

VH 680
2es
1

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



**"Interacción entre *Mycoplasma hyopneumoniae*
y *Pasteurella multocida* en las Neumonías
de los cerdos"**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER
EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
(AREA: MICROBIOLOGIA)

POR

JOSE ABEL CIPRIAN CARRASCO

DIRECTORES:

DRA. GUADALUPE MIREYA DE LA GARZA
DR. CARLOS PIJOAN AGUADE

ASESORES:

DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN
DR. ROBERTO CERVANTES OLIVARES.

1 9 8 7

TESIS CON
FALLA DE CREGM



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

Resumen	a
abstract	b
lista de cuadros	c
lista de figuras	d
1. INTRODUCCION	1
1.1. Factores que contribuyen a la presentación de las neumonias	1
1.1.1. Efecto del medio ambiente	2
1.1.1.1. Temperatura y movimiento del aire y humedad	2
1.1.1.2. Gases nocivos, partículas de polvo y bacterias en el aire	3
1.1.2. Instalaciones	5
1.1.2.1. Divisiones de corrales	5
1.1.2.2. Pisos y estercoleros	5
1.1.3. Asociación con otros cerdos	6
1.1.3.1. Espacio vital (area y volumen)	6
1.1.3.2. Contacto con cerdos infectados	6
1.2. Etiología	7
1.2.1. Papel de <u>Mycoplasma hyopneumoniae</u>	7
1.2.1.1. Características generales de <u>M. hyopneumoniae</u>	8
1.2.1.2. Patogenia de la "neumonía enzootica"	9

3.1.4.3.1. Medio de Arginina (Hidrólisis)	39
3.1.4.3.2. Medio de Glucosa (Fermentación)	39
3.1.5. Medios de cultivo para pasteurelas	40
3.1.5.1. Medios líquido y sólido	40
3.1.5.2. Medios y pruebas de diferenciación bioquímica	40
3.1.6. Soluciones	40
3.1.6.1. Solución para la prueba de dependencia de esteroides	40
3.1.6.2. Solución de azul de metileno para la prueba de producción de H ₂ O ₂	40
3.1.6.3. Solución modificada de Alsever	40
3.1.6.4. Solución de Formalina amortiguada al 10%	41
3.1.6.5. Solución acuosa de acriflavina	41
3.1.7. Cepa de <u>Staphylococcus aureus</u>	41
3.1.8. Antisero de <u>M. hyopneumoniae</u>	41
3.1.9. Soluciones y equipo empleado en la microscopia electrónica de barrido	41
3.1.9.1. Soluciones	41
3.1.9.2. Equipo	41
3.1.10. Explantes traqueales	42
3.2. Métodos	43
3.2.1. Grupos experimentales	43

3.2.2. Preparación de inóculos	43
3.2.2.1. Producción de homogeneizado pulmonar con <u>M. hyopneumoniae</u>	43
3.2.2.2. <u>P. multocida</u>	44
3.2.3. Inoculación con <u>M. hyopneumoniae</u>	44
3.2.4. Inoculación con <u>P. multocida</u>	44
3.2.5. Temperatura corporal y observación de los signos respiratorios	45
3.2.6. Evaluación de las lesiones macroscópicas	45
3.2.7. Lesiones microscópicas	45
3.2.7.1. Microscopía óptica	45
3.2.7.2. Microscopía electrónica	46
3.2.8. Cultivo y aislamiento de los microorganismos	46
3.2.8.1. Aislamiento de <u>M. hyopneumoniae</u>	46
3.2.8.1.1. Prueba de dependencia de esteroides	47
3.2.8.1.2. Prueba de hidrólisis de la arginina	47
3.2.8.1.3. Prueba de fermentación de la glucosa	47
3.2.8.1.4. Prueba de producción de peróxido de hidrógeno	48
3.2.8.2. Aislamiento de <u>P. multocida</u>	48
3.2.8.2.1. Aislamiento e identificación	48
3.2.8.2.2. Tipificación capsular	48
3.2.9. Crecimiento de los cerdos.	49
3.2.10. Estudio "in vitro" con explantes traqueales.	49
3.2.10.1. Preparación de los anillos traqueales	49
3.2.10.2. Formación de los grupos experimentales	50
3.2.10.3. Inoculación con <u>M. hyopneumoniae</u>	50

3.2.10.4. Inoculación con <i>P. multocida</i> y realización de cuentas viables	50
4. RESULTADOS	51
Experimento: I	51
4.1. Evolución de los signos clínicos	51
4.1.1. Temperatura	51
4.1.2. Signos respiratorios	51
4.1.2.1. Tos	51
4.1.2.2. Disnea	52
4.2. Lesiones macroscópicas	52
4.3. Lesiones microscópicas	53
4.3.1. Estudio de microscopía óptica	53
4.3.2. Estudio de microscopía electrónica	54
4.4. Microorganismos aislados de las lesiones	55
4.5. Aumento de peso y conversión alimenticia	55
Experimento: II	56
4.6. Cuentas viables de <i>P. multocida</i> cultivada en presencia de explantes traqueales con o sin inóculo de <i>M. hyopneumoniae</i> .	56
5. DISCUSION	89
6. CONCLUSIONES	96
7. BIBLIOGRAFIA	97

RESUMEN

Este trabajo analiza la interacción de *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en la infección experimental de cerdos convencionales. Se utilizaron los siguientes cuatro grupos de cuatro cerdos cada uno: I testigo, II inoculado solamente con *M. hyopneumoniae*, III inoculado solamente con *P. multocida* y IV inoculado primero con *M. hyopneumoniae* y después con *P. multocida*. Los cerdos fueron de la raza Yorkshire destetados a la quinta semana y se sacrificaron a los 36 días. En los cerdos del grupo I la temperatura fue normal y no se observó tos o disnea, no presentaron lesiones pulmonares, excepto uno de ellos (pequeña zona de 3%) del cual se aisló *Mycoplasma hyorhinis* de la lesión, que fue de tipo proliferativo, no se aislaron los agentes infecciosos que fueron inoculados en los otros grupos y los índices de crecimiento fueron normales. El grupo III presentó temperatura y signos respiratorios normales, no se encontraron lesiones macroscópicas ni microscópicas, no se aisló *P. multocida* y los índices de crecimiento fueron normales. *P. multocida* sola no fue capaz de infectar y colonizar el pulmón. La inoculación con *M. hyopneumoniae* en el grupo II provocó hipertermia los días 19 al 23 y los cerdos presentaron tos y disnea moderada y con signos de recuperación, las lesiones macroscópicas abarcaron del 4 al 17% de la superficie pulmonar y fueron de tipo proliferativo. se aisló el micoplasma en todos los pulmones y la ganancia diaria de peso fue normal aunque el consumo de alimento fue mayor. En los cerdos del grupo IV inoculado con ambos agentes se agravó y se prolongó la hipertermia, presentaron tos y disnea de mayor

severidad y con signos de agravamiento, las lesiones macroscópicas abarcaron del 22 al 26% y fueron de tipo exudativo, se recuperó M. hyopneumonias de todos los pulmones y solo se recuperó en tres animales E. multocida 13 días después aún de inoculada, cuyos pulmones estaban previamente infectados con el micoplasma y fueron incapaces de eliminar a pasteurela. Los grupos mostraron índices de crecimiento similares en la ganancia diaria de peso, sin embargo en el grupo inoculado con ambos agentes el consumo de alimento fué mayor.

ABSTRACT

The interaction between Mycoplasma hyopneumoniae and Pasteurella multocida in experimental pneumonia in conventional Yorkshire pigs was investigated, four experimental groups were set up: I, control; II, inoculated with M. hyopneumoniae alone; III, inoculated with P. multocida alone and IV, first inoculated with M. hyopneumoniae and then with P. multocida. The animals were 49 days old when infected with Mycoplasma; 23 days later they were inoculated with Pasteurella. All pigs were killed on the 36th day of the experiment. In group III, temperature and respiratory functions were found normal, no lung lesions were observed and P. multocida was not recovered by culture. Pigs in group II showed hyperthermia from days 19 to 23, moderate coughing and dyspnoea were recorded; their lungs showed proliferative lesions in 4 to 17% of their surface from which M. hyopneumoniae was isolated. Pigs in group IV had bimodal hyperthermia, the first peak similar to group II and the second appeared 5 days later; cough and dyspnoea were some how more severe, exudative lesions were found in 22 to 26% of lung surface, in three pigs P. multocida was isolated and M. hyopneumoniae was isolated in all of them. All animals had similar growth rates, but pigs in group IV required 60% more food. These results suggest that M. hyopneumoniae causes a moderate pneumonia and is not fully eliminated from lungs. On the other hand, P. multocida when inoculated alone is not pathogenic and is completely removed.

LISTA DE CUADROS

CUADRO		PAGINA
1	Estudios realizados sobre la asociacion entre la prevalencia o extension de la neumonia enzootica y los indices de crecimiento.	33
2	Distribucion y aspecto de las lesiones macroscopicas en los pulmones	61
3	Resultado de la prueba de t de Student del grado de lesion neumonica en los grupos II y IV	63
4	Estudio de las lesiones microscopicas	66
5	Resultado del analisis de varianza en GDP	83
6	Resultado del analisis de varianza en CA	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PAGINA
1 Medias de temperatura de los cuatro grupos	58
2 Signos respiratorios: Tos y Disnea	60
3 A,B,C y D Vistas dorsal y ventral de las lesiones macroscopicas de los cuatro grupos experimentales	62
4 Porciento de lesion neumonica en los grupos II y IV	6.
5 A y B Histopatologia de los pulmones del grupo I	68
5 C y D Histopatologia de los pulmones del grupo III	70
5 E y F Histopatologia de los pulmones del grupo II	72
5 G y H Histopatologia de los pulmones del grupo IV	74
6 Histopatologia de los pulmones de los cuatro grupos	76
7 A y B Microscopia electronica de barrido de los pulmones de los grupos I y III	78
7 C y D Microscopia electronica de barrido de los pulmones del grupo II	80
7 E y F Microscopia electronica de barrido de los pulmones del grupo IV	82
8 Ganancia diaria de peso de los cuatro grupos experimentales	85
9 Conversion alimenticia de los cuatro grupos experimentales	88

1: INTRODUCCION

Ross, (1984) en las memorias de la Asociación Americana de Especialistas en cerdos menciona: "Las neumonías crónicas en el cerdo se pueden observar como un complejo producido por agentes infecciosos fuertemente influenciados por factores ambientales. Mycoplasma hyopneumoniae es claramente el agente etiológico primario en muchas de estas neumonías crónicas: cuando este microorganismo está ausente en los cerdos de crecimiento y finalización las neumonías crónicas son de poco impacto. La importancia del micoplasma puede ser sobrevaluada y se ha preferido caracterizar esta neumonía como una enfermedad infecciosa clásica con determinados signos clínicos típicos y cambios morfológicos. El colocar así a esta enfermedad dentro de la definición, puede entenderse, pero al igual que otras enfermedades que tienen en común la moderna explotación animal, la "neumonía micoplasmática porcina" (NMP) o "neumonía enzootica" (NE) es claramente una enfermedad de producción multifactorial y con muchas facetas misteriosas".

1.1. Factores que contribuyen a la presentación de las neumonías.

Se reconoce que en la patogénesis de la neumonía crónica de los cerdos juega un papel extremadamente importante M. hyopneumoniae además de los agentes microbianos secundarios, tales como P. multocida, de ciertos factores ambientales y de manejo, sin embargo, mucha de la información acerca de los factores que

influyen la presentación de la enfermedad en forma natural es incompleta, especulativa y como sucede en otras enfermedades complejas y multifactoriales, es difícil determinar el papel exacto, así como el significado de los componentes involucrados (Ross, 1934, Pijoan y Morrison, 1985).

La influencia del medio ambiente y de algunos sistemas de manejo en la salud de los cerdos de engorda y particularmente en relación a las neumonías, se señalan una serie de factores que contribuyen a que éstas se presenten; entre otros podemos considerar los siguientes:

1.1.1. Efecto del medio ambiente

1.1.1.1. Temperatura, movimiento del aire y humedad

Los cerdos se adaptan rápidamente a cambios moderados de temperatura (13 a 24 °C) en donde el efecto sobre la salud es mínimo. La temperatura ambiental adecuada de la zahurda se ve afectada por aislamiento insuficiente o por las corrientes de aire que van desde los pisos, paredes, puertas y ventanas. Una velocidad de aire moderada de 30.48 cm/seg. enfría el medio ambiente térmico a 7 °C, los pisos cementados a 5 °C y con un valor R (resistencia térmica) de 14 en las paredes de la zahurda, se obtienen temperaturas de 1 °C en las mismas. Las corrientes de aire frío y temperaturas extremas provocan tensión en los cerdos afectando los mecanismos de inmunidad, provocando susceptibilidad a la enfermedad. Los cerdos toleran una concentración de humedad entre amplios márgenes (60 a 90%) dentro de temperaturas que se encuentren en la zona térmica neutral (15 a 30 °C); la humedad y

temperatura elevadas del aire pueden disminuir el apetito, mientras que la baja humedad asociada con sequedad puede afectar el tracto respiratorio (Thomas, 1984, Pijoan, 1985, Pijoan y Morrison, 1985).

1.1.1.2. Gases nocivos, partículas de polvo y bacterias en el aire

Los gases amoniacales y gases sulfurosos así como partículas de polvo en forma individual o combinada tienen poco efecto sobre el cerdo (Curtis et al., 1975). Pero el dióxido de carbono, el monóxido de carbono y el dióxido de nitrógeno, pueden ser perjudiciales para el aparato respiratorio sano (Curtis, 1981). Se ha encontrado que concentraciones de amonio de 50 a 75 ppm provenientes de los desechos animales en áreas confinadas reduce la capacidad de los lechones para eliminar del pulmón las bacterias inspiradas. En otros estudios, se concluye que hay un aumento de neumonías cuando se incrementa el amoníaco en las instalaciones porcinas (Drummond et al., 1980). Ramirez (1986) considera que el amoníaco es un fuerte irritante del tracto respiratorio y que por lo tanto, su efecto en un medio contaminado de patógenos pulmonares es crítico para la presentación de la neumonía. La falta de ventilación con el concomitante aumento en el amoníaco se ha considerado frecuentemente como uno de los principales eventos que predisponen a la neumonía, pero en realidad solo se da en casos extremos.

Normalmente, los cambios en la ventilación no tienen gran impacto en el problema neumónico, aunque se puede afectar los índices de crecimiento (Pijoan, 1985). Las bacterias patógenas libres o depositadas en gotas, rápidamente penetran el tejido pulmonar del

cerdo susceptible y causan problemas respiratorios cuando están presentes otros factores. Al respecto Pijoan (1965) ,señala que las barreras mecánicas del pulmón estan dadas basicamente por la capacidad del conducto traqueobronquial de atrapar y eliminar las partículas suspendidas en el aire inspirado, debido a los cambios bruscos de dirección así como a la disminución de la velocidad del aire inspirado a medida que entra al pulmón. Estos dos factores determinan que las partículas pesadas suspendidas en el aire se impacten en diferentes niveles del conducto traqueobronquial: el tamaño de las partículas que son retenidas varía con la especie y la edad del animal. En general las partículas de más de 10 μm de diámetro aerodinámico son retenidas en las fosas nasales (en los cornetes), las partículas de 5 a 10 μm de diámetro en bifurcaciones bronquiales y las de 1 a 3 μm en los bronquiolos o alveolos. Las partículas menores a 1 μm generalmente no se impactan y salen con la espiración. Las microgotas que empuja el cerdo cuando estornuda se deshidratan rápidamente (menos de 10 segundos) aun en ambientes saturados de humedad. Esto restringe el tamaño de la partícula (por ejemplo: si el aerosol producido por el cerdo varía de 5 a 50 μm , después de la deshidratación estas gotas medirán de 3 a 10 μm de diámetro). Al ser inspiradas por otro cerdo las microgotas se rehidratan en el árbol respiratorio. Así partículas de 3 a 10 μm pasaran de 6 a 12 μm , de tal manera que, independientemente de la dispersión original del aerosol y de la humedad ambiental las partículas inspiradas

por el cerdo susceptible tendrán poca dispersión y tenderán a presentar tamaños grandes que son menos infecciosos. Por lo tanto la manera más probable de transmisión debe ocurrir por contacto directo entre animales o por estornudos muy cercanos, (probablemente menos de 0.3 m^2 entre cerdos), que son inspirados antes de que las gotas se puedan deshidratar. En estas condiciones los cerdos susceptibles reciben una dosis infecciosa de bacterias que probablemente se establecen primero en la mucosa nasal y posteriormente al ser inspiradas infectan el pulmón.

1.1.2. Instalaciones

1.1.2.1. Divisiones de corrales

Se ha encontrado que en las granjas donde se tenían las barreras o paredes sólidas se presentaron menos neumonías en relación a las tubulares debido a que el aire contaminado no rebasó las paredes. Desafortunadamente las paredes de este tipo no permitieron un contacto visual o social entre los cerdos adyacentes lo que incrementó patrones de comportamiento anormal relacionado con vicios como mordeduras de orejas y cola entre otros (Pijoan 1985, Pijoan y Morrison, 1985).

1.1.2.2. Pisos y estercoleros

Se ha demostrado que los pisos con aislamiento pobre incrementan el riesgo de neumonías severas y pleuresias, sin embargo el problema radica principalmente en lesiones de los miembros de los cerdos. También se ha observado una reducción significativa en la incidencia de las neumonías cuando los cerdos tuvieron acceso a

áreas abiertas en relación a áreas cubiertas por estiércol (Flesja et al., 1982).

1.1.3. Asociación con otros cerdos

1.1.3.1. Espacio vital (Área y volumen)

En un estudio de incidencia de neumonía durante 2 periodos se encontró que en las granjas donde el espacio por cerdo fué menor de 0.5 m^2 y el volumen de aire por cerdo menor de 3 m^3 , las neumonías se incrementaron del 11.9% en el primer periodo al 21.5% en el segundo, mientras que en las otras donde el espacio por cerdo fué mayor de 0.5 m^2 y el volumen de aire por cerdo mayor de 3 m^3 , la incidencia fué tan solo de 2.4% en el primer periodo y de 5% en el segundo. Cuando se pusieron más de 12 cerdos por zahurda aumentaron los riesgos de una neumonía severa y de pleuresia. Estudios en donde había disminuido la incidencia de neumonías revelaron: que el volumen de espacio vital por cerdo debe ser mayor a los 3 m^3 , que el área por cerdo tiene que ser mayor a los 0.7 m^2 y que una sección debe albergar a menos de 500 cerdos. La excesiva densidad animal favoreció el contacto de nariz a nariz y esta fué la forma más común de transmisión de los agentes neumónicos (Larsson y Backstrom, 1971, Lindqvist, 1974).

1.1.3.2. Contacto con cerdos infectados

La neumonía se presentó más frecuentemente por la excesiva distribución y el mezclado de los animales. En el caso de granjas de ciclo abierto la introducción de cerdos de otras granjas (probablemente infectados) y en operaciones de flujo continuo

es una tendencia a diseminar la infección dentro de la zafurda (Pijoan y Morrison, 1985).

1.2. Etiología

1.2.1. Papel de Mycoplasma hyopneumoniae

Se ha visto, desde hace tiempo que la neumonia enzootica (NE) de los cerdos de engorda podía ser transmitida en forma experimental con filtrados libres de otro tipo de bacterias de muestras de pulmón neumónico. Si estos filtrados eran tratados con penicilina o sulfonamidas se mantenía la infectividad; por lo que se sugirió que el agente causal era un virus. Sin embargo, por evidencias posteriores, como son el tratar a los filtrados libres de bacterias con tetraciclinas, para inhibir la infección, el determinar su tamaño: 0.2 a 0.45 μm de diámetro y ser observados en preparaciones pulmonares teñidas con Giemsa, además de la exigencia para su crecimiento en medios libres de células se sugirió que el agente responsable no era un virus sino un micoplasma (Whittlestone, 1979 y Armstrong, 1982).

En forma independiente y casi simultáneamente, dos nombres de especie fueron propuestos para el micoplasma responsable de un tipo de neumonia en los cerdos: el nombre de M. hyopneumoniae fue propuesto por los estadounidenses en 1965; la cepa tipo (por monotipificación) fue la número 11 (también conocida como VPP 11), en el mismo año también los ingleses propusieron el nombre de M. suisneumoniae al mismo agente causal de la neumonia enzootica de los cerdos y la cepa tipo fue designada como la cepa J. Sin embargo el Subcomite Internacional sobre la Taxonomia de

Mycoplasmatales recomendó que la cepa J fuera aceptada como la NEOTIPO de M. hyopneumoniae con base en que las dos cepas son indistinguibles por pruebas serológicas y biológicas (Rose et al., 1979).

1.2.1.1. Características Generales de M. hyopneumoniae

Cuando se desarrolla el micoplasma en medios sólidos se observan colonias pequeñas de 20 a 100 μm de diámetro en los primeros 5 días, que alcanzan un tamaño máximo de 400 μm de diámetro a los 10 días, la colonia es característica y carece de pezón central. Los elementos individuales son muy pleomórficos, cuando crecen en medios sólidos, líquidos, cultivos celulares o cultivos "in vivo" (en lechones) pero en cada uno de estos sistemas de cultivo se desarrolla de manera característica: en las preparaciones de pulmón se observan formas de anillo y bipolares (0.5 a 0.8 μm de diámetro) que se pueden encontrar aisladas o en grupos. En cultivos celulares crece en grupos difusos sobre todo como cocos (0.5 μm de diámetro) en cadenas cortas o anillos (aprox. 3 μm de diámetro) conteniendo una estructura parecida a un coco. En medios líquidos se observan formas filamentosas cocoides, filamentos ramificados finos (0.1 μm de diámetro) en estructuras globulares o colonias más confluentes, más grandes (aprox. 16 μm de diámetro) y más abundantes (Goodwin et al., 1967 y Whittlestone, 1973). Dependiendo del enriquecimiento del medio de cultivo, el micoplasma puede ser almacenado a -25 C en tejidos pulmonares neumónicos durante largos periodos de tiempo pero se inactiva rápidamente cuando se almacena a 4 C. No hemoliza los glóbulos rojos de cerdo, caballo, vaca o pollo. No se multiplica en

embriones de pollo o produce lesiones cuando se inocula por vía pulmonar a ratones lactantes (Switzer,1967).

Comparando algunas cepas de M. hyopneumoniae por métodos serológicos, Ro y Ross (1983). encontraron una diversidad antigénica entre ellas, revelada solamente por las pruebas de inmunoelectroforesis bidimensional, además de que se encontró que los determinantes antigénicos para las pruebas de inhibición de crecimiento y de inhibición metabólica parecen ser proteínas de membrana, glicolípidos y fosfolípidos que se encuentran en la superficie celular, sin embargo la importancia de estas diferencias (distribución geográfica, virulencia o inmunogenicidad) no ha sido determinada.

1.2.1.2.- Patogenia de la "Neumonía Enzoótica"

Esta enfermedad se encuentra en las regiones de más alta producción en el mundo, casi todas las granjas están afectadas y la incidencia de las afecciones es sumamente alta; una variedad de reportes indican que de los cerdos que salen al mercado, un 30 a un 75% está afectado (Armstrong,1982). Es habitual encontrar un porcentaje significativo de pulmones con lesiones típicas de "neumonía enzoótica" en los diferentes rastros; la incidencia encontrada varía del 12 al 81% (Whittlestone,1979). En México, Maqueda (1977) hizo un análisis porcentual de la incidencia de "neumonía enzoótica" en cinco estados de la República, evaluando las lesiones macroscópicas de 4,013 pulmones correspondientes a igual número de cerdos. Los resultados mostraron que un 51% de los cerdos estaban afectados en mayor o menor grado, siendo la incidencia o severidad variables según los estados: Coahuila,

32.4%; Guanajuato, 70.6%; Jalisco, 49.5%; Nuevo León, 23.5% y Sonora, 53.8%. En otro estudio realizado en rastros de la zona metropolitana de la Ciudad de México (Cuautitlán y Tlalnepantla), se encontró el 23% de fluorescencia específica en pulmones neumónicos cuando se empleo la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Ciprián *et al.*, 1982).

La transmisión de las bacterias respiratorias se lleva a cabo fundamentalmente por contacto directo, por las secreciones nasales y faringeadas, por lo tanto el medio principal de diseminación es de cerdo a cerdo debido a que el micoplasma es muy frágil y no resiste mucho tiempo fuera del animal, así la transmisión del *M. hyopneumoniae* se lleva a cabo por contacto o por aerosoles entre cerdos infectados (fase aguda) o cerdos portadores convalescientes y los cerdos sanos (Friis, 1973; Ross, 1984 y Pijoan, 1985). La infección por el micoplasma es primero vertical (de madres jóvenes a lechones) y después al momento del destete, es horizontal (de lechones paridos por cerdas de primeros partos a lechones provenientes de cerdas de cuarto o quinto parto). La transmisión horizontal se intensifica debido a la profunda tensión que acompaña al destete y se produce fundamentalmente al mezclar cerdos de diferentes camadas en una sola corraleta, lo que ocasiona peleas. Se ha encontrado que el constante mezclado de animales de todas las edades es uno de las principales causas de tensión en la pira (Pijoan, 1985). Estudios de otras enfermedades por micoplasmas en otras especies sugieren que la susceptibilidad a estas enfermedades puede incrementarse con la edad. Sin embargo en trabajos experimentales se encontró que no existe ninguna

diferencia en susceptibilidad a la "neumonía enzoótica" en cuanto a la edad (Piffer y Ross, 1984). En condiciones experimentales, se ha reproducido la enfermedad: Hodges et al. (1969) utilizaron cerdos de granjas libres de "neumonía enzoótica" e infectaron a cerdos gnotobióticos con 2.5 a 5 ml (10 unidades cambiantes de color/ml) por vía intratraqueal y de 1 a 2 ml por vía intranasal y a cerdos SPF (libres de patógenos específicos) con 10 ml por vía intratraqueal y 5 ml por vía intranasal de la cepa J de M. hyopneumoniae (altamente purificada) a dosis única y reprodujeron la neumonía. Confirmaron que M. hyopneumoniae es el agente primario en las neumonías del cerdo pero no excluyeron la posibilidad de que otros agentes puedan estar involucrados. En otro estudio se utilizaron cerdos nacidos por histerectomía y privados de calostro (HPCD) y fueron infectados por vía intranasal con suspensiones pulmonares de tejido neumónico de casos confirmados de "neumonía enzoótica"; aislaron el micoplasma en 15 de 16 cerdos inoculados y confirmaron la regularidad con la cual M. hyopneumoniae puede reaislarse de casos activos de la enfermedad inducida experimentalmente (Goodwin, 1972). Por otro lado Underdahl et al. (1980) infectaron por vía intranasal cerdos gnotobióticos con 3 ml de un cultivo diluido 1:1 con solución salina balanceada (el cultivo fue a partir de la cepa NB-12 de M. hyopneumoniae de 26 pases en cerdos HPCD y 22 pases en medio líquido). Sólo reaislaron el micoplasma en 10 de 16 cerdos inoculados y con mayor frecuencia cuando se cultivaron a partir del pulmón (área neumónica). También cuando se emplearon cerdos provenientes de granjas libres de la enfermedad y se inocularon con homogeneizados pulmonares (suspensión de pulmón neumónico al

10% conteniendo la cepa 11 de M. hyopneumoniae) por vía intratraqueal ("A") e intranasal ("B") el micoplasma se realizó en 10 de 18 cerdos de grupo "A" y 9 de 12 del grupo "B" (Piffer y Ross, 1984). Con el objeto de evaluar agentes quimioterapéuticos o de estudiar mejor a la neumonía enzoótica, Hannan et al. (1984) han desarrollado un modelo experimental, basado en la reproducción de la neumonía en cerdos gnotobióticos por medio de aerosoles, utilizando cultivos puros de M. hyopneumoniae de tercer pasaje cepa NB12, aislados de pulmón neumónico de lechones gnotobióticos. El periodo de incubación de la "neumonía enzoótica" de los cerdos en condiciones naturales varía entre 10 y 15 días (Ross, 1984) o de 2 a 3 semanas (Goodwin y Whittlestone, 1967, Livingston et al., 1972), sin embargo se han detectado variaciones extremas en donde la enfermedad se mantiene en forma subclínica hasta por 15 meses (Whittlestone, 1979 y Ross, 1984).

El micoplasma es depositado por inhalación en las margenes ventrales de los pulmones (observación dada por las lesiones que se producen) estableciéndose en el epitelio bronquial y bronquiolar, en donde la población de este microorganismo aumenta y avanza a lo largo del árbol respiratorio (Armstrong, 1982). Esto se ha demostrado por microscopía electrónica de barrido e inmunofluorescencia en donde se observó que el M. hyopneumoniae se concentró en la superficie de las células epiteliales de los bronquios y bronquiolos sobre todo en los cilios, de donde probablemente parte hacia los alveolos y es ingerido por los macrófagos alveolares. Los productos de degradación del micoplasma aparentemente estimulan a las células linfoides que se acumulan en

estas áreas, posiblemente la acumulación de células linfoides adyacentes a bronquios y bronquiolos representa una respuesta inmune hacia el micoplasma (Livingston et al., 1972). En cultivo de órganos, el M. hyopneumoniae no tuvo preferencia para infectar a las células epiteliales de anillos traqueales o de pulmón (ambas fetales) y los resultados indicaron que un inóculo relativamente bajo de micoplasma libre de otros microorganismos, produjo daño local "in vitro", a tejidos del sistema respiratorio del cerdo. El micoplasma probablemente induzca la pérdida de cilios debido a la elaboración de una o varias enzimas, de sustancias tóxicas; por parasitismo o por competencia de los materiales nutricionales de tal manera que si las células epiteliales (pseudoestratificadas columnares) de la traquea y bronquios, la secreción mucosa y los macrófagos alveolares se encuentran afectados, la remoción de partículas y microorganismos patógenos y en este caso micoplasmas no se lleva a cabo. Una vez que los cilios se pierden, el microorganismo colonizaría como resultado de la disminución del movimiento protector de la cubierta mucosa, permitiendo su adhesión a las partes fijas de las células respiratorias (Williams y Gallagher, 1978).

Geary y Walczak (1985) han aislado e identificado un factor citopático de M. hyopneumoniae a partir de membranas de la cepa VPP 11. Este factor fue una proteína con un punto isoeléctrico de 6.2, un peso molecular de 54,000 daltones y fue capaz de inducir efecto citopático en fibroblastos de pulmón humano (MRC-5) a una concentración de 250 μ g de proteína/ml. Es probable que este factor tenga un papel importante en la patogénesis de la enfermedad natural en el cerdo. Cuando se ha establecido la

infección sobre la superficie del epitelio, el micoplasma puede detectarse hasta las 15 semanas después de la inoculación. Estudios con inmunofluorescencia y cultivo indicaron que el número de micoplasmas disminuye en los estados tardíos de la enfermedad experimental y al parecer la intensidad de la infección y su duración fué variable (Livingston et al., 1972 y Underdahl et al., 1980).

Los mecanismos involucrados en el desarrollo de la respuesta linfocitica peribronquial no estan bien aclarados. Lesiones histopatológicas similares se han encontrado en neumonias por micoplasmas en otras especies animales. La infiltración puede ser producida en respuesta a la persistencia de los micoplasmas en la superficie del conducto respiratorio ya que estos no penetran la mucosa. Posiblemente algunos agentes mitógenos de los micoplasmas, sustancias bien conocidas que en pruebas de laboratorio estimulan inespecíficamente a los linfocitos, también estimulan la acumulación o proliferación de linfocitos en el huesped. Por lo tanto no se sabe si la acumulación masiva de células inmunologicamente activas en las neumonias por micoplasma es completamente perjudicial o es también benéfica para la resolución de la enfermedad (Ross, 1984), ya que en estudios microscópicos de las lesiones se encontró hiperplasia linfocitica perivascular, peribronquial y peribronquiolar en cerdos infectados experimentalmente con *M. hyopneumoniae* (Livingston et al., 1972 y Whittlestone, 1973). Desde el punto de vista histopatológico, Whittlestone (1972), reportó una serie de cambios en los pulmones de la siguiente manera: a) etapas tempranas (7 a 28 días

posinoculación), en la luz de los bronquios, bronquiolos y alvéolos se encontraron leucocitos polimorfonucleares (PMN) y pérdida de cilios, a medida que la lesión progresó, se incrementó el número de linfocitos en el tejido peribronquial, peribronquiolar y perivascular, en los alvéolos se encontró una mezcla de infiltrado celular y edema; b) en etapas de infección establecida (17 a 40 días de duración): hubo una extensiva proliferación de tejido linforreticular en áreas peribronquiales y perivasculares, en la lámina propia se encontró penetración de linfocitos, una disminución de PMN y edema; c) en la etapa convalesciente (69 a 262 días) se encontró colapso alveolar, enfisema y un incremento de nódulos linfoides hiperplásicos alrededor de bronquios y bronquiolos. Se presentaron más lesiones en los lóbulos apical y cardiaco, sin embargo se afectaron los lóbulos accesorio o intermedio en su parte ventral y los lóbulos caudales en las porciones craneoventrales, no importando si los animales son gnotobióticos, SPF o HPCD (Hodges et al., 1969; Etheridge et al., 1979 y Armstrong, 1982). El aspecto macroscópico de las lesiones dependerá del tipo de infección: cuando esta se lleve a cabo en forma experimental en cerdos HPCD con cultivos puros de M. hyopneumoniae con una cepa de bajo pasaje, se observó el área ligeramente inflamada, brillante, de distribución lobular y de color púrpura (Armstrong, 1982); en cerdos gnotobióticos, SPF y obtenidos de granjas libres de "neumonía enzootica" las lesiones encontradas fueron: áreas de consolidación de color gris-pálido, gris-rojizas o rojas (Hodges et al., 1969; Etheridge et al., 1979 y Piffer y Ross, 1984). Al principio de la enfermedad, los lóbulos estaban ligeramente inflamados y brillantes y tenían una

consistencia carnosa al corte y las vías respiratorias contenían un exudado blanco pegajoso y mucóide , (en esta fase primaria de la infección los pulmones son especímenes ideales para el aislamiento de M. hyopneumoniae debido a que se encuentra en grandes cantidades): posteriormente, las lesiones se redujeron y se comprimieron por debajo de la superficie del tejido pulmonar normal y su consistencia fué más fibrosa además de que estaban exentas de exudado (Armstrong,1982).

La curación espontánea depende en su mayor parte de las condiciones ambientales. Pero en condiciones de alojamiento superpoblado, las lesiones permanecen durante muchas semanas , en todo ese tiempo el micoplasma esta presente en los cerdos y es propagado por ellos. Bajo condiciones de campo, en donde existe un grado variable de inmunidad pasiva, la neumonía tal vez no se presente inmediatamente después de la exposición a la infección, en algunos cerdos tal vez nunca se presente . Generalmente los primeros signos clínicos en los casos agudos son anorexia , piroxia y respiración con soplo, en lugar de tos, la que se presenta después. Es importante tener en cuenta que toser (el signo más común) y neumonía son condiciones diferentes, la tos seca es más indicativa de bronquitis que de neumonía, y en parte depende de la influencia de otros microorganismos, mientras que en cerdos infectados experimentalmente, a menudo tienen neumonía extensiva aunque no hayan tosido anteriormente (Goodwin,1982).

Armstrong (1982) menciona: " la enfermedad se caracteriza por muy baja mortalidad y alta morbilidad, donde el signo clínico más común es una tos crónica seca. Son también característicos el

pelambre hirsuto, un pobre índice de crecimiento y una deficiente conversión de alimento. Estas últimas características hacen de la "neumonía enzoótica" una enfermedad importante económicamente que está directamente influenciada por enfermedades concurrentes tales como neumonías bacterianas ." Al respecto Morrison *et al.* (1986), concluyen que los estudios sobre la asociación entre los parámetros de rendimiento (ganancia diaria de peso, GDP y conversión de alimento CA) y las lesiones en la "neumonía enzoótica", tienen diferentes resultados (Cuadro 1). El efecto que tienen las lesiones de la "neumonía enzoótica" sobre el rendimiento depende de las condiciones de manejo y del medio ambiente.

1.2.2. Papel de Pasteurella multocida

Pasteurella multocida es un invasor extremadamente común en las neumonías del cerdo. Se le ha aislado de pulmones aparentemente normales, colectados en rastro, aunque puede ser resultado de la contaminación durante el escaldado. Normalmente, el microorganismo está considerado como una bacteria incapaz de invadir el pulmón a menos que exista un factor predisponente (Ross, 1984). Sin embargo se ha demostrado que el agente principal involucrado en las "neumonías crónicas" es P. multocida (Pijoan, 1985). Estudios microbiológicos y patológicos realizados en pulmones neumónicos, colectados de rastros, han demostrado que una serie de microorganismos están asociados al proceso neumónico y los análisis de correlación estadística comprueban que P. multocida es el único agente responsable de las lesiones severas de "neumonía crónica" (Morrison *et al.*, 1985).

1.2.2.1. Características generales de P. multocida

P. multocida, cuando se aísla de los animales que murieron por la infección, se observa como un coccobacilo pequeño, aproximadamente 1.0 μm de longitud y 0.5 a 0.6 μm de ancho. Son bacterias gram negativas e inmóviles, sin embargo, la morfología de estos microorganismos es variable ya que si son aislados del tracto respiratorio superior de animales clínicamente sanos se observan como bacilos relativamente largos, que miden aproximadamente 5 μm de longitud y 1.0 μm de ancho (Buxton y Fraser, 1977 y Nicolet, 1985).

Las características antigénicas de P. multocida han sido determinadas por estudios inmunológicos empleando pruebas de hemaglutinación indirecta, de autoaglutinación en presencia de acriflavina y de inhibición de la formación capsular por hialuronidasa. Mediante estas pruebas se han encontrado diferencias entre esta especie, lo que ha originado que se le clasifique en cuatro tipos si se hace con base en pruebas de protección a ratón son los tipos de Roberts I, II, III y IV, pero si se relaciona con antígenos capsulares son los tipos de Carter A, B, D y E, correspondiendo una y otra de la siguiente manera: I con B; II con A; III con E y IV con D. (Roberts, 1947; Carter, 1955; Carter, 1957; Carter y Subronto, 1973, Carter y Rundell, 1975). Otros doce (1-12) tipos de antígenos se han estudiado mediante pruebas de inmunodifusión (Namioka y Murata, 1961). Utilizando cepas de P. multocida de origen aviario, se han determinado diez y

seis (1-16) tipos somáticos con las pruebas de difusión en gel y de extractos salinos formalinizados calentados a 100 C durante una hora de células capsuladas y no capsuladas (Heddleston et al., 1972). Estudios referentes a la caracterización del lipopolisacárido (LPS) de algunas cepas de *P. multocida* (14 tipo A; 11 tipo B; 5 tipo D y 3 tipo E) revelaron la presencia de monosacáridos como la glucosamina, galactosamina, L-glicero-D-mannoheptosa, D-glicero-D-mannoheptosa, glucosa y galactosa, lo que permitió subdividir esta especie en cuatro tipos químicos (I-IV), sin embargo no se encontró una equivalencia con los serotipos de Carter (Erler et al., 1977). También se ha encontrado en las cepas aviarias una endotoxina (de cepas capsuladas y no capsuladas) que se ha relacionado con la virulencia en el Cólera Aviario (Rebers y Heddleston, 1974). Las características biotípicas de la *P. multocida* aisladas de cerdos como son la producción de toxinas, presencia de fimbrias, y otras ya descritas (Buxton y Fraser, 1977) son importantes en la virulencia de la misma, pero parece ser que solo en Rinitis Atrófica y no en las neumonías. A pesar de eso es difícil de llevar a cabo la colonización de las fosas nasales de cerdos sanos con *P. multocida*, a menos que se combine con *Mordetella bronchiseptica* o que se presenten factores predisponentes (Gutter, 1983; Pijoan y Morrison, 1985). En Europa, se ha demostrado que las pasteurellas aisladas de casos de Rinitis Atrófica pertenecen al serotipo D, se caracterizan por producir toxinas que se miden biológicamente con las siguientes pruebas: inoculación de subcutáneo de un culivo por vía intradérmica a la piel de cuyes; el resultado se mide como la producción de una dermonecrotóxina (DNT positiva) por parte de la *P. multocida*.

o inoculación por vía intraperitoneal (de Jong et al., 1980) a ratones para estudio de letalidad (Rutter, 1983) o pruebas de toxicidad en cultivos de tejidos (Lastra y Pijoan, 1984). En E.U.A., Pijoan et al (1984) aislaron e identificaron cepas de P. multocida toxigénicas a partir de pulmones neumónicos y encontraron: que en el 70.8% de los pulmones se aisló la bacteria, y de este el 87.5% fue tipo A y 12.5 fue tipo D. De las cepas tipo A solo el 12.2% fueron toxigénicas y un 80% de la tipo D, no concluyen el papel exacto de la P. multocida en el desarrollo de las neumonías. En México, Mendoza (1985) aisló la exotoxina de sobrenadantes de cultivos de 18 horas; los hallazgos hacen pensar que la fracción de PM de 22.000 d sea la causante de la reacción dermonecrotóxica en la piel de cuye (DNT positiva). Esta actividad se perdió con el tratamiento con tripsina, pepsina y elevación de temperatura, coincidiendo con los resultados de Rutter (1983) y Van der Heyden et al. (1984), además en este trabajo la cepa control de P. multocida tipo D mostró tener dos bandas en geles de agarosa (intervalo de 6557 y 4371 pares de bases) después de aplicar la técnica de extracción de plásmidos; estas bandas fueron responsables de la DNT+ en la piel de cuye en comparación con la cepa "curada" (tratada con 400 µg de naranja de acridina) que no mostró las bandas y dió la reacción DNT negativa en la piel de cuye. Los resultados sugieren que la cepa control contiene un plásmido responsable de la producción de la DNT+ con la resistencia a antibióticos.

En otros estudios (Nakai et al., 1986), han purificado una toxina DNT+ a partir de extractos obtenidos por sonicación de P.

multocida tipo D, cepas SP-72 y 4745a y de Bordetella bronchiseptica cepa L3. Las propiedades fisicoquímicas de la toxina de P. multocida fueron: PM de 160,000 d, punto isoeléctrico de 4.7 a 4.8 y reacción de absorción a 280/260 nm de 1.89 en relación a B. bronchiseptica de 190,000 d, de 6.5 a 6.6 y de 1.93 respectivamente; esto refleja que es una glicoproteína que tiene similares propiedades biológicas y actividad tóxica (en P. multocida la dosis mínima necrosante fué de 1.0 ng, la dosis letal en ratón por vía intraperitoneal, de 0.2 µg, y la dosis mínima citotóxica de 0.1 ng, mientras que en B. bronchiseptica fué de 2.0 ng, 0.3 µg y de 0.2 ng respectivamente) pero difieren una de otra por pruebas de neutralización cruzada. En trabajos similares realizados por Niels *et al.* (1986) se encontró que la DNT+ de P. multocida tipo D cepa 45/78 obtenida del sobrenadante tuvo un PM de 143,000 d y concluyeron que fueron similares en cuanto a actividad biológica, pero diferentes en propiedades químicas, probablemente debido a las diferentes cepas de P. multocida estudiadas y a que la sonicación de un cultivo en fase exponencial pudiera llevar a la liberación de una toxina intracelular, activa pero ya preformada. Se ha demostrado que las cepas de P. multocida que son importantes en Rinitis Atrófica son los tipo D toxigénicas (DNT+); sin embargo estas no son patógenas para el pulmón (Pijoan, 1985).

El aislamiento, identificación y serotipificación de P. multocida aislada a partir de pulmones neumónicos colectados en rastros ha revelado que el 97.3% son del tipo capsular A y el 2.7% del tipo D; el antígeno somático primario más frecuentemente encontrado fué el tipo 3 (86%) y dentro de los secundarios fué el

tipo 5 (89.7%), así el serotipo más frecuentemente encontrado fue el A:3, 5, (39.2%); seguido de A:3, 4,5,12. (12.2%); A:3, 4,5, (11.2%); A:3, 5,12, (10.4%); A:3, (6.8%) y A:5, (6.8%). Las cepas tipo D tuvieron una distribución similar de serotipos, pero el más encontrado fue el D:5, (33.3%) y el D:3 (5), (33.3%), en efecto, la prevalencia de las cepas A y D en pulmones neumónicos favorece en forma muy significativa a las cepas A, sin embargo es posible que el uso de técnicas de inoculación animal como parte del aislamiento primario de rutina resultaría en una alta proporción de cepas tipo D de pulmones neumónicos de cerdo (Pijoan et al.,1983). La flora nasal del cerdo rinitico es de 80% D y 20% A y la flora pulmonar del cerdo neumónico es 55% A y 15% D. Se ha demostrado que esto se debe al comportamiento del macrófago alveolar ya que esta célula es capaz de fagocitar rápidamente a las cepas D pero no a las A, aparentemente debido a que la A posee una espesa capsula de ácido hialurónico que las protege de la fagocitosis (Pijoan,1985). Por otro lado los macrófagos alveolares no son susceptibles a la acción de la toxina que producen las P. multocida tipo D (Pijoan,1984).

En México. Badiola y Pujols (1984) realizaron un estudio con pulmones neumónicos y normales de rastro y encontraron que de 72 pulmones con lesiones neumónicas, del 51% se aisló algún tipo de pasteurera y de los 34 pulmones normales en un 21% se aisló la bacteria. Un 14% (6) resultó tener P. haemolytica y un 86% (38) tuvo P. multocida, la tipificación capsular encontrada fue: 14% no tipificadas; 18% tipo capsular A y 68% del tipo capsular D. Además observaron una falta de correlación entre el tipo capsular y la

patogenicidad para el ratón cuando se inocularon por vía intraperitoneal. En México, aun no se han determinado los serotipos somáticos (Pijoan y Trigo, 1986).

Ocasionalmente P. multocida puede ser un agente primario en algunos tipos de neumonías. En un estudio experimental realizado por Pijoan y Fuentes (1986) en donde inocularon cerdos de 6 semanas de edad con P. multocida tipo A:50 (clasificada como serotipo A, neumónica): tipo A:52 (clasificada como serotipo A, pleurítica, no toxigénica) y tipo D:82 (clasificada como tipo rinitis atrófica), concluyeron que la cepa de P. multocida A:52 (que desarrolló neumonía fibrinosa, pleuritis, piotorax y abscesos) fue más patógena que la cepa A:50 (que desarrolló neumonía pleurofibrinosa y pleuresia), y que dichas lesiones pulmonares son principalmente producidas por P. multocida serotipo A y no por el serotipo D.

1.2.2.2. Patogenia de la "Neumonía Crónica" por P. multocida

Es extremadamente difícil reproducir la pasteurellosis pulmonar en cerdos sanos, debido a que la P. multocida no puede establecerse y colonizar el pulmón a menos que exista antes un evento inmunosupresor que usualmente es una infección con otro agente o la combinación de infección y tensión. Una gran proporción de animales tienen las fosas nasales colonizadas con P. multocida y la están inspirando constantemente, por lo que resulta evidente que solo desarrollaron la infección aquellos animales que tuvieron afectadas sus defensas pulmonares. Por lo tanto, gran parte del problema de "neumonía crónica" gira alrededor de obtener una mejor comprensión de estos eventos inmunosupresores y de

aquellos que inducen tensión.

En una infección por P. multocida ocurrirían una serie de eventos como los propuestos por Pijoan, 1985 . Pijoan y Morrison, 1985:

1o. Colonización de las bacterias en gran número en las fosas nasales.

2o. Las bacterias son inhaladas al pulmón en las gotas de tamaño pequeño, eludiendo los mecanismos de remoción traqueobronquial e impactándose en los alvéolos (el M. hyopneumoniae es un inmunosupresor, debido a que se establece sobre la superficie epitelial de tráquea y bronquios y posiblemente interfiera con los mecanismos de secreción de sustancias bactericidas y con el movimiento ciliar y sus funciones de eliminación del moco traqueobronquial).

3o. El macrófago está suprimido por una infección viral (virus vacunal del Cólera Porcino o el virus de la enfermedad de Aujeszky).

4o. Si la P. multocida pertenece a un serotipo que es difícil de fagocitar por el macrófago, ésta coloniza al pulmón y se producen las lesiones neumónicas más severas.

Es evidente que mientras el árbol traqueobronquial es bastante resistente, el alveólo pulmonar es muy susceptible. De hecho, estudios de Pijoan y Ochoa (1978a) demostraron que P. multocida fué susceptible a la acción microbicida del sobrenadante de cultivos de tráqueas embrionarias (explantes traqueales) de cerdo, debido a la secreción de una sustancia bactericida inespecífica.

Esta sustancia bactericida fué una glicoproteína de una sola cadena con 20% de carbohidratos . al parecer es una sustancia diferente a la lisozima y beta-lisina, que tenia un espectro antibacteriano amplio, especialmente contra patógenos respiratorios (Iglesias et al., 1982). Estos trabajos sugieren que la P. multocida en el conducto traqueobronquial es inactivada por las sustancias bactericidas presentes en los cerdos sanos. En el alvéolo, no existe este moco y es entonces que el macrófago alveolar juega un papel importante en los mecanismos de inmunidad innata. El macrófago sólo procesa el antígeno y como fagocito no inmune, está relativamente inactivo y poco preparado para combatir una infección bacteriana a menos que exista un estado inmune previo (Pijoan, 1985).

Cuando P. multocida está involucrada en los procesos neumónicos se produce pericarditis y pleuritis (Ross, 1984). Los cambios histológicos iniciales son parecidos a los producidos por la "neumonía enzoótica", pero a medida que avanza la enfermedad son mas graves y se caracterizan por una bronconeumonía severa con hiperplasia linfoide peribronquial, además de la presencia de abundantes leucocitos polimorfonucleares (PMN), células mononucleares y exudado mucopurulento en alveolos y bronquiolos (Pijoan y Trigo, 1986). La consolidación se presenta principalmente en áreas craneoventrales del pulmón y los septa pueden estar aumentados, las lesiones son de aspecto rojogrisáceas con una tendencia hacia el gris como las encontradas en micoplasmosis; la presencia de adherencias y en ocasiones lóbulos atelectásicos son hallazgos característicos de pasteurelosis (Ross, 1984; Morrison et al., 1985 y Pijoan y Trigo, 1986). Al

final se puede observar la presencia de abscesos y áreas necróticas distribuidas en todos los lóbulos; raramente, si la infección adquiere la forma septicémica, se observan hemorragias equimóticas y petequiales en membranas serosas y mucosas (Pijoan y Trigo, 1986). Las hemorragias y hematomas en la mucosa de la vejiga son también lesiones anatomopatológicas esenciales en las pasteurelosis porcinas (Dobrev, 1984).

1.3. Fenómenos de sinergia e interacción en las neumonías

Durante las pandemias de influenza humana ocurridas en 1890 y 1918, erróneamente se atribuyó la causa a Haemophilus influenzae, no obstante que el agente etiológico primario en la primera fue el virus de influenza tipo A2(H2N2) (relacionado con la epidemia de 1957); por lo anterior se pensó en una posible cooperación entre estos dos agentes, en donde la bacteria actuó sinérgicamente después del efecto viral. Este mismo fenómeno fue observado en la influenza del cerdo con Haemophilus suis en donde experimentalmente se inocularon cerdos con los dos agentes y las lesiones que se produjeron fueron más severas en comparación con los agentes inoculados en forma individual. A partir de estos estudios es común encontrar neumonías por agentes secundarios después de una primoinfección con el virus de influenza (Morse, 1973). El fenómeno de sinergia en las enfermedades respiratorias sería cualquier situación en la que dos o más agentes juntos producen un mayor efecto (grado de lesión neumónica) que el producido por cada agente por separado. A diferencia con el fenómeno de interacción en donde el agente primario produciría un

daño en algunas de las funciones del pulmón que posteriormente sería aprovechado por uno o varios de agentes secundarios. Este fenómeno ha sido estudiado principalmente por el grupo de investigadores canadienses, en donde su modelo experimental fueron los aerosoles y su parámetro la remoción-retención de partículas inhaladas. Con este modelo experimental López et al (1976) observaron que terneros inoculados con el virus de parainfluenza-3 (PI-3) y posteriormente infectados con P. haemolytica, y al medir diariamente la remoción de esta bacteria, encontraron que en los días 7 y 11 se disminuyó tal remoción, pero las pasteurelas retenidas no mostraron una correlación con la histopatología efectuada en el pulmón.

1.3.1. Relación virus-bacterias en las neumonías del cerdo

Existen trabajos (Kasza et al., 1969) en donde los adenovirus porcinos fueron capaces de inducir experimentalmente lesiones neumónicas cuando se inocularon a cerdos. Estos hallazgos determinaron que los adenovirus porcinos y M. hyopneumoniae inoculados simultáneamente en cerdos gnotobióticos causaron lesiones mas severas y consistentes que las observadas cuando se inocularon por separado. Las lesiones macroscópicas consistieron en áreas de consolidación bilateral en los lóbulos apical y cardiaco y en la porción anterior de los lóbulos diafragmático y accesorio; fueron caracterizadas como una bronconeumonía exudativa en combinación con neumonia intersticial, además se encontraron cuerpos de inclusión nuclear en las células septales. En este experimento quedó claro el sinergismo que existió entre estos dos agentes en el desarrollo de las neumonías del cerdo . Resultados

similares se encontraron cuando se inocularon enterovirus tipo 2 y P. multocida (Smith et al., 1973a). Sin embargo, este virus es poco común y no explica la alta prevalencia de la enfermedad, de ahí el problema de encontrar cuales virus están involucrados de manera rutinaria (Pijoan, 1985).

En México, se ha descrito el desencadenamiento de la pasteurelisis pulmonar por cepas vacunales del virus del cólera porcino, lo cual tiene gran importancia práctica, debido a la inmunosupresión de la vacuna que favorece la colonización de la P. multocida (Pijoan y Trigo, 1986). Un experimento clásico de interacción virus bacteria fue realizado por Pijoan y Ochoa (1978b), en el que demostraron que el virus del cólera porcino, incluso en forma de cepas "atenuadas" vacunales (cepa china del virus del cólera porcino), podría predisponer a los cerdos a quedar colonizados por P. multocida. Los cerdos fueron primeramente vacunados con dicho virus y cuando presentaron los signos posvacunales se infectaron con la P. multocida. Encontraron que en los días 3 y 4 de posvacunación los cerdos presentaron mayores lesiones neumónicas en contraste con las encontradas el día 14 que fueron menores, en todos los casos se realizó P. multocida.

El virus de la enfermedad de Aujeszky ha sido poco estudiado en cuanto a su participación como agente primario en las neumonías del cerdo. En un estudio de rastro, donde se muestrearon un total de 106 pulmones, el 68 % fueron de tipo neumónico y el 32% de tipo normal. De los casos neumónicos en un 67% se observó serología positiva al virus de Aujeszky, mientras que en los casos normales solo 32% se acompañaron de serología positiva. De los

pulmones neumónicos en un 51% se aisló algún tipo de *Pasteurella*, mientras que de los normales solo se logró aislar en un 9% (Badiola y Pujols, 1984).

En otros estudios, se demostró la interacción del virus de la enfermedad de Aujeszky y *P. multocida* en ratones, aquí se midió la remoción bacteriana pulmonar y se hicieron curva de mortalidad y un estudio histopatológico. Los resultados obtenidos mostraron una marcada disminución de la eliminación bacteriana del pulmón hacia el día 11 de posinfección con el virus de Aujeszky (Badiola y Pujols, 1984). De estos trabajos se desarrolló un experimento con cerdos convencionales previamente vacunados con una cepa inactivada del virus de Aujeszky y se consideró como parámetro principal la remoción pulmonar de *P. multocida* a diferentes días postdesafío con una cepa virulenta del virus de Aujeszky. Se encontró que el virus afecta la remoción pulmonar de la bacteria a partir del día 7 al 15 posinfección (Caballero, 1985). Estos resultados apoyaron la hipótesis de que el virus de la enfermedad de Aujeszky pudiera estar involucrado como agente primario en las neumonías del cerdo. Otro estudio similar, en el cual se infectaron cerdos por vía intranasal con el virus de Aujeszky patógeno cepa Shope (con un título de 10^4 TCID₅₀) y 7 días después con una mezcla de *P. multocida* tipos A y D: se demostró que las cepas virulentas de campo fueron capaces de inmunosuprimir al animal, lo que permitió la superinfección con *P. multocida* debido a que el virus ocasionó interferencia en el macrófago para que no se realizara la fusión del fagosoma-lisosoma, que era necesario para inactivar las bacterias fagocitadas (Fuentes y Pijoan, 1984).

1.3.2. Relación Mycoplasma-Pasteurella en las neumonías de diferentes especies animales.

Los estudios recientes sobre la cooperación entre bacterias de los géneros Mycoplasma y Pasteurella son variables y no concluyentes debido a que estas bacterias se comportan en forma diferente, dependiendo de la especie animal de que se trate. En un trabajo experimental donde se estudió la infección con un cultivo puro de M. ovipneumoniae (propagado en glándula mamaria ovina) y/o P. haemolytica, inoculados por vía intranasal o intratraqueal a corderos nacidos por cesárea y desprovistos de calostro (HPCD), se encontró que la inoculación del primero en forma individual no indujo lesiones neumónicas específicas (pequeñas áreas de atelectasis con poca hiperplasia linfóide peribronquial), en comparación con las encontradas con la inoculación de P. haemolytica (áreas de consolidación rojas grisáceas de 3 cm de diámetro localizadas en los lóbulos apical, accesorio y diafragmático con pleuresia fibrinosa, bronconeumonía purulenta y exudativa, necrosante. La inoculación combinada de ambos agentes no produjo cambios en cuanto a la severidad de las lesiones ya que fueron parecidas a las producidas por P. haemolytica cuando se inoculó en forma individual (Buddle et al., 1984). Por el contrario en otro estudio se encontró un sinergismo entre M. bovis y P. haemolytica cuando se inocularon ambas bacterias por vía intranasal o endotraqueal ya que las lesiones fueron más severas y el porcentaje de lesión neumónica (consolidación gris rojiza) fue mayor (Houghton y Gourlay, 1983).

Existen pocos estudios sobre la influencia de M. hyopneumoniae y

P. multocida en la neumonía crónica del cerdo. Smith et al. (1973b) encontraron que al infectar experimentalmente por vía intranasal o endotraqueal a cerdos gnotobióticos con M. hyopneumoniae o con P. multocida tipo A o la combinación de ambas especies de bacterias, las lesiones mostradas fueron diferentes en cuanto a la extensión y severidad. ya que estas fueron muy similares cuando se inocularon los microorganismos en forma individual (sólo pequeñas áreas neumónicas en los lóbulos apical y cardiaco derechos por los días 12 y 19 posinoculación), mientras que la combinación de ambas bacterias produjo lesiones más graves y severas (áreas neumónicas en los lóbulos apical y cardiaco derecho e izquierdo, así como la parte anteroventral del lóbulo diafragmático derecho y accesorio por el día 19 posinoculación). Estos autores sugirieron que se establezcan investigaciones futuras con bases estadísticas para determinar la posibilidad de que estos 2 organismos actúen en forma aditiva o quizá sinérgica. Morrison et al. (1985), han demostrado que los pulmones neumónicos (colectados en rastro) que presentan tanto M. hyopneumoniae (correlación positiva entre fluorescencia y neumonía $r=0.46$; $p<0.001$) como P. multocida (correlación positiva entre el número de colonias y neumonía, $r=0.60$; $p<0.001$) presentan estadísticamente lesiones de mayor severidad que pulmones con los mismos microorganismos por sí solos. Sin embargo en otro trabajo se ha detectado por aislamiento que M. hyopneumoniae se encuentra en mayor proporción en pulmones con lesiones ligeras neumónicas que aquellos que presentan lesiones severas y concluyen que M. hyopneumoniae no es una especie de marcada actividad patogénica y

que se establece solo en lechones (Gois *et al.*, 1980). Por otro lado se ha estudiado el efecto de *M. hyopneumoniae* sobre el desarrollo de la pleuroneumonía contagiosa producida por *Haemophilus pleuropneumoniae* y se ha encontrado que la infección previa con micoplasma actúa como un factor predisponente que exacerba la pleuroneumonía en los cerdos (Yagihashi *et al.*, 1984). No se ha encontrado en la literatura un estudio sobre la infección secuencial entre *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* en las neumonías del cerdo.

CUADRO 1. ESTUDIOS REALIZADOS SOBRE LA ASOCIACION ENTRE LA PREVALENCIA O EXTENSION DE LA NEUMONIA ENZOOTICA Y LOS INDICES DE CRECIMIENTO.

AUTORES	AÑO	MATERIAL Y MÉTODOS	RESULTADOS
Betts et al	1953	inoculación experimental	GDP* 25 % CA** 25 %
Betts et al	1955	inoculación experimental	GDP 14 % CA 17 %
Shuman et al	1956	1 pira; antes y después	efecto insignificante
Young et al	1959	1 pira; antes y después	GDP
Goodwin et al	1963	1 pira; antes y después	GDP 5 %
Englert et al	1964	inoculación experimental	efecto insignificante
Bjorklund et al	1965	estación de prueba de progenie	efecto insignificante
Eiknieter et al	1965	1 pira	efecto insignificante
Truijen, citado por Plonait(1978)	1967		CA 8.6 %
Huhn	1970	Estación de prueba de progenie	GDP 14 % con neumonia moderada-severa
Shroder et al citado por Plonait (1978)	1981		
Zimmerman et al	1973	inoculación experimental	GDP efecto insignificante
Lindqvist	1974	99 piraas	GDP con neumonia moderada severa
Backstrom et al	1975	1 pira	efecto insignificante
Brandt et al	1975	1 pira antes y después	GDP 5.6 % CA 4.6 %
Jericko et al	1975	estación de prueba de progenie	efecto insignificante
Lundeheim	1979	estación de prueba de progenie	GDP con creciente aumento de neumonia
Muirhead	1979	5 piraas	GDP; CA
Zimmerman et al	1982	inoculación experimental	efecto insignificante
Straw et al	1933	estación de prueba de progenie	GDP con creciente aumento de neumonia
Takov et al	1984	2 piraas	efecto no consistente
Morrison et al	1984	4 piraas	efecto insignificante
Straw et al	1984	estación de prueba de progenie	GDP con extensión

GDP: Ganancia diaria de peso

▲ AUMENTADA

CA: Conversión de alimento

▼ DISMINUIDA

Parámetros de rendimiento antes y después de la introducción de los agentes infecciosos productores de neumonia.

Tomado de (Morrison et al., 1986)

2. OBJETIVOS

2.1.- Desplazamiento del objetivo general.

Los pocos estudios que existen sobre la influencia de Mycoplasma hyopneumoniae y Pasteurella multocida en las neumonías de los cerdos no han sido concluyentes. Entre esos estudios, se había demostrado experimentalmente que ambas especies bacterianas cuando eran inoculadas a cerdos gnotobióticos ya sea en forma individual o combinada las lesiones mostradas eran diferentes en cuanto a extensión y severidad, pero no concluyeron cual especie bacteriana favorece a la otra en el proceso neumónico (Smith et al., 1973b). Por otro lado Gois et al. (1980) habían encontrado que de los pulmones con lesiones neumónicas ligeras, aislaban con mayor frecuencia M. hyopneumoniae que de aquellos con lesiones severas, por lo que consideraron que este micoplasma no era una especie de marcada actividad patogénica y solo se establecía en lechones. También se había demostrado que el virus del cólera porcino vacunal predisponía a los cerdos a quedar colonizados con P. multocida (Pijoan y Ochoa, 1978b). En un estudio realizado en pulmones colectados de rastro se ha encontrado que cuando presentaban tanto M. hyopneumoniae como P. multocida, las lesiones eran de mayor severidad en comparación con aquellos pulmones con los mismos microorganismos aislados individualmente (Morrison et al., 1985), además de que los índices de crecimiento se ven afectados por las neumonías en esta especie animal (Morrison et al., 1986).

Estos estudios no demuestran, por un lado la interacción entre M. hyopneumoniae y P. multocida en forma aditiva o la posible

infección secuencial con estos microorganismos en cerdos convencionales, por lo que se planteó como objetivo principal en esta tesis el estudiar la interacción entre M. hyopneumoniae y P. multocida empleando cerdos convencionales para así simular las condiciones de campo.

2.2.- Objetivos particulares.

Para estudiar si la infección con M. hyopneumoniae aumenta la infectividad y virulencia de P. multocida en esta clase de cerdos, se plantearon una serie de objetivos particulares:

2.2.1.- Estudio de la patogenicidad de estas dos bacterias en base a un diseño experimental de cuatro grupos: Grupo I, testigos; Grupo II, inoculado con M. hyopneumoniae; Grupo III, inoculado con P. multocida y Grupo IV, inoculado primero con M. hyopneumoniae y después con P. multocida. Los cerdos procedieron de madres de quinto parto, debido a que este tipo de cerdas transfieren a sus lechones una buena inmunidad calostrual hacia M. hyopneumoniae, además de que las madres eliminan menos cantidades de este micoplasma por las secreciones nasales.

2.2.2.- Estudio en estos grupos experimentales de:

2.2.2.1.- Evolución de los signos clínicos.

2.2.2.2.- Extensión y severidad de las lesiones pulmonares.

2.2.2.3.- Recuperación a partir de las lesiones, de los microorganismos previamente inoculados.

2.2.2.4.- Índices de crecimiento (ganancia diaria de peso y conversión alimenticia).

2.2.3.- Estudio del posible mecanismo de interacción de M. hyopneumoniae y P. multocida con un experimento "in vitro" de explantes traqueales.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1.- Materiales

3.1.1. Animales. Se utilizaron 19 cerdos machos , raza Yorkshire, destetados a la quinta semana, obtenidos de tres diferentes camadas (7,6 y 6 animales por camada) de madres de quinto parto.

3.1.2. Alimento. Los cerdos fueron alimentados con alimento comercial "Lechoncina" sin antibióticos (Purina de Mexico).

3.1.3. Microorganismos inoculados. Se utilizó la cepa 194 de M. hyopneumoniae en homogeneizado pulmonar, libre de virus (donada por el Dr. Richard Ross, Universidad del Estado de Iowa, EUA) y una cepa de P. multocida tipo D de la colección de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM que fué aislada de un cerdo con neumonia en México, e identificada como tipo D con la prueba de autoaglutinación con acriflavina.

3.1.4. Medios de cultivo para micoplasmas.

3.1.4.1. Medios líquidos para aislamiento.

El medio líquido empleado fué el de Friis (1969), que se preparó a partir de medios basales comerciales: caldo PPLO (Difco) y caldo BHI (Difco). Se esterilizaron en autoclave a 121 C y 15 libras de presión durante 15 minutos y se mantuvieron posteriormente a una temperatura de 45 a 50 C en baño maria. Después se adicionaron en forma aséptica, suero de caballo estéril (colectado en rastro,clarificado mediante la filtración con cartuchos Millipore "Lifegard" CP-15 y esterilizado por filtración con membranas

Millipore de 0.22 μ m), extracto de levadura estéril e inhibidores.

3.1.4.1.1. Medio de HP "hyopneumoniae" modificado por Friis:

Sol. salina balanceada modificada de Hank	152.0 ml
Extracto de levadura	18.0 ml
* agua desionizada	225.0 ml
* Infusión cerebro corazón (BHI, Difco)	2.5 g
* Caldo PPLO (Difco)	2.5 g
* Rojo de fenol (sol.0.2%)	3.5 g
* DNA	0.02 g
Meticilina	75.0 mg
Sulfato de kanamicina	1.0 mg/ml
Suero de caballo inactivado(56 C/15 minutos)	125.0 ml

Se ajustó el pH a 7.4 con una sol. al 7.5% de NaHCO_3 . El medio ya preparado se distribuyó en tubos de 13 X 100 mm con tapón de baquelita a razón de 4.5 ml en cada uno. (*) Se esterilizó en autoclave.

3.1.4.1.2. Sol. salina balanceada modificada de Hank:

(disolver en el orden que se presenta)

Solución "A"

Agua desionizada	400.00 ml
Na Cl	80.0 g
K Cl	4.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1.0 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	1.0 g
Ca Cl_2	1.4 g
Agua desionizada hasta	500.00 ml

Solución "B"

Agua desionizada	400.00 ml
Na ₂ HPO ₄ .12 H ₂ O	1.5 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
Agua desionizada hasta	500.00 ml

Al momento de su uso 25 ml de la sol. "A" se mezclaron con agua desionizada hasta 400 ml, después se agregaron 25 ml de la sol. "B" y se aforó con agua desionizada hasta 500 ml.

3.1.4.1.3. Extracto de levadura (Carter,1975 y Boughton y Thorns,1976). Se suspendieron 50 g de levadura fresca de panadería en 100 ml de KH₂PO₄ 0.2 M. Se calentó a 80-85 C durante 20 minutos, se clarificó mediante la filtración con cartuchos Millipore "Lifegard" CP-15, se ajustó el pH a 7.6 con una sol. 1 N de NaOH. Se esterilizó por filtración (membranas Millipore, 0.22 µm) y se almacenó a -20 C hasta su uso.

3.1.4.2. Medios sólidos

3.1.4.2.1. Medio de Friis:

Infusión cerebro corazón (BHI,Difco)	5.0 g
PLO caldo (Difco)	5.0 g
Rojo de fenol (sol. 0.2%)	7.0 ml
Agar noble (Difco)	9.0 g
DNA	0.02 g
Agua desionizada	450.0 ml

Se ajustó el pH a 7.6 con una sol. 0.1 N de NaOH y se esterilizó en el autoclave manteniendose a 45-50 C en baño maría para

agregarle en forma aseptica los siguientes compuestos:

Sol. salina balanceada mod. de Hank	304.0 ml
Extracto de levadura	36.0 ml
Suero inactivado de caballo	250.0 ml
Meticilina	150.0 mg
Sulfato de kanamicina	1.0 mg/ml

Se mezclaron y se distribuyeron en caja de petri de 100 mm de diámetro.

3.1.4.3. Medios líquidos para caracterización bioquímica

3.1.4.3.1. Medio de Arginina (hidrolisis):

PPLO caldo (Difco)	10.5 g
L-Arginina HCl	5.0 g
Rojo de fenol (sol. 0.2%)	6.3 ml
Agua desionizada hasta	250.0 ml

Se ajustó el pH a 7.0 con una sol. 0.1 N de NaOH y se esterilizó por filtración (membranas Millipore de 0.22 μ m), se le agregó en forma aseptica los siguientes compuestos, previamente esterilizados:

Suero inactivado de caballo	100.0 ml
Extracto de levadura	50.0 ml
Sulfato de kanamicina	1.0 mg/ml

3.1.4.3.2. Medio de Glucosa (fermentación).

Este medio se preparó tomando como base el medio de Friis y sólo se le adicionó glucosa en una proporción de 1 g por 1000 ml de medio líquido.

Tanto el medio de arginina como el medio de glucosa se

distribuyeron en tubos de 13 X 100 mm con tapón de baquelita a razón de 4.5 ml por tubo y se almacenaron a 4 C.

3.1.5. Medios de cultivo para pasteurelas

3.1.5.1. Medios líquido y sólido

Se empleó caldo infusión cerebro corazón, (BHI, Bioxon de Mexico, S.A.) y con agar al 1.5% suplementado con sangre de bovino al 5%.

3.1.5.2. Medios y pruebas de diferenciación bioquímica

Se realizaron en base a los criterios de Cowan y Steel (1974).

3.1.6. Soluciones

Se preparó una serie de soluciones que se emplearon para realizar las pruebas bioquímicas bacteriológicas así como para realizar las pruebas serológicas de inhibición de crecimiento de micoplasmas.

3.1.6.1. Solución para la prueba de dependencia de esteroides.

La sol. de digitonina al 1.5% (Friis, 1975) se esterilizó por filtración (membranas Millipore de 0.22 μ m), se humedecieron discos de papel filtro previamente esterilizados, se secaron a 37 C y se almacenaron a 4 C.

3.1.6.2. Solución de azul de metileno para la prueba de producción de peróxido de hidrógeno (Roberts y Pijoan, 1977).

Se preparó una sol. al 0.1% de azul de metileno en agua destilada, se esterilizó en autoclave y se almacenó a 4 C.

3.1.6.3. Solución modificada de Alsever

Glucosa

20.5 g

NaCl	4.2 g
Nitrato de sodio	8.0 g
ácido cítrico	0.55 g
Agua destilada	1000.0 ml

Se esterilizó por filtración (membranas Millipore de 0.22 μ m) y se almacenó a 4 C.

3.1.6.4. Solución de formalina al 10% en solución salina balanceada.

3.1.6.5. Solución acuosa de acriflavina (Carter y Subronto, 1973).

Se preparó una sol. de acriflavina al 1:1000 con agua destilada y se utilizó inmediatamente.

3.1.7. Cepa de Staphylococcus aureus, que se empleó para determinar el tipo capsular A de P. multocida (Carter y Rundell, 1975).

3.1.8. Antisero de M. hyopneumoniae.

Se empleó un antisuero homólogo de M. hyopneumoniae (donado por el Dr. Richard Ross, Universidad del Estado de Iowa, EUA) diluido 1:20 con una sol. balanceada de fosfatos al 0.01 M a pH 7.2.

3.1.9. Soluciones y equipo empleados en la microscopia electrónica de barrido.

3.1.9.1. Glutaraldehído al 3% en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a pH 7.2. Alcohol etílico a las concentraciones del 15, 30, 50, 70, 95 y 100%. Acetato de amilo (solvente anhidro).

3.1.9.2. Microscopio electrónico de barrido, modelo JSM-25 SII, marca Jeol. Evaporador de iones (Fine Coat, ion sputter),

modelo Smdri-780 A, marca Tousimis Res. Corp. Camara fotografica,
modelo OM-10, marca Olympus.

3.1.10. Explantes traqueales. Las traqueas fueron colectadas en el
rastros de Ferreria de la Ciudad de México, de fetos de
aproximadamente dos meses de edad y fueron transportadas en medio
de RPMI-1640 (Gibco) sin antibióticos.

3.2. Métodos

Experimento I.- Estudio In Vivo con lechones.

3.2.1. Grupos experimentales. Al cumplir 5 semanas de edad, los lechones fueron destetados y con ellos se formaron grupos experimentales de cuatro cerdos cada uno, los cuales se distribuyeron por parejas en áreas separadas, con comederos y bebederos independientes (el peso promedio: 15.9 kg, peso total: 61.6 kg). Antes de iniciar el experimento los animales se mantuvieron una semana en reposo. Los grupos formados fueron los siguientes: GRUPO I, testigo, no infectado (peso promedio: 15.5 kg; peso total: 62.2 kg); GRUPO II, inoculado con M. hyopneumoniae el primer día de experimentación (peso promedio: 16.7 kg; peso total: 67 kg); GRUPO III, inoculado el día 23 con P. multocida (peso promedio: 15.9 kg; peso total 63.6 kg); GRUPO IV, inoculado el primer día con M. hyopneumoniae y el día 23 con P. multocida.

3.2.2. Preparación de inóculos

3.2.2.1. Producción de homogeneizado pulmonar con M. hyopneumoniae. Se inocularon tres lechones con la suspensión de M. hyopneumoniae cepa 194 (con un título de 10^4 UFC/ml), se usaron 20 ml por animal, se administraron por vía endotraqueal con una sonda, para lo cual los cerdos fueron previamente sedados con asaperona (2 mg/kg de peso, vía intramuscular) y anestesiados con clorhidrato de metomidato (1.5 mg/kg de peso, vía intravenosa). Los lechones fueron observados diariamente y se sacrificaron por choque eléctrico y exsanguinación cuando presentaron los signos

clínicos de neumonía (día 19 posinoculación). Los pulmones se obtuvieron asépticamente y de sus áreas neumónicas se preparó un homogeneizado al 10% (p/v) en medio de Friis, con morteros Ten-Broeck (Piffer y Ross, 1984). Con este homogeneizado, se inoculó de la manera antes descrita a los cerdos de los grupos experimentales II y IV. Para titular el homogeneizado se emplearon 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 CO₂ al 10% durante 5 a 7 días; a las colonias sospechosas se les realizaron pruebas de identificación bioquímica y serológica.

3.2.2.2. cepa P. multocida

La cepa de P. multocida tipo D se propagó en medio líquido de infusión cerebro corazón líquido durante 8 horas a 37 C en aereación forzada y la concentración celular de la suspensión se ajustó a 10 bacterias/ml con el mismo medio.

3.2.3. Inoculación con M. hyopneumonias.

Los ocho cerdos de los grupos II y IV se anestesiaron y fueron inoculados con el homogeneizado pulmonar (con un título de 10⁴ UFC/ml), endotraquealmente, como ya se mencionó. El día de la inoculación se designó como el primer día del experimento.

3.2.4. Inoculación con P. multocida.

Cada grupo de cerdos de los grupos III y IV fué inoculado con 22 ml de la suspensión bacteriana (10⁸ células/ml) empleando una cámara de aerosolización modificada para cerdos (López et al., 1976) ajustada para aplicar el inóculo en 30 minutos. La

inoculación con P. multocida fué 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 II y IV.

3.2.5. Temperatura corporal y observación de los signos respiratorios.

Diariamente, a todos los cerdos, se les tomó la temperatura por vía rectal entre las 7 y 8 de la mañana y durante el manejo cotidiano se observaron los signos respiratorios de tos y de disnea en agitación. En la tarde se observó la disnea en reposo, cuando los animales presentaron hipertermia y se observaron los signos respiratorios (día 23), solo al grupo IV se le inoculó P. multocida. El sacrificio de todos los animales se realizó cuando en los cerdos del grupo IV se observaron los signos respiratorios severos.

3.2.6. Evaluación de 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 de ambas vistas y se calculó el porcentaje del área ocupada por las lesiones neumónicas tomando como base el porcentaje del área total del pulmón y se realizó análisis estadístico por la prueba de "t" de Student ($p < 0.05$). También se registró el aspecto de las lesiones neumónicas así como la presencia de adherencias en ellas.

3.2.7. Lesiones microscópicas.

3.2.7.1. Microscopía óptica.- Los fragmentos representativos de

los pulmones afectados (l6bulos craneal y cardiaco derechos) se fijaron en formalina amortiguada al 10%, se incluyeron en parafina para la obtenci6n de cortes de 6 um de espesor y se tinieron con hematoxilina-eosina. Las lesiones microsc6picas se evaluaron de acuerdo al m6todo de Morrison et al. (1985) modificado, este m6todo de evaluaci6n subjetiva consisti6 en la infiltraci6n linfocitaria e infiltraci6n de polimorfonucleares (PMN) en la luz bronquial y dependiendo de su relativa abundancia en cada secci6n se calificaron de 1 a 4 puntos.

3.2.7.2. Microscopía electr6nica.- Se colectaron muestras de un centimetro c6bico de las zonas neum6nicas previamente expandidas y fijadas por perfusi6n alveolar con glutaraldehido al 3%. Las muestras se cortaron en bloques de 1 a 2 mm y se continuaron fijando en la misma soluci6n durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron en PBS y se deshidrataron en etanol al 15, 30, 50, 70, 95 y 100% durante 15 minutos en cada uno de ellos y con acetato de amilo durante 30 minutos. Se desecaron a punto critico con CO₂ y finalmente se recubrieron con una capa de oro de un espesor de 100 Å. Se tomaron fotografias directamente de la pantalla del microscopio electr6nico de barrido empleando pelicula Kadalith y se imprimieron en papel Kodakbromide tipo F-2 (Goldstein et al., 1981).

3.2.8. Cultivo y aislamiento de los microorganismos.

3.2.8.1. Aislamiento de M. hyopneumoniae.

Se hicieron lavados endotraqueales de todos los especimenes

sacrificados, así como homogeneizados de las áreas neumónicas y se cultivaron en medio líquido de Friis haciendo diluciones decimales de 10 hasta 10^5 que se incubaron a 37 C. En los cultivos se registró la acidificación y la turbidez. De los cultivos positivos se hicieron subcultivos en medio sólido de Friis, se incubaron a 37 C en una atmósfera de aire con CO_2 al 10%. Las colonias aisladas de micoplasmas se clonaron tres veces y se subcultivaron en medio líquido y sólido y se sometieron a las pruebas de identificación bioquímica y serológica.

3.2.8.1.1. Prueba de dependencia de esteroides. Los micoplasmas se sembraron en medio sólido de Friis, inmediatamente después se colocaron sobre la superficie de discos impregnados con digitonina y se incubaron a 37 C en una atmósfera de aire con CO_2 al 10% durante 5 a 7 días. Una zona de inhibición indicó sensibilidad hacia la digitonina y presencia de esteroides (Friis, 1975).

3.2.8.1.2. Prueba de hidrólisis de la arginina. Los micoplasmas se sembraron en el medio de arginina líquido y se incubaron a 37 C durante 5 a 7 días, junto con los medios de arginina sin inocular que se usaron como controles de la prueba. Una reacción alcalina (color púrpura) indicó hidrólisis positiva (Boughton y Thorns, 1976 y Rose et al., 1979).

3.2.8.1.3. Prueba de fermentación de la glucosa. Los micoplasmas se sembraron en los medios de Friis líquido con glucosa, se incubaron a 37 C durante 5 a 7 días, así mismo de los medios sin inocular que se usaron como controles. Una acidificación (color

amarillo-anaranjado) indicó una reacción positiva (Piffer y Ross, 1984).

3.2.8.1.4. Prueba de producción de peróxido de hidrógeno. De los micoplasmas que se desarrollaron en el medio sólido de Friis, se cortaron pequeños trozos de agar (1 cm²) con colonias y se colocaron sobre portaobjetos. Por otro lado se prepararon eritrocitos (tipo "0" de humano) que se lavaron tres veces con sol. salina amortiguada, después de lo cual se ajustaron al 0.5%. Estos eritrocitos se mezclaron con un volumen igual de azul de metileno diluido 1/10 con sol. salina amortiguada, de esta mezcla se agregaron dos gotas sobre el agar con colonias y al cabo de varios minutos se observaron al microscopio. Una reacción positiva se manifestó al teñirse los eritrocitos que rodearon a las colonias de micoplasmas (Roberts y Pijoan, 1977).

3.2.8.2. Aislamiento de P. multocida.

3.2.8.2.1. Aislamiento e identificación.- De las lesiones neumónicas se tomaron asepticamente trozos de aproximadamente 1 cm³ que se homogeneizaron en un triturador de tejidos Ten-Broeck. Se incubaron sobre placas de gelosa sangre (sangre de bovino al 5%) y se incubaron a 37 C durante 24 a 48 horas. A las colonias purificadas se les hicieron pruebas de identificación bioquímica, de acuerdo a los criterios de Cowan y Steel (1974).

3.2.8.2.2. Tipificación capsular.- Para determinar el tipo capsular D de las pasteurellas aisladas, las bacterias se sembraron en caldo infusión cerebro corazón durante 12 horas, se lavaron con PBS, 1 ml. de la suspensión bacteriana se le adicionó

1 ml. de acriflavina al 1:1000. La lectura se realizó a los 3 minutos y una reacción positiva fué la observación de una autoaglutinación (Carter y Subronto, 1973). Para determinar el tipo capsular A, las pasteurellas se sembraron en estria continua sobre placas de gelosa sangre y después se colocó una estria de Staphylococcus aureus sobre el mismo. Las placas se incubaron a 37 C durante 24 hrs. y una reacción positiva fué la observación de colonias de menor tamaño y descapsuladas cerca de la estria de las colonias de Staphylococcus aureus (Carter y Rundell, 1975).

3.2.9. Crecimiento de los cerdos.

Los lechones se introdujeron en los corrales de experimentación desde una semana antes de iniciar el experimento. 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/día y entre 28 y 38 kg de peso, se les suministró 2 kg/di. Se midió la ganancia diaria de peso (GDP) de cada cerdo y se calculó la conversión alimenticia (CA) de cada grupo dividiendo el peso del alimento consumido entre el peso ganado. Los resultados de cada grupo se compararon mediante el análisis de varianza (ANOVA).

3.2.10. Experimento II: Estudio "in vitro" con Explantes Traqueales.

3.2.10.1. Preparación de los anillos traqueales. Las traqueas se obtuvieron del rastro de Ferrería del D.F. (IDA) a partir de fetos de 2 a 3 semanas de edad y en el laboratorio se cortaron en

fragmentos de 3 a 4 anillos traqueales y se lavaron con PBS empleando para ello grandes volúmenes (500 ml). Se incubaron a 37 C durante 24 horas en medio de RPMI-1640 sin antibióticos y con suero fetal bovino al 5%. La viabilidad de los anillos traqueales se confirmó mediante la observación del movimiento ciliar con un microscopio estereoscópico.

3.2.10.2. Formación de los grupos experimentales. Se formaron cuatro grupos experimentales de cuatro replicas con cuatro anillos traqueales en cada una de ellas. GRUPO I, testigo, no inoculado, solo se adicionó medio de cultivo. GRUPO II, inoculado con M. hyopneumoniae el primer día. GRUPO III, inoculado el día 5 con P. multocida y GRUPO IV, inoculado el primer día con M. hyopneumoniae y el día 5 con P. multocida. Todas las replicas se incubaron a 37 C.

3.2.10.3. Inoculación con M. hyopneumoniae. Los grupos II y IV se inocularon con un cultivo de 4 días de M. hyopneumoniae en medio de Friis sin antibióticos después de las 24 horas de preincubación. El día de la inoculación se designó como el primer día del experimento.

3.2.10.4. Inoculación con P. multocida y realización de cuentas viables. Los grupos III y IV se inocularon con 2×10^7 bacterias / ml el día 5, se incubaron a 37 C y se realizaron cuentas viables a las 4, 8, 12 y 24 horas por el método de Miles y Misra (1938).

4. RESULTADOS

Experimento: I

4.1. Evolución de los signos clínicos.

4.1.1. **Temperatura.** Los cerdos de los grupos I (testigo) y III (inoculado con P. multocida) tuvieron temperaturas normales, cuyos promedios (+-DE) fueron 38.5 ± 0.3 C (Fig. 1 A) y 38.6 ± 0.2 C (Fig. 1 B) respectivamente, durante los 36 días del experimento. Por el contrario, los cerdos del grupo II (inoculados el primer día con M. hyopneumoniae) tuvieron hipertermia que se inició el día 19, fué máxima (39.6 C) el día 26 y se mantuvo en niveles ligeramente mayores que el normal hasta el fin del experimento (Fig. 1 A). El grupo IV (inoculado el primer día con M. hyopneumoniae y el día 23 con P. multocida) tuvo un primer pico de hipertermia, la cual se inició el día 19 llegando a un máximo (39.3 C) el día 24 y un segundo pico de hipertermia (39.2 C) el día 28; la temperatura de este grupo se mantuvo en niveles ligeramente mayores que el normal hasta la fecha del sacrificio (Fig. 1 B).

4.1.2. **Signos respiratorios.** Los cerdos de los grupos I y III mostraron signos respiratorios normales. En cambio los cerdos de los grupos II y IV que fueron inoculados con M. hyopneumoniae el primer día, tuvieron tos no productiva, cuya intensidad varió de leve hasta severa y disnea de esfuerzo y de reposo. La evolución de la tos y de la disnea en los grupos II y IV se muestra en la Fig. 2 y se describe a continuación:

4.1.2.1. **Tos.** En el grupo II se inició con caracter leve el día

18; el día 22 aumento a moderada en tres de los cuatro cerdos; a partir del día 23 todos los cerdos del grupo II tuvieron tos moderada, que duró cinco días mas y del día 28 en adelante, su severidad disminuyó paulatinamente de manera que el día 30 era leve en todos los cerdos y se mantuvo así hasta el día del sacrificio (Fig. 2 A). En contraste con el grupo II, todos los cerdos del grupo IV (inoculados el día 23 con P. multocida) tuvieron tos moderada a partir del día 23, la que se mantuvo sin cambio durante 7 días y a partir del día 30 aumentó a severa hasta el final del, experimento (Fig. 2 B).

4.1.2.2. Disnea. En los grupos II y IV la disnea se inicio el día 18 en tres de los cuatro cerdos y los afectó a todos el día 22; a partir de entonces en el grupo II predominó la disnea de esfuerzo (tres cerdos) sobre la disnea de reposo (un cerdo) hasta el final del experimento, excepto los días 28 y 31 en los que dos cerdos tuvieron disnea de reposo y los restantes disnea de esfuerzo (Fig. 2 C). Por otra parte, en los cerdos del grupo IV la disnea de reposo predominó sobre la disnea de esfuerzo desde el día 18 y ocurrió en todos los cerdos desde el día 26 hasta el sacrificio (Fig. 2 D).

4.2. Lesiones macroscópicas.

En el grupo I no hubo lesiones pulmonares macroscópicas, excepto en el lobulo 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 (Fig. 3 A). Se encontraron

lesiones en los pulmones de todos los animales del grupo II; las áreas consolidadas abarcaron del 4 al 17% de la superficie pulmonar y eran gris rojizas con adherencias (Fig. 3 B). En los pulmones del grupo III no se observaron lesiones macroscópicas (Fig. 3 C). Todos los animales del grupo IV 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 (Fig. 3 D). La distribución y aspecto de las lesiones macroscópicas de los cuatro grupos se resumen en el cuadro 2. Los promedios de la superficie que abarco el área pulmonar consolidada de cada grupo fueron: grupo I, 0.8%; grupo II, 12.1%; grupo III, 0% y grupo IV, 23.8%. En el cuadro 3 y en la figura 4 se muestran los resultados de la prueba de "t" de Student practicado en los grupos II y IV, se observa que las diferencias respecto a las lesiones fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

4.3. Lesiones microscópicas.

4.3.1. Estudio de microscopia óptica. En los cortes histológicos de los pulmones de los grupos I (ver Fig. 5 A y B) y III (ver Fig. 5 C y D) no se observaron cambios patológicos, excepto en la lesión de la que se aisló M. hyorhinis. En esta se encontraron abundantes leucocitos polimorfonucleares (PMN) en los alveolos y en las 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 II (ver Fig. 5 E y F) 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 IV (ver Fig. 5 G y H) 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. En la Fig. 6 se observan las principales lesiones microscópicas encontradas en los cuatro grupos experimentales. La evaluación subjetiva basada en la acumulación de puntos dependiendo del grado de lesión se resumen en el cuadro 4.

4.3.2. Estudio de microscopia electrónica. La microscopia electrónica de barrido reveló que los pulmones testigo (grupo I) y los que fueron inoculados con P. multocida solamente (grupo III) no mostraron cambios patológicos (ver Fig. 7 A: 70X), a pesar de que a mayores aumentos se observaron bacterias en el epitelio ciliar (ver Fig. 7 B: 3000X). En cambio, los pulmones de los cerdos inoculados con M. hyopneumoniae (grupo II) tuvieron consolidación pulmonar evidente a menores aumentos (ver Fig. 7 C: 70X), a mayores aumentos (ver Fig. 7 D: 3000X) 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 (grupo IV) mostraban esencialmente los mismos cambios que se encontraron en el grupo II, con la adición de que los epitelios ciliados mostraron zonas carentes de cilios y micoplasmas evidentes en ellos formando acúmulos, así como de

abundantes bacterias (ver Figs. 7 E: 70X y 7 F: 3000X).

4.4. Microorganismos aislados de las lesiones.

En el grupo I aunque no fué posible aislar los microorganismos inoculados en los demás grupos, del lobulo cardiaco derecho de un animal se aisló M. hyorhinis. De los pulmones del grupo III no se aisló la P. multocida que habia sido inoculada el día 23. Se aisló M. hyopneumoniae de todos los animales del grupo II cuando se emplearon lavados endotraqueales, mientras que de los homogeneizados pulmonares se pudo aislar en tres animales; de ninguno de los animales de este grupo se aisló P. multocida. De todos los animales del grupo IV se aisló M. hyopneumoniae cuando se utilizaron lavados endotraqueales, mientras que de los homogeneizados pulmonares solo se aisló en 3 animales (el aislamiento de M. hyopneumoniae fué a la dilución 10^{-2} en 6/8 pulmones y de 10^{-3} en 2/8 cuando se utilizaron lavados endotraqueales y a la dilución 10^{-2} cuando se utilizaron homogeizados pulmonares). Solo en tres pulmones del grupo IV se logro recuperar P. multocida (a la dilución de 10^{-1}). El aislamiento de M. hyorhinis se hizo de un animal del grupo II y de otro del grupo IV.

4.5. Aumento de peso y conversión alimenticia.

Los cerdos de los grupos I y III tuvieron una ganancia diaria de peso (GDP) de 0.355 ± 0.072 kg y de 0.360 ± 0.072 respectivamente y la conversión alimenticia (CA) fué de 2.68 ± 0.62 kg de alimento para el grupo I y de 2.42 ± 0.62 kg para el grupo III. Los cerdos del grupo II tuvieron una GDP parecida a los grupos anteriores

(0.344 ± 0.072 kg) pero su CA fué de 3.55 ± 0.62 kg. El grupo IV tuvo la más baja GDP (0.293 ± 0.072 kg) y la más alta CA (4.25 ± 0.44). En el cuadro 5 así como en la figura 8 se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) en la que se tomó como variable de respuesta la ganancia diaria de peso (GDP) y en el cuadro 6 y figura 9 los resultados de la conversión alimenticia (CA).

Experimento: II.

4.6. Cuentas viables de P. multocida cultivada en presencia de explantes traqueales con o sin inculó de M. hyopneumonias

Las replicas de los grupos I y II que no fueron inoculadas con P. multocida solo sirvieron como controles. Las cuentas viables encontradas en los grupos III y IV fueron muy similares, así el promedio de los resultados encontrados de bacterias por ml en el grupo III fué el siguiente: a las 4 hrs: 41.5×10^7 , (Log :8.62); a las 8 hrs: 80.3×10^8 , (Log :9.96); a las 12 hrs: 21.8×10^9 , (Log :10.34) y a las 24 hrs: 33.7×10^5 , (Log :6.52), mientras que las encontradas en el grupo IV fueron: a las 4 hrs: 39.5×10^7 (Log :8.56); a las 8 hrs: 79×10^8 , (Log :9.86); a las 12 hrs: 16.8×10^9 , (Log :10.23) y a las 24 hrs: 16.7×10^5 , (Log :6.22).

FIGURA 1. MEDIAS DE TEMPERATURA DE LOS CUATRO GRUPOS.

En la figura 1 A se observa en el grupo II un pico de hipertermia máxima el día 26 (●—●). En la figura 1 B se observa en el grupo IV dos picos de hipertermia, el primero con una máxima el día 24 y el segundo el día 28 (▲—▲). Los cerdos del grupo I (○—○) y los del grupo II (△—△) mostraron temperaturas normales.

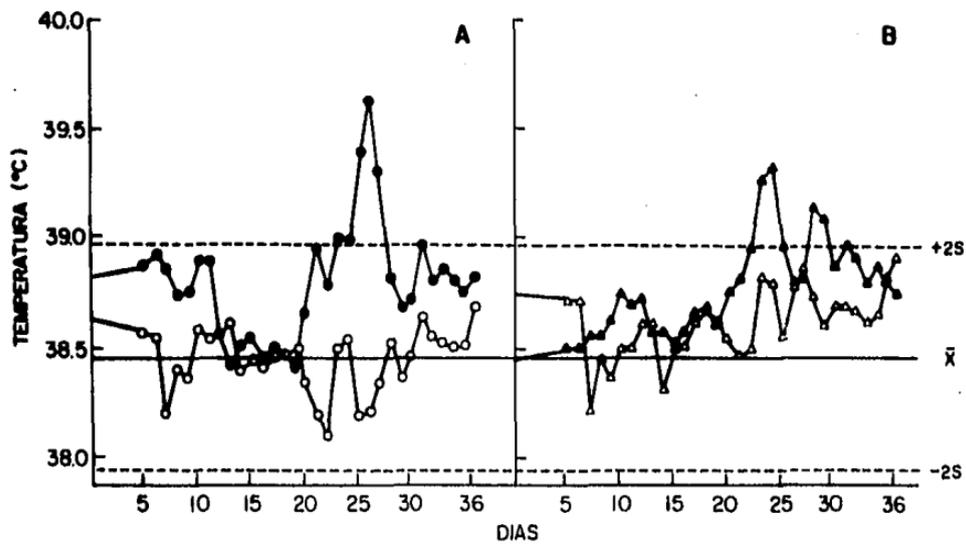


Fig. 1

FIGURA 2. SIGNOS RESPIRATORIOS: TOS Y DISNEA.

Las figuras 2 A y 2 C muestran los signos respiratorios de los cerdos del grupo II, que fueron inoculados con Mycoplasma hyopneumoniae  y en las figuras 2 B y 2 D de los cerdos del grupo IV que fueron inoculados con Mycoplasma hyopneumoniae  y Pasteurella multocida. 

TOS LEVE:  TOS MODERADA:  TOS SEVERA: 
DISNEA DE ESFUERZO:  DISNEA EN REPOSO: 

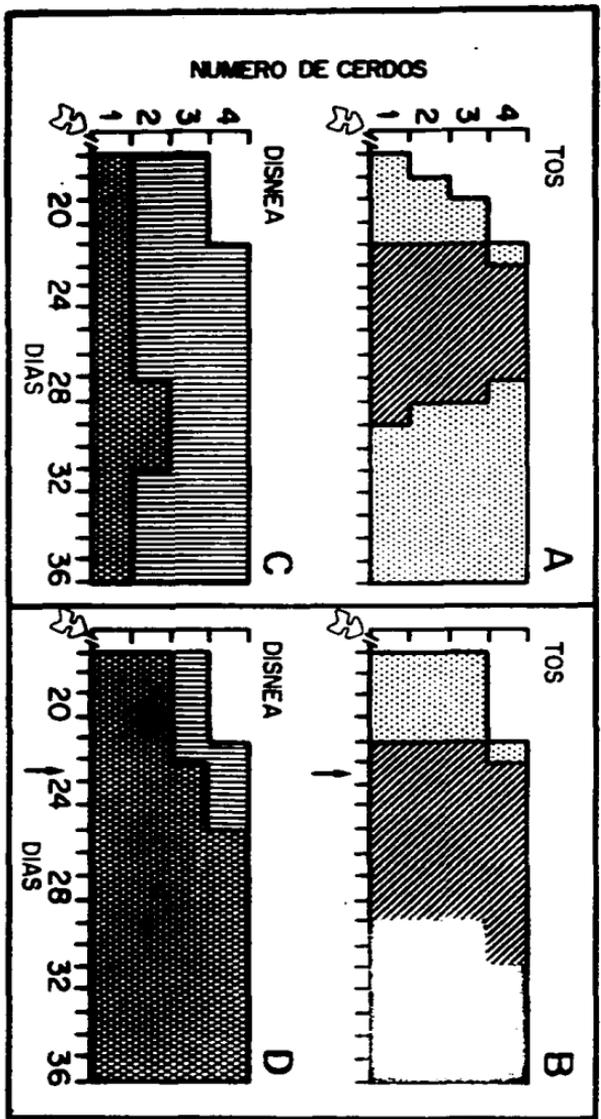


Fig. 2

CUADRO 2.- DISTRIBUCION Y ASPECTO DE LAS LESIONES MACROSCOPICAS EN LOS PULMONES. *

GRUPOS EXPERIMENTALES				
	I	II	III	IV
LOBULOS AFECTADOS				
APICAL: Derecho	0	4	0	4
Izquierdo	0	4	0	4
CARDIACO: Derecho	1**	4	0	4
Izquierdo	0	4	0	4
DIAFRAGMATICO:***				
Derecho	0	3	0	3
Izquierdo	0	2	0	3
ACCESORIO	0	3	0	3
ASPECTO DE LAS LESIONES				
ROJIZA	1	1	0	2
GRIS-ROJIZA	0	3	0	2
ADHERENCIAS	1	3	0	2

* Los datos indican el numero de animales afectados en cada grupo.

** Se aisló Mycoplasma hyorhinis de esta lesión.

*** Sólo en las areas cefálicas.

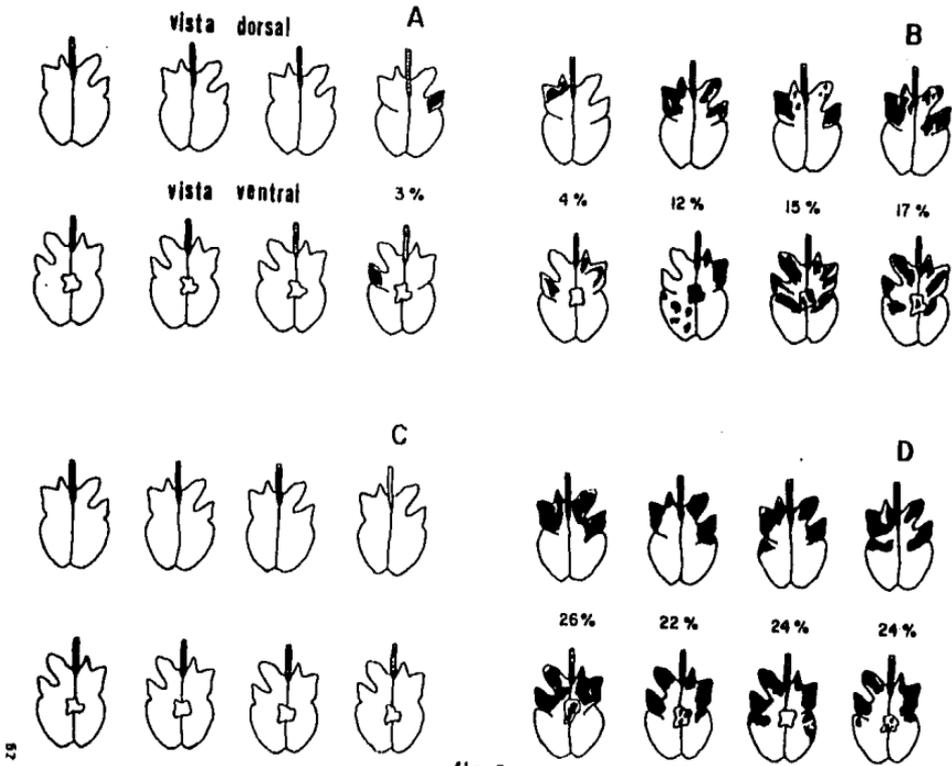


fig. 3

CUADRO 3. RESULTADO DE LA PRUEBA DE T DE STUDENT DEL GRADO DE LESION NEUMONICA EN LOS GRUPOS II Y IV.

GRUPO	% de lesión neumónica	X	EE
II	4.3	12.1	2.926
	12.0		
	15.2		
	16.9		
IV	21.6	23.8	2.926
	23.6		
	24.0		
	25.9		
Diferencias de Medias: -11.73		t: 4.006	
Desviación estandard de diferencias: 4.1389913			
(P < 0.05)			

FIGURA 4. PORCIENTO DE LESION NEUMONICA DE LOS GRUPOS II Y IV.

En la figura 4 se muestra el resultado de la prueba de "t" Student ($p < 0.05$) realizado al grupo II (X de 12.1 y EE de 2.9): 
y al grupo IV (X de 23.8 y EE de 2.9): 

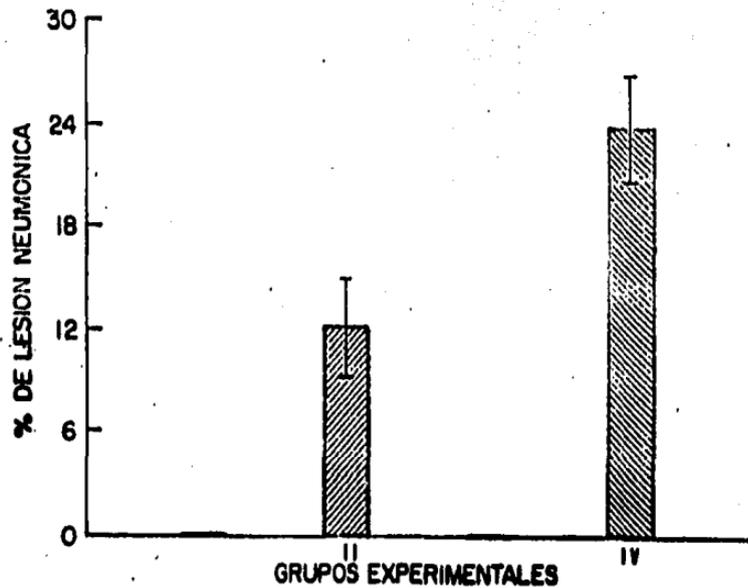


fig 4

CUADRO 4. ESTUDIO DE LAS LESIONES MICROSCOPICAS.

GRUPOS EXPERIMENTALES	INFILTRACION LINFOCITARIA (1 a 4)*	INFILTRACION DE PMN EN LA LUZ BRONQUIAL (1 a 4)*	TOTAL DE PUNTOS ACUMULADOS
GRUPO I	1	0	
	2	0	9
	3	2	
	4**	3	4
GRUPO II	5	3	
	6	3	17
	7	3	
	8	2	2
GRUPO III	9	2	
	10	2	0
	11	0	0
	12	0	0
GRUPO IV	13	3	
	14	3	4
	15	3	3
	16	3	3

* Posibles puntos a acumular dependiendo del grado de lesión.

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

PMN = Polimorfonucleares.

FIGURA 5. HISTOPATOLOGIA DE LOS PULMONES DEL GRUPO I.

En las figuras 5 A (160 X) y 5 B (160 X) no se observaron cambios patológicos. a) Tejido linfoide asociado a bronquios. b) Bronquio de aspecto normal. c) Paredes alveolares sin cambios.

Fig. 5A



Fig. 5B

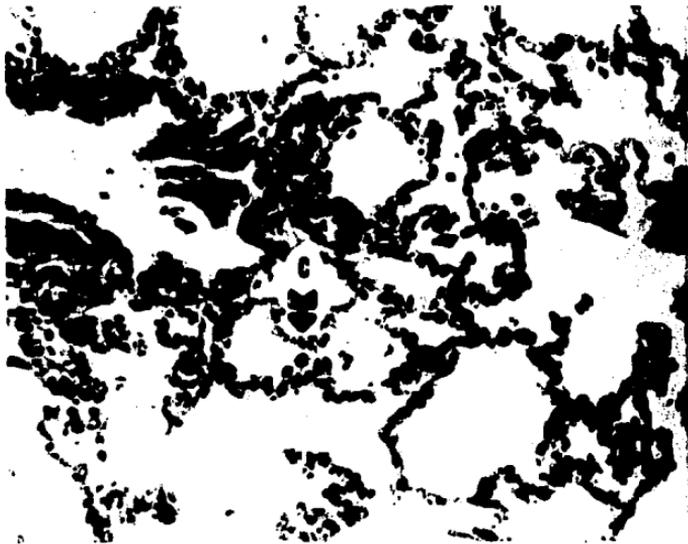


FIGURA 5. HISTOPATOLOGIA DE LOS PULMONES DEL GRUPO III.

En las figuras 5 C (32 X) y 5 D (160 X) no se observaron cambios patológicos. a) Alveolos de aspecto normal. b) Tejido linfoide asociado a bronquios. c) Paredes alveolares sin cambios. d) Bronquio de aspecto normal.

Fig. 5C

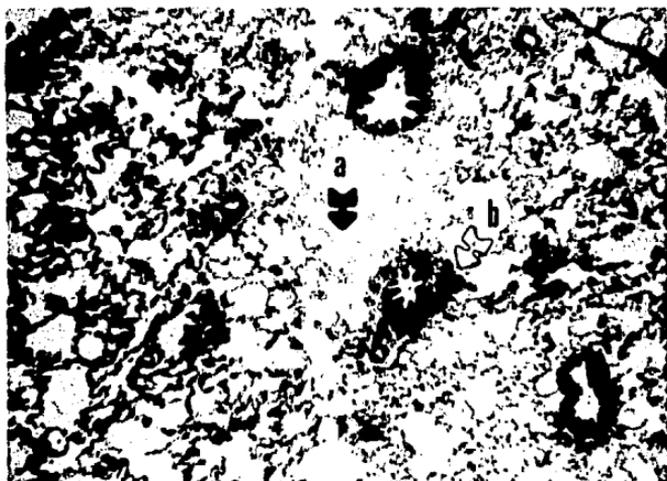


Fig. 5D



FIGURA 5. HISTOPATOLOGIA DE LOS PULMONES DEL GRUPO II.

En las figuras 5 E (32 X) y 5 F (160 X) se observan áreas colapsadas congestionadas (a), engrosamiento de los septos alveolares (b), infiltración linfocitaria peribronquial (c) y algunos macrófagos en la luz bronquial (d).

Fig. 5E



Fig. 5F



FIGURA 5. HISTOPATOLOGIA DE LOS PULMONES DEL GRUPO IV.

En las figuras 5 G (32 X) y 5 H (160 X) se encontró engrosamiento de los septos (a), congestión y hemorragia alveolar (b), abundantes PMN en los alveolos y luz bronquial (c), proliferación de macrófagos alveolares (d) e infiltración linfocitaria peribronquial (e).

Fig. 5G



Fig. 5H

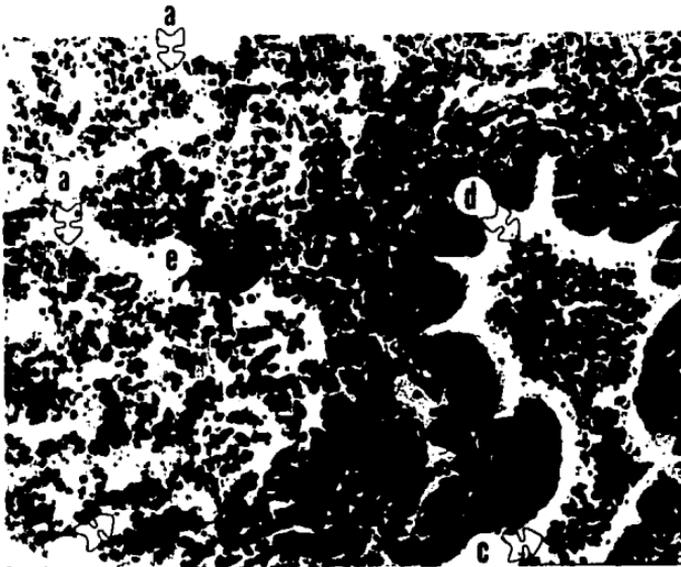


FIGURA 6. HISTOPATOLOGIA DE LOS PULMONES DE LOS CUATRO GRUPOS.

En la figura 6 A,B,C y D se observan las principales lesiones encontradas en los cuatro grupos experimentales.

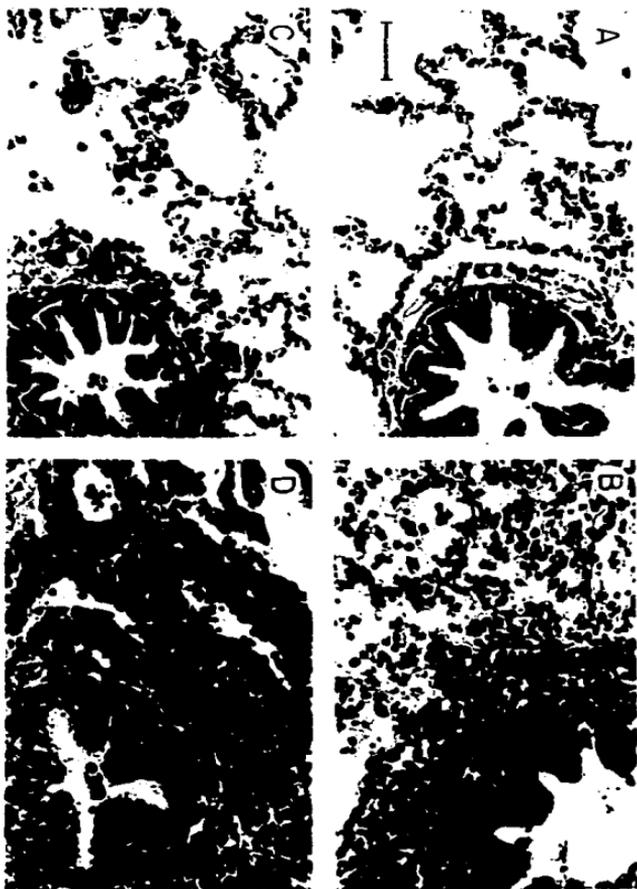


fig. 6

**FIG.7. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LOS
PULMONES DEL GRUPO I Y III.**

En la figura 7 A (70 X) se observan las estructuras de alveolos normales (a) encontradas en los pulmones de los cerdos del grupo I y III. En la figura 7 B (3000 X) se muestran los cilios normales con bacterias adheridas en su superficie (b) en los pulmones de ambos grupos.

Fig. 7A

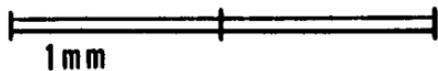
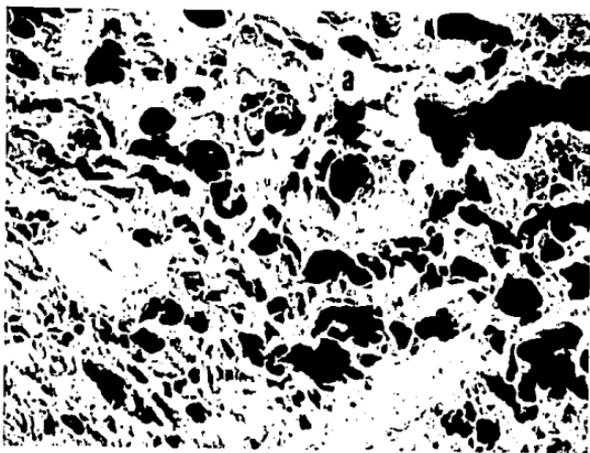
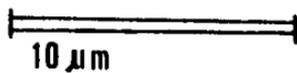
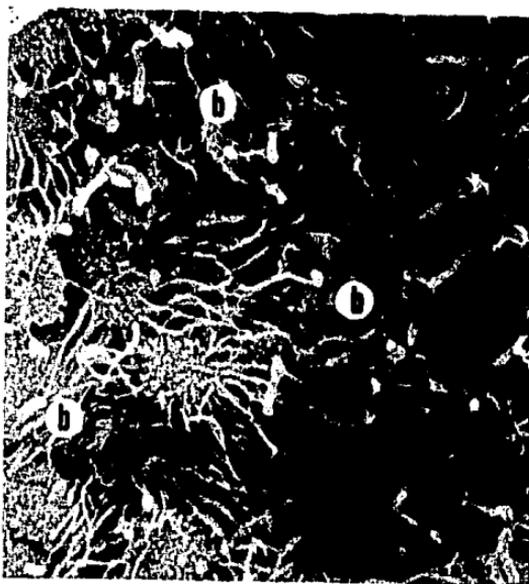


Fig. 7B



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

FIG. 7. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LOS
PULMONES DEL GRUPO II.

En la figura 7 C (70 X) se observan áreas de consolidación pulmonar (a), septos alveolares engrosados (b) e infiltración celular peribronquial (c). En la figura 7 D (3000 X) se observan abundantes bacterias y moco adheridas al epitelio ciliar (d) y a células fagociticas (e).

Fig. 7C

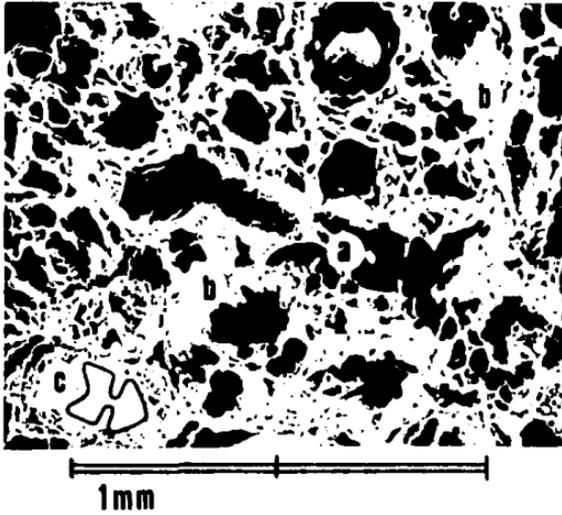
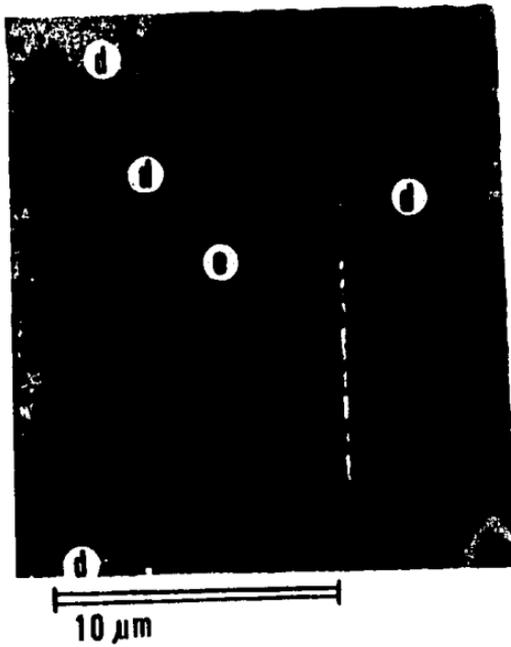


Fig. 7D



**FIG. 7. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DE LOS
PULMONES DEL GRUPO IV.**

En la figura 7 E (70 X) se observan zonas de consolidación evidente (a). La figura 7 F (3000X) se observa que las células epiteliales ciliadas se encuentran adheridas entre ellas por los micoplasmas formando acúmulos (b), así también se observan zonas carentes de cilios (c).

Fig. 7E

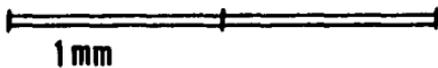
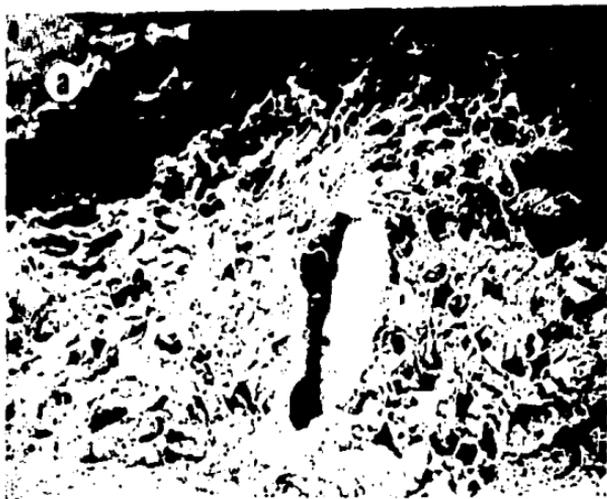
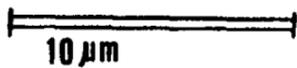


Fig. 7F



CUADRO 5. RESULTADO DEL ANALISIS DE VARIANZA EN GDP.

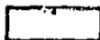
GRUPO		X	EE	
I		0.355	0.072	
II		0.344	0.072	
III		0.360	0.072	
IV		0.293	0.072	

F.V.	gl	SC	CM	FC
TRAT.	3	0.0109	0.00363	0.1745
ERROR	12	0.2497	0.02081	
TOTAL	15	0.2606		

FIGURA 8. GANANCIA DIARIA DE PESO DE LOS CUATRO GRUPOS EXPERIMENTALES.

En la figura 8 se muestra el resultado del analisis de varianza (ANOVA), tomando como variable de respuesta la GDP.

Grupo I (\bar{X} de 0.355 y EE de 0.072):



Grupo II (\bar{X} de 0.344 y EE de 0.072):



Grupo III (\bar{X} de 0.360 y EE de 0.072):



Grupo IV (\bar{X} de 0.293 y EE de 0.072):



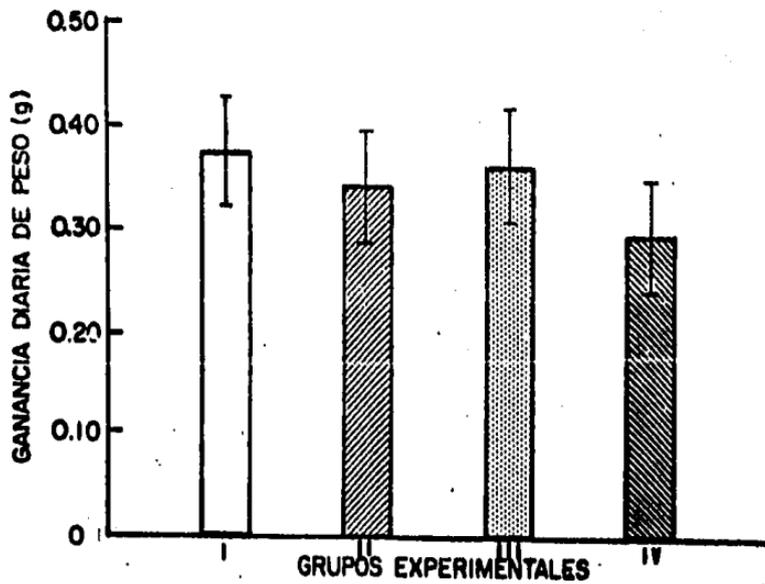


fig 8

CUADRO 6. RESULTADO DEL ANALISIS DE VARIANZA EN CA.

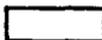
GRUPO		X	EE	
I		2.68	0.62	
II		3.55	0.62	
III		2.42	0.62	
IV		4.25	0.44	

F.V.	gl	SC	CM	FC
TRAT.	3	4.9417	1.6472	1.9290
ERROR	6	5.1234	0.8539	
TOTAL	9	10.0651		

FIGURA 9. CONVERSION ALIMENTICIA DE LOS CUATRO GRUPOS EXPERIMENTALES.

En la figura 9 se muestra el resultado del analisis de varianza (ANOVA) tomando como variable de respuesta la CA.

Grupo I (X de 2.68 y EE de 0.62):



Grupo II (X de 3.55 y EE de 0.62):



Grupo III (X de 2.42 y EE de 0.62):



Grupo IV (X de 4.25 y EE de 0.44):



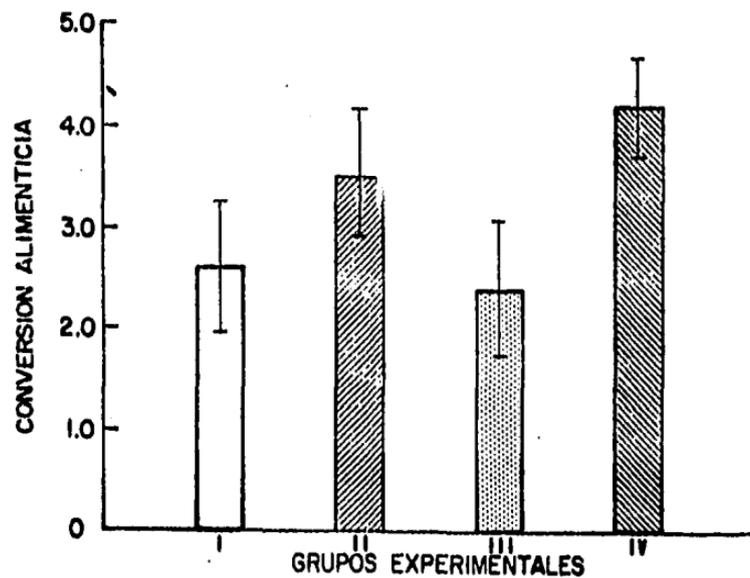


fig. 9

5. DISCUSION

Smith et al. (1973b) demostraron que los cerdos gnotobióticos infectados experimentalmente con M. hyopneumoniae desarrollan lesiones neumónicas más severas cuando el inóculo se combina con P. multocida. Utilizando muestras colectadas en rastros, Morrison et al. (1985) demostraron que los pulmones de cerdos que dan reacción positiva a M. hyopneumoniae por inmunofluorescencia, y de los cuales también se aísla P. multocida, tienen lesiones neumónicas más extensas que aquellos en los cuales se identifica solamente uno de estos dos agentes. Sin embargo, aunque muestra la presencia de ambos agentes en casos severos, el segundo trabajo no prueba claramente la sinergia patogénica que pudiera haber entre M. hyopneumoniae y P. multocida. que el presente trabajo sí parece demostrar, en cerdos convencionales.

La temperatura corporal y los signos respiratorios de los cerdos en el grupo testigo y en el inoculado solamente con P. multocida fueron normales. M. hyopneumoniae provocó hipertermia los días 19 a 26 después de la inoculación (Fig. 1A), como habían encontrado previamente Livingston et al. (1972). Por esta observación se decidió inocular con P. multocida 23 días después de M. hyopneumoniae, al grupo de cerdos que fueron expuestos a ambos agentes.

En los cerdos infectados primero con M. hyopneumoniae y luego con P. multocida, la hipertermia fué mayor y más

prolongada (Fig. 1B) que la causada por M. hyopneumoniae solo (Fig. 1A). Datos similares fueron observados previamente por Smith et al. (1973b) en cerdos gnotobióticos inoculados simultáneamente con M. hyopneumoniae y P. multocida.

Los cerdos inoculados solamente con M. hyopneumoniae presentaron dificultad respiratoria ligera y tendieron a la recuperación (Fig. 2A y 2C), como ocurrió a los cerdos tratados en forma similar por Whittlestone (1979). Sin embargo, los cerdos inoculados con ambos agentes tuvieron tos y disnea de mayor severidad y la tendencia de estos signos fué al agravamiento (Fig. 2B y 2D), como ocurre en las bronconeumonías severas causadas por agentes infecciosos secundarios (Morrison et al., 1985 y Pijoan y Trigo, 1986).

Los cerdos del grupo testigo y los inoculados solamente con P. multocida no tuvieron lesiones pulmonares macroscópicas, excepto un animal del grupo testigo, en el que se encontró una pequeña área neumónica que abarcó el 3% de la superficie pulmonar y de la cual se aisló M. hyorhinis. Es común encontrar a este micoplasma en el aparato respiratorio anterior de los cerdos, sin embargo actualmente se relaciona raramente con procesos neumónicos en lechones o con poliartrosis. A pesar de esto los lechones muy jóvenes (neonatos) son más susceptibles que los destetados a las micoplasmosis pulmonares en cuyas lesiones no sólo M. hyopneumoniae esta involucrado sino también M. hyorhinis y M. flocculare (Pijoan, 1986).

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 la superficie pulmonar (Fig. 3B). En el grupo de animales inoculados con ambos agentes las áreas de consolidación variaron del 22 al 26% (Fig. 3D); con el método de evaluación de Goodwin (1971) estas lesiones habrían acumulado el máximo puntaje de severidad (55 puntos), y con el de Burch (1982) se hubiesen clasificado como severas.

En el cerdo del grupo testigo que resultó infectado naturalmente con M. hyorhinis, las lesiones pulmonares fueron proliferativas, como las causadas por agentes infecciosos primarios (Whittlestone 1972; Underdahl et al., 1980). La inoculación con P. multocida al grupo III no provocó lesiones microscópicas; estos resultados no concuerdan con los de Smith et al. (1973b), quienes sí observaron lesiones al inocular sólo P. multocida tipo A. Esta diferencia podría deberse a que el tipo capsular A es más patógeno que el tipo D usado en este trabajo, o a que los cerdos gnotobióticos son más susceptibles a la infección que los cerdos convencionales empleados por nosotros. Por otro lado, Lara et al. (1985) han determinado que los cerdos sanos convencionales remueven fácilmente la P. multocida tipo D cuando se utiliza un sistema de aerosolización.

En el grupo II la inoculación con M. hyopneumoniae también produjo lesiones proliferativas (Fig. 6 B). Sin embargo, las lesiones microscópicas de los cerdos inoculados secuencialmente con ambos agentes infecciosos fueron de tipo exudativo (Fig. 6 D), como las comúnmente producidas en

infecciones secundarias (Morrison et al., 1985), la evaluación subjetiva de estos autores reveló una mayor acumulación de puntos cuando los dos agentes están involucrados en la neumonía (ver cuadro 4). Los hallazgos de la microscopía electrónica de barrido encontrados en el grupo inoculado solo con M. hyopneumoniae son similares a los descritos por Underdahl et al. (1980) en cerdos gnotobióticos y no fué sorprendente encontrar bacterias en las vías respiratorias ya que se trataron de cerdos convencionales (Fig. 7 B). La mayor intensidad de las lesiones en los cerdos del grupo IV se explica por la inoculación con el micoplasma patógeno que interactúa con la P. multocida en el proceso neumónico debido probablemente a la pérdida de los cilios o la formación de acúmulos ciliares que impide la eficiencia de la remoción pulmonar (Fig. 7 D).

En los animales del grupo testigo no se aisló ninguno de los dos agentes infecciosos que fueron inoculados en los grupos experimentales. En los pulmones del grupo inoculado solamente con P. multocida éste agente tampoco se recuperó en ningún caso. En cambio, sí se aisló M. hyopneumoniae de las lesiones neumónicas de los cerdos que habían sido inoculados sólo con este agente. Este hallazgo concuerda con que M. hyopneumoniae generalmente se aísla de casos activos de neumonías inducidas experimentalmente (Goodwin, 1972 y Etheridge et al., 1979), debido a que persiste por largos periodos en el pulmón (Livingston et al., 1972; Whittlestone, 1979 y Underdahl et al., 1980).

En tres de los cerdos inoculados con ambos agentes si se aisló P. multocida a los 13 días después de su inoculación cuando terminó el experimento con el sacrificio de los cerdos. Es decir, los animales cuyos pulmones habían sido infectados previamente con M. hyopneumoniae fueron incapaces de eliminar P. multocida, a diferencia de los cerdos inoculados solamente con P. multocida, que si eliminaron a este agente infeccioso. Para que P. multocida se establezca en el pulmón parece por lo tanto necesario que ocurra un evento inmunosupresor, provocado por la infección previa de un agente primario, entre los que se incluye a M. hyopneumoniae (Goodwin et al., 1967 y Hodges et al., 1969). Este fenómeno de interacción sinérgica se ha observado también con el virus vacunal del cólera porcino, que permite la colonización e invasión de las vías respiratorias por P. multocida (Pijoan y Ochoa, 1978b).

El grupo testigo tuvo un índice de crecimiento normal y la inoculación con P. multocida tampoco afectó el crecimiento ni la conversión alimenticia de los lechones. Por otra parte, aunque la inoculación con M. hyopneumoniae no modificó la ganancia diaria de peso, los cerdos de este grupo consumieron 32% más alimento que los del grupo testigo. La infección secuencial con ambos agentes infecciosos provocó que los lechones consumieran 59% mayor cantidad de alimento que los cerdos del grupo testigo, aunque su ganancia diaria de peso fué normal. Pointon et al. (1935) encontró que la infección con M. hyopneumoniae solo y en condiciones parecidas a las que operan en las granjas comerciales, se redujó la GDP en un

16% (en cerdos con un peso entre 8 a 85 kg) mientras que la CA fué en un 14% (en cerdos con un peso entre 10 y 25 kg), en este trabajo se confirman tales observaciones, sin embargo, aunque la infección con M. hyopneumoniae sola (grupo II), resultó en lesiones pulmonares y un consumo de 32% de más alimento, estos parámetros fueron considerablemente más graves cuando se dió una superinfección con P. multocida (grupo IV).

Se realizó la inoculación secuencial con M. hyopneumoniae y P. multocida en cerdos convencionales, para simular las condiciones de las explotaciones porcinas. Con este trabajo se confirmó la interacción aditiva entre M. hyopneumoniae y P. multocida en el desarrollo de la neumonía crónica de los cerdos. Además se demostró que la infección previa por M. hyopneumoniae favorece la colonización y el daño pulmonar por P. multocida tipo D, que no es patógena per se. Con el modelo experimental que aquí se describe, se podrán ahora analizarse los mecanismos de la patogenicidad de M. hyopneumoniae que permiten la invasividad de P. multocida.

Se realizó un experimento para demostrar si M. hyopneumoniae era capaz de inhibir a las células productoras de la substancia bactericida, que se encuentra en los explantes traqueales de fetos porcinos, substancia descrita por Pijoan y Ochoa (1978a) y por Iglesias et al. (1982) que tiene la propiedad de destruir "in vitro" a la P. multocida. En este trabajo, se encontró que en lugar de disminuir las unidades formadoras de colonias en relación al tiempo, P.

multocida continuó multiplicandose, esto puede deberse posiblemente a que la substancia bactericida se trate de una proteina inestable debido a que las condiciones del experimento se sometió. Por otro lado, en los estudios de Iglesias et al. (1982) el tiempo máximo de exposición de la P. multocida con los explantes traqueales fué de una hora, mientras que el tiempo mínimo en este trabajo fué de 4 horas. Al parecer la inestabilidad de la substancia bactericida y los tiempos prolongados de exposición no permitieron esclarecer si esta importante barrera del pulmón pudo ser afectada por el M. hyopneumoniae.

6. CONCLUSIONES

Se analizó la interacción de Mycoplasma hyopneumoniae y Pasteurella multocida en la neumonía experimental de cerdos convencionales y se encontró:

- 1.- La inoculación de la P. multocida por medio de aerosoles no colonizó ni daño al pulmón.
- 2.- La inoculación del M. hyopneumoniae por medio de homogeneizados pulmonares si colonizó y daño al pulmón.
- 3.- La inoculación del M. hyopneumoniae y la P. multocida en forma secuencial produjo una infección más grave.
- 4.- La inoculación de M. hyopneumoniae permitió la colonización de P. multocida.
- 5.- La infección con M. hyopneumoniae y P. multocida provocó que los cerdos consumieran más alimento.
- 6.- El estudio de los explantes traqueales no fue concluyente.

7. BIBLIOGRAFÍA

Armstrong, C.H. (1982). Mycoplasma pneumoniae of swine. International Swine Update (Squibb) Issue One P. 1.6 y 8.

Badiola, S.J.I. y Pujols, R.J. (1984). Estudios sobre la interacción del virus de Aujeszky con Pasteurella multocida en los procesos neumónicos del cerdo. Tesis Maestría en Ciencias (Area: Microbiología) FES-Cuautitlán, UNAM.

Boughton, E. and Thorns, C. (1976). Mycoplasma Laboratory Handbook; Ministry of Agriculture, Fisheries and Food; Central Veterinary Laboratory; New Haw, Weybridge, Surrey, England.

Buddle, B.M.; Herceg, M. and Davies, D.H. (1984). Experimental infection of sheep with Mycoplasma ovipneumoniae and Pasteurella haemolytica; Veterinary Microbiology, 9; 543-548.

Burch, D. (1982). In: Thomas, P., 1984. The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. Pig News and Information, Vol. 5, (4); 343-349.

Buxton, A. and Fraser, G. (1977). Animal Microbiology, Vol. I; First Edition; Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Melbourne. Pag. 121-126 y 267-269.

Caballero, C.S. (1985). Efecto del virus de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de Pasteurella multocida en cerdos de engorda. Tesis Maestría en Ciencias (Area: Microbiología) FES-Cuautitlán, UNAM.

Carter, G.R. (1955). Studies on Pasteurella multocida I. A haemagglutination test for the identification of serological types. Am. J. Vet. Res. 16; 481-484.

Carter, G.R. (1957). Studies on Pasteurella multocida III. A serological survey of bovine and porcine strains from various parts of the world. Am. J. Vet. Res. 18; 437.

Carter, G.R. and Subronto, P. (1973). Identification of type D strains of Pasteurella multocida with Acriflavine; Am. J. Vet. Res. 34 (2); 293-294.

Carter, G.R. (1975). Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology; Second Edition; Charles C. Thomas Publisher; Springfield Illinois, USA.

Carter, G.R. and Rundel, S.N. (1975). Identification of type A strains of Pasteurella multocida using a Staphylococcal Hyaluronidase; Vet. Rec. 93; 343.

Ciprián, A.; Cruz, T. and Pijoan, C. (1982). Specific fluorescence against Mycoplasma hyopneumoniae in pneumonic lungs of pig in México. Proceeding Int. Pig Vet. Soc. Congress 1982, México, p. 90.

Curtis, S.E.; Anderson, C.R.; Simon, J. Hensen, A.H.; Day, D.L. and Kelley, K.W. (1975). Effect of serial NH, H S and swine dust on rate of gain and respiratory tract structure in swine. J. of Animal Science 41; (3); 735-739.

Curtis, S.E. (1981). Environmental Management in Animal Agriculture. Animal Environment Services, Mahomet, Illinois. Chapters 21-24.

Cowan, S.T. (1974). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd edit. Cambridge University Press. Cambridge.

de Jong, M.F.; Oel, M.L. and Tentenburg, G.J. (1980). Atrophic Rhinitis pathogenicity test for Pasteurella multocida isolates. Proceedings Int. Pig Vet Soc. Congress 1980; Copenhagen, p.211

Dobrev, V. (1984). Epizootologic and pathologic-anatomic peculiarities with swine pasteurellosis. Proceedings Int. Pig Vet. Soc. Congress 1984; Belgium, p. 126.

Drummond, J.G., Curtis, S.E., Simon, J. and Norton, N.W. (1980) In: Thomas, P. (1984). The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. Pig News and Information, 5 (4); 343-349.

Erler, W.; Feist, H. Flossmann, K-D und Jacob, B. (1977). Charakterisierung der Lipopolysaccharide einiger Pasteurella multocida - Stämme. Arch. Exper. Vet. Med. Leipzig 31; 139-

Etheridge, J.R.; Cottew, G.S. and Lloyd, L.C. (1979). Isolation of Mycoplasma hyopneumoniae from lesions in experimental infected pigs. Australian Vet. J. 55; 356-359.

Flesja, K.I. Forus, I.B.; Solbero, I (1982). Pathological lesions in swine at slaughter. Acta Vet. Scandinavica 23; 169-183.

Friis, N.F. (1969). Mycoplasma suis-pneumoniae Isolated in Denmark. Acta Vet. Scandinavica 10; 295-297.

Friis, N.F. (1973). Resistance of porcine mycoplasmas to drying. Acta Vet. Scand. 14; 489-491.

Friis, N.F. (1975). The SPS and Digitonin test applied to porcine mycoplasmas; Acta Vet. Scandinavica 16; 474-476.

Fuentes, M. and Pijoan, C. (1984). Studies on the interaction between vaccinal and pathogenic Aujeszky's virus and Pasteurella multocida in young pigs. Proceedings Int. Pig Vet. Soc. Congress 1984, Belgium, p. 28.

Geary, S.T. and Walczak, E.M. (1985). Isolation of a cytopathic factor from Mycoplasma hyopneumoniae; Infect. Immun. 48; (2); 576-578.

Gois, M.; Kuksa, F. and Sisak, F. (1980). Microbiological findings in the lungs of slaughter pigs. Proceedings Int. Pig Vet. Soc. Congress 1980, Denmark, p.214.

Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Echlin, P.; Joy, D.C.; Fiori, C. and Lifshin, S. (1981). Scanning electron microscopy and X ray microanalysis. A text for biologist, materials scientists and geologists. Plenum Press New York. p. 495-534.

Goodwin, R.F.W.; Poseroy, A.P. and Whittlestone, P. (1967). Characterization of Mycoplasma suis-pneumoniae; a mycoplasma causing enzootic pneumonia of pigs. J. Hyg. Camb. 65; 85-97.

Goodwin, R.F.W. and Whittlestone, P. (1967). The detection of Enzootic Pneumonia in pig herds. I. Eight years general

experience with a pilot control scheme. Vet. Rec. 81; (25); 643-647.

Goodwin, R.F.W. (1971). In: Thomas, P. (1984). The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. Pig News and Information, 5 (4); 343-349.

Goodwin, R.F.W. (1972). Isolation of Mycoplasma suisneumoniae from the nasal cavities and lungs of pigs affected with enzootic pneumonia or exposed to this infection; Res. Vet. Sci. 13; (3); 262-267.

Goodwin, R.F.W. (1982). Swine enzootic pneumonia. International Swine Update (Squibb). Issue One. p.1,4 y 8.

Hannan, P.C.T.; Banks, R.M.; Bhogal, B.S.; Blanchflower, S.E.; Donald, A.C.; Fish, J.P. and Smith, D. (1984). Reproducible pneumonia in gnotobiotic piglets induced with broth cultures of Mycoplasma hyopneumoniae and the effect of animal passage on virulence; Res. Vet. Sci. 36; 153-163.

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

Hodges, R.T.; Bett, A.O. and Jennings, A.R. (1969). Production of pneumonia in gnotobiotic pigs with pure cultures of Mycoplasma hyopneumoniae; Vet. Rec. 84; 268-273.

Houghton, S.B. and Gourlay (1983). Synergism between Mycoplasma bovis and Pasteurella haemolytica in calf pneumonia. Vet. Rec. 113; 41-42.

Iglesias, G.; Pijoan, C. and Hernandez, E. (1982). Characterization of a substance in tracheal exudates with activity against Pasteurella multocida. Proceedings Int. Pig Vet. Soc. Congress, Mexico, p. 86.

Kasza, L.; Hodges, R.T.; Betts, A.O. and Trexler, P.C. (1969). Pneumonia in gnotobiotic pigs produced by simultaneous inoculation of a swine Adenovirus and Mycoplasma hyopneumoniae; Vet. Rec. 84; 262-267.

Larsson and Backstrom (1971). In: Thomas, P. (1984). The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia; *Pig News and Information*; 5 (4); 343-349.

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

Lara, V.; Caballero, S.; Alarcón, F.; Camacho, J. y Ciprián, A. (1985). Remoción pulmonar de Pasteurella multocida en cerdos de engorda. Resúmenes XX Reunión Anual de AMVEC-Merida, Yuc. p.144-147.

Lindqvist, J.O. (1974). Animal health and environment in the production of fattening pigs. *Acta Vet. Scandinavica*, Suppl. 51: 1-77.

Livingstone, C.W.; Stair, E.L.; Underdahl, N.R. and Mebus, C.A. (1972). Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. *Am. J. Vet. Res.* 33; (11); 2249-2258.

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

Maqueda, J.J. (1977). Incidencia de Neumonía Enzootica en varios estados productores de cerdos en la República Mexicana (Estudio preliminar) Memorias del I Congreso Latinoamericano de Veterinarios Especialistas en cerdos UAM-Xochimilco, México (XIII Convención AMVEC).

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

Miles, A.A. and Misra, S.S. (1938). The estimation of the bactericidal power of blood. *J. Hyg.* 38; 732-748.

Morrison, R.B.; Pijoan, C.; Hilley, H.D. and Rapp, V. (1985). Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine; *Can. J. Comp. Med.* 49; 129-137.

Morrison, R.B.; Pijoan, C. and Leman, A.D. (1986). Association between enzootic pneumonia and performance. *Pig News and*

Information vol. 7 (1); 23-31.

Morse, S.I. (1973). The Haemophilus-Bordetella Group, In: Microbiology, Ed. Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. and Wood, W.B.; Second Edition. Harper and Row Publishers. P.792-800.

Nakai, T.; Kume, K. and Yamada, H. (1936). Purification of dermonecrotic-toxin from a sonic extract of Pasteurella multocida or Bordetella bronchiseptica. Proceedings Int. Pig Vet. Soc. Congress, Espana. P.222.

Namioka, S. and Murata, M. (1961). II. Characteristics of somatic (O) antigen of the organism. Cornell Vet. 51; 507.

Nicolet, J.(1985). Compendio de Bacteriologia Medica Veterinaria. Traducido por Muñoz de Arenillas, J.R. Editorial Acribia, S.A.; Zaragoza (Espana). P.52-56.

Niels, T.F.; Folmer, E. and Pedersen, K.B. (1986). Isolation and characterization of a toxin from Pasteurella multocida. Proceedings Int. Pig Vet. Soc. Congress, Espana, p.231.

Piffer, I.A. and Ross, R.F.(1984). Effect of age on susceptibility of pigs to Mycoplasma hyopneumoniae pneumonia; Am. J. Vet. Res. 45; (3): 478-481.

Pijoan, C. and Ochoa, G.(1978 a). A bactericidal substance against Pasteurella multocida a produce by pig embryo tracheal explants. Rev. Lat. Microbiol. 20; (1); 1-3.

Pijoan, C. and Ochoa, G.(1978 b). Interaction between a Hog Cholera vaccine strain and Pasteurella multocida in the production of porcine pneumonia; J. Com. Path. 88; (2); 167-170.

Pijoan, C.; Morrison, R.B. and Hilley, H.D. (1980). Serotyping of Pasteurella multocida isolated from swine lungs collected at slaughter; J. Clin. Microbiol. 17; (6); 1074-1076.

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

Pijoan, C.; Lastra, A.; Ramirez, C. and Leman, A.D. (1984). Isolation of toxigenic strains of Pasteurella multocida from lungs of neumoniac swine. JAVMA 185; (5); 522-523.

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

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

Pijoan, C. and Fuentes, M. (1986). Field outbreaks of severe Pasteurella multocida infections associated with adhesive pleuritis. Proceedings Int. Pig Soc. Congress, España, p.281.

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

Pijoan, C. (1986). Mycoplasmosis. En: Enfermedades de los Cerdos; Edit. R.R. Necochea y C. Pijoan Aguade. Ed. México; p.357-366.

Pointon, A.M.; Byrt, D. and Heap, P. (1985). Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance. Aust. Vet. J. 62; 13-18.

Ramirez, R.N. (1986). Intoxicación por gases. En: Enfermedades de los Cerdos; Edit. R.R. Necochea y C. Pijoan Aguade. Ed. México; p.591.

Rebers, P.A. and Heddleston, K.L. (1974). Immunologic comparison of Westphal-type lipopolysaccharides and free endotoxins from a encapsulated and nonencapsulated avian strain of Pasteurella multocida; Am. J. Vet. Res. 35; 555-560.

Ro, L.H. and Ross, R.F. (1983). Comparison of Mycoplasma hyopneumoniae strains by serologic methods; Am. J. Vet. Res. 44; (11); 2087-2094.

Roberts, D.H. and Pijoan, C. (1977). Identification of Mycoplasma hyorhinis; Brit. Vet. 127; 582-587.

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

Rose, D.L.; Tully, J.C. and Wittler, R.G. (1979). Taxonomy of some swine mycoplasmas: Mycoplasma suis-pneumoniae, Goodwin et al, 1965, a later objective synonym of Mycoplasma hyopneumoniae, Mare and Switzer, 1965 and the status of Mycoplasma flocculare, Meyling and Friis, 1972; Int. J. Syst. Bacteriol. 29; 83-91.

Ross, R.F. (1984). Chronic pneumonia of swine with emphasis on mycoplasmal pneumonia. Proceedings American Association of swine Practitioners USA. P.79-96.

Rutter, J.M. (1983). Virulence of Pasteurella multocida in Atrophic Rhinitis of gnotobiotic pigs infected with Bordetella bronchiseptica; Res. Vet. Sci. 34; 287-295.

Smith, I.M.; Betts, A.O.; Watt, R.G. and Hayward, A.H.S. (1973a). Experimental infections with Pasteurella septica (sero-group A) and an Adeno- or enterovirus in gnotobiotic piglets; J. Comp. Path. 83; 1-12.

Smith, I.M.; Hodges, R.T.; Betts, A.O. and Hayward, A.H.S. (1973b). Experimental infections of gnotobiotic piglets with Pasteurella septica (sero-group A) alone or with Mycoplasma hyopneumoniae; J. Comp. Path. 83; 307-321.

Switzer, W.P. (1967). Swine mycoplasmosis. Annals New York Academy of Sciences 143; 281-286.

Thomas, P. (1984). The influence of housing design and some management systems on the health of the growing pig, particularly in relation to pneumonia. Pig News and Information, 5 (4); 343-349.

Underdahl, N.R.; Kennedy, G.A. and Ramos, Jr. A.S. (1980). Duration of Mycoplasma hyopneumoniae infection in gnotobiotic pigs; Can. Vet. J. 21; 258-261.

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

Williams, P.P. and Gallagher, J.E. (1978). Cytopathogenicity of Mycoplasma hyopneumoniae in porcine tracheal ring and lung explant organ cultures alone and in combination with monolayer cultures of fetal lung fibroblast. *Infect. Immun.* 20 (2); 495-502.

Whittlestone, P. (1972) Pathogenic mycoplasma, CIBA Found. Symp. pp.263-283.

Whittlestone, P. (1973). Enzootic pneumonia of pigs (EPP). *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 17; 1-55.

Whittlestone, P. (1979). Porcine Mycoplasmas en: *The Mycoplasmas vol. II Human and animal Mycoplasmas*; Ed. Tully, J.G. and Whitcomb, R.F.; Academic Press. 133-176.

Yagihashi, T.; Nunoya, T.; Mitui, T. and Tajima, M. (1984). Effect of Mycoplasma hyopneumoniae Infection on the Development of Haemophilus pleuropneumoniae Pneumonia in Pigs.; *Jpn. J. Vet. Sci.*, 46, (5); 705-713.