheit. II, Studium der zytopathogenitat und

plaquen morphologie verschiedener virusstämme bezüglich
ihser virulenz für schweine. Arch. Exp. Vet. Med. 20:
127-140 (1966).

Zwilling, B.S.; Campolito, L.B.: Destruction of tumor cells
by BCG activated macrofages. J. Immunol. 119:838-841
(1977).