

12  
2 Gen



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

## Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán"

ESTUDIO AL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BA-  
RRIDO DE SUSTANCIA BACTERICIDA SECRETADA POR  
EXPLANTES TRAQUEALES DE EMBRION DE CERDO,  
SOBRE Pasteurella multocida.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
MIGUEL FUERTE FUENTES



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## INDICE.

	Página.
I.- INTRODUCCION	1
A) Generalidades.	
1.- Historia.	1
2.- Características de <u>Pasteurella multocida</u> .	2
3.- Patogenia de <u>Pasteurella multocida</u> .	5
4.- Signos y lesiones causadas por <u>Pasteurella multocida</u> .	7
5.- Prevalencia de <u>Pasteurella multocida</u> en conejos.	8
6.- Mecanismos de defensa del hospedero.	8
7.- Profilaxis, control y tratamiento contra <u>Pasteurella multocida</u> .	12
8.- Microscopía electrónica.	13
II.- OBJETIVO.	14
III.- MATERIALES Y METODOS.	15
a) Organismo.	15
b) Cultivo de explantes traqueales.	16
c) Ensayos de actividad bactericida.	17
d) Microscopía electrónica de barrido.	18
IV.- RESULTADOS.	19
V.- DISCUSION.	29
VI.- CONCLUSIONES.	33
VII.- REFERENCIAS.	34

## INTRODUCCION.

Uno de los problemas que ha enfrentado y enfrenta hoy nuestro país son las pérdidas económicas en el área pecuaria, Pijoan y Trigo ( 1982 ). Anualmente, México pierde gran cantidad de carne porcina debido a enfermedades respiratorias que causan ocasionalmente abortos, desnutrición y muerte. En la mayoría de los casos, no son diagnosticadas con exactitud. Sin embargo, son varios los agentes involucrados en estas afecciones pulmonares, entre los más importantes se han aislado algunos virus respiratorios, micoplasma y Pasteurella multocida, Pijoan y Trigo ( 1982 ).

## HISTORIA

Pasteurella multocida fue primeramente aislada por M. Toussaint en 1879, a partir de pollos. Desde ese momento y hasta la fecha, ha sido aislada de muchas especies de mamíferos y aves. Se ha aislado también de varias regiones del cuerpo humano, siendo la mayor de las veces del tracto respiratorio, pulmón y de heridas infectadas ( de manos, brazos y piernas ), causadas por perros y gatos, Heddles - ton y Wessman ( 1975 ).

En una revisión inicial ( Levy-Bruhl, 1938 ), se encontró que el primer humano infectado por P. multocida fue la es-

posa de un granjero, la cual tenía fiebre puerperal, estableciéndose que padecía bacteremia, pudiéndose aislar el organismo mediante cultivo en agar sangre, Carter (1955).- El primer brote de pasteurelisis reportado en cerdos ocurrió en la India en 1963 y fue causado por P. multocida tipo B. Se estableció que este organismo no era únicamente patógeno a los cerdos, sino también a búfalos, chivos, conejos, ratones y cobayos, Murty y Kausshik ( 1965 ).Otros animales que han causado heridas por mordedura o arañazos, en las cuales se ha aislado P. multocida, incluye al león, zarigueya, rata, pantera y conejo, Carter ( 1955 ).

#### CARACTERISTICAS DE P. multocida.

Este organismo, a partir de material clínico y de cultivos frescos se presenta como bastón o cocobacilo Gram negativo, con tinción bipolar; es aerobio y anaerobio facultativo; crece óptimamente en un rango de 35-37°C en medios sólidos y líquidos complementados con sangre o suero; después de 24-48 hpras de incubación, las colonias semejan en apariencia y medida a las de E. coli y Salmonella. Este microorganismo es fermentativo, no móvil, no forma esporas, tampoco produce hemólisis en agar sangre, produce indol y reduce al nitrato, Carter ( 1955 ), Cowan ( 1974 ).- No hay características absolutas que puedan ser usadas pa-

ra identificar todos los cultivos de P. multocida, pero - las más usuales, sin tomar en cuenta el origen del hospede ro en el cual fue aislada son: la fermentación de glucosa, sucrosa, manitol y fructosa sin producción de gas; no fer mente lactosa, maltosa, inositol, inulina, ramnosa y sali cín; además carece de ureasa, Heddleston y Wessman (1975). Para propósitos prácticos existen, existen clasificadas, - principalmente tres variantes de colonias ( ver cuadro 1): 1) mucoide, 2) lisa o flourescente y 3) no capsulada o ru gosa, Carter ( 1955 ).

Para estudios serológicos iniciales de P. multocida, se u saron pruebas de precipitación, aglutinación y fijación de de complemento, las cuales arrojaban poca información acer ca de los inmunotipos conocidos ( ver cuadro 2 ). Inicial mente Carter usó la prueba de hemaglutinación indirecta pa ra identificar tipos capsulares de P. multocida. Los tipos capsulares encontrados en bovinos con pasteurelosis fueron el A, B, D y E. Para la identificación del tipo D, se uti liza la prueba de acriflavina, la cual al ponerse en con tacto con los microorganismos, produce un precipitado flo culento característico, esto no sucede con los serotipos - A, B y E, Carter y Subronto ( 1973 ). Sin embargo, si se desea una identificación rápida de P. multocida ( no del serotipo ) se puede usar SIM-Rafinosa, ya que es la única- Pasteurella negativa a la rafinosa, positiva al indol, ne-

Cuadro 1. Algunas características de las variaciones de P. multocida.

Variante	Colonias en agar	Crecimiento en caldo	Virulencia en ratón
Mucoide	Grandes	Depósito <u>mu</u> coide	Moderada
Lisa	Medianas, discretas	Difuso	Alta
Rugosa	Pequeñas, discretas	Aglutinado	Baja

Cuadro 2. Carter y Roberts clasificaron los siguientes in-  
munotipos de P. multocida.

Carter		Roberts
Tipo A	=	Tipos II, III y IV
Tipo B	=	Tipo I
Tipo D	=	Tipo V
Tipo E	=	No equivalente.

gativa al  $H_2S$  y además no es móvil, Pijoan y Ochoa ( 1978- ).

Las Pasteurellas que causan infecciones internas frecuentemente son capsuladas y aquellas que producen colonias mucoides poseen gran cantidad de ácido hialurónico, el cual puede ser fácilmente detectado por hialuronidasa testicular, Pujols y col. ( 1984 ) o estafilococal, Carter ( 1955 ).

Cuatro diferentes tipos capsulares, designados A, B, D y E, pueden ser identificados por un procedimiento pasivo de hemaglutinación indirecta, en la cual los polisacáridos capsulares son adsorbidos sobre eritrocitos, Carter ( 1955 ). Se ha demostrado que aquellos cultivos identificados como tipo A y D poseen diferentes antígenos somáticos, los cuales son aglutinables, Namioka y Murata ( 1961 ).

P. multocida, posee cuatro antígenos capsulares y por lo menos 16 antígenos somáticos, los cuales, al parecer, tienen naturaleza lipopolisacárida, Pijoan y col. ( 1983 ).

#### PATOGENIA DE P. multocida.

En general las bacterias patógenas poseen, por lo menos, dos características: a) habilidad para multiplicarse dentro del hospedero y b) capacidad para sobrevivir a los mecanismos de defensa del hospedero, en especial de la fa-



gocitosis.

Existen cepas primariamente patógenas, las cuales, por sí solas, son capaces de producir la enfermedad y las secundariamente patógenas, que requieren de la ayuda de agentes físicos ( cambios bruscos de temperatura, alta humedad, - desnutrición, etc. ), agentes químicos ( como los corticosteroides, que son potentes inmunodepresores ) y agentes biológicos ( como algunos virus y micoplasmas ).

Las bacterias oportunistas revisten mayor importancia en la actualidad, ya que su prevención implica tomar en cuenta los factores tanto del agente como de su hospedero, que están en equilibrio y cuya naturaleza no se conoce completamente. Siendo la adherencia un requisito indispensable para la patogénesis, cualquier interferencia en este proceso previene la infección. Existen excepciones a esto, por ejemplo con P. multocida, en la cual la adherencia a epitelio no se lleva a cabo, Pijoan y Ochoa ( 1978 ).

P. multocida actúa como oportunista en las infecciones del tracto respiratorio inferior, siendo incluso más patógena que el agente iniciador del cuadro neumónico, Pujols y col ( 1984 ). Es también un importante organismo en la compleja etiología de la neumonía crónica del cerdo, Pijoan y col. ( 1983 ). Este microorganismo está ampliamente distribuido en la población porcina y es el principal agente infeccioso secundario en la neumonía del cerdo. Las infeccio-

nes del tracto respiratorio son causadas por importantes agentes primarios tales como Mycoplasma hyopneumoniae y Myxovirus parainfluenza-3, Bentley y Farrington ( 1980 ). Es posible que la lesión pulmonar causada por el virus promueva que las bacterias subsistan y se multipliquen, creando el cuadro clínico, Stokdale y col ( 1979 ).

#### SIGNOS Y LESIONES CAUSADAS POR P. multocida.

La enfermedad se caracteriza fundamentalmente por atacar animales de ceba, en la octava y décima semana. Rara vez produce un cuadro nervioso. Produce bronconeumonía crónica que puede finalizar en pericarditis y pleuritis. La presencia de abundantes neutrófilos, células mononucleares y exudado mucopurulento en alveolos y bronquiolos es característica en infección por P. multocida, Pijoan y Trigo ( 1982 ).

La pasteurelisis pulmonar ocurre principalmente en dos formas: a) septicémica aguda y b) subaguda o crónica. Las lesiones se caracterizan por una coloración rojo-azulosa de la piel, con hemorragia puntiforme, faringitis aguda, consería infiltración de la región faríngea y de tejido conectivo, área subcutánea adyacente con fluido infiltrado amarillento o rojo pálido. Los pulmones se presentan congestionados y edematosos, los riñones se encuentran marcada-

mente congestionados sin hemorragia, el hígado y el bazo - se presentan aparentemente normales, hay presencia de petequias sobre las membranas serosas y tejido subcutáneo. En muchas de las ocasiones se presentan hemorragias gastroentéricas, Murty y Kausshik ( 1965 ).

#### PREVALENCIA DE P. multocida EN CONEJOS.

Extensos estudios hechos en conejos infectados con P. multocida, demuestran que su prevalencia difiere significativamente con la edad, sexo y origen. Se ha visto también, que las hembras maduras tienen mayor incidencia ( 80 % ), mientras que machos jóvenes tienen únicamente una incidencia del 6 %. La otitis media se establece en un 4 % - en conejos jóvenes y en un 32 % en adultos, Lu y col (19 - 78 ). Los signos clínicos más frecuentes que causa P. multocida en conejos varían, los más comunes son la rinitis, otitis media, epididimitis, Bjotvedt y col. ( 1979 ), crecimiento del buche, Hernández ( 1984 ), neumonía, catarro nasal y abscesos, Targowski y Targowski ( 1979 ).

#### MECANISMO DE DEFENSA DEL HOSPEDERO.

Los animales poseen complejos mecanismos de defensa - que les permiten controlar a la mayoría de las bacterias -

con las que entran en contacto. existen mecanismos inespecíficos como el pH, lavado mecánico ( de ojos, boca, vagina, etc. ), lisozima, lactoferrina, flora normal, proceso de inflamación, fagocitosis y mecanismos específicos mediados principalmente por anticuerpos o gammaglobulinas, Benacerraf y Unanue ( 1979 ).

El aparato respiratorio de los animales representa uno de los sistemas de defensa mejor integrado. La primera defensa está constituida por el epitelio ciliado y secreciones mucosas que se encargan de atrapar partículas y eliminarlas hacia el exterior, Kilburn ( 1967 ). El moco nasal así como el traqueobronquial, contienen sustancias bactericidas que incluyen la lisozima, Carson y Dannenberg ( 1965 - ), Adams y col. ( 1976 ), Boat y Cheng ( 1980 ) y lactoferrina, Boat y Cheng ( 1980 ).

La adhesión de los microorganismos se previene por la acción de IgA, Benfer y Chan ( 1976 ), Boat y Cheng (1980) . El epitelio traqueobronquial se defiende de una manera similar pero en este caso, el movimiento ciliar y el moco también son importantes. Si una bacteria logra penetrar dentro del epitelio traqueobronquial entonces se lleva a cabo un proceso de inflamación local, donde ya interviene la IgG y con ayuda del complemento causa bacteriolisis. La fagocitosis normal del pulmón se lleva a cabo en el alveolo, donde los macrófagos junto con la IgA se encargan de e

eliminar a las bacterias que logran atravesar la barrera del epitelio. Se sabe que P. multocida es pobremente fagocitada por macrófagos alveolares en ausencia de anticuerpos. Esta observación indica que la circulación de anticuerpos es probablemente de poca importancia en la defensa contra este organismo.

La alteración en las células secretoras del moco del árbol traqueobronquial, resulta en cambios de cantidad y/o calidad de las secreciones de las vías respiratorias, esto ha sido implicado en la patogénesis de enfermedades respiratorias, Adams y col. ( 1976 ). Daño en los cilios, cambios en el volumen y consistencia del moco, células epiteliales dañadas, reducen el transporte del moco, Kilburn ( 1967 ). Varias son las proteínas aisladas en las vías respiratorias ( ver cuadro 3 ). Otras proteínas del suero identificadas en secreciones traqueobronquiales incluyen las inmunoglobulinas, antitripsina alfa 1, antiquimotripsina alfa 1, antitrombina III, macroglobulina alfa 2, transferrina, prealbúmina, glicoproteína alfa 1, fibrinógeno, ceruloplasmina, heptoglobina, diversos componentes del complemento y otras, Boat y Cheng ( 1980 ).

Por otro lado se ha visto que la lisozima actúa sinérgicamente con anticuerpos en procesos bactericidas y bacteriolíticos contra bacilos Gram-negativos, Carson y Dannerberg ( 1965 ).

Cuadro 3. Proteínas secretadas por células de vías respiratorias.

Proteína	Fuente celular	Concentración en secreciones ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )
Glicoproteínas del moco	Células globosas y glándulas mucosas	500-1000
Lisozima	Glándulas serosas	16-70
Lactoferrina	" "	5-50
Calicreina	Epitelio	-
Proteínas ricas en prolina	?	-
Antiproteasas	Epitelio superficial y glándulas mucosas	-
Componente secretorio	"	-
IgA	Células plasmáticas	20-40
IgG	" "	5-21
IgM	" "	-

Otro mecanismo de defensa del cerdo es la segregación traqueal en los estadios embrionarios, de sustancias bactericidas contra P. multocida, Pijoan y Ochoa ( 1978 ), Iglesias ( 1979 ) e Iglesias ( 1981 ). Se ha comprobado que tales sustancias bactericidas tienen efecto sobre otros microorganismos como Bacillus subtilis, Haemophilus parahaemolyticus, Staphylococcus aureus, Pseudomona aeruginosa, Bordetella bronchiseptica y Proteus mirabilis. Además, estas sustancias producen alteraciones en la morfología de las bacterias, especialmente en la estructura externa, Iglesias ( 1981 ).

#### PROFILAXIS, CONTROL Y TRATAMIENTO CONTRA P. multocida.

Aunque es posible encontrar bacterinas comerciales contra pasteurelisis porcina, estas usualmente han dado resultados pobres debido, por un lado, a la naturaleza multi-etiológica de la enfermedad y por el otro lado, al uso de serotipos diferentes a los prevalecientes en la zona que se desea proteger. Las medidas de control incluyen la prevención de anemia en lechones, adecuada alimentación y evitar el exceso de humedad y cambios bruscos de temperatura, Pijoan y Trigo ( 1982 ).

Las investigaciones dentro del campo inmunogénico de P. multocida, en los últimos años, han llevado a desarrollar-

una variedad de agentes inmunoproliféricos. Para esto se han utilizado fracciones celulares del organismo tales como antígenos capsulares, endotoxina libre, complejos polisacárido-proteína, etc., Bhasin y Lapointe-Shaw ( 1980 ). Otro aspecto de prevención implica evitar la vacunación - contra el cólera porcino al mismo tiempo que se realiza el destete, ya que esto promueve la invasión de P. multocida, Pijoan y Trigo ( 1982 ).

P. multocida es altamente sensible a la oxitetraciclina y a la clorotetraciclina, sensible al cloranfenicol, dehidroestreptomicina y penicilina; es resistente a bacitracina y sulfa triple, Murty y Kausshik ( 1965 ). El tratamiento es eficaz sólo al inicio, se recomienda el uso de sulfamerazina y/o sulfatiazol para cepas resistentes, Pijoan Y Trigo ( 1982 ).

#### MICROSCOPIA ELECTRONICA.

El primer microscopio electrónico de transmisión ( - TEM ) fue construido por Knoll y Ruska en 1932 y el primer TEM comercial que superó el poder de resolución del microscopio de luz fue producido por Siemens y Halske en 1939. - Los estudios de microscopía electrónica de barrido ( SEM ) fueron iniciados un poco más tarde que aquellos del TEM, - sin embargo, no fue sino hasta los años de 1965-1966 que a



pareció un modelo útil y es en el año de 1967 cuando diversas muestras de humanos y animales empezaron a ser investigadas con el SEM, incrementándose más los estudios de microbiología, Zensaku y col. ( 1976 ).

En el SEM la muestra a ser estudiada es irradiada por un fino haz de electrones, los cuales liberan otros electrones ( secundarios ) y otros tipos de radiaciones; estos electrones secundarios son colectados y mandados hacia una pantalla que nos presenta la imagen en estudio. La intensidad de las radiaciones dependen de la forma y composición química del objeto irradiado. El SEM carece de la resolución obtenible con el TEM, pero la ventaja es que revela una sorprendente imagen en tercera dimensión. Esta técnica presenta, además, la superficie topográfica de la muestra con una claridad y una profundidad de campo no lograda por otro método, Zensaku y col. ( 1976 ).

#### OBJETIVO.

Comprobar, utilizando el microscopio electrónico de barrido, que la actividad de la sustancia bactericida secretada por explantes traqueales de embrión de cerdo, causa la muerte a Pasteurella multocida, ya sea transformando su morfología o lisándola.

## MATERIALES Y METODOS.

### ORGANISMO.

Se utilizó durante todo el experimento una cepa de P multocida serotipo A, la cual fue donada por el laboratorio de bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

La bacteria fue proporcionada en estado liofilizado. Los medios de cultivo utilizados fueron caldo y agar de BHI ( - BIOXON ), agar sangre y tripticaseinato de soya ( BIOXON ) Para recuperar el microorganismo se le adicionó al liofilizado, 10 ml de NaCl al 0.85 % ( estéril ). Se tomaron 2 ml de este resuspendido, se adicionó 1 ml al caldo y 1 ml al agar de BHI, se incubaron a 37°C por 24 horas. Para su utilización en los ensayos con la sustancia bactericida, se incubaron de 18 a 24 horas a la misma temperatura en agar-BHI, de este cultivo se tomaron con el asa varias colonias y se resuspendieron en 5 ml de NaCl al 0.85 % . La concentración bacteriana se ajustó a una absorbencia de 0.216, leyendo a una longitud de onda de 620 nm ( Espectrofotómetro PM2D ZEISS ).

## CULTIVO DE EXPLANTES TRAQUEALES.

Se colectaron 118 traqueas de embrión de cerdo de diferentes edades, en los rastros de Tlalnepantla y Cuautitlán, Edo. de México.

Se utilizaron dos medios: a) medio de transporte: medio mínimo esencial 199 ( MEM-199, GIBCO ), ajustado a pH 7.4 con bicarbonato de sodio, además, de 100 UI/ml de penicilina y b) medio de cultivo: MEM-199, pH 7.4, sin antibiótico

Las traqueas colectadas fueron aquellas de embriones extraídos de las hembras recién sacrificadas. La obtención de las traqueas se realizó cuidadosamente tratando de evitar la menor contaminación, se introdujeron en el medio de transporte; en el laboratorio se pasaron al medio de cultivo y se retiraron los excesos de ligamentos serosos; se cortaron anillos traqueales de 2-3 mm de ancho con un bisturí estéril; se lavaron 3 veces, dentro de una botella de dilución de leche, agitándolos moderadamente ( en cada ocasión se utilizó un volumen de 20 ml de medio ). Esto se hizo con la finalidad de remover el moco y restos del medio de transporte. Se colocaron de 8-10 anillos en botellas de dilución de leche conteniendo 20 ml del medio de cultivo; se incubaron a 37°C durante 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación, el sobrenadante se filtró con una membrana ( Millipore ) de 0.22 micras de diámetro de poro, con -

servándose el filtrado en tubo con tapón de rosca estéril a 4°C.

#### ENSAYOS DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA.

I.- A medios ( caldo y agar BHI ) conteniendo  $3 \times 10^4$  bacterias/ml de P. multocida se les adicionó, a cada uno ( 4 en total ), 0.1 ml del filtrado y se incubaron a 37°C 24 horas. Comprobado el efecto bactericida, se procedió a realizar los siguientes ensayos:

II.- 6 cajas con agar BHI, conteniendo igual número de bacterias que en I, fueron adicionadas con 0.1 ml de la sustancia bactericida, se incubaron en pares, a 37°C por 6, 12 y 24 horas.

III.- A 12 tubos de ensayo conteniendo cada uno 5 ml de caldo BHI, la bacteria y la sustancia bactericida ( igual que en I ), se les determinó absorbencia por turbidimetría después de incubación a los tiempos: 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 minutos; esto para conocer la cinética de crecimiento de la bacteria expuesta a la sustancia bactericida.

En todos los casos se usaron como controles las mismas condiciones, excepto la sustancia bactericida y en su lugar se colocó medio de cultivo; estos se hicieron por duplicado.

## MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO.

Las bacterias tratadas con la sustancia bactericida- ( II ) fueron fijadas con vapores de glutaraldehído al 25- % ( Merck ), de la siguiente manera: a la tapa de la caja- de Petri ( del medio ), se adicionó 5 ml del fijador y se- incubaron durante 2 horas a 37°C. Se cortaron bloques de - agar de aproximadamente 0.4X0.8 mm de las áreas de inhibi- ción, de tal manera que se abarcara la orilla del halo; se lavaron con una solución amortiguadora ( 10 ml ) de fosfa- tos 0.1 M, pH 7.4 y se resuspendieron en la misma solución por 24 horas. Posteriormente se deshidrataron con solucio- nes etanol-agua en grados crecientes como se indica:

- 1.- Alcohol etílico al 70 % 10 minutos a 4°C, enjuagar.
- 2.- " " " 80 " " " " " "
- 3.- " " " 95 " 15 " a temperatura ambien- te, enjuagar.
- 4.- Igual que en 3.
- 5.- " " " 100 " 30 " " "

Este último paso se repite dos veces más.

Después de lo anterior, se transfirieron a una solución de acetato de amilo-etanol en una proporción 1:1 por 30 minu- tos; se deshidrataron a punto crítico con CO<sub>2</sub> ( Critical - Point Apparatus, Technics ); se montaron sobre portamues - tras con pintura de plata ( conductor ) y se secaron en es

tufa; se cubrieron con oro ( Jeol Fine Coat, Model ion sputter JFC-1100 ) a 5 mA y 500 V; finalmente se observaron las muestras al microscopio electrónico de barrido ( JEOL: JSM-25SII ) a 5 KV. Las imágenes fueron registradas en película Kodak Royal Pan 4X5 ( 10X12.5 cm ).

#### RESULTADOS.

En el ensayo I, las bacterias de P. multocida expuestas al filtrado del sobrenadante del cultivo de explantes traqueales de embrión de cerdo, murieron todas en los dos medios utilizados. En el agar se obtuvieron áreas de inhibición de aproximadamente 2 cm de diámetro ( ver cuadro 4 ). Para el ensayo II, las áreas de inhibición también se obtuvieron; el medio con 6 horas de incubación presentó un bajo crecimiento poco visible; a las 12 horas de incubación el crecimiento es visible y a las 24 horas es abundante. ( ver cuadro 5 ). Del ensayo III, la cinética de crecimiento, podemos observar el efecto bactericida acentuado que hay sobre P. multocida a los diferentes tiempos de incubación. Esto es claro si vemos que las absorbencias en los controles aumentan con el tiempo, en cambio, en presencia de la sustancia bactericida dichas absorbencias decrecen conforme transcurre el tiempo ( ver cuadro 6 ). Además, esto nos indica que conforme avanza el tiempo, el efecto -

Cuadro 4. Ensayo 1.

Tubo/caja de Petri	Medio	Tipo de crecimiento	Tiempo de incubación ( hs )
1	Agar con sustancia bactericida	Formación de área de inhibición	24
2	Agar con sustancia bactericida	Formación de área de inhibición	24
3	Agar sin sustancia bactericida	Crecimiento total	24
4	Agar sin sustancia bactericida	Crecimiento total	24
5	Caldo con sustancia bactericida	No hubo crecimiento	24
6	Caldo con sustancia bactericida	No hubo crecimiento	24
7	Caldo sin sustancia bactericida	Crecimiento abundante	24
8	Caldo sin sustancia bactericida	Crecimiento abundante	24

Los controles son los medios que no contienen la sustancia bactericida.

Cuadro 5. Ensayo II.

Tubo/Caja de Petri	Medio	Tipo de crecimiento	Tiempo de incubación ( horas )
1	Agar con sustancia bactericida	Poco visible, con área inhibición	6
2	Agar con sustancia bactericida	Poco visible, con área inhibición	6
3	Agar sin sustancia bactericida	Película de bacterias homogénea	6
4	Agar sin sustancia bactericida	Película de bacterias homogénea	6
5	Agar con sustancia bactericida	Visible con área de inhibición	12
6	Agar con sustancia bactericida	Visible con área de inhibición	12
7	Agar sin sustancia bactericida	Visible homogéneo	12
8	Agar sin sustancia bactericida	Visible homogéneo	12

9, 10, 11 y 12 son iguales a 1, 2, 3 y 4 del ensayo I respectivamente.



Cuadro 6. Ensayo III. Absorbencias leídas a 620 nm.

Tiempo/tubo ( hs )	Sin sustancia bactericida				Con sustancia bactericida			
	1	2	$\bar{X}$	DS	1	2	$\bar{X}$	DS
0	0.216	0.198	0.207	0.013	0.200	0.190	0.195	0.007
20	0.216	0.211	0.213	0.004	0.198	0.180	0.189	0.040
40	0.293	0.300	0.296	0.005	0.164	0.153	0.158	0.008
60	0.352	0.368	0.360	0.011	0.159	0.155	0.157	0.003
80	0.401	0.412	0.406	0.008	0.132	0.138	0.135	0.004
100	0.469	0.450	0.459	0.013	0.132	0.121	0.126	0.008
120	0.472	0.460	0.466	0.008	0.131	0.117	0.124	0.010

Análisis estadístico numérico:

$$\begin{aligned}\bar{X}' &= 0.344 \\ DS' &= 0.118 \\ V &= 0.010\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\bar{X}' &= 0.155 \\ DS' &= 0.028 \\ V &= 0.0007\end{aligned}$$

Ajuste de la curva:

$$\begin{aligned}r &= 0.980; m = 0.002; b = 0.196 \\ \text{Para } x &= 10 \text{ min. tengo } Y = A = 0.221 \\ \text{Para } x &= 110 \text{ min. tengo } Y = A = 0.467\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}r &= 0.970; m = 0.0006; b = 0.193 \\ \text{Para } x &= 10 \text{ min. tengo } Y = A = 0.187 \\ \text{Para } x &= 110 \text{ min. tengo } Y = A = 0.123\end{aligned}$$

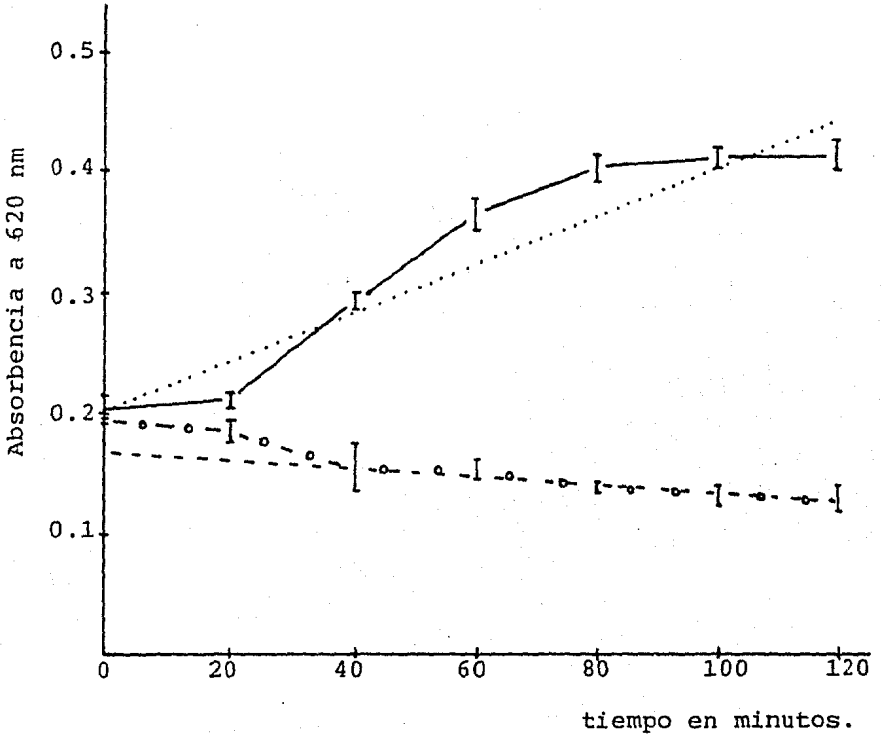
A= absorbencia,  $\bar{X}$ = media aritmética de dos puntos,  $\bar{X}'$ = media aritmética de todos los puntos, DS= desviación estándar de dos puntos, DS'= desviación estándar de todos los puntos, V= varianza, r= correlación, m= pendiente, b= punto de intersección.

bactericida se incrementa, de tal manera que al final del experimento el número de bacterias se ve reducido ( ver gráfica ). Esto nos indica, además, que el efecto bactericida empieza a presentarse entre cero y veinte minutos, lo cual nos da una idea de que sea inmediato este efecto.

Cuando se observan las áreas de inhibición al microscopio electrónico de barrido, las bacterias presentan cambios morfológicos bastantes pronunciados ( ver fotografías ). La forma característica de P. multocida es la de un bastón, con sus contornos bien definidos ( ver fotografía 1 ), esta forma se pierde totalmente al ser expuesta a la sustancia bactericida, observándose protuberancias y alargamientos ( ver fotografías 2, 3 y 4 ). El efecto mostrado en los diferentes tiempos de incubación ( 6, 12 y 24 horas ) con la sustancia bactericida es similar. También podemos ver en cada una de las fotografías que un pequeño porcentaje de bacterias no sufrió cambio aparente en su morfología, pero si fue muerta, comprobándose esto último realizando una siembra del medio líquido tratado con la sustancia bactericida, siendo el crecimiento negativo.

De las 118 traqueas colectadas, el 68 % ( 80 traqueas ) produjeron la sustancia bactericida. Quizá, al parecer esto tenga que ver con la edad de los embriones.

Gráfica. Cinética de crecimiento de Pasteurella multocida expuesta y no expuesta a la sustancia bactercida.

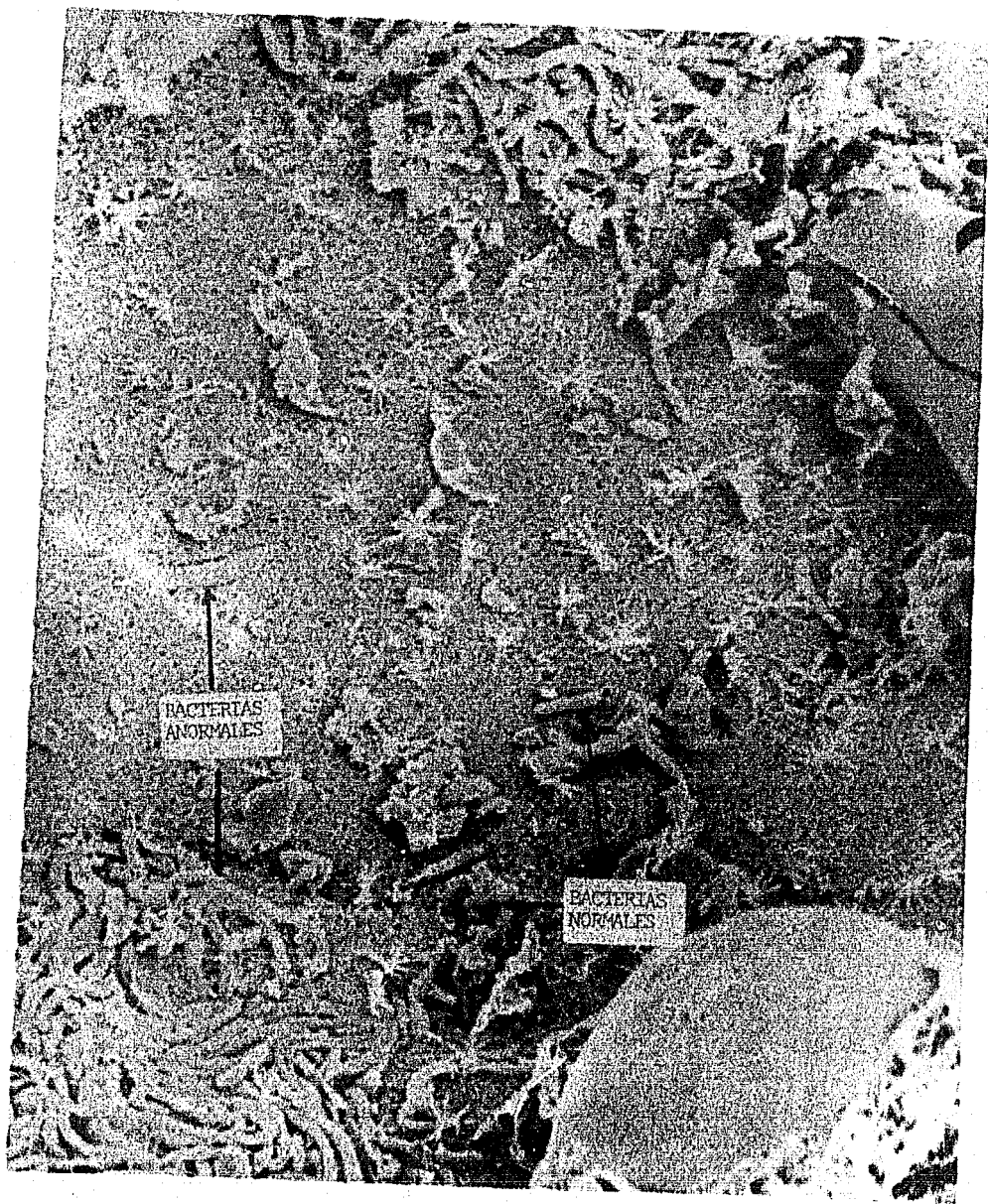


————— No expuesta.

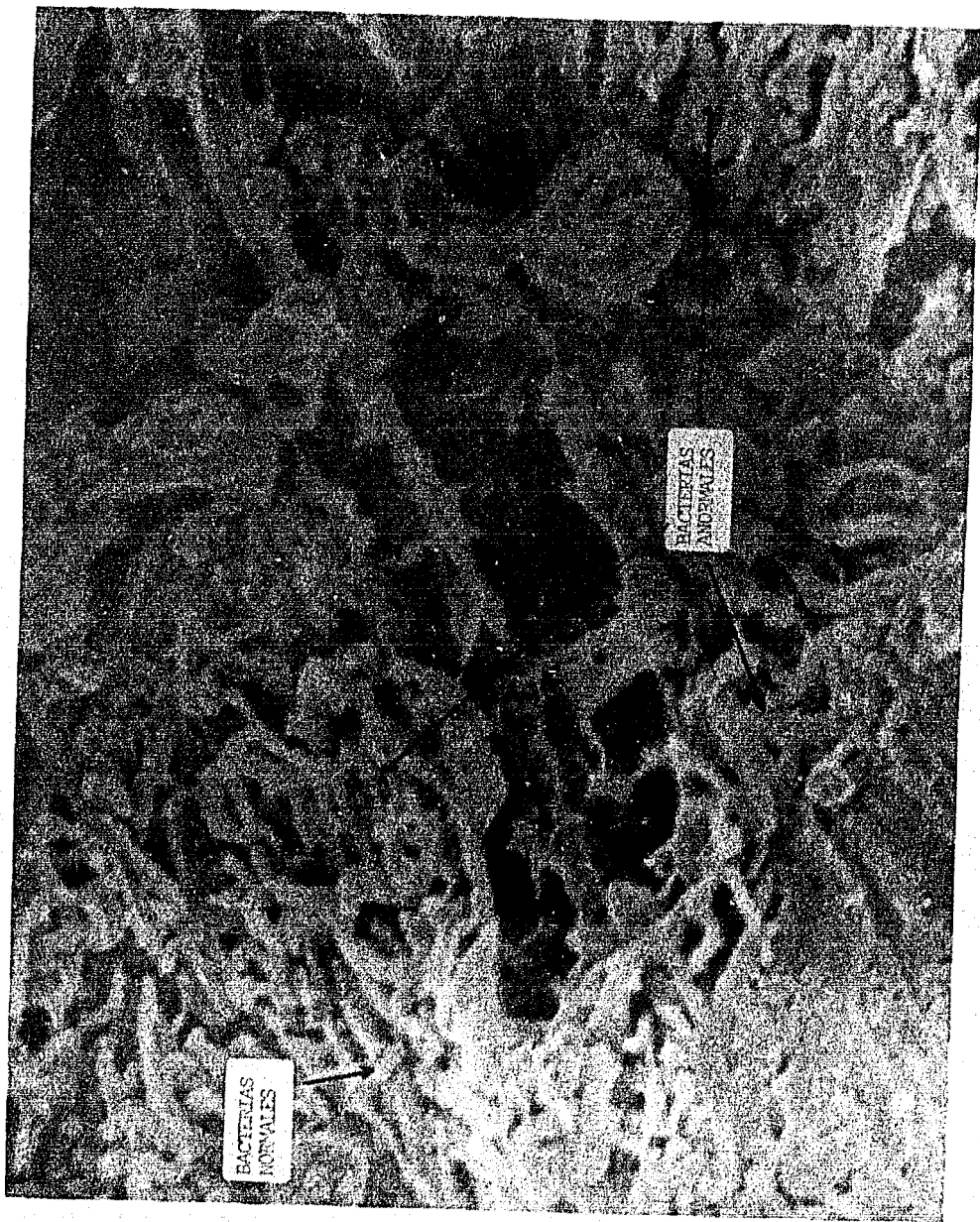
..... Curva ideal con una correlación de 0.98

-o-o-o-o-o-o-o-o-o- Expuesta.

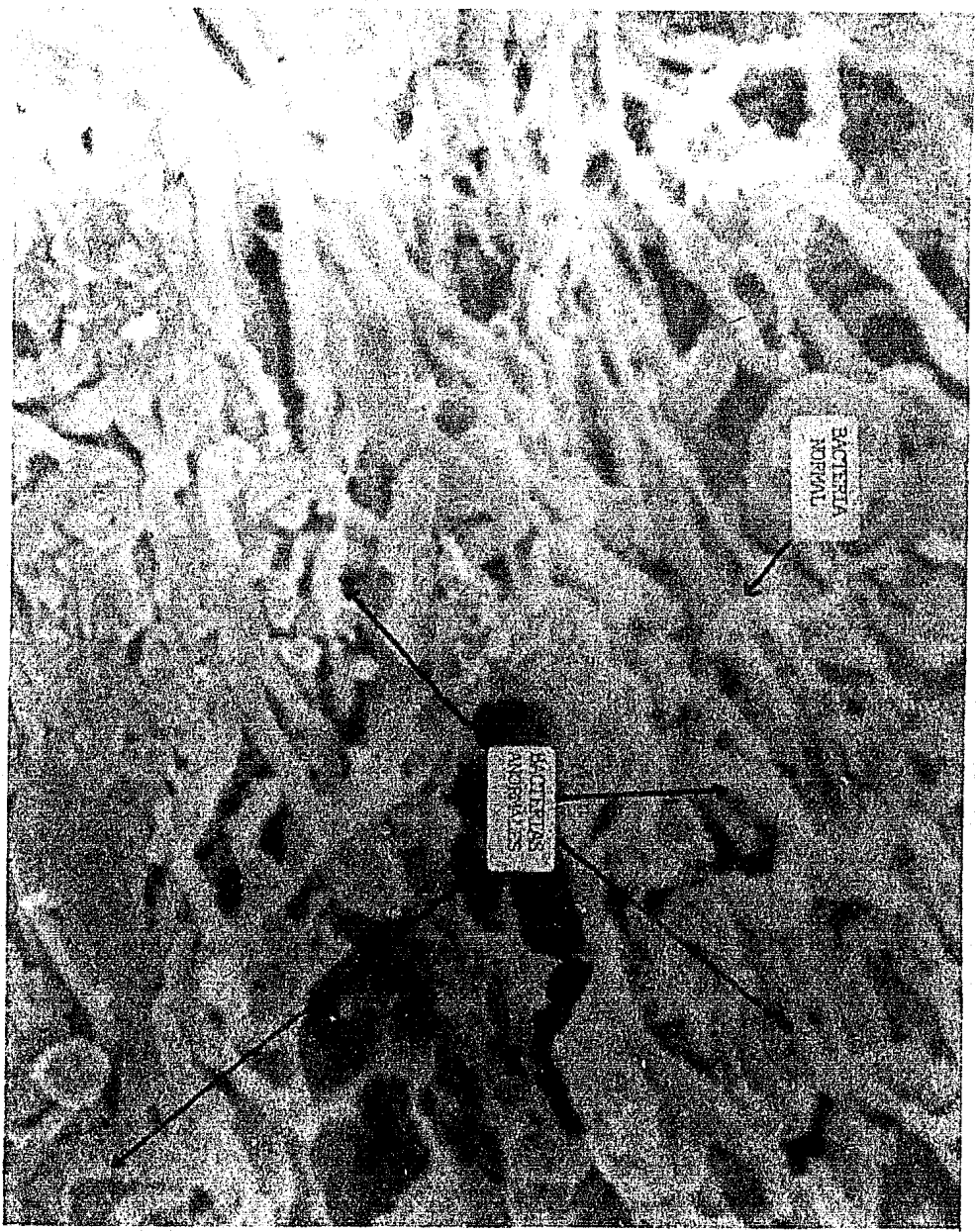
----- Curva ideal con una correlación de 0.97



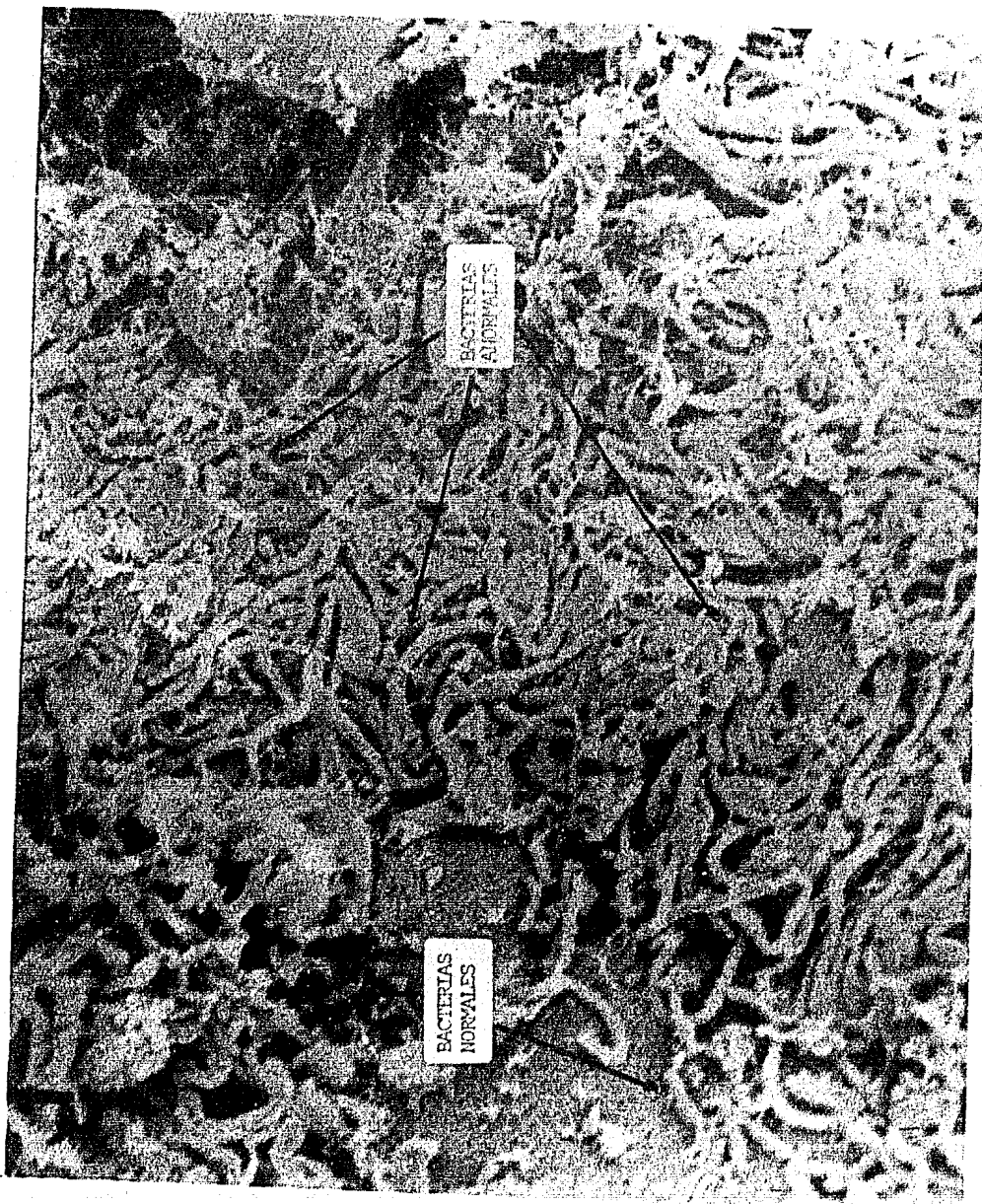
Fotografifa 1. Pasteurella multocida expuesta a la sustancia bactercida durante 6 horas. Observación a 2000X.



Fotografía 2. Pasteurella multocida expuesta a la sustancia bactericida durante 12 horas. Observación a 2000X.



Fotografía 3. Pasteurella multocida expuesta a la sustancia bactericida durante 12 horas. Observación a 4500X.



Fotografía 4. Pasteurella multocida expuesta a la sustan -  
cia bactericida 24 horas. Observación a -  
2000x.

## DISCUSION.

El efecto bactericida de una sustancia secretada por explantes traqueales de embrión de cerdo sobre P. multocida, estudiado previamente por Pijoan y Ochoa ( 1978 ), Iglesias ( 1979 ) e Iglesias ( 1981 ), se confirma en este trabajo. El efecto bactericida contra P. multocida ha sido anteriormente estudiado al microscopio electrónico de transmisión por Iglesias ( 1981 ), demostrándose alteraciones en la morfología de la bacteria, especialmente en las estructuras externas. En esa ocasión la bacteria fue expuesta a la sustancia bactericida por tiempos cortos de 15,- 30 y 60 minutos, Iglesias ( 1981 ).

Los resultados presentados por este trabajo confirman el efecto bactericida sobre P. multocida, ya que la lisa y transforma de tal manera que el cuerpo bacteriano sufre cambios, presentando protuberancias y alargamientos vistos en las fotografías.

Según los resultados, podemos decir que la sustancia bactericida, que al parecer son tres proteínas, Iglesias ( 1981 ), posiblemente tienen actividad enzimática, lo cual puede involucrar un sistema complejo multienzimático o enzimas que actúan sinérgicamente para producir la muerte y cambios morfológicos, dentro de los primeros veinte minutos de exposición a dicha sustancia, a P. multocida.



La muerte de todas las bacterias, tanto en medio líquido - como en agar, que se expusieron a la sustancia bactericida demuestra que la acción de estas proteínas es rápida y con gran poder de penetración a la pared celular bacteriana. - Al parecer dicha penetración permite que la actividad se - manifieste principalmente en la pared celular y produzca - los cambios morfológicos observados.

Suponemos dos posibilidades de acción de la sustancia bactericida sobre la pared celular: a) que las proteínas bactericidas se intercalen con los componentes moleculares de la pared celular y esto produzca un desequilibrio en las - configuraciones electrónica y tridimensional de los grupos funcionales de ésta y b) que las proteínas bactericidas - corten en sitios específicos de la pared celular promovien - do, quizá, que se lleven a cabo interacciones del tipo - puentes de hidrógeno, hidrofílicas, hidrofóbicas, etc.

Es posible que si es un sistema multienzimático, este sea altamente organizado, ya que no permite la sobrevivencia - de ninguna bacteria ( medio líquido ); además, creemos que la actividad enzimática que exista, no se pierde inmedia - tamente que actúa, sino que se retiene por algún tiempo, - lo cual evita la reproducción de alguna bacteria que halla resistido al ataque ( medio agar ).

Se piensa, también, que el sinergismo enzimático sea un me - canismo mediante el cual se proveen las condiciones para -

una mejor penetración, ataque y desequilibrio del arreglo molecular de la pared celular de P. multocida.

Es probable que la simple difusión de las proteínas bactericidas en la pared celular induzcan un cambio conformacional de tal magnitud que produzca la transformación en la estructura bacteriana, esto considerando un peso molecular bajo, del orden de 10,000 a 20,000 daltons.

Otra opción, sería pensar que estas proteínas tengan la propiedad de romper enlaces glucosídicos de forma similar a la lisozima.

El descenso del número de bacterias en la cinética de crecimiento frente a la sustancia bactericida confirman el efecto de ésta contra la bacteria en estudio. Según la gráfica, podemos decir que el efecto bactericida es inmediato o casi inmediato, Iglesias ( 1981 ) ya que se observa en los primeros 20 minutos de incubar a la bacteria con la mencionada sustancia.

Es importante hacer incapie en el área de inhibición, ya que ésta tenía pocas bacterias y ninguna colonia, esto sugiere que al contacto con la sustancia bactericida murieron y no tuvieron oportunidad de multiplicarse.

Se sabe que un importante mecanismo de defensa contra esta bacteria depende de las secreciones de sustancias bacteriostáticas por el epitelio ciliado traqueobronquial, Iglesias ( 1981 ).

El 68 % de explantes traqueales produjeron la sustancia bactericida, esto quizá, esté relacionado con la edad y tiempo de muerte de los embriones, con la respuesta inmunológica que presenta la madre en esta etapa (gestación) o con ambos.

Además, considéramos que la susceptibilidad de P. multocida a la sustancia bactericida pudiera estar íntimamente relacionada con la interacción que existe entre esta bacteria y la neumonía crónica del cerdo, ya que es probable, que este último halle desarrollado una maquinaria inmunológica tal que produzca una o varias sustancias bacteriostáticas y/o bacteriolíticas en contra del microorganismo que le causa daño.

## CONCLUSIONES

Se confirma que los explantes traqueales de embrión de cerdo producen una sustancia bactericida contra un organismo patógeno de tipo secundario, del tracto respiratorio, como lo es Pasteurella multocida.

La sustancia bactericida secretada por explantes traqueales de embrión de cerdo, produce lisis y cambios morfológicos drásticos sobre Pasteurella multocida.

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento de gran utilidad para observar en tercera dimensión los daños causados por la sustancia bactericida segregada por explantes traqueales de embrión de cerdo.

Es importante continuar con este tipo de estudios para determinar la naturaleza de la sustancia, su espectro contra otras bacterias y su posible relación con otras sustancias bactericidas como la lisozima, lactoferrina, etc.

## REFERENCIAS.

- 1.- Adams, G. K., Aharonson, E. F., Reasor, M. J., Procyor D. F., 1976, Collection of normal canine tracheobronchial secretions, J. Appl. Physiol. 40(2):247-249.
- 2.- Afzelius, B. A., 1976, A human syndrome caused by immotile cilia. Science. 193:317-319
- 3.- Agar, W. A. and Chescoe, H. R., Principles and practice of electron microscope operation. North Holland Publishing Company, Netherlands. 320-326.
- 4.- Badiola, S. J. I., Pujols, R. J., Ponce, H. C. y Camacho, M. J., 1984, Patrón de remoción Pasteurella multocida D/necrotóxica y efecto del sobrenadante de un cultivo de ésta sobre la remoción pulmonar. Memorias del II Congreso Nacional AMVC, FES-C, UNAM: 16-18.
- 5.- Badiola, S. J. I., Pujols, R. J., González, G. S. y Ciprian, C. A. 1984, Relación virus de Aujeszky-Pasteurella multocida en pulmones neumónicos de cerdo colectados en rastro. Memorias del II Congreso Nacional AMVEC FES-C, UNAM:9-11.
- 6.- Bak, U. B. and Kim, Y. O., 1982, A herd outbreak of Pasteurella pneumonia of the pigs pathological and epidemiological field studies. International pig veterinary society congress, México, College of Veterinary Medicine, Seoul National University: 84.

- 7.- Benacerraf, B. and Unanue, R. E., 1979. Textbook of -  
Immunology. The Williams & Wilkins Company, USA: 1-76.
- 8.- Benfer, K. H., Chan, M. K. L., 1976. The class specific immunoglobulin composition of fluids obtained from various levels of the canine respiratory tract. J. Immunol. 116(2): 423-429.
- 9.- Benson, M. L, Thomson, R. G. and Valli, V. E. O. 1978. The bovine alveolar macrophage. II. In vitro studies - with Pasteurella haemolytica. Can. J. Comp. Med. 42(3) 368-369.
- 10.-Bentley, D. E. and Farrington, D. C. 1980. Evaluation of an induced Pasteurella multocida swine pneumonia model. Am. J. Vet. Res. 41(11): 1870-1873.
- 11.-Bergey's, 1974, Manual of determinative bacteriology. Eighth Edition, R. E. Buchanan and N. E. Gibbons. The Williams and Wilkins Company.
- 12.-Beveridge, T. J. 1980. Bacterial structure and implications in the mechanisms of infection: short review Can. J. Microbiol. 26(6): 643-653.
- 13.-Bhasin, J. L and Lapointe-Shaw, L. 1980. Antigenic Analysis of Pasteurella multocida (serotype 1) by crossed immunoelectrophoresis: characterization of cytoplasmic and cell envelope associated antigens. Can. J. Microbiol. 26: 676-689.
- 14.-Bhasin, J. L. and Lapointe-Shaw, L. 1980. Antigenic -

- analysis of Pasteurella multocida (serotype 1) by crossed immunoelectrophoresis: characterization of whole cell associated antigens. Can. J. Microbiol. 26: 1392-1402.
- 15.-Bjotvedt, G., Bertke, E. M. and Hendricks, G. M. 1979. Peritonitis due to Pasteurella multocida in a rabbit. Vet. Med. February: 215-216.
- 16.-Boat, T. F. and Cheng, P. W. 1980. Biochemistry of airway mucus secretions. Federation Proc. 39(13): 3067-3074.
- 17.-Borge, P. K. 1982. The occurrence of toxin-producing strains of Pasteurella multocida in SPF herds. International pig veterinary society congress. México: 82.
- 18.-Carson, M. E. and Dannenberg, A. M. 1965. Hydrolytic enzymes of rabbit mononuclear exudate cells. II. Lysozyme: properties and quantitative assay in tuberculous and control inbred rabbits. J. Immunol. 94(1): 99-104.
- 19.-Carter, G. R. and Subronto, P. 1973. Identification of type D strains of Pasteurella multocida with acriflavine. Am. J. Vet. Res. 34(2): 293-294.
- 20.-Carter, G. R. 1955. Studies on Pasteurella multocida. - I. A hemagglutination test on the identification of serological types. Am. J. Vet. Res. 16, July: 481-484.
- 21.-Cowan and Steel's. 1974. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge Univ. Press. 2a. Ed. 94-97.

- 22.-Damiano, V. V., Cohen, A., Batra, G. and Petersen, R. 1980. A morphologic study of the influx of neutrophils into dog lung alveoli after lavage with sterile saline. *Am. J. Pathol.* 100(2): 349-354.
- 23.-Heddleston, K. L. and Wssman, G. 1975. Characteristics of Pasteurella multocida of human origin. *J. Clin. Microbiol.* 1(4): 377-383.
- 24.-Hernández, B. E. 1984. (comunicación personal, FES-C - UNAM).
- 25.-Iglesias, S. G. 1979. Estudio de la interacción entre el virus de cólera porcino y Pasteurella multocida en explantes traqueales de cerdo embrionario. Tesis de Licenciatura. ENEP-C UNAM.
- 26.-Iglesias, S. G. 1981. Estudio sobre sustancias bactericidas presentes en secreción traqueal de cerdo embrionario. Tesis de Maestría. FES-C UNAM.
- 27.-Iglesias, S. G. and Pijoan, A. C. 1982. Effect of hog cholera virus on the porcine mucociliary activity. *International Pig Veterinary Society Congress.* p 85.
- 28.-Iglesias, S. G., Pijoan, A. C. and Hernández, B. E. - 1982. Characterization of a substance in tracheal exudates with activity against Pasteurella multocida. *International Pig Veterinary Society Congress.* p 86.
- 29.-Kielstein, P., Martin, J. and Janetschke, P. 1977. Experimentelle Pasteurella-multocida-Infectionen beim Schwein als ein Beitrag zur Ätiologie der enzootischen



- pneumonie des schweines. Arch. Expert. Vet. Med. 31(4)  
: 609-619.
- 30.-Kilburn, K. H. 1967. Cilia and mucus transport as de-  
terminantes of the response of lung to air pollutants.  
Arch. Environ. Health. 14: 77-91.
- 31.-Koch, Y. and Rademacher, K. H. 1980. Chemical and enzy-  
matic changes in the cell walls of Candida albicans -  
Saccharomyces cerevisiae by scanning electron microscop-  
y. Can. J. Microbiol. 26: 965-970.
- 32.-Louzis, C. et Dubois-Darnaudpeys, A. 1977. Modifica- -  
tion rapide des bactéries du genre Yersinia et Pasteu-  
rella. Rec. Med. Vet. 153(6): 435-438.
- 33.-Lu, Y. S. Ringler, D. H. and Park, J. S. 1978. Characte-  
rization of Pasteurella multocida isolates from the na-  
res of healthy rabbits and rabbits with pneumonia. Lab.  
Anim. Sci. 28(6): 691-697.
- 34.-Mc Allister, A. H. and Carter, G. R. 1974. An aerogenic  
Pasteurella-like organism recovered from swine. Am. J.  
Vet. Res. 35(7): 917-922.
- 35.-Mercer, H. E. and Birbeck, C. S. M. 1972. Electron mi-  
croscopy a handbook for biologists. 3th ed. Blacwell -  
Scientific Publications. p: 1-28,48-50.
- 36.-Morisse, J. P. 1978. Infection pulmonaire expérimenta-  
les a Pasteurella multocida. Influence d'un facteur -  
irritant (  $\text{NH}_3$  ) sur la réceptivité du lapin. Rec. Med.  
Vet. 154(10): 859-863.

- 37.-Murty, K. D. and Kausshik, K. R. 1965. Studies on an outbreak of acute pasteurellosis due to Pasteurella multocida type B (Carter, 1955). Vet. Rec. 77(15):411-416.
- 38.-Muse, E. K., Collier, M. A. and Baseman, B. J. 1977. Scanning electron microscopic study of hamster tracheal organ cultures infected with Bordetella pertusis J. Infect. Dis. 136(6): 768-777.
- 39.-Namioka, S. and Murata, M. 1961. Serological studies of Pasteurella multocida. Cornell. Vet. 51: 522-528.
- 40.-Nicolet, J. 1982. Observations on the relationship of H. pleuropneumonia in pigs. International Pig Veterinary Society Congress. p: 87.
- 41.-Pennington, E. J. and Reynolds, Y. H. 1973. Concentrations of gentamicin and carbenicillin in bronchial secretions. J. Infec. Dis. 128(1): 63-68.
- 42.-Pijoan, A. C., Larios, F. Iglesias, S. G. and Monroy, J. 1982. Epidemiology and immunity in locally infected pigs with Pasteurella multocida. International Pig Veterinary Society Congress. p: 83.
- 43.-Pijoan, A. C., Morrison, R. B. and Hilley, H. D. 1983. Serotyping of Pasteurella multocida isolated from swine lungs collected at slaughter. J. Clin Microbiol. 17(6): 1074-1076.
- 44.-Pijoan, A. C., Ochoa, G. and Trigo, T. F. 1975. Aisla

- miento e identificación de bacterias de pulmones neumó-  
nicos de cerdo. Tec. Pec. México. 29: 46-49.
- 45.-Pijoan, C. y Ochoa, G. 1978. SIM-Rafinosa, nuevo medio  
para la identificación rápida de Pasteurella multocida  
Resúmenes de la reunión Bianual de Microbiología Tolu-  
ca, México.
- 46.-Pijoan, C. y Ochoa, G. 1978. A bactericidal substance-  
against Pasteurella multocida produced by pig embryo -  
tracheal explants. Rev. Lat. Microbiol. 20: 1.
- 47.- Pijoan, C. y Trigo, F. 1982. Pasteurellosis. Diagnósti-  
co de las enfermedades del cerdo. R. Necoechea y Pi-  
joan eds. México. p: 511513.
- 48.- Polak, A. A., Samson, A. R. and Leeuw, N. T. G. 1979.  
Scanning electron microscopy of Acheloplasma colonies  
on agar. Can. J. Microbiol. 25: 13731380.
- 49.- Prodjoharjono, S., Carter, G. R. and Gabel, H. C. 1974  
Serologic study of bovine strains of Pasteurella mul-  
tocida. Am. J. Vet. Res. 35(1): 111-114.
- 50.- Pujols, R. J., Badiola, S. J. I., Mendoza, E. S. y -  
Ciprián, C. A. 1984. Tificación capsular de Pasteure-  
lla multocida aislada en rastro y patogenicidad para  
ratón. Memorias del II Congreso de AMVEC. FES-C UNAM-  
p: 14-15.
- 51.- Pujols, R. J., Badiola, S. J. I., Caballero, C. S. y -  
Hernández, B. E. 1984. Remoción pulmonar de Pasteure-

- lla multocida a diferentes tiempos post-infección de -  
Aujezki. Memorias del II Congreso de AMVEC. FES-C UNAM  
p: 19-21.
- 52.- Shigidi, A. T. M. and Mustafa, A. A. 1980. Serologi -  
cal relationship between strains of Pasteurella multo  
cida. Cornell. Vet. 70: 27-36.
- 53.- Simmons, C. J. D. and Simpson, W. 1977. The biochemi -  
cal and cultural characteristics of Pasteurella pneu  
motropica. Med. Lab. Sci. 34: 145-148.
- 54.- Srinivasan, A. V., Vengopalan, T. A. and Balaprtasan,  
A. R. 1977. A note on Pasteurella multocida infection  
in deer. Clin. Vet. J. 54: 409-410.
- 55.- Sreivastava, K. K. and Foster, W. J. 1977. Characteri -  
zation of an immunogenic fraction of Pasteurella mul  
tocida cultures filtrates. Can. J. Microbiol. 23: 197  
201.
- 56.- Stockdale, G. H. P., Langford, V. E. and Darcel, Q. C  
1979. Experimental bovine pneumonic Pasteurellosis. I  
Prevention of the disease. Can. J. Comp. Med. 43:262-  
271.
- 57.- Stockdale, G. H. P., Jericho, F. W. K., Yates, G. A.-  
W., Darcel, Q. C. and Lanngford, V. E. 1979. Experi -  
mental bovine pneumonic Pasteurellosis. II. Genesis -  
and prevention. Can. J. Comp. Med. 43: 272-279.
- 58.- Targowski, S. and Targowski, H. 1979. CO<sub>2</sub> requirement

for growth of Pasteurella strain isolated from rabbit  
J. Clin. Microbiol. 10(3): 388-389.

- 59.- Thigpen, E. J., Clements, E. M. and Gupta, N. B. 1978.  
Isolation of Pasteurella aerogenes from the uterus of  
a rabbit following abortion. Lab. Anim. Sci. 28(4): -  
444-447.
- 60.- Trentini, C. W. and Murray, E. G. R. 1975. Ultrastruc-  
tural effects of lysozymes on the cell wall of Caryo-  
phanon latum. Can. J. Microbiol. 21: 164-172.
- 61.- VanderMolen, E. G. and Williams, D. F. 1977. Observa-  
tion of the swarming of Proteus mirabilis with scan-  
ning microscopy. Can. J. Microbiol. 23: 107-112.
- 62.-Wikie, N. B. and Markhan, F. J. R. 1979. Sequential ti-  
tration of bovine lung and serum antibodies after pa-  
renteral or pulmonary inoculation with Pasteurella ha-  
emolytica. Am. J. Vet. Res. 40(12): 1690-1693.
- 63.-Wilkie, N. B., Markhan, F. J. R. and Shewen, E. P. 19-  
80. Response of calves to lung challenge exposure with  
Pasteurella haemolytica after parenteral or pulmonary-  
immunization. Am. J. Vet. Res. 41(11): 1773-1778.
- 64.-Zamecnik, P. C. 1962. Unsettled questions in the field  
of protein synthesis. Biochem. J. 85: 257-264.
- 65.-Zensaku, Y., Tokunaga, J. and Tawara, J. 1976. Atlas -  
of scanning electron microscopy in microbiology. First  
edition. Igaku Shoin LTD. pp: 3-37.