

40



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN**

28/8/52

**EVIDENCIA POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE
BARRIDO DEL DAÑO AL EPITELIO MUCOCILIAR
PRODUCIDO POR LA INTERACCION ENTRE
MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE Y
PASTEURELLA MULTOCIDA EN PULMON DE
CERDO.**

PUBLICACION

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

NORA GUADALUPE GONZALEZ ROSALES

ASESOR: M. en C. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SANCHEZ



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.

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

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

El artículo: Evidencia por microscopía electrónica de barrido del daño al
al epitelio mucociliar producido por la interacción entre
Mycoplasma hyopneumoniae y Pasteurella multocida en pulmón de cerdo.

que presenta la pasante: Nora Guadalupe González Rosales
con número de cuenta: 9352840-1 para obtener el título de:
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Junio de 2000

PRESIDENTE

M.V.Z. Gilberto Ochoa Uribe

VOCAL

M. en C. Tónatiuh Alejandro Cruz Sánchez

SECRETARIO

M.V.Z. Raúl Schinca Felitti

PRIMER SUPLENTE

M.V.Z. Marco A. Mendoza Saavedra

SEGUNDO SUPLENTE

M.V.Z. Raúl García Tinajero

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por permitirme, poder disfrutar de este sueño maravilloso que es vivir , por darme la extraordinaria familia que tengo, y por tener la oportunidad de llegar a ver cumplida una de mis metas más anheladas.

A la memoria de mi padre :

Don Pablo González Ruelas , de quién sólo recibí siempre un amor especial y la herencia de integridad humana a toda prueba. Que afortunada fui en ser tu hija... te dedico mi sueño, nuestro sueño, aquí está, ojalá también puedas disfrutarlo, desde dónde estés. **TE AMO.**

A mi madre :

Guadalupe Rosales García, mujer de gran fortaleza, ejemplo de superación constante y empuje... mil gracias por darme no sólo la vida, también por el apoyo , libertad , confianza y tu amor.

Mis hermanos :

Siempre he sentido su cariño incondicional

Mary : hermana y colega... siempre el apoyo en los dos aspectos.

Rafa: tus bromas y consejos siempre me acompañan.

Diana : El "vivo" ejemplo de una triunfadora, te admiro mucho.

Luis : gracias por ser parte importante de mi familia, te quiero.

Antonio y Eric :

La alegría de todos nosotros, espero poder transmitirles el entusiasmo inmenso que significa perseguir una meta.

A mis amigos y amigas :

Con quienes he podido compartir a lo largo de mi vida no sólo momentos buenos. Enriquecen mi existencia. Gracias por ser parte **MUY** importante de mi vida. (Claudia, Panchis, Eva, Chiquis, Heber, Los Herrera, René, Lupe, Luisés, Dany, Manuel, Paty, Edmundo, Bombón, Güera, mil perdones si omito a alguien)

Mis Maestros :

Dr. Abel Ciprián Carrasco :

Gracias por el apoyo profesional y personal, la confianza al abrirme las puertas de su casa, por la amistad y sobre todo por hacer de ésto una realidad. Espero corresponder al hecho de ser de la "familia".

Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez :

No sólo mi "profe", también mi AMIGO, le debo mucho. Gracias !.

Dr. Jorge Rico Pérez, amigos desde el principio, sus consejos siempre los tengo en mi corazón... gracias !. **Dra. Blanca Moreno Cardenti**, maestra, amiga, te quiero mucho. **Dr. Víctor Pérez Valencia**, sus enseñanzas me han acompañado siempre, las valoro mucho, gracias también por la amistad que me ha demostrado.

Y a todos mis demás profesores, que en mucho han contribuido a mi formación con la excelente calidad que demuestran día a día.

Para mis animalitos :

Poppy, Nanuk, Nicky, Snowsy, Macuca, Snar, Cuyeyo, Pancho, Alvaro, Lobohombo y Titanio.... que siempre están en mi mente recordándome el por qué de todo ésto... para ustedes por su amor sin igual, su compañía y todos los momentos hermosos que hemos compartido... Gracias por ser el motor que me impulsa a ser mejor .

AGRADECIMIENTOS

A la **FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**, mi escuela :

Que me dio la oportunidad de ser lo que siempre quise ser....

A la sección de **Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** :

Por su apoyo académico y laboral. Gracias a todos los que la conforman.

Un reconocimiento especial para el laboratorio de **Enfermedades Respiratorias del Cerdo** de la Coordinación General de Investigación y Estudios de Posgrado pertenecientes a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, por todo su apoyo.

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de **Enfermedades Respiratorias del Cerdo** de la Coordinación de Estudios de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Campo 1. Universidad Nacional Autónoma de México.

Trabajo publicado en la revista **Técnica Pecuaria en México**, Vol 37, No. 3. Septiembre - Diciembre – 1999.

RESUMEN

Las interacciones entre microorganismos son un fenómeno importante para el entendimiento de su patogenicidad. En este trabajo se decidió explorar los posibles mecanismos de patogenicidad del *Mycoplasma hyopneumoniae* que permiten la invasividad de la *Pasteurella multocida*, utilizando técnicas de microscopía electrónica de barrido. Se formaron cuatro grupos de cerdos libres de neumonía enzoótica, los cuales recibieron diferentes preparaciones de estos microorganismos. El grupo A se inoculó sólo con medio de cultivo libre de *M. hyopneumoniae* y no presentó lesiones macroscópicas, ni microscópicas. El grupo B inoculado con *M. hyopneumoniae* al inicio del experimento, presentó lesiones macroscópicas características de la neumonía enzoótica; microscópicamente se observaron cambios en los epitelios, abundante bacteria, fibrina y células fagocíticas. El grupo C se inoculó con *P. multocida* el día 23 y no presentó lesiones macroscópicas ni microscópicas. El grupo D inoculado al inicio con *M. hyopneumoniae* y el día 23 con *P. multocida*, también desarrolló lesiones de neumonía enzoótica; a nivel microscópico se observaron las mismas características que en el grupo B con cilios apelmazados y abundantes bacterias. La acción del *M. hyopneumoniae* causa la falta de actividad ciliar y permite la instalación de la *P. multocida* y otras bacterias oportunistas.

PALABRAS CLAVE: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, Neumonías, Microscopía electrónica.

Scanning electron microscopic evidence of the damage produced by the interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* to the mucociliar epithelium from pig lungs.

SUMMARY

To understand pathogenicity interaction among microorganisms is a very important phenomenon. In this work using scanning microscopic we decided to explore the possible pathogenicity mechanisms of *Mycoplasma hyopneumoniae* allow the *Pasteurella multocida* invasiveness. Four groups of pigs free of enzootic pneumonia were formed, which received different preparations of these microorganisms. Group A was inoculated with culture media bacteria free and this group did not show any lesions. Group B was inoculated with *M. hyopneumoniae* at the beginning of the experiment and presented macroscopic lesions characteristic of enzootic pneumonia. Changes in epithelium, abundant bacteria, fibrin and phagocytic cells were observed microscopically. Pigs from group C were inoculated with *P. multocida* on day 23 and did not develop neither macroscopic nor microscopic lesions. Group D was inoculated with *M. hyopneumoniae* at the beginning of the experiment and on day 23 with *P. multocida*; these animals developed enzootic pneumonia with flat cilia and abundant bacteria. *M. hyopneumoniae* activity lead to the lack of ciliary activity and allows the installation of *P. multocida* and other opportunistic bacteria.

KEY WORDS: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, Neumonia, Scanning Electron Microscopy..

Las enfermedades respiratorias del cerdo, hoy en día están consideradas como los problemas de salud animal más importantes en la producción porcina (1). En neumonía enzoótica (NE) *Mycoplasma hyopneumoniae* es considerado como el agente bacteriano primario más importante (2, 3) seguido de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que causa pleuroneumonía contagiosa porcina (4, 5). El agente secundario que con mayor frecuencia se aísla es *Pasteurella multocida* una vez que las defensas de pulmón han sido alteradas, agravándose el problema en una pasteurelisis pulmonar (PP) (6, 7). La interacción entre *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* después de una infección secuencial ha sido demostrado (8, 9, 10). Existe mucha información sobre las lesiones patológicas de NE, y los estudios se encaminan a identificar los mecanismos de patogenicidad de *M. hyopneumoniae* cuando se analizan por microscopía óptica y electrónica de escanión y de transmisión, complementando estos estudios con autoradiografía a partir de pulmones con NE (11, 12, 13). El propósito del presente trabajo fue visualizar por microscopía electrónica de barrido la interacción de *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* en cerdos infectados en forma secuencial con estos dos agentes.

De una granja convencional libre de neumonía enzoótica, se adquirieron 19 cerdos de cinco semanas de edad recién destetados, procedentes de tres camadas, de hembras de quinto parto, con ellos, tres se utilizaron para desafiarlos con *Mycoplasma hyopneumoniae* y tener inoculos en homogeneizados pulmonares; y con los demás se formaron cuatro grupos experimentales de cuatro cerdos cada uno, los cuales se distribuyeron por parejas en áreas separadas, con comederos y bebederos independientes (con un peso promedio de 15.9 kg y peso total 61.6 kg). Antes de iniciar

el experimento los animales se mantuvieron durante una semana en los nuevos corrales, para permitir la aclimatación y adaptación tanto, de las instalaciones como del alimento. Los lechones fueron alimentados con raciones de alimento comercial peletizado, libre de antibióticos.

La cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* 194 en homogeneizado pulmonar, fue donada amablemente por el Dr. Richard Ross, del Veterinary Medical Research Institute, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, y la cepa de *Pasteurella multocida* tipo A, procedente de un caso clínico y purificada por clonación, fue donada por el Dr. Carlos Pijoan.

Los grupos experimentales quedaron como sigue: Grupo A. Testigo. No infectado, solo inoculado con medio de Friis (peso promedio:15.5 kg; peso total 62.2 kg); Grupo B. Inoculado con *Mycoplasma hyopneumoniae* el primer día de experimentación (peso promedio: 16.7 kg; peso total: 67.0 kg). Grupo C. Inoculado el día 23 con *Pasteurella multocida* (peso promedio: 15.9 kg; peso total 63.6 kg) y Grupo D. Inoculado el primer día con *Mycoplasma hyopneumoniae* y el día 23 con *Pasteurella multocida* A los lechones de todos los grupos se les proporcionó alimento comercial sin antibióticos, dosificado según el peso del animal: cuando los cerdos pesaron entre 11 y 16 kg se suministró 1 kg /día , cuando los animales pesaron entre 16 y 28 kg, 1.5 kg/día y entre 28 y 38 kg de peso, se les suministró 2 kg/día).

Producción de homogeneizado pulmonar con *Mycoplasma hyopneumoniae*. Se inocularon tres lechones libres de gérmenes con la suspensión de *Mycoplasma hyopneumoniae* cepa 194 (con un título de 104 Unidades Cambiantes de Color,

UCC /ml), se usaron 20 ml por animal, se administraron por vía endotraqueal con una sonda, para lo cual los cerdos fueron previamente sedados con clorhidrato de metodimato (1.5mg/kg vía intravenosa). Los lechones fueron observados diariamente y se sacrificaron por choque eléctrico, después de la sedación/ anestesia y exsanguinación cuando presentaron los signos clínicos de neumonía (día 19 posinoculación). Los lóbulos pulmonares con las áreas neumónicas, se obtuvieron asépticamente y con ellos se preparó un homogeneizado al 10% (peso/volumen) en medio de Friis, con morteros TenBroeck, (2). El homogeneizado se distribuyó en alícuotas de 2 ml., congeló a -20°C y se sometió a un panel de pruebas de control de calidad para determinar la ausencia de otras especies de *Mycoplasma*, así como de *Pasteurella multocida*, *Bordetella* sp., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus* sp. porcino y virus respiratorios, para asegurarse tanto de la pureza del material, como de la identidad del microorganismo causante de las lesiones. Para titular el homogeneizado se utilizaron muestras de 0.5 ml., que se diluyeron seriadamente en medio de Friis y se incubaron a 37°C en una atmósfera de aire y CO_2 al 10 % durante cinco a siete días; a las colonias sospechosas se les realizaron pruebas de identificación bioquímica y serológica. Se tomó una alícuota para determinar la concentración de los organismos viables en unidades cambiantes de color (UCC). El homogeneizado diluido conteniendo 104 UCC/ml se usó para inocular a los animales de los grupos B y D, usando el mismo procedimiento descrito. El día de la inoculación se designó como el primer día del experimento.

La cepa A de *Pasteurella multocida* fue cultivada en caldo Infusión Cerebro Corazón ó (Brain Heart Infusion: BHI) por ocho horas, a 37°C ; la suspensión bacteriana se ajustó a una densidad óptica de 0.70 a 660 nanómetros en un

espectrofotómetro Spectronic 20 (Baush & Lomb, Rochester, New York) , equivalente a 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por ml. Cada grupo de cerdos de los grupos C y D fué inoculado con 22 ml de la suspensión bacteriana (108 células/ml) empleando una cámara de aerosolización modificada para cerdos conteniendo tres nebulizadores médicos (De Vilbiss, Somerset, Pennsylvania) (14, 15) ajustados para aplicar el inóculo en 30 minutos. La inoculación con *Pasteurella multocida* fue realizada el día 23, cuatro días después de haberse iniciado la hipertermia producida por la infección con *M. hyopneumoniae* en los cerdos de donde se obtuvo el homogeneizado para la inoculación de los grupos B y D.

Para la evaluación de las lesiones macroscópicas, se midió la extensión de las lesiones neumónicas mediante planimetría de los diagramas pulmonares normalizados de vista dorsal y ventral. Se calculó el promedio del área dañada por ambas vistas y se calculó el porcentaje del área ocupada por las lesiones neumónicas, tomando como base el porcentaje del área total del pulmón, realizándose el análisis estadístico por la prueba de "t" de Student. También se registró el aspecto de las lesiones neumónicas, así como la presencia de adherencias en ellas.

Para la evaluación de las lesiones microscópicas, los fragmentos representativos de los pulmones afectados (lóbulos craneal y cardiaco derechos) se fijaron en formalina amortiguada al 10%, se incluyeron en parafina para la obtención de cortes de 6 μ m de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las lesiones microscópicas se evaluaron de acuerdo al método de Morrison et al (5) modificado, este método de evaluación subjetiva consistió en la infiltración linfocitaria e infiltración de polimorfonucleares (PMN)

en la luz bronquial, y dependiendo de su relativa abundancia en cada sección se calificaron de 1 a 4 puntos.

Para la microscopía electrónica, se colectaron muestras de un centímetro cúbico de las zonas neumónicas previamente expandidas y fijadas por perfusión alveolar con glutaraldehído al 3%. Las muestras se rebanaron en secciones de 3 mm y se continuaron fijando en la misma solución durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron en PBS y se deshidrataron en etanol a 15, 30, 50, 70, 95, y 100% durante 15 minutos, con tres cambios de alcohol absoluto, se infiltraron gradualmente con acetato de amilo y se mantuvieron en acetato de amilo puro durante 30 minutos y con tres cambios; finalmente se deshidrataron a punto crítico con CO₂ y por último se recubrieron con una capa de oro de un espesor de 100 amstrons con un evaporador de iones (Fine Coat, ion sputter modelo Samdri-780 A, marca Tousimis Res. Corp.). Las observaciones fueron hechas con un microscopio electrónico de barrido, modelo JSM-25 SII, marca Jeol; se tomaron fotografías directamente de la pantalla del microscopio empleando diferentes tipos de película (16).

Los inóculos preparados resultaron contener un sólo tipo de microorganismo hasta donde pudimos determinar, el homogeneizado pulmonar sólo parecía contener *Mycoplasma hyopneumoniae*, y la suspensión bacteriana sólo contenía *Pasteurella multocida*.

En el grupo A, testigo no inoculado, no hubo lesiones pulmonares macroscópicas, excepto en el lóbulo cardiaco derecho de un animal, en el cual se encontró una pequeña zona de consolidación rojiza que abarcó el 3.3 % de la superficie pulmonar.

estuvo asociada con adherencias pleurales y de ella se aisló *Mycoplasma hyorhinis* (Figura 1A). Se encontraron lesiones en los pulmones de todos los animales del grupo B inoculado sólo con *Mycoplasma hyopneumoniae*; las áreas consolidadas abarcaron del 4 al 17 % de la superficie pulmonar y eran gris rojizas con adherencias (Figura 1B). En los pulmones del grupo C, inoculado sólo con *Pasteurella multocida*, no se observaron lesiones macroscópicas (Figura 3C). Todos los animales del grupo D, inoculado primero con *M. hyopneumoniae* y 23 días después con *P. multocida*, presentaron áreas de consolidación que variaron del 22 al 26 % de la superficie pulmonar, eran rojizas y gris rojizas y tenían adherencias en un solo caso. (Figura 1D). Los porcentajes de lesiones observados entre tratamientos fueron ($P < 0.05$).

Con el estudio de microscopía óptica, en los cortes histológicos de los pulmones de los grupos A y C no se observaron cambios patológicos, excepto en la lesión de la que se aisló el *M. hyorhinis*. En esta se encontraron abundantes leucocitos polimorfonucleares (PMN) en los alvéolos y en la luz bronquial, proliferación de macrófagos alveolares y reacción linfocitaria perivascular con depósitos de fibrina. Los cortes de las áreas consolidadas en los cerdos del grupo B presentaron zonas colapsadas con congestión, engrosamiento de septos alveolares, proliferación linfocitaria peribronquial, dos o tres linfocitos por septo y un ligero incremento de los macrófagos alveolares. Los cortes de las áreas consolidadas del grupo D presentaron engrosamiento de septos, abundantes PMN en los alveolos y luz bronquial, congestión y hemorragia alveolar e intersticial, gran proliferación de macrófagos alveolares, reacción linfocitaria perivascular y depósitos de fibrina.

La evaluación subjetiva basada en la acumulación de puntos dependiendo del grado de lesión se resume en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Estudio de las lesiones microscópicas

Grupos experimentales No. Cerdo	Infiltración linfocitaria (1 a 4)*	Infiltración de PMN en la luz bronquial (1 a 4)*	Total de puntos acumulados
Grupo A			
1	0	0	9
2	0	0	
3	2	0	
4**	3	4	
Grupo B			
5	3	1	17
6	3	1	
7	3	2	
8	2	2	
Grupo C			
9	2	0	4
10	2	0	
11	0	0	
12	0	0	
Grupo D			
13	3	4	25
14	3	3	
15	3	3	
16	3	3	

*Rango de posibles puntos por acumular dependiendo del grado de lesión.

**Cerdo con el 3.3 % de lesión neumónica del cual se aisló *Mycoplasma hyorhinis*

PMN = Polimorfonucleares

La microscopía electrónica de barrido reveló que los pulmones testigo y los que fueron inoculados únicamente con *P. multocida*, no mostraron cambios patológicos (ver Figura 2 y Figura 4). En cambio, los pulmones de los cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae* tuvieron consolidación pulmonar evidente a menores aumentos (ver Figura 5); a mayores aumentos (ver Figura 6 y Figura 7) se observaron cambios en los epitelios ciliados, abundantes bacterias, fibrina y células fagocitarias alveolares en gran cantidad. El grupo de cerdos inoculados primero con *M. hyopneumoniae* y después con *P. multocida* mostraban esencialmente los mismos cambios que se encontraron en el grupo B, con la adición de que los epitelios ciliados mostraron zonas carentes de cilios y micoplasmas evidentes en ellos formando cilios apelmazados, así como de abundantes bacterias. Es de hacer notar que en las lesiones del tejido ciliado de los bronquiolos se encontró evidencia morfológica tanto de micoplasma como de pasteurela en el mismo campo visual, que indudablemente cubre un área muy pequeña.

Estudios previos han demostrado la participación sinérgica entre *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* en las neumonias del cerdo (6, 8, 9, 10), sin embargo, pocos trabajos describen cuales son los mecanismos de patogenicidad y de cómo ocurre la interacción en el pulmón (10,17). En este trabajo se encontraron evidencias importantes de cómo ocurre el fenómeno de interacción que complementan los estudios anteriores.

Los cerdos del grupo testigo y los inoculados solamente con *P. multocida* no tuvieron lesiones pulmonares, excepto un animal del grupo testigo, en el que se encontró una pequeña área neumónica que abarcó el 3% de la superficie pulmonar, del cual se aisló *M. hyorhinis*, y aunque la participación de este micoplasma en las neumonias es polémico, existen cepas que en cerdos gnotobióticos producen neumonias (18) y se le

atribuye la causa de poliserositis y artritis en lechones (3) y en forma esporádica se ha aislado de lavados bronquiales de pulmones con y sin lesiones (19).

Las áreas de consolidación pulmonar del grupo inoculado solamente con *M. hyopneumoniae* fueron menos extensas que las del grupo inoculado con ambos agentes, y abarcaron del 4 al 17% de superficie pulmonar. En el grupo de animales inoculados con ambos agentes las áreas de consolidación variaron del 22 al 26% y se clasificaron como severas (7, 8, 9).

En el grupo testigo no se encontraron lesiones microscópicas excepto en el cerdo que se infectó naturalmente con *M. hyorhinis* en donde las lesiones fueron proliferativas como las causadas por agentes infecciosos primarios (1,16). La inoculación con *P. multocida* al grupo C no provocó lesiones microscópicas, Lara et al (14) han determinado que los cerdos sanos convencionales remueven fácilmente *P. multocida* cuando se utiliza un sistema de inoculación por medio de aerosoles.

En el grupo B la inoculación con *M. hyopneumoniae* también produjo lesiones proliferativas. Sin embargo, las lesiones microscópicas de los cerdos del grupo D inoculados secuencialmente con ambos agentes infecciosos fueron de tipo exudativo, como las comúnmente producidas en las infecciones secundarias (7, 8, 9). Se ha demostrado que la infección previa por *M. hyopneumoniae* favorece la colonización y el daño pulmonar por *P. multocida*, que no es patógeno per se.

Con este modelo experimental se analiza por interpretación de las imágenes de microscopía electrónica. los posibles mecanismos de patogenicidad de *M. hyopneumoniae* que permiten la invasividad de *P. multocida*. La técnica de preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido sobre todo con la distensión de los espacios alveolares con la infusión del fijador, indicaban la posibilidad de que las bacterias y micoplasmas fueran desalojados de las lesiones, sin embargo esto no

sucedió así, ya que se encontraban abundantes bacterias en las lesiones estudiadas. Las áreas de consolidación pulmonar, así como los septos de las zonas afectadas confirman las observaciones de microscopía óptica, pero dado que la microscopía electrónica de barrido no permitió la observación de estructuras internas sino solamente de superficies, la complejidad de los materiales acumulados en los alvéolos, resultó poco informativa.

En los grupos A y C (Figura 2) se observó que el fondo alveolar expuesto en otras áreas, aparece limpio y libre de perforaciones, lo cual aunado a la ausencia de polvo y bacterias, confirman que se trata de un animal joven en el cual estos elementos no han tenido mucha oportunidad de depositarse. Tampoco se hicieron evidentes bacterias ni macrófagos alveolares, confirmando que se trata de un pulmón sano. También el epitelio bronquial fue normal, en donde numerosas células caliciformes mostraban su típica característica cubierta de papilas y cilios cortos, así como células epiteliales ciliadas con sus característicos cilios largos. Los espacios intercelulares son evidentes, no se sabe si por mostrar un inicio de proceso patológico o por un defecto de fijación. La técnica de preparación de la muestra parece haber sido adecuada ya que si bien se removió el moco que normalmente cubre a estos epitelios, los cilios muestran partículas de polvo todavía adheridos cerca de la punta. En la célula caliciforme a gran aumento (4000X), se aprecia un gran número de microvelocidades y cilios cortos; estas células son glándulas unicelulares encargadas de producir el moco que normalmente cubre a estos epitelios. Todo esto a su vez parece indicar que el epitelio estaba funcionando normalmente como parte del escalador traqueobronquial, ya determinado por Lara et al (14) en los cerdos sanos convencionales que removieron fácilmente *P. multocida* aerosolizada. Blanchard et al (10) observaron en las tráqueas de lechones no infectados, la membrana celular, los cilios, las microvelocidades y algunas gotas de

moco, durante las fases iniciales de la enfermedad, el proceso de eliminación de cilios en el epitelio del tracto respiratorio fue notorio.

En los pulmones de los cerdos del grupo B y D infectados con *M. hyopneumoniae* y *P. multocida*, el área pulmonar afectada (Figura 5) mostraba alvéolos semejantes a las de la Figura 2, pero ahora los alvéolos fueron borrados por los exudados, células y bacterias, mientras que la consolidación pulmonar observada no permitió distinguir los bronquiolos pulmonares. Los cilios del epitelio respiratorio (Figura 6) estaban adheridos unos a otros formando mechones o macollos característicos de una afección por micoplasma. Generalmente la patogenicidad de los micoplasmas es por la habilidad de adherirse a la célula huésped, más aún cuando ya se ha mencionado que existe una asociación estrecha entre la cito-adsorción y cito-patogenicidad en el caso de las diferentes especies de micoplasmas (20,21). Ya se había encontrado en condiciones in vitro que *M. hyopneumoniae* interfiere con las ondulaciones normales del cilio (20), y que la eliminación de los cilios después de la infección con *M. hyopneumoniae* también ocurría (21). Así mismo, se observó que cuando el *M. hyopneumoniae* se multiplica en la tráquea y en los bronquios, el evento primario de la infección de *M. hyopneumoniae*, fue la adhesión de los micoplasmas a las células ciliadas, lo que desencadenó un efecto citopático y una exfoliación de las células epiteliales (21). En este estudio, el epitelio de los animales del grupo D estaba entrando en degeneración, debido a la interacción de *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* y por lo tanto el escalador traqueo bronquial como forma de eliminación de contaminación del pulmón había dejado de funcionar. Se apreció en la superficie de los cilios tanto bacilos como cocos, lo que parecería corresponder a pasteurelas y micoplasmas, respectivamente. Sin embargo la identificación fue puramente morfológica. Así mismo, el epitelio respiratorio estaba cubierto de bacterias, el grado de afección lo había privado de los cilios que

normalmente se encontraban en este tejido. La distancia entre las células aumentó considerablemente indicando que las células epiteliales además de haber perdido todos sus cilios, se encontraban desprendiéndose del tejido subyacente en un aparente inicio de apoptosis. Toda el área se encuentra generosamente salpicada de bacterias en forma de bastoncitos de diferente longitud pero del mismo grueso, se trata aparentemente de *Pasteurella multocida*.

Este estudio no permite responder la pregunta de si la ó las toxinas del micoplasma actúan solamente en forma local, o si se difunden a otros tejidos para ejercer su acción patógena. Si bien este estudio no excluye la posible existencia de toxinas difusibles de acción a distancia, resulta claro que las áreas sin cilios que provocan las toxinas del micoplasma, son rápidamente aprovechados como sitios de colonización por la pasteurela inoculada posteriormente. La acción conjunta de estos dos microorganismos no solo causa la transvasación de plasma en los alvéolos, en donde la falta de actividad ciliar permite la permanencia del patógeno primario, sino además la de los oportunistas y el ejercicio de sus respectivas actividades patógenas, de tal manera que las zonas de consolidación pulmonar no sólo permiten la multiplicación microbiana sino además crean una barrera a la penetración de medicamentos capaces de eliminarlos. Los epitelios ciliados por otra parte, no solo muestran la pérdida de la motilidad por la formación de mechones, sino además la pérdida de los cilios y de las células de recubrimiento en la mucosa respiratoria. Esta solución de continuidad crea un sitio ideal para la invasión de oportunistas terciarios en el aire y representa un reto importante a la capacidad de defensa del animal.

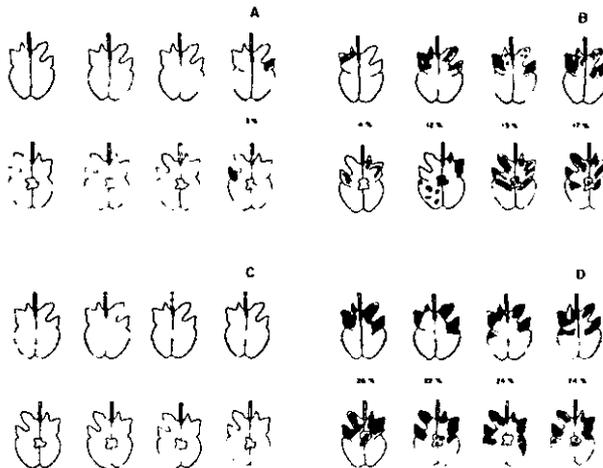


Figura 1. Extensión de las lesiones pulmonares con diferentes inóculos. Grupo A con medio de Friis; grupo B con *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh); grupo C con *Pasteurella multocida* (Pm); grupo D con Mh y Pm.

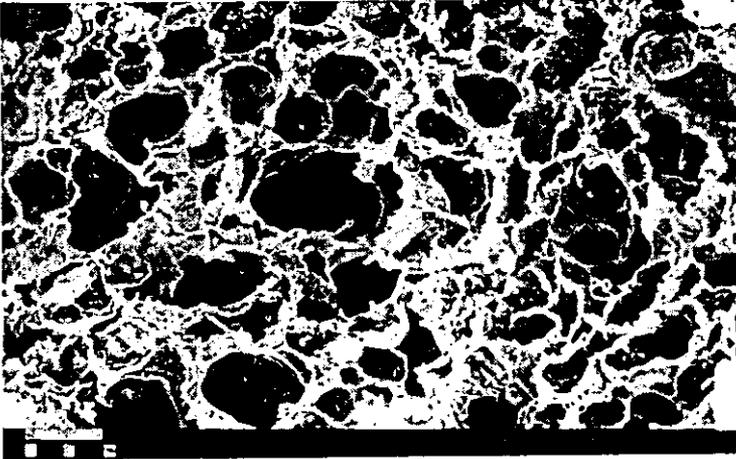


Figura 2. Pulmón normal (100x). Se aprecia el espesor de las tabiques intraalveolares así como el fondo de algunos alvéolos limpios y libres de perforaciones. La barra clara representa 50 μm de longitud.

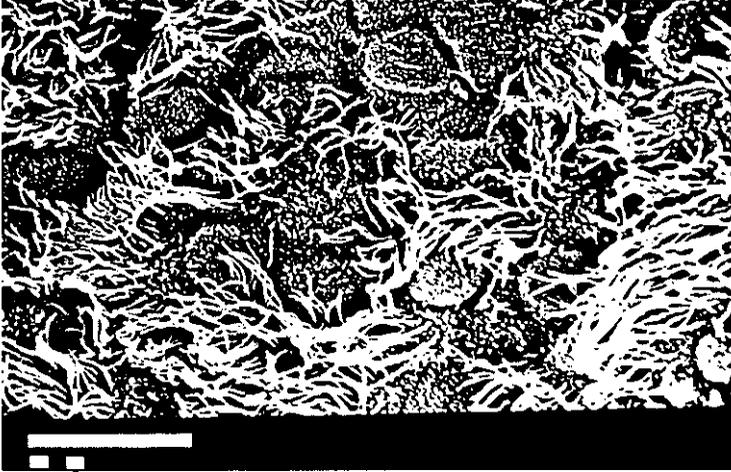


Figura 3. Epitelio bronquial normal (300x). Numerosas células calciformes, células epiteliales; espacios intercelulares evidentes. Sin presencia de moco. La barra clara representa 10 μm de longitud.



Figura 4. Célula calciforme a gran aumento (10,000x). Se aprecia un gran número de microvelocidades y cilios cortos. La barra clara representa 1 μm de longitud.

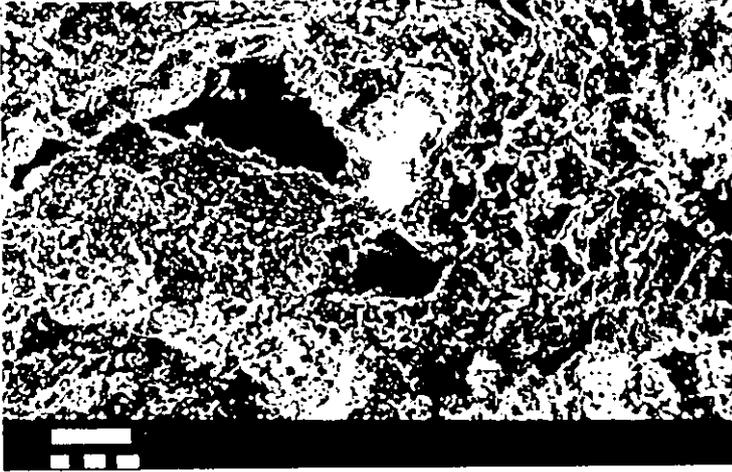


Figura 5. Area pulmonar afectada (100x). Los alvéolos se han borrado por exudados, células y bacterias. La consolidación pulmonar observada no permite distinguir si hay bronquiolos pulmonares. La barra clara representa 50 μm de longitud.



Figura 6. Cilios amacollados (7,000x). Adheridos unos a otros formando mechones o macollos característicos; se observan cocoides pleomórficos característicos de micoplasmas. La barra clara representa 30 μm de longitud.

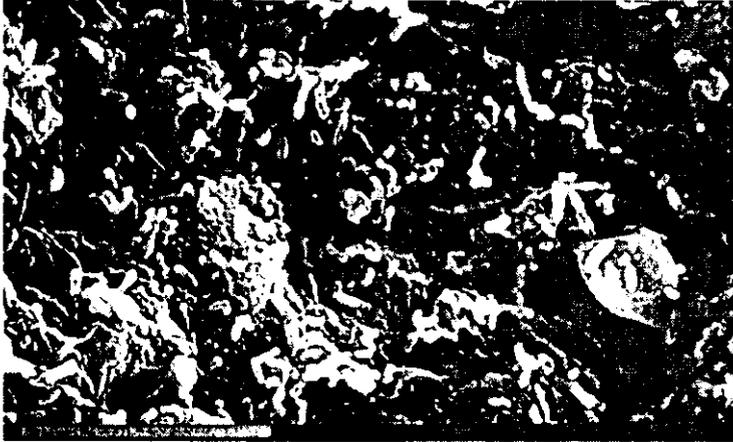


Figura 7. Epitelio respiratorio cubierto de bacterias (4,500x). Epitelio ciliado casi nulo, aumento de distancia entre células; abundantes bacterias. La barra clara representa 20 μm de longitud.

REFERENCIAS

1. Loeffen WLA, Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, *et al.* Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs. *Vet Rec* 1999; 145:123-126.
2. Piffer IA, Ross RF. Effect of age on susceptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *Am J Vet Res* 1984;45:478-481.
3. Ross RF. Mycoplasmal diseases. Straw B, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ. Editors. In *Diseases of swine* 8th ed. Ames, Iowa, USA: Iowa State University Press; 1999:495-509.
4. Sebunya TNK, Saunders JR. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *JAVMA* 1983;182:1331-1336.
5. Ciprián A, Medina G, Fuentes M, *et al.* Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. *Vet Mex* 1988;19:205-210.
6. Morrison RB, Pijoan C, Hilley HD, Rapp V. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can J Comp Med.* 1985;49:129-137.
7. Smith IM, Hodges RT, Betts AO, Hayward AHS. Experimental infections of gnotobiotic piglets with *Pasteurella septica* (sero-group A) alone or with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Path* 1973;83:307-321.
8. Ciprián A, Pijoan C, Cruz T, *et al.* *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can.J Vet Res* 1988;52:434-458.

9. Amass SF, Clark LK, Uah Alstine WG, Boversock TL, Murphy DA, Knox KE, Albregts SR. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. J Am Vet Med Assoc 1994;204:102-107.
10. Blanchard B, Vena MM, Cavallier A, Lelannie J, Gouranton J, Kobish M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet Microbiol 1992;30:329-341.
11. Tajima M, Yagihasi T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. Infect Immun 1982;37:1162-1169.
12. Gabridge MG, Brigh MJ, Richards HN. Scanning electron microscopy of *Mycoplasma pneumoniae* on the membrane of individual ciliated tracheal cells. In. Vitro. 1982;1:55-62.
13. López A, Thompson RG, Savan M. The pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* in calves infected with bovine parainflunza-3 virus. Can J Comp Med 1976;40:385-391.
14. Lara V, Caballero S, Alarcón F, Camacho J, Ciprián A. Remoción pulmonar de *Pasteurella multocida* en cerdos de engorda. Resúmenes de XX Reunión Anual de AMVEC. Mérida Yucatán. 1985:144-147.
15. Goldstein J, Newbury D, Eclin P. et al. Scanning electron microscopy and X ray microanalysis. A text for biologist, materials scientist and geologist. 1981.Plenum Press New York. p 495.

16. Fuentes M C, Pijoan C. Pneumonia in pigs induced by intranasal challenge exposure with pseudorabies virus and *Pasteurella multocida*. Am J Vet Res 1987;48:1446-1448.
17. Underdahl NR, Kennedy GA, Ramos AS Jr. Duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in gnotobiotic pigs. Can Vet J 1980;21:258-262.
18. Gois M, Kuksa E. Intranasal infection of gnotobiotic piglets with *Mycoplasma hyorhinis* differences in virulence of strain and influence of age on the development of infection. Zentral Vet 1974; (B)21:352-361.
19. Hensel A, Ganter M, Kipper S. *et al.* Prevalence of aerobic bacteria in bronchoalveolar lavage fluids from healthy pigs. Am J Vet Res 1994;55:1697-1701.
20. Williams PP, Gallager JE. Cytopathogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal ring and lung explant organ cultures alone and in combination with monolayer cultures of fetal lung fibroblasts. Infect Immun 1978;20:495-502.
21. Mebus CA, Underdahl NR. Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am J Vet Res 1977;38:1249-1254.