

11661  
3  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**CUAUTITLAN**

ESTUDIO DE LAS TOXINAS DE Bordetella bronchiseptica  
Y Pasteurella multocida EN LA PATOGENIA DE LA  
RINITIS ATROFICA DEL CERDO.

**T E S I S**  
**P R E S E N T A D A**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE :**  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**(AREA: MICROBIOLOGIA)**

**P O R**

**SUSANA ELISA MENDOZA ELVIRA**

**Directores: Dr. José Abel Ciprián Carrasco**  
**M. en C. José Camacho Machin**  
**Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo**

1989

**TESIS CON**  
**FECHA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

	Pags.
Resumen.....	i
Abstract.....	ii
Lista de Cuadros y Figuras.....	iii
1. Introducción.....	1
1.1. Rinitis Atr6fica.....	1
1.1.1. Definici6n.....	1
1.1.3. Influencia Ambiental.....	2
1.1.4. Agentes Etiol6gicos Involucrados.....	3
1.1.5. Modo de Infecci6n.....	5
1.1.6. Patogenia de la Rinitis Atr6fica.....	5
1.2.1. Caracteristicas Generales de <u>Bordetella bronchiseptica</u> .....	7
1.2.1.1. Clasificaci6n.....	7
1.2.1.2. Habitat.....	7
1.2.1.3. Morfologia.....	8
1.2.1.4. Caracteristicas de Cultivo.....	8
1.2.1.5. Antigenos.....	9
1.2.1.6. Enzimas y T6xinas.....	10
1.2.2. Papel de la <u>Bordetella bronchiseptica</u> en la Rinitis Atr6fica.....	11
1.2.3. Estudios de Inmunidad en <u>Bordetella bronchiseptica</u> .....	17
1.3.1. Caracteristicas generales de <u>Pasteurella multocida</u> .....	20
1.3.1.1. Morfologia.....	20
1.3.1.2. Antigenos.....	20
1.3.1.3. T6xinas.....	21

1.3.1.4.	Material Extracromosomal.....	22
1.3.2.	Papel de <u>Pasteurella multocida</u> en la Rinitis Atr6fica.....	23
1.4.	Aerosoles y su Importancia en las Infecciones Respiratorias.....	26
1.4.1.	Distribuci6n y Mecanismo de dep6sito de las partículas inhaladas.....	27
1.4.2.	Aerosoles Bacterianos.....	28
1.4.3.	Modelos Experimentales de Remoci6n Bacteriana.....	28
2.0.	<b>Objetivos</b> .....	30
3.0.	<b>Materiales y M6todos</b> .....	32
3.1.0.	Colecci6n de Muestras en Granjas.....	32
3.1.1.	Clasificaci6n de las Muestras.....	32
3.1.2.	Aislamiento Bacteriano.....	32
3.1.3.	Identificaci6n por Pruebas Bioquímicas.....	33
3.2.0.	Tipificaci6n de las <u>Pasteurella multocida</u> tipo "D" <u>B. bronchiseptica</u> .....	33
3.2.1.	Prueba de Hialuronidasa Testicular Bovina.....	33
3.2.2.	Prueba de Acriflavina.....	34
3.3.0.	Pruebas Biol6gicas para la Identificaci6n de la DNT.....	34
3.3.1.	Producci6n de Exotoxina Demonecrot6xica (DNT).....	34
3.3.1.1.	Prueba de la DNT en la Piel de Cuye.....	34
3.3.1.2.	Pruebas de Letalidad en Rat6n Lactante.....	35
3.3.4.	Efecto en el Bazo de ratones de 21 dÍas.....	35
3.4.0.	Selecci6n de Cepas.....	35
3.5.0.	Presencia de Plásmidos en las cepas.....	36
3.6.0.	Efecto de la Dermonecrot6xina en Cultivos Celulares.....	37

3.7.0.	Estudio de la Patogenicidad de la <u>Bordetella bronchiseptica</u> por medio de Aerosoles.....	37
3.7.1.	Cámara de Aerolización.....	37
3.7.2.	Evaluación y Estandarización del Sistema.....	39
3.7.3.	Patrón de Remoción de <u>Bordetella bronchiseptica</u> en ratones.....	40
3.7.3.1.	Animales.....	40
3.7.3.2.	Preparación del Inóculo.....	40
3.7.3.3.	Aerosolización.....	41
3.7.3.4.	Remoción en Pulmón.....	41
3.7.3.5.	Remoción en Cornete Nasal.....	42
3.7.3.6.	Efecto en el Crecimiento de los Ratones Inyectados	42
3.8.0.	Estudio Histopatológico.....	43
4.0.	<b>Resultados</b> .....	44
4.1.	Aislamiento Bacteriano.....	44
4.2.	Identificación de la DNT.....	44
4.3.	Selección de Cepas.....	53
4.4.	Extracción del Plásmido.....	53
4.5.	Citotóxicidad en Cultivos Celulares.....	58
4.6.	Infección de Ratones con Aerosol de <u>Bordetella bronchiseptica</u> .....	58
4.6.1.	Estandarización de la Cámara de Nebulización.....	58
4.6.2.	Remoción Bacteriana en Pulmón.....	61
4.6.3.	Remoción Bacteriana en Cornetes Nasaes.....	62
4.7.	Estudio Histopatológico.....	67
4.8.	Efecto en el Crecimiento de Ratones Inyectados....	67
4.9.	Mortalidad de Ratones Inyectados con <u>Bordetella bronchiseptica</u> .....	68

5.0.	<b>Discusión.....</b>	75
6.0.	<b>Conclusiones.....</b>	82
7.0	<b>Bibliografía.....</b>	83

## RESUMEN

En este estudio se determinó la patogenicidad de cepas de campo de Bordetella bronchiseptica y de Pasteurella multocida tipo "D" aisladas de 41 cerdos con cuadro clínico de Rinitis Atrófica (RA) e identificadas por pruebas bioquímicas. En 20 de los casos se aisló B. bronchiseptica, en 3 (7%) P. multocida y en el 44% restante no hubo aislamientos. Las tres cepas de P. multocida correspondieron al serotipo "D", todas las cepas de P. multocida y B. bronchiseptica resultaron ser productoras de dermonecrotóxina. La acción de la dermonecrotóxina fué demostrada por endurecimiento en piel de cuye (IPC), muerte en ratón lactante (MRL) y atrofia del bazo en ratón (ABR); para IPC resultaron positivas 12 de 20 con aislamientos de B. bronchiseptica y 2 de 3 de P. multocida, para la prueba de MRL 15 de 20 de B. bronchiseptica y 2 de 3 de P. multocida y la prueba de ABR 17 de 20 de B. bronchiseptica y 3 de 3 de P. multocida. El análisis estadístico (Xi cuadrada) reveló que cualquiera de las tres pruebas biológicas se pueden utilizar para detectar cepas con dermonecrotóxina. Se seleccionaron 4 cepas, dos de ellas patógenas, de estas cepas sólo la cepa (Vc) de P. multocida patógena presentó un plásmido de aproximadamente 5.2 Kb, mientras que las otras tres cepas no presentaron plásmido. El estudio de citotoxicidad en cultivos celulares de estas mismas cepas mostró que sólo la cepa 4 de B. bronchiseptica patógena produjo un marcado efecto citotóxico en la línea celular MDBK, moderado en la VERO y leve en las PK-15 mientras que la cepa Vc tuvo un moderado efecto citotóxico en las células MDBK y leve en las otras dos. El estudio por medio de aerosoles de infección a ratones de 21 días de edad por medio de aerosoles con la cepa 4 de B. bronchiseptica demostró, que la inoculación de  $5 \times 10^{10}$  UFC de B. bronchiseptica, no fué capaz de producir ninguna lesión en los cornetes nasales de los ratones. La remoción de la bacteria de los pulmones presentó 4 fases, dependientes del tiempo: una de crecimiento rápido, una disminución, un aumento ligero con una fase estacionaria y finalmente un descenso del número de bacterias en los últimos días. La baja de peso fue significativa en los animales infectados, además se presentó una alta mortalidad de los animales en el transcurso del experimento.

## ABSTRACT

This study was aimed at identifying toxins from field strains of B. bronchiseptica and P. multocida serotype "D" associated with atrophic rhinitis. Forty one pigs with clinical symptoms of the disease were sampled; 20 (49%) yield B. bronchiseptica and 3 (7%) P. multocida. Bacterial toxins were identify by three biological assays: a) Induration and necrosis of guinea pig skin (IPC test); b) Dead of suckling mouse (MRL test); c) Spleen atrophy in mice (ABR test). Twelve B. bronchiseptica cultured supernatants were positive in IPV test, 15 in MRL and 17 in ABR. In the case of P. multocida, 2 were positive in IPC and MRL tests and none in ABR. No statistical differences were found among the three assays. Culture supernatants from one positive and one negative toxin strain of either B. bronchiseptica and P. multocida were tested for cytotoxic effect on MDBK, VERO and PK-15 cell lines. B. bronchiseptica positive strain showed severe cytotoxic effect on MDBK, moderate on VERO and light on PK15. P. multocida positive strain showed moderate cytotoxic effect on MBDK and light on VERO and PK-15 cell lines. The same four strains mentioned above were studied for the presence of plasmids; only P. multocida toxin positive strain showed one of 5.2 Kb. An attempt was made to reproduce atrophic rhinitis like lesions in mice infected with a B. bronchiseptica aerosol. Bacteria actively multiplied in lungs and could also be recovered from nasal washings; high mortality and body weight lost was observed, however turbinate bones atrophy was not detected.



## Lista de Cuadros y Figuras

Cuadro		Pags.
1	Resultado de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de <u>P. multocida</u> y <u>B. bronchiseptica</u> .....	45
2	Aislamientos de <u>B. bronchiseptica</u> y <u>P. multocida</u> en 41 cerdos de diferentes edades y con signos clínicos de rinitis atrófica.....	46
3	Resultados de las tres pruebas biológicas realizadas para detectar la producción de toxina con 3 cepas de <u>P. multocida</u> y 20 cepas de <u>B. bronchiseptica</u> , aisladas de cerdos de 5 días de edad.....	47
4	Resultados de las tres pruebas biológicas realizadas para detectar la producción de toxina con 3 cepas de <u>P. multocida</u> y 20 cepas de <u>B. bronchiseptica</u> , aisladas de cerdos de 5 semanas de edad.....	48

5	Resultados de las tres pruebas biológicas realizadas para detectar la producción de toxina con 3 cepas de <u>P. multocida</u> y 20 cepas de <u>B. bronchiseptica</u> , aisladas de cerdos de 5 meses de edad.....	49
6	Resultados de la prueba de atrofia de bazo en ratones de 21 días inoculados con sobrenadantes de 20 cepas de <u>B. bronchiseptica</u> y 3 cepas de <u>P. multocida</u> .....	51
7	Número de cepas de <u>B. bronchiseptica</u> y <u>P. multocida</u> DNT positivas y negativas de acuerdo a las pruebas IPC, MRL y ABR.....	52
8	Resultados de las siguientes pruebas: endurecimiento y necrosis en la piel de cuye, atrofia de bazo, en ratones de 21 días y mortalidad de ratones lactantes con sobrenadantes de 20 cepas de <u>B. bronchiseptica</u> y 3 de <u>P. multocida</u> .....	56

9	Resultados de las pruebas biológicas realizadas a 4 cepas seleccionadas para estudios de citotóxicidad.....	57
10	Efecto citotoxico de sobrenadantes bacterianos en tres líneas celulares.....	59
11	Medias de las UFC obtenidas a partir de diluciones de caja Petri con medio líquido de cultivo colocadas en diferentes posiciones en la cámara de aerolización.....	60
12	Promedio de UFC/cornete en ratones infectados con <u>B. bronchiseptica</u> en diferentes días posteriores a la inoculación.....	65
13	Ganancia de peso durante 21 días de 4 ratones controles y 8 ratones infectados con <u>B. bronchiseptica</u> . El peso inicial de los ratones fue de 9.80 0.10g.....	71

14	Mortalidad en un grupo de ratones infectados con <u>B. bronchiseptica</u> .....	74
----	---	----

## Figuras

1	Vista de planta de la cámara diseñada para infectar ratones con <u>B. bronchiseptica</u> .....	38
2	Gel de Agarosa del DNA extracromosómico de <u>P. multocida</u> .....	54
3	Media y error estandar del logaritmo de las UFC obtenidas de pulmon a diferentes tiempos posinoculación con <u>B. bronchiseptica</u> .....	63
4	Curva de regresión de la relación entre la remoción de <u>B. bronchiseptica</u> y el tiempo poinoculación en los cornetes nasales.....	69
5	Curva de crecimiento de los ratones controles.....	72

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. RINITIS ATROFICA.

#### 1.1.1. Definición.

Es una enfermedad del cerdo caracterizada por atrofia en los cornetes nasales, ha sido reconocida desde hace casi 150 años y fué descrita como "Schnuffelkrankheit" en Europa Central (Franke, 1830). La rinitis atrófica (RA) es una enfermedad infecciosa y contagiosa, ampliamente distribuida en la población porcina caracterizada por atrofia en los cornetes nasales y en casos raros, ramificación hacia el premaxilar nasal o el hueso maxilar. Los cornetes ventrales inferiores son los que se encuentran afectados más comunmente. En brotes moderados a severos, puede observarse cierto grado de distorsión facial (incluyendo braquignatia superior "mandíbula corta" y desviación lateral del morro) y ocasionalmente hemorragia nasal (Leman y cols., 1981; Smith, 1980).

#### 1.1.2. Distribución e Importancia.

La Rinitis Atrófica, es una enfermedad de distribución mundial (Pedersen y Elling, 1981). Se reportó en Estados Unidos de Norteamérica (Doyle y cols., 1944) y en Inglaterra (Anon, 1954) siendo subsecuentemente reconocida en otras áreas del mundo que cuentan con una producción importante de cerdos. La condición precisa de la atrofia ha sido debatida activamente en este siglo y su entendimiento todavía permanece incompleto. Se ha dicho frecuentemente que la rinitis

atrófica, lleva a un retraso en el crecimiento de aproximadamente 5 %, aunque en Japón se ha encontrado hasta un 10% (Leman y cols,1981). Existen otros reportes donde el retraso de crecimiento es muy poco o no lo hay, aún en animales con rinitis atrófica severa (Schofield, 1956; Pearce, 1967; Straw, 1984).

### **1.1.3. Influencia Ambiental.**

La mayor frecuencia de esta enfermedad esta dada en dos estaciones del año, primavera e invierno. El estres aumenta la severidad de las lesiones de los cornetes nasales, además de otros factores ambientales que influyen en la presentación y severidad de las lesiones. Los factores más significativos que agravan la enfermedad son la mala ventilación e irritación de la mucosa nasal por materia particulada suspendida en el aire (Martineau,1982). La frecuencia con la que se infectan los cerdos en las 4 primeras semanas hasta las 10 semanas de edad es cerca del 55-95%, del 5 al 6 mes de edad del 30 al 35% y del 8 al 9 mes de edad del 20 al 25% (Runnels,1982).

El mal manejo, el hacinamiento y el medio ambiente desfavorable llevan a un severo retraso de crecimiento, estas condiciones generalmente se presentan en sistemas intensivos de producción, cuando los cerdos estan confinados en lugares pequeños. En construcciones pobremente ventiladas Smith y Giles, (1980) y Penny, (1977) identificaron algunos factores ambientales que tienden a predisponer la severidad de la RA:

<b>Incremento</b>	<b>Decremento</b>
Pequeñas y cerradas	Piaras grandes y abiertas
Expansión de la piaras	Tamaño estático de las piaras.
Alta proporción de lechones	Principalmente cerdos viejos
Destete en grupos.	Destete en camada.
Frecuencia de movimiento y mezclados.	Poco movimiento y no mezclados
Sistemas intensivos internos	Sistemas abiertos
Hacinamiento	Baja carga animal por m <sup>2</sup>
Ventilación pobre y temperatura no controlada.	Buena ventilación y control de temperatura
Higiene pobre, poca desinfección.	Buena desinfección e higiene

#### 1.1.4. Agentes Etiológicos Involucrados.

Se han realizado muchas investigaciones dirigidas a la definición precisa del o los agentes microbiológicos responsables de la RA. Mientras algunos factores pueden influir la severidad y expresión clínica de la enfermedad. Se ha establecido que la condición primaria es de carácter infeccioso, más que un desorden nutricional (Brown y cols., 1966).

Se ha señalado la posible asociación con agentes infecciosos tales como: tricomonas (Switzer, 1931), virus (Switzer y Cuyler, 1960; Edington y cols., 1976) y Micoplasma (Switzer, 1955; Gois y cols., 1977), sin embargo, solo dos bacterias han sido consideradas de importancia que son P. multocida y B. bronchiseptica, con las que se ha podido

desarrollar la atrofia experimental de los cornetes nasales de cerdo y ratón, cuando han sido inoculados cultivos puros por vía intranasal (Sawata y Kume, 1982; Semjén y Magyar, 1985; Montaraz, 1986 y Switzer, 1988).

La RA se ha asociado a las toxinas de P. multocida y B. bronchiseptica, reportadas como responsables del cuadro rinitico, (Roop y cols., 1987). Un grupo de investigadores ha demostrado que los cerdos inoculados desarrollan frecuentemente en los primeros días de vida, atrofia leve de los cornetes y que en cerdos de más edad se desarrollan lesiones más severas (Lemar y cols., 1981). Se ha observado en cerdos lactantes es la presencia de la RA puede resultar de una infección mixta de cepas toxigénicas de Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica (Whittlestone, 1981). Se ha discutido mucho el que B. bronchiseptica sea el agente etiológico primario en la atrofia de los cornetes de los cerdos en el campo (Switzer y Farrington, 1972). La invasión secundaria por otros microorganismos como P. multocida, se lleva a cabo después de una infección por B. bronchiseptica (Martineau, 1982; Runnels, 1982), siendo muy importante para el desarrollo e intensificación de la rinitis atrófica, (Gois; 1983; Harris y Switzer, 1968; Nielsen, 1976; Schoss, 1984).



### 1.1.5. Modo de Infección.

La principal forma de transmisión de la enfermedad de cerdo a cerdo, es por medio de aerosoles infectados, los cerdos expuestos pueden desarrollar rinitis catarral, faringitis y otras alteraciones antes de producirse rinitis atrófica (Harris y Switzer, 1968; Martineau, 1982).

### 1.1.6. Patogenia de la Rinitis Atrófica.

Recientemente se han encontrado en P. multocida tipo "D" y B. bronchiseptica la producción de dermonecrotinas capaces de producir lesiones severas en los cornetes nasales (De Jong, 1980; Schos y Thiel, 1984; Nakai y cols., 1985). Las cepas de P. multocida tipo "D" que producen la dermonecrotina DNT(+), colonizan la nariz de cerdos inoculados con B. bronchiseptica por tiempos prolongados (Rutter, 1983). La inoculación intranasal de la toxina de P. multocida en cerdos gnótobioticos, ha provocado la atrofia marcada de los cornetes (Martineau, 1982).

Duncan y cols (1965 y 1966), utilizando la tinción de anticuerpos fluorescentes, encontraron en cerdos B. bronchiseptica sobre el epitelio de los cornetes nasales y en la tráquea. El organismo no parece invadir el tejido subyacente. También se ha encontrado que esta bacteria, modificó los cilios de la mucosa nasal. Una evaluación de los osteoblastos y osteocitos del hueso de cerdos infectados con B. bronchiseptica, mostró distensión del retículo endoplásmico, de las mitocondrias y lisis celular (Fetter y

cols., 1975).

Se ha encontrado una variación en la patogenicidad de B. bronchiseptica aislada de las secreciones nasales de cerdos, considerados libre de la enfermedad clínica (Little, 1975). Inoculaciones intranasales en cerdos, gatos, conejos y ratas han producido atrofia de los cornetes nasales en forma ligera y moderada (Ross y cols., 1967).

Otros estudios muestran que P. multocida toxigénica es el agente primario en el desarrollo de la rinitis atrófica progresiva, que presenta lesiones de moderadas a severas, es permanente y afecta a la producción porcícola. Estas lesiones también se han observado cuando las dos bacterias han sido inoculadas intranasalmente a cerdos jóvenes. Al respecto cuando fueron inoculados los cerdos con cultivos puros de P. multocida tipo "D" la bacteria se adhirió al epitelio nasal, debido a la infección previa de B. bronchiseptica, las lesiones fueron muy severas en los cornetes con desviación del morro (Maniats y Johnson, 1980; Rutter y Rojas, 1982; Pedersen y Barfod, 1981; Rutter, 1983).

Los autores que han trabajado la hipótesis sobre la atrofia progresiva, sugieren que el daño de la mucosa nasal en cerdos jóvenes es provocada por B. bronchiseptica, en adición a los irritantes que se encuentran en el medio ambiente u otras infecciones (Gois y cols; 1983).

### 1.2.1. Características Generales de Bordetella bronchiseptica.

#### 1.2.1.1. Clasificación.

Bordetella bronchiseptica fué aislada e identificada como Bacillus bronchicanis por Ferry por primera vez en 1910. Este nombre fue seleccionado porque se aisló del tracto respiratorio de perros. Después organismos con características idénticas fueron descritos y aislados del tracto respiratorio de cuyes, monos y humanos por Ferry, en 1912-1913. El organismo fue reclasificado varias veces, Alcaligenes bronchisepticus, Bergey (1925), Brucella bronchiseptica, Topley y Wilson (1929), Alcaligenes bronchicanis, Haupt (1935), y Haemophilus bronchisepticus, Wilson y Miles (1946). Estas clasificaciones se realizaron en base a la morfología, crecimiento y características bioquímicas. Pero su nombre actual fue dado cuando Moreno-López describió el género Bordetella, en honor a Jules Bordet por ser el primero en aislar el organismo (Pittman, 1974) y encontrando que las tres especies de Bordetella son patógenas para los mamíferos.

#### 1.2.1.2. Habitat.

En cerdos B. bronchiseptica se aisló por vez primera de pulmones neumónicos (Thorp y Tanner 1940; Phillips, 1943) y aunque este organismo es patógeno ocasional en las bronconeumonías primarias de cerdos jóvenes, puede también actuar como un patógeno del tracto respiratorio inferior en animales viejos. Esta bacteria fue aislada primero de la

cavidad nasal por Switzer en 1956, quien demostró la habilidad de este organismo para inducir cambios hipoplásicos (atrofia) en los cornetes y consecuentemente se le consideró como patógeno primario en la rinitis atrofica.

#### 1.2.1.3. Morfología.

Bordetella bronchiseptica es un cocobacilo, no produce esporas, pleomórfico, en crecimiento sobre medio sólido, se presenta principalmente en forma cocoide, de un tamaño de 3.0 por 0.5 um a 0.4 x 0.72 um a 0.5 x 0.4 um; algunas formas filamentosas tienen en promedio un tamaño de 0.4 x 8.0 um (Ritcher y Kresy, 1967), presenta motilidad positiva, por flagelos peritricos. Estudios con microscopía electrónica, han mostrado flagelos, en donde se puede observar una triple hélice con dirección a la izquierda teniendo un promedio de diámetro de 10.9 nm (Labaw y Mosley, 1955; Goodnow, 1980).

#### 1.2.1.4. Características de Cultivo.

La identificación de B. bronchiseptica de aislamiento primario, se ha reportado como más difícil, que las cepas mantenidas en el laboratorio. Cuando estas bacterias crecen sobre agar sangre las colonias suelen ser hemolíticas desarrollando un promedio de diámetro de 0.2 mm en 2 días aproximadamente. Sin embargo Simpson y Simmons (1976), reportan un aislamiento de cultivos primarios en muestras nasofaríngeas, las cuales produjeron colonias no hemolíticas, no características, pero que correspondían a B. bronchiseptica.

Las colonias de B. bronchiseptica sobre placas de agar, son características y de aspecto rugoso o lisas. A las colonias lisas se les ha designado como de fase I y son virulentas y las colonias rugosas como de fase IV y son avirulentas (Parker, 1976). Nakase (1957), designa como de fase I a las colonias lisas que son patógenas para el ratón, como de fase IV a las colonias rugosas que no son virulentas para el ratón. La fase I es extremadamente inestable y se transforma rápidamente a fases II, III y IV. La fase III se ha encontrado asociada con antígenos capsulares o antígenos somáticos o bien con ambos. La fase IV ó colonias rugosas, han sido consideradas como de fase III celular y a las que les faltan únicamente los antígenos flagelares.

#### 1.2.1.5. Antígenos.

Los miembros del género Bordetella poseen características antigénicas similares, cada especie posee un Antígeno O somático termoestable, una dermonecrotóxica termolábil y un aglutinógeno termolábil común, (Ferry, 1918; Eldering, 1942; Hoiby y cols., 1976; Olsen y cols., 1976), sin embargo cada especie tiene un aglutinógeno especie-específico y otros 10 aglutinógenos están presentes en las tres especies (Pittman, 1974). Las diferencias de estructura morfológica y antigénica se deben a la fase colonial y fueron medidos con sueros monoespecíficos; los resultados indicaron que B. bronchiseptica, puede ser dividido en tres fases lisas y una fase rugosa. Las células lisas fase 1 y 2 poseen un antígeno idéntico L (capsular termolábil), antígenos, H, S,

(de superficie termoestables) y antígenos O<sub>1</sub>, O<sub>5</sub> y O<sub>7</sub>. Las células de la fase III, fueron divididas antigenicamente en tres grupos más, fase III-1 (antígenos, H, O<sub>1</sub> y O<sub>7</sub>) y la fase III-2 (antígenos H, O<sub>5</sub> y O<sub>7</sub>). Las células rugosas de la Fase IV poseen únicamente O<sub>1</sub> y O<sub>5</sub>. Las propiedades antigénicas de B. bronchiseptica, son variables por el tipo de nutrientes usados para su crecimiento y por el número de pases seriados hechos en el laboratorio en medios de crecimiento. Además cepas de laboratorio han fallado en la aglutinación con suero preparado contra cepas aisladas frescas. Un antígeno (Proteína de membrana de 68 Kd) de B. bronchiseptica, fue identificado mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que reconoce dos determinantes que no cruzan entre sí. Este anticuerpo también reaccionó con proteínas homólogas de B. pertussis pero no con otros 12 organismos de otros géneros de bacterias (Montaraz y cols., 1985).

#### 1.2.1.6. Enzimas y Toxinas.

Todas las especies de Bordetella sintetizan por lo menos una toxina, la cual es similar química y biológicamente al lipopolisacárido de otros Gram negativos (Evans y Mai, 1939; Maitland y MacLennan, 1960). Además de una toxina termolábil, preparada a partir de extractos libres de B. bronchiseptica y B. pertussis que ha resultado ser tóxica en cuyes y en ratón, produciendo lesiones dermonecrotóxicas, cuando la toxina es inoculada intradérmicamente a estos animales.

Cuando la toxina fue inoculada intravenosamente en conejos, inicialmente se indujo una hiperglicemia, con posterior hipoglucemia y acabando finalmente en la muerte. El factor inductivo a hipoglucemia fue reducido o eliminado, cuando se calentó la toxina a 55 °C / 30 mins. ( Oddy y Evans, 1940). La toxina fue sensible a la formalina, no fue antigénica, y perdió la potencia después de la filtración a través de un filtro-Seitz-E-R. En contraste, Evans (1940) encontró que B. bronchiseptica formalinizada fue antigénica y una antitoxina así preparada bloqueó la toxina de B. bronchiseptica, además de neutralizar a las toxinas de todas las especies de Bordetella. Se ha descubierto una gran actividad de adenilatociclasa en cultivos en fase I en las tres especies de Bordetella, que liberan esta enzima al fluido, excepto B. pertussis, que produjo más actividad intracelular (Endoh y cols, 1980). Cultivos en la fase III de estas especies no tienen actividad enzimática extracelular e intracelular. Han sido descritos 3 tipos de aglutinógenos en B. bronchiseptica y son los siguientes: antígeno flagelar II, antígeno O de superficie y un antígeno termoestable (Eldering, 1942; Lautrop y Lucas, 1960). Debido a que B. pertussis y B. parapertussis son inmóviles, carecen por lo tanto del antígeno H, pero las tres especies de Bordetella, tienen un antígeno O compartido similar, y una toxina antigénica, termolábil, hemorrágica ( Eldering, 1938). Cada especie mostró un antígeno K mayor diferente, con variaciones en los números de antígenos parciales K (Anderse, 1953). Un total de 14 antígenos K, han

sido encontrados en las tres especies de Bordetella.

### 1.2.2. Participación de Bordetella bronchiseptica en la Rinitis Atrófica.

La bordetellosis y la RA han sido estrictamente ligadas en muchísimas ocasiones como virtuales sinónimos (Ogata y cols, 1970; Switzer y Farrington, 1975; Switzer, 1981). Una parte sustancial de esta opinión se sostiene en el oeste de Europa y de una manera extensa y precisa se ha involucrado, este microorganismos en la RA (Done, 1975; DeJohns y cols., 1976; Tornoe y cols, 1976; Giles y cols, 1980; Woodmins, 1980; Pedersen y Barford, 1981; Rutter, 1981; Whittlestone, 1982). Aunque esta opinión es variada en cuanto a la naturaleza exacta de esta relación o asociación.

Este microorganismo esta asociado con infecciones respiratorias en animales, particularmente RA de cerdos (Chang y cols.,1975; Bermis y Appel,1977). Esta enfermedad esta caracterizada por atrofia de los huesos de los cornetes nasales, pneumonia y crecimiento retardado (Foged y cols.,1987; Pedersen y cols.,19801). La prevalencia de B. bronchiseptica es muy alta en la población de cerdos de los países con una alta productividad. Estudios en los Estados Unidos en el cultivo de muestras nasales de cerdos jóvenes se ha demostrado en el 25 al 54% de los animales (Ross y Harris, 1969) y en cerca del 11% de los cerdos adultos (Farrington y Switzer, 1977 y Jenkins y cols, 1977). Los resultados de las estimaciones en el oeste de Europa muestran una alta prevalencia (Cameron y cols., 1980). En el



Este de Inglaterra en los cerdos de engorda, se estimó que el 49% de los mismos cerdos alberga el microorganismo (Anon, 1954).

La transmisión de B. bronchiseptica de cerdo a cerdo es por aerosoles. La alta prevalencia de la infección en cerdos en desarrollo, sugiere que la transmisión puede ocurrir en cualquier edad, pero es más probable en cerdos jóvenes susceptibles, en los cuales se produce una activa rinitis, con estornudos, por lo que la enfermedad puede distribuirse rápidamente (Smith y cols, 1982). Los factores que predisponen a la infección pueden ser diversos pero el más importante parece ser la edad; la habilidad del cerdo lactante a resistir la infección, depende no únicamente del desafío, también del grado de protección pasiva proporcionado por la cerdas que se encuentran infectadas en la piara (Guiles, 1981).

Las observaciones sobre la enfermedad experimental son numerosas, así como los efectos clínicos y patológicos de la infección están bien documentados. Esta bacteria ha sido ampliamente aislada de cerdos jóvenes con rinitis atrófica en brotes de la enfermedad, en cerdos con neuomonía y en animales sin signos clínicos de la enfermedad. Este microorganismo también es un patógeno potencial en otros mamíferos, incluyendo perro, gato y ratas (Goodnow, 1980).

La patogénesis de B. bronchiseptica en la cavidad nasal ha sido estudiada en detalle, particularmente en cuanto a la naturaleza y el efecto de los factores tóxicos del

organismo y el daño osteoblástico producido en el desarrollo del hueso. Sin embargo el mecanismo preciso por el cual el microorganismo produce las lesiones en los cornetes permanece incierto.

Se considera que la colonización de B. bronchiseptica en la cavidad nasal ocurre por adherencia del microorganismo, este se une preferentemente a las células de los epitelios ciliados (Yokomizu y Shimizu, 1979). Esto es seguido por la multiplicación de la bacteria sobre la superficie de la mucosa y producción de cambios inflamatorios proliferativos y degenerativos en el epitelio nasal, incluyendo la pérdida de cilios (Duncan y cols, 1966; Edington y cols, 1976) El organismo no es considerado un invasor de tejidos profundos, esto supone que en la mucosa elabora un factor agresivo o una toxina que se extiende al tejido óseo de los cornetes y es responsable de la osteopatía (Harris y cols, 1971).

Extractos libres de células en fase I de esta bacteria, contienen una toxina termolábil, dermonecrotóxica, que es probablemente un factor importante en la patogénesis. Cuando este extracto fue inoculado intranasalmente en cerdos, desarrollaron lesiones nasales similares a la RA (Hanada y cols., 1979; Nakasé y cols., 1980). Existen algunas variaciones en la toxigenicidad de las diferentes fases de B. bronchiseptica aisladas de cerdos; cepas en fase I son más toxigénicas que las de fase III (Rutter y Collins, 1983), pero aparentemente no existe diferencias entre las cepas de las

piaras con y sin RA (Rutter y cols., 1982).

Por largo tiempo se ha considerado (Schofield y Jones, 1950) que una osteogenesis deficiente, en lugar de una osteolisis marcada, es el mecanismo fundamentalmente básico en el desarrollo de la hipoplasia de los cornetes en cerdos jóvenes. Observaciones ultraestructurales tienden a confirmar esto, los estudios han revelado que los osteoblastos (en el interior del periosteum), son las células donde ocurren las anomalías en la rinitis hipoplástica inducida por B. bronchiseptica (Fetter y cols., 1975; Silveira y cols., 1982). Se presume que el factor tóxico o tóxicos liberados por el microorganismo pueden inducir estos cambios en los osteoblastos diferenciados, la actividad de fosfatasa alcalina en los huesos de los cornetes se presenta disminuida en 4 días después de la infección experimental con la bacteria. Esta actividad enzimática se incrementa 2 semanas después de la infección, sin embargo, la acción del factor tóxico sobre los osteoblastos es de duración más limitada que la persistencia de la infección (Silveira y cols., 1982).

En 1975 Switzer demostró que la rinitis atrófica se puede inducir en el laboratorio, por medio de cultivos puros de la bacteria aplicada a los cornetes nasales, el papel primario de la B. bronchiseptica en cerdos no fue sin embargo completamente aclarado. Durante el siguiente año Switzer fue apoyado por otros investigadores alrededor del mundo (Brassine y cols., 1976; McCandlish y cols., 1976; Tornoe y Nielsen, 1976).

El papel de B. bronchiseptica como patógeno primario en las infecciones respiratorias en animales de laboratorio ha sido ya aceptado (Fisk y Soave, 1973). Las lesiones dermonecróticas producidas por la DNT, así como las reacciones adversas sistémicas, han sido observadas en animales de laboratorio, después de inyectar la toxina.

Las observaciones realizadas sin embargo solo permiten especular que la toxina esta involucrada en los mecanismos patogénicos involucrados en la atrofia inducida por B. bronchiseptica en los tejidos de los cornetes nasales de los cerdos (Skelly y cols., 1980).

Recientemente, un investigador realizó estudios *in vivo*, usando un extracto sonicado libre de células de B. bronchiseptica, este fue inoculado intranasalmente en cerdos jóvenes que se observaron durante 60 días, y se encontró una variación en la fragilidad de los cornetes nasales de los animales tratados. El extracto fue fraccionado, en un componente endotóxico y uno dermonecrotóxico termolábil. Al inocular la parte endotóxica a ratones jóvenes, no desarrollaron lesiones de atrofia en los cornetes nasales, mientras que si se desarrolló una severa atrofia de cornetes nasales con la toxina dermonecrotóxica (Nakase y cols., 1985). Harris y cols., (1971) proponen que B. bronchiseptica libera un factor tóxico, que altera la formación normal del hueso del cornete nasal, el daño sería producido por la DNT termolábil en lugar de la endotoxina, además de otros factores tóxicos que son producidos por la B.

### bronchiseptica.

También se ha demostrado que la administración intravenosa de histaminágenos, con B. bronchiseptica, produce un incremento significativo en el grado de descarga de receptores irritantes en el pulmón. Este estudio sugirió que existe un factor sensible a la histamina es producida por la B. bronchiseptica (Dixon y cols., 1979).

Otros autores, infectando a ratones lactantes de 2 a 5 días de edad por vía intranasal con un cultivo de B. bronchiseptica obtuvieron lesiones histopatológicas semejantes a las ocasionadas por la rinitis atrófica (Sawata y Kume, 1982; Magyar y cols., 1984; Magyar, 1987). Por otro lado también se detectó una disminución en el peso de los bazo de los ratones infectados y por último, ratones lactantes que fueron inoculados con B. bronchiseptica por vía intracerebral o intravenosa murieron. (Elias, 1985; Magyar, 1987).

#### 1.2.3. Estudios de Inmunidad en Bordetella bronchiseptica.

Las bacterinas que se han utilizado de B. bronchiseptica, para prevenir la distorsión facial y la atrofia de los cornetes nasales, solo han mostrado que disminuyen la infección en la membrana nasal (Hanada y cols., 1979). Harris y Switzer (1969), no pudieron inducir resistencia nasal, contra una infección con B. bronchiseptica en cerdos vacunados por vía intramuscular, con una bacterina a base de células completas y sin adyuvante. En estudios posteriores Harris y Switzer (1972) demostraron que reduce la infección

nasal en cerdos vacunados subcutáneamente con otra bacterina a base de células sonicadas.

La prevención de la infección de la mucosa del tracto respiratorio por la B. bronchiseptica (pulmón, tráquea, o cornetes nasales), parece ser depender de la inhibición de la adhesión y colonización por la bacteria. Se cuenta con pocos reportes de una infección septisémica, la inhibición de estas infecciones parece ser dependiente de una actividad localizada de aglutininas, antitoxinas humorales o factores inmunes celulares. Los preparados de antígenos de B. bronchiseptica han sido administrados en una variedad de formas, con y sin adyuvante y por diferentes vías de administración. Se han realizado estudios de inmunidad con el uso de Ag de B. pertussis (Harris y Switzer, 1972). Se han usado vacunas de B. bronchiseptica viva avirulenta o de subunidades, para inmunizar cerdos, cuyes y perros (Bercovich y Oosterwoud, 1977; Pedersen y Barfod, 1977; Goodnow y cols., 1979; Giles y Smith, 1982).

Las células completas inactivadas químicamente de B. bronchiseptica, con adyuvante completo de Freund o hidróxido de aluminio, han sido utilizadas exitosamente para inmunizar cuyes contra la muerte, pero no de la bronconeumonía, resultante de una infección natural o inducida en el laboratorio (Ganaway, 1965; Little, 1975; Fitzi, 1975; Giles y Smith, 1982).

Con el uso de un anticuerpo monoclonal se ha identificado un antígeno (una proteína de membrana de 68 kd) presente en B. bronchiseptica y también en B. pertussis y B. parapertussis.

Este anticuerpo protege a ratones de la infección por aerosol con B. bronchiseptica con mortalidad reducida y lesiones leves en cornetes. El antígeno de membrana de B. bronchiseptica se purificó por cromatografía de afinidad y se evaluó al inmunizar ratones que fueron desafiados, intraperitonealmente y por aerosoles con B. bronchiseptica. La inmunización con el antígeno de 68Kd en adyuvante incompleto de Freund, redujo significativamente los niveles de mortalidad en los ratones desafiados intraperitonealmente. En el modelo de infección por aerosoles, la inyección del antígeno 68kd con adyuvante completo e incompleto de Freund o con saponina redujo las cuentas bacterianas en el pulmón de los ratones desafiados infectados. Estos resultados sugieren que la proteína 68kd puede corresponder a un antígeno de protección para B. bronchiseptica (Montaraz y cols., 1985).

### 1.3.1. Características Generales de P. multocida

#### 1.3.1.1. Morfología.

Cuando P. multocida se aísla de los animales que murieron por la infección, se observa como un cocobacilo pequeño, aproximadamente 1.0  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  de longitud y 1.0  $\mu\text{m}$  de ancho (Buxton y Fraser, 1977; Nicolet, 1985).

#### 1.3.1.2. Antígenos.

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 tipos de esta especie, caracterizando cuatro tipos en base a pruebas de protección en ratón, 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 clasificación 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).

Se han estudiado doce tipos de antígenos somáticos denominados del 1 al 12 (Namioka y Murata, 1961). Mediante



pruebas de inmunodifusión y extractos salinos de células capsuladas y no capsuladas formalinizadas y calentadas a 100 C durante una hora, se han determinado diez y seis (1-16) tipos somáticos de P. multocida de origen aviario (Heddleston y cols., 1972).

### 1.3.1.3. Toxinas.

En Europa, se ha demostrado que las pasteurelas aisladas de casos de rinitis atrófica pertenecen al serotipo D, y se caracterizan por producir toxinas que se identifican por medio de pruebas biológicas, como la producción de una lesión dermonecrótica (DNT) (de Jong y cols., 1980); inoculación intraperitoneal a ratones para estudios de letalidad (Rutter, 1983) o pruebas de toxicidad en cultivos de tejidos (Lastra y Pijoan, 1984). Nakai y cols., (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 sugiere que se trata de glicoproteínas que tienen propiedades biológicas y actividades tóxicas similares, pero difieren una en pruebas de neutralización cruzada. En trabajos similares realizados por Niels y cols., (1986) se encontró que la DNT+ de P. multocida tipo D (cepa 45/78) obtenida de sobrenadantes, tuvo un PM de 143,000 d y

concluyeron que resultó similar en cuanto a actividad biológica, pero diferente 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.

La caracterización del lipopolisacárido (LPS) de algunas cepas de P. multocida (14 tipo A; 11 tipo B; 5 tipo D y 3 tipo E), han revelado la presencia de monosacáridos como la glucosamina, galactosamina, L-glicero-D-mannoheptosa, D-glicero-D-mannoheptosa, glucosa y galactosa, lo que ha permitido subdividir esta especie en cuatro tipos químicos (I-IV), sin embargo no se encontró una equivalencia con los serotipos de Carter (Erler y cols., 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).

#### 1.3.1.4. Material Extracromosomal.

En México, Mendoza (1985) aisló una exotoxina en los sobrenadantes de cultivos de 18 horas; los hallazgos hicieron pensar que la fracción de PM de 22,000 d fue 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 y cols., (1984), además en este trabajo la cepa control de P. multocida tipo D mostró tener un plásmido de un tamaño de

alrededor de 5.2 Kb en geles de agarosa, esta banda parece ser responsable de la presencia (DNT) en el plásmido que dio una reacción dermonecrótica en la piel de cuye en comparación con la cepa "curada" (tratada con 400 ug de naranja de acridina), no mostró la presencia de plásmido y no mostró la reacción en la piel de cuye. Además con la pérdida del material extracromosomal, se perdió la resistencia a varios antibióticos, lo que sugiere que estos factores están en el mismo plásmido. En un estudio en Estados Unidos, en donde se aislaron 58 cepas de P. multocida serotipo 3 de pavos, encontraron la presencia de plásmido R, en donde 7 de estas cepas, se encontró resistencia a estreptomicina, tetraciclinas y sulfonamidas, (Hirsh y cols., 1984). También se ha demostrado en cepas de P. haemolytica aisladas del tracto respiratorio de ganado vacuno resistencia a tetraciclina y ampicilina, codificada en DNA extracromosomal (Richards y cols, 1984; Boyce y Marter, 1986). En otro estudio con 5 cepas de P. haemolytica, solo tres de ellas presentaron plásmidos medianos con resistencia hacia algunos antibióticos (Jackwood y cols., 1987).

### 1.3.2. Importancia de Pasteurella multocida en la Rinitis Atrófica.

Pasteurella multocida es un agente extremadamente común en las neumonías del cerdo. 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 P. multocida es el

principal agente involucrado en las "neumonías crónicas" del cerdo (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 en la "neumonía crónica" (Morrison y cols., 1985).

Las características biotípicas de P. multocida aisladas de cerdos como son: la producción de toxinas, y otras ya descritas (Buxton y Fraser, 1977) son importantes en la virulencia de la misma, pero solo en la rinitis atrófica y no en las neumonías. Se ha demostrado que las cepas de P. multocida que son importantes en Rinitis Atrófica son las de tipo D toxigénicas (DNT+), sin embargo, estas no son patógenas para el pulmón (Pijoan, 1985).

La flora nasal del cerdo rinitico se compone en un 80% de P. multocida tipo D y 20% de tipo A y mientras que la flora pulmonar del cerdo neumónico es 55% de tipo A y 15% de tipo D. Se ha demostrado que esto se debe al comportamiento del macrófago alveolar ya que ésta célula es capaz de fagocitar rápidamente a las cepas D pero no a las cepas A, aparentemente debido a que las cepas A poseen una espesa cápsula 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 el caso de la rinitis atrófica, se ha demostrado que

la invasión secundaria por P. multocida, se llevaría a cabo después de una infección con B. bronchiseptica, induciendo lesiones más severas e intensificando el desarrollo de la atrofia de los cornetes, estos estudios sugieren que P. multocida, juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad, (Pedersen y Barfod, 1981; Martineau, 1982; Runnels, 1982; Rutter y Rojas, 1982). Estudios con cepas toxigénicas de P. multocida inoculadas después de la irritación con ácido acético, han inducido el desarrollo de la rinitis atrófica, asociada con la reabsorción inicial del hueso y con la falla de la osteogénesis, debido al daño sobre los osteoblastos (Switzer y cols., 1975; Smith y cols., 1982). Por otro lado, no se ha encontrado que P. multocida produzca una respuesta inflamatoria en el desarrollo de la rinitis atrófica y si un factor que estimula la reabsorción del hueso y suprime la síntesis osteoide (Pedersen y Elling, 1984).

Mediante microscopía electrónica, se ha encontrado la presencia de fimbrias en P. multocida que se han asociado a su patogenicidad, (Comunicación personal Pijoan y Trigo, 1988). A pesar de esto es difícil de llevar a cabo la colonización en las fosas nasales de cerdos sanos con P. multocida, a menos que se combine con Bordetella bronchiseptica o que se presenten otros factores predisponentes (Rutter, 1983; Pijoan y Morrison, 1985).

#### 1.4. Aerosoles y su Importancia en las infecciones respiratorias.

La diseminación se produce de las infecciones respiratorias por los microorganismos inhalados y depende de la producción de partículas coloidales, líquidas o sólidas, suficientemente pequeñas ser capaces de permanecer estables en el aire por periodos de tiempo relativamente largos (Thomson y Gilka, 1974). La generación de aerosoles se lleva a cabo a través del reflejo de la tos y el estornudo y pueden ser expelidas a la atmósfera más de un millón de gotas de un tamaño entre 1 y 15  $\mu\text{m}$  (Gerone y cols., 1966).

En el tracto respiratorio, la velocidad del aire es suficientemente elevada para formar aerosoles que pueden ser inspirados o expirados durante la respiración normal, al menos en los animales donde la longitud del aparato respiratorio superior es considerable (Grey y Thomson, 1971).

El 48% de las partículas que se generan en la cavidad nasal presentan un tamaño que puede variar entre 0.5 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, a causa de la evaporación quedan reducidas a lo que se ha denominado "Núcleos de Gotas"; este tamaño permite que puedan permanecer en el aire durante varias horas, antes de ser depositadas en el suelo por la fuerza gravitacional (Dunill, 1979). Experimentalmente pueden crearse aerosoles de distintos tipos y se han clasificadas como monodispersos, aquellos en los que la mayoría de las partículas tienen el mismo tamaño; polidispersos aquellos que no son homogéneos (Mercer, 1973).

#### 1.4.1. Distribución y mecanismos de depósito de las partículas inhaladas.

El lugar de deposición depende de las propiedades físicas de la partícula, así como de la profundidad y frecuencia de la respiración. Las partículas mayores a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro son retenidas en el aparato respiratorio superior, esto se explica por los cambios bruscos de dirección y turbulencia del flujo de aire en los cornetes, laringe y bifurcación bronquial. Las partículas comprendidas entre 2 y 0.5  $\mu\text{m}$  pueden alcanzar el alvéolo y las partículas menores de 0.5  $\mu\text{m}$  tienden a ser retenidas en lugares próximos a bronquios terminales o bien salir expiradas (Hatch, 1961). La velocidad del aire va disminuyendo paulatinamente a lo largo de las vías aéreas, hasta ser prácticamente nula a nivel del alvéolo, y solo un 10% del volumen inspirado es recambiado con el volumen residual del pulmón y se considera que la zona de reemplazo es mínimo en esta zona alveolar (Durnill, 1979), y depende de la profundidad y frecuencia respiratoria, así como de la especie animal, peso corporal y factores ambientales (Phillis, 1976).

Para explicar los mecanismos de depósito de partículas en el aparato respiratorio se se han propuesto: impacto de sedimentación y movimiento Browniano. La importancia de estos mecanismos dependerá del tamaño, forma, densidad, solubilidad, estructura de la superficie y tensión superficial, así como de la velocidad del flujo aéreo y de

las características aerodinámicas de las vías respiratorias. El impacto ocurre primero en la nariz y vías respiratorias superiores, por este mecanismo se deposita el mayor número de partículas y se considera como la fuerza a la que es suspendida y es bruscamente desviada, como ocurre en cornetes nasales y bifurcaciones de bronquios (Dunill, 1979).

#### **1.4.2. Aerosoles Bacterianos**

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

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

#### **1.4.3. Modelos Experimentales de remoción Bacteriana**

Diversas adaptaciones se han realizado para aerolizar a grandes especies y medir su remoción, así como para controlar las condiciones de la aerolización: humedad, temperatura del aire, velocidad de flujo de presión del aire y aparatos para recuperar las bacterias aerolizadas. Los aerosoles han sido ampliamente utilizados por diferentes autores, para llevar a



cabo diversos experimentos, (Beard y Easterday, 1965; Lillie y Thomson, 1972; Osborne y cols., 1985; Jericho, 1987; Zinck y Yaker, 1987). Los experimentos sofisticados han llevado recientemente a utilizar nebulizadores ultrasónicos que permiten controlar el tamaño de la partícula y obtener una mayor densidad del aerosol (saunders y Sebunya, 1983). La determinación de la remoción bacteriana del pulmón es un método "in vivo" que se utiliza para medir la velocidad a la cual las bacterias inhaladas desaparecen del tracto respiratorio. Con este método se puede evaluar la capacidad del pulmón para inactivar las bacterias en él depositadas, puede calcularse el número de microorganismos depositados y los índices de retención-remoción de bacterias a distintos tiempos postexposición. Como desventaja cabe apuntar que este método por sí solo no puede diferenciar que mecanismo de defensa pulmonar está afectado y en que proporción el aparato mucociliar o el sistema de fagocitosis, está actuando (López y cols., 1976; Jones, 1983; Jericho, 1987).

Los factores que determinan la remoción pulmonar de bacterias, y con ello el establecimiento de la infección o por lo contrario la eliminación bacteriana serían: la concentración y volumen del inóculo, virulencia de la bacteria y el estado de los mecanismos de defensa del pulmón (Green y cols., 1978; Nugent y Pesanti, (1982).

## 2.0. OBJETIVOS.

La rinitis atrófica, enfermedad infectocontagiosa, ampliamente distribuida en la población porcina se caracteriza por producir atrofia en los cornetes nasales así como una baja en los parámetros productivos (Goodnow, 1980; Leman y cols, 1981 y Trigo y Pijoan, 1988). En México no hay información disponible en cuanto a las propiedades de las cepas de B. bronchiseptica y P. multocida tipo "D" asociadas con rinitis atrófica por lo que el presente trabajo persigue los siguientes objetivos:

### **Objetivo General:**

Determinar la patogenicidad, mediante la identificación de toxinas, de cepas de Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica, aisladas a partir de cerdos con problemas de rinitis atrófica.

### **Objetivos Particulares:**

1. Encontrar similitud ó diferencias entre las toxinas de las cepas de ambas bacterias por medio de tres pruebas biológicas como son: Induración y Necrosis en piel de cuye; Muerte de ratón lactente y Atrofia de bazo en ratones de 21 días.
2. Indagar si en P. multocida y B. bronchiseptica, la producción de las dermonecrotoxinas (DNT) están codificadas en DNA extracrosomal y así comparar los patrones electroforéticos en geles de agarosa por medio de su extracción.

## 2.0. OBJETIVOS.

La rinitis atrófica, enfermedad infectocontagiosa, ampliamente distribuida en la población porcina se caracteriza por producir atrofia en los cornetes nasales así como una baja en los parámetros productivos (Goodnow, 1980; Leman y cols, 1981 y Trigo y Pijoan, 1988). En México no hay información disponible en cuanto a las propiedades de las cepas de B. bronchiseptica y P. multocida tipo "D" asociadas con rinitis atrófica por lo que el presente trabajo persigue los siguientes objetivos:

### **Objetivo General:**

Determinar la patogenicidad, mediante la identificación de toxinas, de cepas de Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica, aisladas a partir de cerdos con problemas de rinitis atrófica.

### **Objetivos Particulares:**

1. Encontrar similitud ó diferencias entre las toxinas de las cepas de ambas bacterias por medio de tres pruebas biológicas como son: Induración y Necrosis en piel de cuye; Muerte de ratón lactente y Atrofia de bazo en ratones de 21 días.
2. Indagar si en P. multocida y B. bronchiseptica, la producción de las dermonecrotinas (DNT) están codificadas en DNA extracrosomal y así comparar los patrones electroforéticos en geles de agarosa por medio de su extracción.

3. Demostrar el efecto citotóxico de las tóxicas de ambas bacterias en diferentes líneas celulares.

4. Evaluar un sistema de infección por aerosol con Bordetella bronchiseptica en ratones y emplearlo para desarrollar un modelo experimental de rinitis atrófica.

### 3.0 MATERIAL Y METODOS

#### 3.1.0 Colección de Muestras en Granjas

Para determinar la presencia de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida se tomaron un total de 61 muestras de secreción nasal de cerdos de diferente edad (5 días, 5 semanas y 5 meses) de una granja con rinitis atrófica, ubicada en Cuautitlán de Romero Rubio, Edo. de Méx. Las muestras se colectaron en forma aseptica desinfectando con alcohol al 70% el rodete y las fosas nasales. De cada cerdo se tomó la secreción nasal con un hisopo y se depositó en un tubo con caldo nutritivo como medio de transporte, todas las muestras se almacenaron a 4 C (Runnell, 1980).

#### 3.1.1. Clasificación de las Muestras

La clasificación primaria de las muestras se hizo atendiendo al aspecto clínico que presentaban los cerdos como: estornudos, secreción nasal, dificultad en la respiración y la deformación de los cornetes. De acuerdo a este criterio 41 muestras se etiquetaron como "Rinitis Atrófica" de diferente grado y los restantes 20 lechones sin signos clínicos aparentes sirvieron como controles.

#### 3.1.2. Aislamiento

Las muestras se sembraron en agar Mc Conkey al 1% de glucosa y agar gelosa sangre (5% de sangre de bovino v/v), incubándose éstas en aerobiosis a 37 C .A las 18 horas y observando el aspecto de las diferentes colonias aisladas se subcultivaron en nuevas placas de agar Mc Conkey y agar sangre (Cowan y Stell, 1974).

### 3.1.3. Identificación por pruebas bioquímicas

En relación a lo publicado por diversos autores, se determinó que las pruebas mínimas para la identificación de las especies de Pasteurella y Bordetella deberían incluir : Tinción de Gram, oxidasa, catalasa, oxidación-fermentación, motilidad, crecimiento en agar Mc Conkey, hemólisis en agar sangre al 3%, indol, ureasa, producción de H<sub>2</sub>S, producción de ácido a do a partir de glucosa, sacarosa, manitol, rafinosa, trehalosa y arabinosa. También se tomaron en cuenta las características menos objetivas como morfología colonial y aroma del cultivo (Mc Allister y Carter, 1974; Cowan y Steel, 1974; Carter, 1975; Simmons y Simpson, 1977; Thigpen y cols., 1978).

### 3.2.0. Tipicación de Pasteurella multocida, tipo "D"

#### 3.2.1. Prueba de Hialuronidasa Testicular Bovina

La hialuronidasa testicular bovina se disolvió en solución salina amortiguada (PBS) pH 7.2 a una concentración final de 1000 UI /ml . La solución se esterilizó por filtración con membranas Millipore de 0.22 um de diámetro. Pasteurella multocida se sembró en agar infusión cerebro corazón (BHI), en estria y en el centro de dicha estria se depositó un disco de papel de filtro estéril en el se depositaron 20 ul de la solución de hialuronidasa testicular bovina. Las placas se incubaron a 37 C y la lectura se realizó a las 24 horas. Se consideró positiva la prueba cuando el área de descapsulación, alrededor de la estria, fue superior a un centímetro ( Carter y Rundell, 1975).

### 3.2.2 Prueba de Acriflavina

P. multocida se cultivó en caldo BHI y 24 horas después el cultivo se centrifugó a 1000 x g durante 45 min. El líquido sobrenadante se descartó dejando una pequeña cantidad del mismo para resuspender las bacterias. A cada tubo se le agregó un volumen igual de acriflavina 1:1000. Los tubos se agitaron y la lectura se realizó después de 5 y 30 min. de incubación a temperatura ambiente. Un precipitado granular se tomó como resultado positivo (Carter y Subronto, 1973).

### 3.3.0 Pruebas Biológicas para la Identificación de la DNT

#### 3.3.1 Producción de Exotoxina Dermonecrotóxica (DNT)

Para detectar cepas de P. multocida tipo "D" y B. bronchiseptica productoras de exotoxina dermonecrotóxica se siguió la técnica de De Jong y cols. (1980). Se cultivaron las bacterias en caldo BHI durante 18 horas a 37 C, el líquido sobrenadante se centrifugó a 3000 x g durante 45 min. y se filtró con membrana millipore de 0.45 um de diámetro. El líquido sobrenadante se sometió a las siguientes pruebas:

##### 3.3.1.1. Prueba de la DNT en la piel de cuye

Los cuyes se rasuraron en la región dorsal (lomo) y se dividió en 6 áreas en las que se inocularon por vía intradérmica 0.1 ml del sobrenadante filtrado. A las 24 y 48 hrs. se observó la presencia de una reacción cutánea que consistió en: eritema, edema, induración y necrosis (Prueba de Induración en piel de cuye, IPC). Las reacciones eritematosas, con endurecimiento de 1 cm de diámetro se

consideraron positivas, repitiéndose las que dieron reacciones de 0.5 cm (De Jong, 1980).

### 3.3.1.2. Pruebas de Letalidad en ratón lactante.

Ratones lactantes (de tres días de edad), cepa NHI-3 se dividieron en varios grupos, cada uno formado por 4 ratones y a cada uno de ellos se le inoculó por vía intracerebral 0.1ml de los sobrenadantes de ambas bacterias. Los ratones controles se inocularon con PBS pH 7.2. Los resultados se realizaron de las 18 a 24 horas. La reacción positiva, se determinó por la muerte de los ratones (MRL) (Nakai y cols, 1984). Los ratones controles se inocularon con solución PBS pH7.2.

### 3.3.1.3. Efecto en el Bazo de Ratones de 21 días.

Se formaron grupos de 4 ratones cepa NIH-3 cada uno, a los cuales se les inoculó por vía intra peritoneal a cada ratón 0.1ml del sobrenadante filtrado. Después de 7 días posinoculación, los ratones se sacrificaron, se colectaron los bazos y se midieron. Los bazos que presentaban un 25 % de reducción en tamaño (atrofia), se consideraron como positivos a la prueba (ABR) (Nakai y cols., 1984).

### 3.4.0 Selección de P. multocida y B. bronchiseptica

Las cepas seleccionadas se identificaron como "patógenas", cuando resultaron positivas en los parámetros de IPC, MRL y ABR. Asimismo se seleccionaron cepas que fueron negativas a IPC, MRL y ABR que se identificaron como "no patógenas".



(Nakai y cols, 1984).

### 3.5.0 Presencia de Plásmidos en P. multocida y B. bronchiseptica

El aislamiento del material genético extracromosómico (DNAP). Se realizó por la técnica de lisis alcalina de Birnboim and Doily (1979), en las cepas estudiadas. Un cultivo de 5 ml de 18 hrs. se centrifugó a 3000 x g / 30 min. y se cosecharon las bacterias, se resuspendieron en 200 ul de la solución A (Glucosa 50 mM; EDTA 1 mM; Tris 10 mM pH 8; Lisozima 5 mg/ml) por 5 a 10 min, agitando suavemente, se agregaron 400ul de la solución B (SDS 1%P/V en NaOH 0.2N) y se dejó reposar durante 10 min., después se le adicionaron 300ul de la solución C (Acetato de sodio 3M pH 4.8) e inmediatamente que se formó el coágulo, se agitolentamente, evitando romperlo y la formación de emulsión, se congeló en hielo seco-etanol de 1 a 5 min., se descongeló y se tomó el sobrenadante pasándolo a tubos Eppendorf estériles, se centrifugó nuevamente a 12000 x g, durante 15 min., el sobrenadante se pasó a tubos nuevos y se agregó 500 ul de etanol absoluto (-70 C), se descongeló de 5 a 15 min. en la mezcla etanol-hielo seco, se descongeló y se lavó tres veces con etanol frío (-20 C) al 90% ,con previa centrifugación, se dejó secar la pastilla y se resuperdió en Tris- EDTA (20 ul), posteriormente se tomaron 7 ul de la muestra resuspendida y se le agregó de 1 a 2 ul de colorante (mezcla de xilencianol y azul de bromofenol 1:1) en glicerol al 20%. en un gel de agarosa al 0.7% con 10 pocillos se colocaron las muestras en cada uno de ellos. En un pocillo

se colocó el genoma del fago restringido con la endonucleasa Hind III. Se corrió el gel con una fuente de poder durante 45 min., a 85 volts, después de determinada la corrida, se reveló con bromuro de etidido a una concentración de 0.5 mg/ml, se lavó con agua destilada el gel y se observó en un transluminador de ultravioleta.

### 3.6.0 Efecto de la Dornonecrotoxina en Cultivos Celulares.

Se cultivaron líneas celulares PK-15, VERO y MDBK en medio mínimo esencial (MEM) de Eagle con sales de Hank's suplementado con piruvato de sodio 1 mM, 10% de suero de ternera y antibióticos (penicilina 100 UI / ml y estreptomina 100 ug/ml) en botellas FALCON de 75 mm (Corning, USA). Una vez formado el monoestrato se le retiró el medio de crecimiento, se lavó dos veces con PBS, (pH 7.2) y se inoculó 0.1 ml del sobrenadante extraído de los cultivos de P. multocida y B. bronchiseptica. Los cultivos se incubaron 1 hora a 37 °C, durante un máximo de 10 días y se revisaron diariamente para observar la aparición de efecto citotóxico (Pennings y cols., 1984).

### 3.7.0 Estudio de la Infección de B. bronchiseptica en ratones por medio de aerosoles..

#### 3.7.1. Cámara de aerolización.

Para la infección por aerolización de los ratones se empleó una cámara rectangular de metal, herméticamente sellada, cuyas dimensiones están especificadas en la Figura No.1. La

FIGURA No.1.-VISTA DE PLANTA DE LA CAMARA  
DISEÑADA PARA INFECTAR RATONES CON Bordetella  
bronchiseptica. SE EMPLEARON 5 ml. DE  
SUSPENSION DE  $5 \times 10^{10}$  UFC/ML PARA INOCULAR A 46  
RATONES DEL GRUPO II A UN FLUJO DE 0.5 ML /  
MIN. EL GRUPO CONTROL, SE AEROLIZO EN LAS  
MISMAS CONDICIONES PERO EN LUGAR DE EMPLEAR LA  
SUSPENSION BACTERIANA, SE UTILIZO CALDO BHI  
ESTERIL.

cámara esta formada de una tapa de cristal con sello de neopreno, un nebulizador (Devilbiss Mod 645) conectado a una perforación lateral por medio de tuberías de latex para entrada y salida del aerosol, rejillas para prevenir accidentes con los ratones y baffles deflectores parabólicos en las esquinas que evitan la acumulación del aerosol en estos lugares. En la parte de salida del aerosol va conectado un matraz Kitasato con formaldehído al 10%, para inactivar a las bacterias. El flujo de aire para la producción del aerosol se generó con una bomba compresora (modelo B-131 Industria G, Murgia, S.A.) ajustada a 14.3 PSI 3 Kg/cm. Se empleó una bomba de vacío a 3 Kg/cm para aliviar la presión generada en la cámara, y propiciar la extracción de las bacterias.

### 3.7.2. Evaluación y Estandarización del Sistema.

La evaluación del sistema se efectuó formando dos grupos de 10 cajas de petri para cada uno de los dos experimentos y se procedió de la siguiente manera:

Grupo 1, Control negativo : aerosolizado con 5 ml de medio líquido estéril (BHI) durante 10 min. Antes de la aerolización se colocaron cajas de Petri con 1 ml de caldo BHI estéril dentro de la cámara en diferentes posiciones, para recibir el aerosol suspendido. A partir del medio de cultivo depositado en las cajas aerolizadas, se prepararon diluciones de base 10 hasta  $1 \times 10^{10}$  y se inocularon 3 gotas de 20 ul en placas de agar sangre. Después de un periodo 18 a

24 horas de incubación a 37 C, se determinaron las UFC/ml.

Grupo 2 : aerosolizado con 5 ml de una suspensión de Bordetella bronchiseptica en PBS a pH 7.2, a una concentración de  $5.3 \times 10^{10}$  UFC/ml, durante 10 mins.

De igual forma antes de la aerolización se colocaron las cajas de Petri con 1 ml de caldo de cultivo estéril y se colocaron en diferentes posiciones en la cámara para poder comparar las UFC presentes en cada posición. A partir de las bacterias depositadas en las cajas con medio de cultivo, se prepararon diluciones de base 10 hasta  $1 \times 10^{10}$  y se inocularon 3 gotas de 20 ul en placas de agar sangre y McConkey, tras 18 a 20 horas de incubación a 37 C se calcularon las UFC/ ml.

### 3.7.3. Patrón de Remoción de Bordetella bronchiseptica en ratones.

#### 3.7.3.1. Animales.

Se utilizaron 60 ratones machos de 9 a 14 g de peso de 21 días de edad, cepa NIH-3 obtenidos del bioterio del INIFAP. De forma aleatoria se formaron dos grupos, uno de 46 ratones para la infección con la bacteria y otro de 14 ratones para aerosolizarlos con medio de cultivo estéril. Se instalaron en jaulas independientes con agua y comida "ad libitum".

#### 3.7.3.2. Preparación del Inóculo.

Con un asa metálica se tomaron 5 colonias de la cepa 4 de Bordetella bronchiseptica, previamente desarrollada en gelosa sangre, con las que se inóculo un matraz nefelométrico que contenía 50 ml de caldo BHI. Este se cultivó en agitación a

<sup>o</sup>  
37 C y 120 rpm, hasta fase estacionaria, determinada por nefelometría a 660 nm en un espectrofotómetro. En la fase estacionaria, el contenido del matraz se centrifugó durante 45 min. a 3500xg. El paquete bacteriano fue lavado dos veces con PBS (pH 7.2), en el que finalmente se resuspendieron las bacterias para obtener una concentración final de bacterias de  $5 \times 10^{10}$  Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC/ml).

### 3.7.3.3. Aerolización.

De la suspensión bacteriana ajustada y lavada, se tomaron 5 ml con los que simultáneamente se aerolizaron los 46 ratones del experimento. Después de 10 min. de nebulización, los 46 animales se sacaron de la cámara y se pusieron en sus cajas con agua y comida. Se formó un grupo de 14 ratones de las mismas características que fueron aerolizados con medio de cultivo estéril (BHI), bajo las mismas constantes ( $t = 10$  min y  $C = 5$  ml). De igual forma los ratones fueron sacados de la cámara y puestos en sus cajas correspondientes.

### 3.7.3.4. Remoción en Pulmón.

De ambos grupos, se sacrificaron por desnucamiento 2 ratones a las 30 min, 1, 3, 5, 7 y 14 días post-desafío; los restantes en el grupo experimental a los 21 días. En una campana de flujo laminar se desinfectó el cuerpo del ratón con alcohol etílico al 70%. y en una mesa de disección se incidió la cavidad abdominal y por sección de la arteria renal izquierda se desangró el ratón. Al completarse el desangrado se abrió la cavidad torácica y de ella se extrajo el paquete cardio-pulmonar, cuidando de no seccionar el

esófago. Del paquete extraído se eliminaron el corazón, los grandes vasos, la tráquea y la porción extrapulmonar de los bronquios colocando el resto en un mortero Ten-Broeck estéril que contenía 5 ml de PBS. Los pulmones se homogeneizaron con 15 golpes de mortero; los homogeneizados se diluyeron en base 10, hasta la dilución  $10^{10}$  en PBS. De cada una de las diluciones, se sembraron tres gotas, en placas de agar sangre que se incubaron durante 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . El conteo del número de unidades formadoras de colonias por gota (UFC/gota) se realizó después de dicho periodo de incubación.

#### 3.7.3.5. Remoción en Cornete Nasal.

A los mismos ratones utilizados para el estudio de remoción bacteriana en pulmón se les decapitó y se disecó la región correspondiente a los cornetes nasales. Sosteniendo esta región con unas pinzas estériles, se lavaron con 1 ml de PBS contenido en una jeringa de 1 ml. Del lavado se realizaron diluciones en base 10, hasta la dilución  $10^{10}$ . De las diluciones se sembraron 3 gotas, 20 ul/gota, en placas de aga. sangre y placas de Mc-Conkey, que se incubaron durante 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , y se calculó el número de bacterias por cornete.

#### 3.7.3.6. Efecto en el crecimiento de los ratones infectados.

Tanto los animales el grupo experimental y como los del grupo control se sometieron a un seguimiento diario de su peso corporal antes, durante y al final del experimento.

### 3.8.0. Estudio Histopatológico.

Después de que los cornetes fueron cortados se les quitaron los bigotes, se fijaron. Y se conservaron en formaldehído al 10% en PBS durante dos semanas. Después de lavarlos de 4 a 6 veces con agua de la llave, se descalcificaron en solución LORCH (Ac. cítrico, NaOH 0.2N, HCl 0.1N, ZnSO<sub>4</sub> 1% y CHCl<sub>3</sub> 0.1%), la que se cambiaba cada tercer día durante 3 semanas. También se fijaron muestras de hígado y bazo, los que junto con los cornetes descalcificados se incluyeron en parafina y se procedió a realizar cortes de 6µ que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Para catalogar el grado de atrofia, hemorragia, edema, pleuritis y perivasculitis se estableció un sistema de puntuación de 0 a 2.



#### 4.0. RESULTADOS.

##### 4.1. Aislamiento Bacteriano.

Se tomaron muestras de 41 cerdos que presentaron problemas clínicos de rinitis atrófica. Para la identificación de P. multocida y B. bronchiseptica, se emplearon como criterios de identificación las características bioquímicas que se muestran en el Cuadro No.1. En 12 de los 22 cerdos de 5 días de edad, 5 de 5 semanas de edad y en 3 de los de 5 meses se aisló B. bronchiseptica, mientras que P. multocida se aisló de 3 de los 41 cerdos; dos fueron cerdos adultos y uno de 5 días de edad, de este último también se aisló B. bronchiseptica. En 18 casos no hubo aislamiento. En estos resultados se puede notar que B. bronchiseptica resultó el aislamiento más frecuente en los cerdos jóvenes y P. multocida en los cerdos adultos. La distribución de las P. multocida y B. bronchiseptica aisladas con respecto a la edad se resumen en el Cuadro No.2. Tanto los cerdos sin el cuadro clínico como los 18 restantes de los 41 cerdos, se aislaron cepas Lac+ sugestivas de coliformes. En relación a la tipificación, las tres cepas de P. multocida fueron del serotipo "D".

##### 4.2. Identificación de la DNT.

Los resultados de las tres pruebas biológicas realizadas para detectar la producción de toxina para cada una de las 3 cepas de P. multocida y las 20 cepas de B. bronchiseptica aisladas de cerdos de tres diferentes edades se muestran en los Cuadros No. 3, 4 y 5, donde cada cepa esta representada con una clave.

CUADRO No. 1. RESULTADO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS UTILIZADAS  
 PARA LA IDENTIFICACION DE P. multocida y B. bronchiseptica

PRUEBA	<u>Bordetella bronchiseptica</u>	<u>Pasteurella multocida</u>
Crecimiento en		
McConkey	(+)	(-)
GRAM	(-)	(-)
FORMA	COCOBACILO	COCOBACILO
MOTILIDAD	(+)	(-)
O/F	F	F
CATALASA	(+)	(+)
OXIDASA	(+)	(+)
INDOL	(-)	(+)
H <sub>2</sub> S	(-)	(-)
UREASA	(+)	(-)
CITRATO	(+)	(-)

CUADRO 2. AISLAMIENTOS DE Bordetella bronchiseptica Y Pasteurella multocida EN 41 CERDOS DE DIFERENTES EDADES. Y CON SIGNOS CLINICOS DE RINITIS ATROFICA.

EDAD	<u>Bordetella bronchiseptica</u>	<u>Pasteurella multocida</u>	T	No. de Cerdos muestreados	
5 dias	12	1		13	22
5 semanas	5	0		5	15
5 meses	3	2		5	5
TOTAL	20 (48.7%)	3 (7.3%)		23	41 (100%)

CUADRO No. 3. RESULTADOS DE LAS TRES PRUEBAS BIOLÓGICAS REALIZADAS PARA DETECTAR LA PRODUCCIÓN DE TOXINA CON 3 CEPAS DE *P. multocida* y 20 cepas *B. bronchiseptica*, AISLADAS DE CERDOS DE 5 DIAS.

CLAVE	GENERO	MRL	ABR %	IPC cm.
a	B	3:4	32.43	0.9
18a	B	3:4	43.24	0.9
Rb	B	3:4	35.13	1
N1	B	0:4	29.72	0
++	B	2:4	44.59	1
* Mu	P	0:4	5.40	1
+++	B	0:4	28.37	0
-	B	2:4	32.43	0
19a	B	2:4	27.02	1.2
* N5	B	0:4	33.78	0
21a	B	2:4	33.78	1

\* Cepas aisladas del mismo cerdo

IPC: ENDURECIMIENTO Y NECROSIS EN PIEL DE CUYE

MRL: MUERTE DE RATON LACTANTE

ABR: ATROFIA DE BAZO DE RATON.

B : *B. bronchiseptica*

P : *P. multocida*

CUADRO No. 4. RESULTADOS DE LAS TRES PRUEBAS BIOLÓGICAS REALIZADAS PARA DETECTAR LA PRODUCCIÓN DE TOXINA EN CEPAS DE *P. multocida* y CEPAS DE *B. bronchiseptica*, AISLADAS DE CERDOS DE 5 SEMANAS.

CLAVE	GENERO	MRL	ABR %	IPC cm
15c	B	4:4	27.02	1
+	B	3:4	31.08	0
15d	B	4:4	40.54	1.1
15b	B	2:4	22.97	1
15f	B	3:4	27.02	0
Ra 20N	B	3:4	50.00	1

IPC: ENDURECIMIENTO Y NECROSIS EN PIEL DE CUYE

MRL: MUERTE DE RATON LACTANTE

ABR: ATROFIA DE BAZO DE RATON.

B : *B. bronchiseptica*

P : *P. multocida*

CUADRO No. 5. RESULTADOS DE LAS TRES PRUEBAS BIOLÓGICAS REALIZADAS PARA DETECTAR LA PRODUCCIÓN DE TOXINA EN CEPAS DE P. multocida y CEPAS DE B. bronchiseptica, AISLADAS DE CERDOS DE 5 MESES DE EDAD.

CLAVE	GENERO	MRL	ABR %	IPC cm.
Y	B	2:4	37.83	1
4	B	3:4	27.02	1.3
N3	B	0:4	20.27	0
58b	B	0:4	1.35	0
9a	P	2:4	0	0
Vc	P	4:4	14.86	1.2

IPC: ENDURECIMIENTO Y NECROSIS EN PIEL DE CUYE

MRL: MUERTE DE RATON LACTANTE

ABR: ATROFIA DE BAZO DE RATON.

B : B. bronchiseptica

P : P. multocida

Los resultados de la prueba de atrofia de bazo (ABR) en ratones de 21 días inoculados con sobrenadantes de cada una de las 20 cepas de B. bronchiseptica y las 3 de P. multocida aisladas de campo, se muestran en el Cuadro No. 6. El tamaño de bazo de los ratones infectados con cada cepa (4 ratones por cepa) se comparó con el tamaño del bazo de ratones sanos, por medio de un análisis de varianza se determinó que una disminución de 0.46 mm del tamaño de bazo normal fue estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). Los bazos normales midieron en promedio 1.85 mm +/- 0.46mm es el 25% de esta cantidad por lo que se consideró una prueba positiva cuando se obtuvo una reducción de tamaño o atrofia de bazo mayor del 25%. De las 20 cepas de B. bronchiseptica y de las 3 de P. multocida se encontraron 15 y 2 DNT positivas, por esta prueba respectivamente. En la prueba de mortalidad en ratón lactante 15 de las 20 cepas de B. bronchiseptica y 2 de 3 cepas de P. multocida causaron una mortalidad mayor o igual al 50% por lo que se consideraron positivas. La prueba IPC se consideró DNT positiva cuando se obtuvo un halo de endurecimiento mayor o igual a 1.0 cm. De acuerdo a esta prueba 12 de las 20 cepas de B. bronchiseptica y 2 de las 3 cepas de P. multocida resultaron DNT positiva (Cuadro No. 7). Se utilizó una prueba estadística (Xi) cuadrada para comparar las proporciones de DNT positivos y negativos detectados por cada prueba, dando como resultado que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las tres pruebas biológicas.

CUADRO No. 6. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ATROFIA DE BAZO EN RATONES DE 21 DIAS INOCULADOS CON SOBRENADANTES DE 20 CEPAS DE Bordetella bronchiseptica y 3 CEPAS DE Pasteurella multocida\*

Cepa	Promedio del Tamaño del Bazo (mm)	% Reducción de Tamaño de Bazo	Interpretación
a	1.25	32.43	+
18a	1.05	43.24	+
Rb	1.2	35.13	+
N1	1.3	29.72	+
++	1.025	44.59	+
Mu*	1.75	5.40	-
+++	1.325	28.37	+
-	1.25	32.43	+
19a	1.35	27.02	+
N5	1.225	33.78	+
21a	1.225	33.78	+
15c	1.35	27.02	+
+	1.275	31.08	+
15d	1.1	40.54	+
15b	1.425	22.97	-
15f	1.35	27.02	+
Ra20N	0.925	50	+
Y	1.15	37.83	+
4	1.35	27.02	+
N3	1.475	20.27	-
58b	1.825	1.35	-
9a*	1.85	0	-
Vc*	1.575	14.86	-
Control	1.85	0	-

NOTA : Se consideraron DNT positivas todas las cepas que causaron reducción del tamaño de bazo mayor al 25%.



CUADRO No. 7. NUMERO DE CEPAS DE B. bronchiseptica y P. multocida DNT POSITIVAS Y NEGATIVAS DE ACUERDO A LAS PRUEBAS IPC, MRL ABR.

CEPA	PRUEBA	POSITIVOS	NEGATIVOS	TOTAL
<u>B. bronchiseptica</u>	IPC	12	8	20
	MRL	15	5	20
	ABR	17	3	20
<u>P. multocida</u>	IPC	2	1	3
	MRL	2	1	3
	ABR	0	3	3

IPC: ENDURECIMIENTO Y NECROSIS EN PIEL DE CUYE

MRL: MUERTE DE RATON LACTANTE

ABR: ATROFIA DE BAZO DE RATON.

Por otro lado, en el Cuadro No. 8, se observa que de las 23 cepas aisladas, 12 resultaron DNT positivas con las tres pruebas utilizadas, 2 con la pruebas de MRL e IPC, 2 con la prueba de MRL y ABR, 3 resultaron DNT positivas solo con la prueba de ABR, una cepa positiva solo para IPC y 2 cepas fueron DNT negativas a las tres pruebas.

#### 4.3. Selección de Cepas.

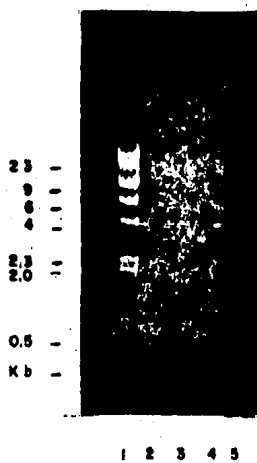
Con los resultados obtenidos y para estudios subsecuentes, se seleccionaron dos cepas de B. bronchiseptica y dos de P. multocida con las características que se muestran en el Cuadro No. 9. Las cepas 4 y Vc ( de B. bronchiseptica y P. multocida se consideraron patógenas porque dieron positivas a las tres pruebas biológicas y las cepas 15b y 9a apatógenas, porque resultaron negativas a cuando menos dos de las pruebas (Según el criterio de Nakai y cols., 1984).

#### 4.4. Extracción del Plásmido.

A las cuatro cepas seleccionadas (Cuadro No. 9), se les realizó la extracción de plásmido por la técnica de lisis alcalina y posteriormente se le realizó la electroforesis en geles de agarosa al 0.7%. Para la cepa patógena Vc se detectó un plásmido de aproximadamente 5.2 Kb. La cepa apatógena de P. multocida y la dos cepas de B. bronchiseptica no mostraron tener ningún plásmido (Figura No.2).

## GEL DE AGAROSA DEL DNA EXTRACROMOSOMICO.

- 1.- MARCADOR DEL PESO MOLECULAR, DNA DE CORTADO  
CON HIND III.
- 2.- DNA DE Pasteurella multocida DNT (+).
- 3.- DNA DE Pasteurella multocida DNT (+), CORTADA  
CON HIND D.III.
- 4.- DNA DE Pasteurella multocida DNT (+), CORTADA  
CON ECO.
- 5.- AUSENCIA DE DNA EXTRACROMOCOMICO EN  
Bordetella bronchiseptica.



CUADRO No. 8. RESULTADOS DE LAS SIGUIENTES PRUEBAS: ENDURECIMIENTO Y NECROSIS EN LA PIEL DE CUYE, ATROFIA DE BAZO, EN RATONES DE 21 DIAS Y MORTALIDAD DE RATONES LACTANTES CON SOBRENADANTES DE 20 CEPAS DE *B. bronchiseptica* y 3 de *P. multocida*.

PRUEBA			No. de Cepas
MRL	ABR	IPC	
+	+	+	12
+	+	-	2
+	-	+	2
-	+	+	0
-	-	+	1
-	+	-	3
+	-	-	1
-	-	-	2
TOTAL			23

IPC: ENDURECIMIENTO Y NECROSIS EN PIEL DE CUYE

MRL: MUERTE DE RATON LACTANTE

ABR: ATROFIA DE BAZO DE RATON.

CUADRO No. 9. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS REALIZADAS A 4 CEPAS SELECCIONADAS PARA ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD.

Cepas	Pruebas Biológicas			
	IPC	ABR	MRL	DNAP
<u>Bordetella bronchiseptica</u>				
15b (apatógena)	1	23.4% (-)	50%	-
4 (patógena)	1.3	29.4% (+)	75%	-
<u>Pasteurella multocida</u>				
Vc (patógena)	1.2	-	100%	+
9a (apatógena)	0	-	50%	-

IPC: ENDURECIMIENTO Y NECROSIS EN PIEL DE CUYE  
MRL: MORTALIDAD DE RATON LACTANTE  
ABR: ATROFIA DE BAZO EN RATON  
DNAP: DNA EXTRACROMOSOMAL.

#### 4.5. Citotóxicidad en Cultivos Celulares.

No se observó efecto citotóxico con sobrenadante de la cepa de B. bronchiseptica 15 b, en ninguna de las líneas celulares estudiadas; en contraste la cepa 4 que si produjo efecto citotóxico marcado en la línea celular MDBK, moderado en VERO y leve en PK-15. La cepa de P. multocida 9a no produjo efecto citotóxico en ninguna de las líneas celulares, mientras que la cepa VC mostró moderada citotoxicidad en la línea MDBK y leve para las dos líneas restantes . Por su parte la cepa apatógena no mostró tener un efecto citotóxico en los cultivos celulares, bajo los criterios antes mencionados (Cuadro No.10).

#### 4.6 Infección de ratones con aerosoles de Bordetella bronchiseptica

##### 4.6.1. Estandarización de la Cámara de Nebulización.

Se elaboró un modelo experimental en ratones para estudiar la rinitis atrófica, para lo cual ratones de 21 días de edad fueron inoculados con B. bronchiseptica por vía aerógena con una cámara de aerosolización construida específicamente para este fin.

Para comprobar que las distribución de las bacterias fuera uniforme dentro de la cámara se aerosolizó con 10 ml de una suspensión conteniendo  $5.3 \times 10^{10}$  UFC/ ml de B. bronchiseptica, en 5 minutos; se colocaron cajas de Petri con caldo BHI estéril en diferentes posiciones en la cámara. Se muestran en el Cuadro No. 11, la posición donde se colocaron dentro de

CUADRO No.10. EFECTO CITOTOXICO DE SOBRENADANTES BACTERIANOS  
EN TRES DIFERENTES LINEAS CELULARES.

Cepas	Lineas Celulares		
	MDBK	PK-15	VERO
<u>Bordetella bronchiseptica</u>			
15b	-	-	-
4	+++	+	++
<u>Pasteurella multocida</u>			
Vc	++	+	+
9a	-	-	-
+ REACCION LEVE			
++ REACCION MODERADA			
+++ REACCION SEVERA.			



CUADRO No. 11. MEDIAS DE LA UFC OBTENIDAS A PARTIR DE DILUCIONES DE CAJAS DE PETRI CON MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO COLOCADAS EN DISTINTAS POSICIONES EN LA CAMARA DE AEROSOLIZACION.

	ENTRADA*	CENTRO	SALIDA**
ARRIBA	$2.38 \times 10^{10}$	$2.26 \times 10^{10}$	$6.76 \times 10^9$
ABAJO	$1.13 \times 10^{10}$	$1.49 \times 10^9$	$4.59 \times 10^9$

\* LADO DE LA ENTRADA DEL AEROSOL

\*\* LADO DE LA SALIDA DEL AEROSOL

la cámara y el promedio de las UFC por caja de Petri. El análisis estadístico (ANOVA), no reveló diferencia significativa entre el número de bacterias colectadas en las cajas de Petri en diferentes posiciones. Por otro lado y como control se aerolizó caldo BHI estéril y no se apreció crecimiento bacteriano. Estos resultados indican que los ratones pueden ocupar cualquier lugar en la cámara y recibir la misma cantidad de bacterias, con la confiabilidad de que la distribución bacteriana es uniforme.

#### 4.6.2. Remoción Bacteriana en Pulmón.

El análisis de varianza para la variable estudiada ( las UFC/pulmón ) indicó la existencia de diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los conteos de los distintos días. La comparación de medias posterior (prueba de Tuckey), permitió detectar un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) de los conteos entre el momento de la inoculación y el primer día. Posteriormente, un descenso significativo ( $P < 0.05$ ) entre los conteos del primer día y los de los días 3 y 5. A partir del día 5 aparece nuevamente un aumento significativo ( $P < 0.05$ ) hasta el día 7, y permanece sin variación ( $P > 0.05$ ) hasta el día 14, para luego bajar significativamente ( $P < 0.05$ ). De acuerdo a esta información podemos identificar claramente 4 periodos: I) hay un desarrollo bacteriano rápido detectado en el primer día posinoculación; II) disminución de la cuenta viable hasta el día 5 aproximadamente; III) aumento ligero del número de bacterias y una fase estacionaria de crecimiento entre los días 7 y 14 aproximadamente y IV)

decremento a partir del día 14. Cada una de estas fases se señalan en la Figura No.3.

#### 4.6.3. Remoción de bacterias en Cornetes.

Los promedios del número de bacterias (UFC/ml) obtenidos en los cornetes nasales, los días 0, 1, 3, 5, 7, 14 y 21 posteriores a la inoculación de B. bronchiseptica se muestran en el Cuadro No. 12. En este cuadro se puede observar la disminución del número de bacterias en los cornetes con respecto al tiempo. El análisis de regresión de estos resultados indicó que la cinética de remoción de B. bronchiseptica en los cornetes nasales sigue una relación cuadrática dada por la siguiente ecuación :

$$B = 10.73 - 0.766(t) + 0.002073(t)^2$$

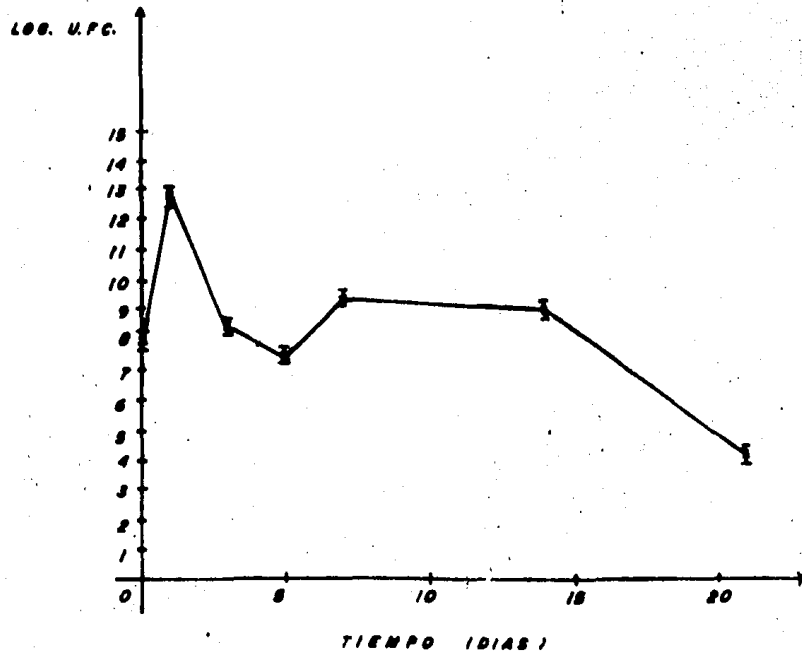
DONDE :

B	=	Log de UFC en cornetes
t	=	Tiempo en días
10.73	=	Promedio estimado del logaritmo de bacterias el en el día cero.
-0.766 bact./día	=	Coefficiente de linealidad.
2.073x10 <sup>-2</sup>	=	Coefficiente de curvatura de 2do. grado.

El coeficiente de correlación fue de 0.98 y los coeficientes de linealidad y curvatura fueron significativamente diferentes de cero (P<0.05). En la Figura No. 4 se muestra la curva de regresión obtenida .

FIGURA No. 3.-MEDIA Y ERROR ESTANDAR DEL  
LOGARITMO DE LAS UFC OBTENIDAS DE PULMON A  
DIFERENTES TIEMPOS POSINOCULACION CON  
Bordetella bronchiseptica.

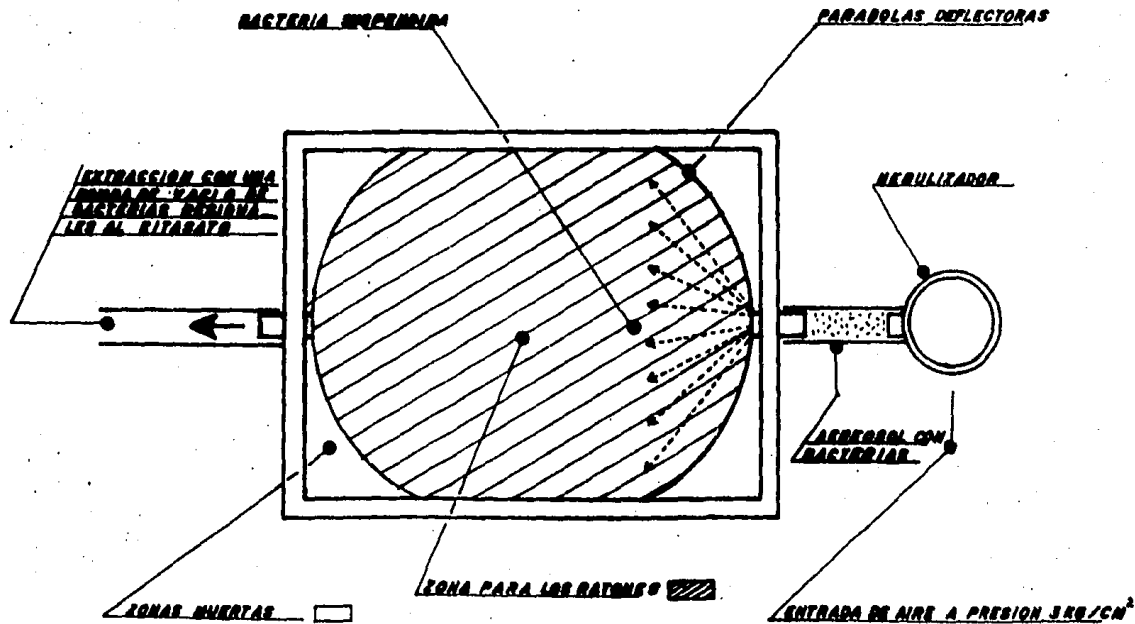
FIGURA N.º 3



CUADRO No. 12 . PROMEDIO DE UFC/CORNETE EN RATONES INFECTADOS  
CON *B. bronchiseptica* EN DIFERENTES DIAS POSTERIORES A LA  
INOCULACION.

DIA POSINOCULACION	UFC/CORNETE
0	7.58x10 <sup>10</sup>
1	6.15x10 <sup>9</sup>
3	5.50x10 <sup>8</sup>
5	2.22x10 <sup>7</sup>
7	5.81x10 <sup>6</sup>
14	9.85x10 <sup>3</sup>
21	6.63x10 <sup>3</sup>

FIGURA Nº 1



ESC: 1:4

#### 4.7. Estudio Histopatológico.

Los resultados del estudio histopatológico no mostraron ninguna alteración en los tejidos de los diferentes órganos estudiados en este experimento. El estudio de histopatología de los cornetes nasales mostró un infiltrado escaso de mononucleares con un engrosamiento de septos, con una congestión y ligera hemorragia, sin ser esto indicadores de alteraciones consecuentes a la infección.

#### 4.8. Efecto en el Crecimiento de ratones Infectados.

Se comparó el crecimiento de un grupo de 4 ratones controles con el de un grupo de ratones infectados por aerolización con B. bronchiseptica. Los ratones se pesaron el día de la aerolización y se seleccionaron para este estudio los que pesaron 9.80 g  $\pm$  0.1 y se registró su peso de ellos diariamente durante 21 días. En el Cuadro No. 13 se muestra el peso ganado por cada ratón, durante el periodo del experimento. La prueba t de student demostró que la ganancia de peso de los ratones controles fue significativamente mayor que la de los ratones infectados ( $P < 0.05$ ). En promedio la ganancia de peso en 21 días fue de 15.84g para los ratones controles y de 9.576g para los ratones infectados. Lo anterior también se comprobó comparando las tasas de crecimiento relativas de los ratones, esta tasa relativa esta determinada por el coeficiente de regresión de la relación entre peso y tiempo. Los coeficientes de regresión o las tasa de crecimiento relativas se compararon por medio de un



análisis de covarianza. En el caso de los ratones controles se obtuvo la siguiente ecuación :

$$P = (9.96) e^{0.0452t}$$

DONDE :

P = Peso de ratón en gr.  
 9.96 = Estimación del promedio del peso inicial en gr.  
 e = 2.718 base de logaritmos naturales  
 t = Tiempo en días  
 0.0452g/día = Tasa de crecimiento relativa

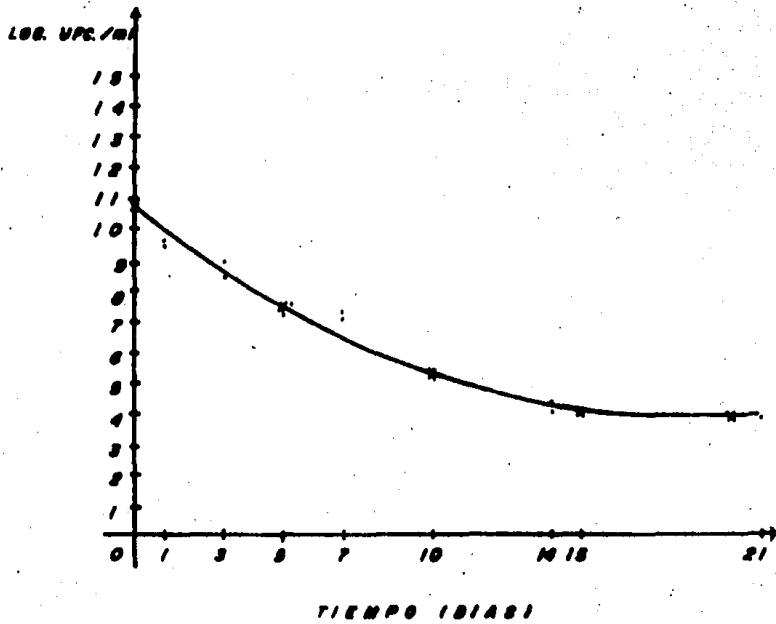
El coeficiente de regresión fue altamente significativo ( $P < 0.001$ ) y el coeficiente de correlación fue de 0.96. La figura 5 muestra la curva de crecimiento exponencial de los ratones sanos con 95% de confianza.

#### 4.9. Mortalidad de Ratones Infectados con B. bronchiseptica

De los 32 ratones infectados, 14 (43.7%) murieron durante los 10 primeros días post-inoculación (Cuadro No. 14). Además se observaron en los animales infectados los siguientes signos clínicos en los mismos días, pelo erizado, disnea, retardo en reflejos, que los animales controles no presentaban, los ratones que llegaron a término después del 10o. día tampoco los presentaban.

FIGURA No.4.-CURVA DE REGRESION DE LA RELACION  
ENTRE LA REMOCION DE *Bordetella bronchiseptica*  
Y EL TIEMPO POSINOCULACION EN LOS CORNETES

FIGURA N.º 4

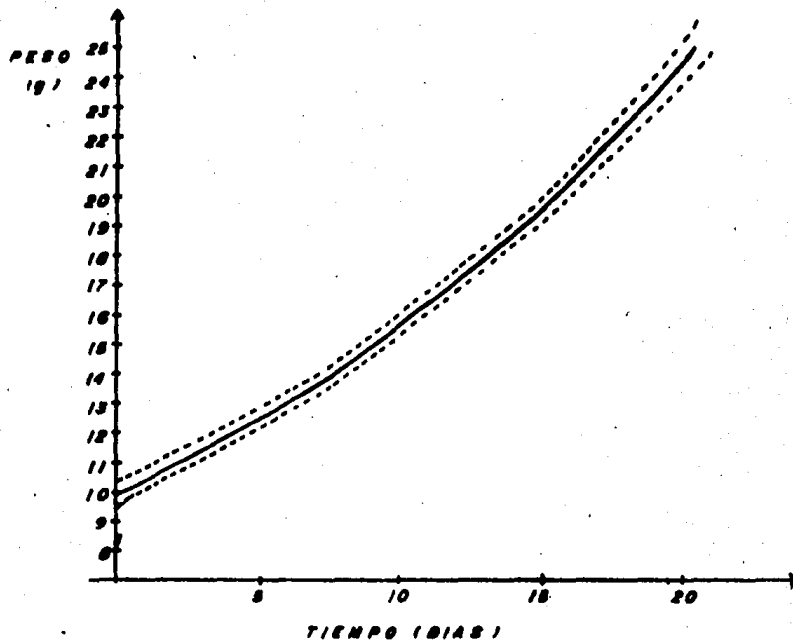


CUADRO No. 13. GANANCIA DE PESO DURANTE 21 DIAS DE 4 RATONES  
 CONTROLES Y 8 RATONES INFECTADOS CON Bordetella bronchiseptica.  
 EL PESO INICIAL DE LOS RATONE FUE DE 9.80 0.10g.

-----	
GANANCIA DE PESO (G)	
-----	-----
RATONES SANOS	RATONES INFECTADOS
-----	-----
14.4	10.1
17.6	10.8
17.8	8.6
16.3	10.2
	6.5
	11.4
	12.7
	7.61
-----	-----
x 16.525	9.688
-----	-----

FIGURA No.5.- CURVA DE CRECIMIENTO DE LOS RATONES CONTROLES. EL ANALISIS DE REGRESION DEMOSTRO UNA RELACION EXPONENCIAL ENTRE PESO Y TIEMPO CON UN COEFICIENTE DE CORRELACION DE 0.96. LAS LINEAS PUNTEADAS REPRESENTA EL INTERVALO DE CONFIANZA (95%).

FIGURA N.º 8



CUADRO No. 14. MORTALIDAD EN UN GRUPO DE RATONES INFECTADOS  
CON B. bronchiseptica.

DIA	No. DE MUERTOS DE UN TOTAL DE 32 RATONES
1	0
2	0
3	0
4	5
5	0
6	2
7	4
8	2
9	1
10-21	0
TOTAL	14

## DISCUSION

Se ha estudiado la infección mixta de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida y los resultados sugieren que es muy importante en la rinitis atrófica del cerdo (Runnels, 1982; Rutter, 1983; Nakai y cols, 1984; Nakai y cols, 1985). Los diferentes estudios han demostrado la sinergia en la patogenia de la enfermedad entre ambas bacterias (Pedersen y Barford, 1981; Pedersen, 1983; Pedersen y Nielsen, 1983; De Jong, 1984; Nielsen, 1983; Giles, 1985; Schoss, 1987), además de que en ambas bacterias la patogenicidad se ha relacionado con la presencia de toxinas (De Jong y cols, 1980; Pedersen y Barford, 1981; Schos y Thiel, 1984; Pijoan y cols, 1985 ). Por otro lado, algunos autores sugieren una interacción entre ambas bacterias, en donde B. bronchiseptica es el agente primario que se instala en la mucosa nasal, permitiendo la colonización posterior de P. multocida, desarrollando así la rinitis atrófica (Switzer, 1956; Harris y Switzer, 1968). Otros autores mencionan también que la enfermedad se presenta en dos formas, una causada por B. bronchiseptica que produce lesiones de tipo transitorio y regresivo con poco impacto económico; y otra por P. multocida que produce lesiones severas, progresivas, irreversible y de gran impacto económico (Iglesias y Pijoan, 1987; Trigo y Pijoan, 1988).

Con el objetivo de conocer más acerca de la patogenia de la enfermedad, en el presente trabajo, se realizaron una serie de experiencias con este fin. Primeramente se realizó un



estudio en una granja de Cuautitlán, Edo. de México, para conocer la frecuencia con que ambos microorganismos aparecen asociados a la enfermedad.

Los resultados indican que fue B. bronchiseptica la que se aisló con mayor frecuencia en los lechones disminuyendo en los cerdos adultos. Estos aislamientos provinieron de cerdos con lesiones muy ligeras. En el caso de P. multocida, los aislamientos fueron mayores en cerdos adultos que en lechones. Estos resultados concuerdan con los trabajos de Backstrom y cols. (1985) en donde la frecuencia de aislamientos de B. bronchiseptica y P. multocida, varió considerablemente con la edad de los cerdos; además ambas bacterias raramente se aislaron juntas. En este trabajo todas las cepas de P. multocida se identificaron como tipo D, comprobándose así que es el tipo predominantemente asociado a la rinitis atrófica (Iilina, 1978; Jang, 1980; Pedersen y Jensen, 1980). Esto implica que la infección de B. bronchiseptica se da casi al nacimiento mientras que la P. multocida se da en una etapa posterior de la vida del cerdo, como lo han demostrado otros autores (Iglesias y Pijoan, 1987; Trigo y Pijoan, 1988). Hay evidencias de que B. bronchiseptica y P. multocida son capaces de producir esta enfermedad debido a las toxinas que producen, generando el daño en la mucosa nasal y por lo tanto lesionando los cornetes nasales. (De Jong y cols, 1980; Pedersen y Barford, 1981; Schos y Thiel, 1984; Pijoan y cols, 1985). Por lo tanto a las cepas aisladas de granja en este estudio se les realizaron tres pruebas biológicas para establecer la

presencia o ausencia de toxina y los criterios de patogenicidad con acuerdo a Nakai y cols. (1984). Los resultados señalados en el estudio muestran diferentes efectos en MRL, ABR e IPC con la misma cepa estudiada. Esto podría significar la existencia en el caso de B. bronchiseptica de más de una toxina responsable, detectada en cada prueba o que cada prueba requiera cantidades diferentes de toxina para que se presente el efecto. En P. multocida se ha demostrado la presencia de una toxina compuesta de tres subunidades. La evidencia indica que las diferentes subunidades por separado no tienen ninguna acción, lo que no sucede cuando están unidas, sugiriendo que es una sola proteína la responsable del efecto evidente al inocularla en ratones, células o en la piel de cuyes (Nakai y Kume, 1987). Con las tres pruebas biológicas se identificó la presencia de toxina (DNT+) o ausencia de ella (DNT-) en las cepas aisladas. La prueba estadística de  $\chi^2$  <sup>2</sup> reveló que las tres pruebas biológicas podrían ser utilizadas para las cepas de B. bronchiseptica y P. multocida productoras de dermonecrotoxinas ( $P < 0.05$ ) (Nakai y cols, 1984). En este estudio se encontró que en ambas bacterias la aparición y detección de las DNTs estuvo asociadas a la rinitis atrófica. El comportamiento de las toxinas de B. bronchiseptica o de P. multocida fue semejante, como fue el caso de las pruebas de IPC y MRL, pero fue diferente con la prueba ABR, ya que la toxina de P. multocida no produjo atrofia del bazo (Nakai y cols, 1984; Roop y cols, 1987; Jacques, 1988). La reducción de

los bazos de los ratones con B. bronchiseptica, concuerdan con los resultados de Elias, (1985); Magyar, (1987).

Aunque en este trabajo no se determinó la concentración de tóxima, Kamp y cols (1987) han demostrado que la prueba que requiere mayor concentración de tóxima de P. multocida es la DL50 en ratón, siguiendo en forma decreciente la prueba en la piel de cuye y toxicidad en cultivos celulares; la prueba DL50 resulta determinante, ya que un resultado positivo a esta, puede sugerir positividad a las otras pruebas. Los resultados de este estudio revelaron que la prueba que detectó más cepas positivas para B. bronchiseptica, fue la prueba de ABR, seguida de la prueba de MRL y por último la de IPC. Para P. multocida, las dos pruebas biológicas IPC y MRL permitieron detectar a las cepas positivas. Estos resultados sugieren que para B. bronchiseptica la concentración de tóxima no fue suficiente para dar un resultado positivo en alguna de la pruebas biológicas, mientras que para P. multocida la concentración fue suficiente para ambas pruebas.

Otros autores purificaron una toxina de los sobrenadantes de P. multocida que presentó las mismas propiedades biológicas que un extracto crudo, pero ellos no afirman que se trate de una sola tóxima o de varias. (Pedersen y Barfod, 1981; Rutter y Lutter, 1984; Chanter y cols., 1986; Foged y cols., 1987). En razón a los resultados anteriores se seleccionaron 4 cepas, 2 con propiedades dermonecrotóxicas y 2 sin éstas, para probarlas en su efecto citotóxico en cultivos celulares. Los resultados demuestran que la cepa dermonecrotóxica de B.

bronchiseptica tuvo un efecto citotóxico más severo que la de P. multocida, aunque en ambos casos, el efecto fue observable especialmente en la línea MDBK y en menor grado en VERO y PK-15, estos resultados concuerdan con los de otros autores, (Ilna y Zazukhin, 1975; De Jong, 1983; Rutter y Rojas, 1983; Vander Heidjen y cols, 1983; Kamp y cols, 1987). aunque Penning y Storm han mostrado que las células VERO son las más adecuadas para las cepas DNT+.

Por otro lado, trabajos preliminares (Mendoza y cols., 1985) habían sugerido la presencia de un plásmido en cepas de P. multocida tipo "D". Por lo que se pretendió corroborar este hecho, probando algunas de las cepas aisladas en este estudio, encontrándose un plásmido de 5.2 Kb para P. multocida, mientras que para P. bronchiseptica con la técnica empleada no se detectó ninguno. Esta evidencia no ha sido previamente reportado por ningún autor, por lo que sería de gran importancia para futuros estudios sobre la patogenia de la enfermedad.

La nebulización ha mostrado ser un buen método de inoculación para reproducir enfermedades asociadas al tracto respiratorio, (Badiola y Pujols, 1984; Caballero y cols., 1985; Montaraz y cols, 1985; Osborne y cols., 1985; Jericho, 1987; Zink y Jager, 1987). Con el fin de obtener evidencia sobre el establecimiento de la infección a nivel de los cornetes nasales y el pulmón, se realizó un experimento de infección con P. bronchiseptica. Esta inoculación no fue capaz de desarrollar lesiones en ratones de 21 días de edad

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

adn después de 21 días posinoculación, datos que no concuerdan con los de Sawata y Kume, (1982); Magyar y cols, (1984); Elias, (1985) y Magyar, (1987). Una posible causa de esta diferencia, puede deberse a la edad de los ratones, los autores antes citados usaron ratones de 2 a 5 días de edad mientras que en el presente estudio se emplearon de 21 días. Esto hace pensar que probablemente existan receptores para esta bacteria que se van perdiendo conforme aumenta la edad o por otro lado que las cepa utilizada en este trabajo no presentara citoadherencia, permitiendo una fácil remoción de la misma. Sin embargo el análisis matemático de los datos, muestra un comportamiento que se ajusta a una curva cuadrática, lo cual haría sospechar que la bacteria desaparece de los cornetes nasales y reaparece tiempo después. Algunos autores han encontrado un comportamiento similar para P. multocida, encontrándose que esta migra hacia las tonsilas regresando después a los cornetes (Trigo y Pijoan, 1988). Aunque la concentración de bacteria inoculada fue muy alta con respecto a la utilizada por otros autores (Montaraz y cols, 1985), los resultados concuerdan con los obtenidos por éstos en el tipo de curva que presenta la remoción pulmonar, más no con los tiempos señalados en los trabajos. La baja de peso que se presentó en los ratones y la alta mortalidad a lo largo del experimento, concuerdan con los experimentos de Montaraz y cols, 1985).

Es claro con los datos obtenidos en el presente trabajo, que será importante en un futuro próximo trabajar aún más en la biología del plásmido encontrado, con el fin de obtener mayor

información y hacer estudios al respecto de la toxina de P. multocida y el papel que desempeña en la enfermedad. Es importante señalar que con mayor experimentación se podría demostrar la hipótesis de que las tonsilas sirven como reservorio natural a ambas bacterias, para su establecimiento final en los cornetes nasales.

Por último es importante señalar que aunque actualmente se conoce ya bastante sobre los agentes etiológicos involucrados en esta enfermedad es importante continuar con la investigación en este campo para establecer más claramente los mecanismos de patogenicidad de estas bacterias.

## CONCLUSIONES

-En este estudio se determinó la patogenicidad de cepas de campo de Bordetella bronchiseptica y Pasteurella multocida aisladas de cerdos con problemas de Rinitis Atrófica encontrándose lo siguiente:

- Se aislaron e identificaron cepas de P. multocida tipo "D" y cepas de B. bronchiseptica, productoras de dermonecrotoxina.
- La frecuencia de aislamientos fue mayor para B. bronchiseptica a partir de cerdos jóvenes, mientras que P. multocida se aisló de cerdos adultos.
- Las tres pruebas biológicas probadas para identificar toxinas bacterianas arrojaron.
- El efecto citotóxico de sobrenadantes bacterianos se observó claramente en la línea celular MDBK.
- Se probó un modelo de infección de ratones con aerosoles de B. bronchiseptica. No se logró reproducir la atrofia de los cornetes, sin embargo la bacteria se replicó en los pulmones causando un 43.7 % de mortalidad y una notable disminución del peso corporal.

## BIBLIOGRAFIA

- Andersen, E. K. (1953). Serological studies on Haemophilus pertusis, Haemophilus pararpertussis and Haemophilus bronchisepticus Acta Pathol. Microbiol. Scand. **33**:202-224.
- Anon. (1954). New pig disease in Britain. Vet. Rec. **66**:316.
- Beard, C.W.; Easterday, B.C. (1965): An aerosol apparatus for the exposure of large and small animals:Description and operation characteristics. Am. J. Vet. Res. **26**: 174-182.
- Becovish, Z. and Oosterwoud R.A. (1977). Vaccination with B. bronchiseptica vaccine on a farm with atrophic rhinitis an evaluation of a field experiment. Tijdscha. Diergeneeskd. **102**:485-494.
- Bemis, D.A. and Appel, M.J. (1977). Aerosol Nolvasan treatment of Bordetella bronchiseptica in dogs. Vet. Med. Small Anim. Cli. **72**:53-55.
- Bemis, D.A.; Greisen,H.A.; Appel, M.J. (1977). Pathogenesis of canine bordetellosis. J. Infect. Dis. **135**:753-762.
- Bergey's, (1925). Manual of determinative bacteriology, The Williams and Wilkins, Co. Baltimore.
- Birnsboim, A. C. and Doily,C.P. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinants plasmid DNA. Nucleic. Acids. Res. **7**:1513.
- Boyce and Marter. (1986). Plasmid profile analysis of bovine isolates of Pasteurella haemolytica. Am. J. Vet. Res. **47** 6:1204-1206
- Brassine, M.A.; Dewaele,A.; Gouffaux,M. (1976). Intranasal infection with Bordetella bronchiseptica in gnotobiotic piglets. Res. Vet. Sci. **20**:162-166.
- Brownn, W.R.; Krook, L.A. and Pond, W.G. (1966). Atrophic rhinitis in swine. Etiology, pathogenesis and prophylaxis. Cornell Vet. **56** (suppl 1).



Bruckner, I.E. and Evans, D.G. (1939) . The toxin of Bordetella parapertussis and the relationship of this organism to Haemophilus pertusis and Bordetella bronchiseptica. J. Pathol. 49:563-570.

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.

Cameron, R.; Giles, C.J.; and Smith, I.M.. (1980). The prevalence of Bordetella bronchiseptica and turbinata (conchal) atrophy in English pig herds in 1978-79. Vet. REC. 107:146.

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 Rundell, S.N. (1975). Identification of type A strains of Pasteurella multocida using a Staphylococcal Hyaluronidase; Vet. Rec. 93; 343.

Carter, G.R. (1987). Serological classification of P. multocida. Vet. Rec. 121:382

Chang, K.C.; Zakheim, C.T.; C, C.T. and Montgomery, J.C. (1975). Posttraumatic purulent meningitis due to Bordetella bronchiseptica. J. Pediatr. 86:639-640.

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

Cowart, R.P. and Bacckstrom, L.(1984). Prevalence of dermonecrotic toxin producing Pasteurella multocida swine herds with varying levels of atrophic rhinitis and pneumonia. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.

Cross, R.F. and Claflin, R.M. (1962). Bordetella bronchiseptica- induced porcine atrophic rhinitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 141:1467-1468.

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

De Jong, M.F.; Oosterwoud, R.A. and Kamp, F.T. (1984). A field evaluation of the Nobi-Vac-AR vaccine. Proc. Int. Cong. Vet. Soc. Belgium p.174.

DeJohns, D.; Duncan, J.F.; Ross, R.F.; Switzer, W.P. (1976). Pathology of experimental Bordetella bronchiseptica infection in swine. Am J. Vet. Res. 27:467-472.

Done, J.T. (1975). Infectious atrophic rhinitis of pigs: Rational Control at the herd level. Vet. Annu.15:105.

Doyle, L. F.; Donham, C.R. and Hutchings, L.M.. (1944). Report of a type of rhinitis in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 107:132.

Duncan, J.R. and Ramsey, F.K. (1965). Fine structural changes in the porcine nasal ciliated epithelial cell produced by Bordetella bronchiseptica rhinitis. Am. J. Pathol. 47:601-612.

Duncan, J.R. and Ramsey, F.K. and Switzer, W.P. (1966). Pathology of experimental Bordetella bronchiseptica infection in swine: atrophic rhinitis. Am.J. Vet. Res. 27:467-472.

Dunnill, M.S. (1979). Some aspects of pulmonary defence. J. Pathol. 128:222-236.

Eldering, G. and Kendrick, P. (1938). Bacillus parapertussis: a species resembling both Bacillus pertussis and Bacillus bronchisepticus but identical with neither. J. Bacteriol 35:561-572.

Eldering, G. (1942). A study of the antigenic properties of Haemophilus pertussis and related organisms. II Protection tests in mice. Am. J. Hyg. 36:294-232.

Eliás, D.G.; Kruger, M.; Ráts, F. (1982): Epizootiologische Untersuchungen der Rhinitis des Schweines. II. Biologische Eigenschaften der von Schweinen isolierten B. bronchiseptica Stammes Zentralbl Veterinarmed. 99:619-635.

Endington, N.; Smith, I.M.; Plowright, W. and Watt, R.G. (1976). Relationship of porcine cytomegalovirus and Bordetella bronchiseptica to atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets Vet. Rec. 48:42.

Endoh, M.; Toshiyuki, T.; Nakase, Y. (1980). Adenylate cyclase activity of Bordetella bronchiseptica organisms. I.- Its production in liquid medium. Microbiol. Immunol. 24:95-104.

Erler, W.; Feist, H. Flossmann, K-D und Jacob, B. (1977). Charakterisierung der Lipopolysaccharide einiger Pasteurella multocida - Stämme. Arch. Exper. Vet. Med. Leipzig 31; 139-144.

Evans, G. and Maitland, H.B. (1939). The toxin of Bordetella bronchiseptica and the relationship of this organism to Haemophilus pertussis. J. Pathol. 43:67-78.

Evans, D.G. (1940). The production of pertussis antitoxin in rabbits and the neutralization of pertussis, parapertussis y bronchiseptica toxins. J. Pathol. 51:49-58.

Farrington, D.O. and Switzer, W.P. (1977). Evaluation of nasal culturing procedures for the control of atrophic rhinitis caused by Bordetella bronchiseptica in swine. J. Am. Vet. Res. 40:1347-1351.

Ferry, N.S. (1910). A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper. Am. Vet. Rev. 37:499-504.

Ferry, N.S. (1912). Bacillus bronchisepticus: The cause distemper in dogs an similar disease in other animals. Vet. J. 68:376-391.

Ferry, N.S. (1913). Bacteriology and control of acute infections in laboratory animals. J. Pathol. 18:445-455.

Ferry, N.S. and Klix,C. (1918). Studies relative to the apparent close relationship between Bact. pertussis and Bordetella bronchisepticus. II.- Complement fixation tests. J. Bacteriol. 3:309-312.

Fetter, A.W.; Switzer, W.P. and Capon, C. (1975). Electron microscopic evaluation of bone cells in pigs with experimentally induced Bordetella rhinitis (turbinate osteoporosis ). Am. J. Vet. Res. 36:15-22.

Fisk, S.K. and Soave, O.A. (1973). Bordetella bronchiseptica in laboratory cats from central California. Lab. Anim. Sci. 23:33-35.

Fitzi, M. (1975). Selective isolation of Bordetella bronchiseptica. Zentralb. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. 224:270-272.

Flosdorf, E.W.; Dozois,F.F. and Kimball, A.C. (1941). Studies with H. pertussis V. agglutinogeniccccc relationshipo of the phases. J. Bacteriol. 41: 457-471.

Franque. (1830). Was ist die schnuffelkrankheit der schweine? Dtsch Z. Gesamte. Tierheilkd. 1:75.

Foged, N.T.; Pedersen, K.B. and Elling, F. (1987). FEEMS Microbiology Letters. 43 y 45.

Ganaway, J.R.; Allen, A.M.; Mcpherson, C.W. (1965). Prevention of acute Bordetella bronchiseptica pneumonia in a guinea pig colony. Lab. Anim. Care 15:152-162.

Gerone, P.J.; Coch, R.B.; Keefer, G.V.; Doglas, R.G.; Derrembacher, E.B. and Knight, V. (1966). Assesment of experimental and natural viral aerosols. Bact. Rev. 30:576-584.

Giles, C.J.; Smith, I.M.; Baskerville, A.J. and Brothwell, E. (1980). Clinical bacteriological and epidemiological observations on infectious atrophic rhinitis of pigs in southern England. Vet. Rec. 106:25.

Giles, C.J.; Smith, I.M.; Baskerville, A.J. and Oliphant, J. (1981). Treatment of experimental Bordetella bronchiseptica infection in young pigs with potentiated sulphonamide in the drinking water. Vet. rec. 108:136.

Giles, C.J. and Smith, I.M. (1982). The value of vaccinating pigs with Bordetella bronchiseptica. Pig. Vet. Soc. Proc. 9:1

Gois, M.F.; Kuksa, F. and Sisak, F. (1977). Experimental infection of gnotobiotic piglets with Mycoplasma hyorhinis and Bordetella bronchiseptica. Zentralbl. Veterinaarmed. Rcibe B. 24: 89-96.

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.

Gois, M; Barnes, H.J. and Ross, R.F. (1983). Potentiation of turbinate atrophy in pigs by long therm nasal colonization with P. multocida. Am. J. Vet. Res. 44:372.

Goodlow, R.J. (1961). Viability and infectivity of microorganisms of experimental airborne infection. Bact. Rev. 25:182-187.

Goodnow, R.A. ; Lehr, C.D.; Shade, F.J. and Wisecarver, J.L. (1977). Mouse potency assay for Bordetella bronchiseptica bacterins. J. Clin. Microbiol. 6:43-46.

Goodnow, R.A.; Shade, F.J. and Switzer, W.P. (1979). Efficacy Bordetella bronchiseptica bacterin in controlling enzootic atrophic rhinitis in swine. Am. J. Vet. Res. 40:58-60.

Goodnow, R.A. (1980). Biology of Bordetella bronchiseptica Microbiol. Rev. 44:772-738.

Green, G.M.; Jakab, G.J.; Low, R.B. and Davis, G.S. (1978). Defense mechanism of the respiratory membrane. Am. Rev. Respir. Dis. 115:479-514.

Grey, C.L.; Thomason, R.G. (1971) > Pasteurella haemolytica in the tracheal air of calves. Can. J. Comp. Med. 35:121-128.

Hanada, M.K.; Shimoda, S.; Tomita, Y. Nakase, Y. and Nishiyama, Y. (1979). Production of lesions similar to naturally occurring swine atrophic rhinitis by cell-free sonicated extract of Bordetella bronchiseptica. Jpn. J. Vet. Sci. 41:1-8.

Harris, D.L. and Switzer, W.P. (1968). Turbinate atrophy in young pigs exposed to Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida and combined inoculum. Am. J. Vet. Res. 29:777-785.

Harris, D.L. and Switzer, W.P. (1969). Nasal and tracheal resistance of swine against reinfection by Bordetella bronchiseptica. Am. J. Vet. Res. 30:1161-1166.

Harris, D.L.; Switzer, W.P. and Harris, R.A. (1971). A suggested mechanism for the pathogenesis of infectious atrophic rhinitis. Can. J. Comp. Med. 35:318-323.

Harris, D.L. and Switzer, W.P. (1972). Immunization of pigs against Bordetella bronchiseptica infection by paranteral vaccination. Am. J. Vet. Res. 33:1975-1984.

Hatch, M. T. and Dimmick, R.L. (1966). Physiological response of air-borne bacteria to shifts. Bact. Rev. 30:597-603.

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

Hirsh, D.C.; Martin, L.D.; Keith, B.D. and Rhoades, R. (1985). Resistance plasmid of P. multocida isolated from turkeys. Am. J. Vet. Res. 46 (7):1490-1493.

Hoiby, N.J.; Hertz, J.B. and Andersen, V. (1976). Cross reaction between Bordetella pertussis and 28 other bacterial species. Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B 84:395-400.

Hsu, F.S.; Yang, P.C. and Wung, S.C. (1982). Tiamulin injectable for tretment of swine bacterial pneumonia. Proc. Fth. Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Mexico p.104.

Iglesia, G.; Pijoan, C. and Molitor, T. (1988). Replication of pseudorabies virus in swine alveolar macrophages. Proc. Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Brazil. p.162.

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.

I'Lina, Z.M. and Zasukhin, M. I. (1975). Sb nauch Rab, Sib Zonal' Nauchno-Issled Vet. Inst.. Omsk 25:76.

Jackwood, M. W.; Saif, M. and Coplin, D.E. (1986). Isolation and characterization of B. avium plasmids. Avian Diseases. 31:782-786.

Jacques, M.; Parent, N. and Foiry, B. (1988). Adherence of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida to porcine nasal and tracheal epithelial cells. Can. J. Vet. Res. 52:283-285.

Jenkins, E.M.; Anthony, V.; Vance, R.; Cleveland, J. and Gbadamosi, S.G. (1977). Prevalence of Bordetella bronchiseptica infection in swine of south-eastern Alabama. Am. J. Vet. Res. 38 :2071.

Jericho, K.W.F.; Langford, E. V, and Pantekoek, J. (1977). Recovery of Pasteurella multocida from aerosols at differing temperature and humidity. *Can. J. Comp. Me.* **41**:211-214.

Jericho, K.W.F. (1987). Experimental studies of studies of Infectious respiratory disease. *Can. J. Vet. Res.* **51**:417-418.

Jones, C.D.R. (1983). Mucociliary clearance from the calf lung. *Can. J. Comp. Med.* **47**:265-269.

Kang, B.K.; Koshimizu, K. and Ogata, M. (1971). Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. III. Field survey by agglutination test in relation to incidence of Bordetella bronchiseptica and turbinate atrophy. *Jpn. J. Vet. Sci.* **33**:17.

Kemeay, L.J. (1972). Experimental atrophic rhinitis produced by Bordetella bronchiseptica culture in young pigs. *Cornell. Vet.* **62**:477-485.

Labaw, L. W. and Mosley, V.M. (1955). Periodic structure in the flagella of Brucella bronchiseptica. *Biochim. Biophys. Acta.* **17**:322-324.

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.

Lautrop, H. and Lacey, B.W. (1960). Laboratory diagnosis of whoping cough or Bordetella infections. *Bull, W. H.* **23**:15-35.

Little, T.W.A. (1975). respiratory disease in pigs: a study. *Vet. Rec.* **96**:540-544.

Leman, A.D.; Straw, B.; Glock, R.; Mengeling, W.; Penny, R.H.; Giles, C.J. (1985). *Diseases of swine*. Sixth edition. Cap. 38-40.

Lillie, T.W.A.; and Thomson, R.G. (1972). The pulmonary clearance of bacteria by calves and mice. *Can. J. Comp. Med.* **36**: 129-137.



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.

MacLennan, A.P. (1960). Specific lipopolysaccharides of Bordetella. *Biochem. J.* **74**:409.

Magyar, T.; Semjén, G. and Osuatch, Z. (1985). Investigation of adhesive and nonadhesive Bordetella bronchiseptica strains in suckling-mouse model. *Acta. Vet. hungarica* **33**:137-141.

Martineau, G.P.; Broes, A.; De Jong, M.F.; Martineau-Roize, B. (1982). Experimental reproduction of atrophic rhinitis with Pasteurella multocida on gnotobiotic and conventional piglets. *Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. México*, p.88.

McAllister, H.A. and Carter, G.R. (1974). An aerogenic Pasteurella-like organism recovered from swine. *Am. J. Vet. Res.* **35**(7):917-922.

McCandlish, I.A.P.; Thompson, H. and Wright, G. (1976). Kennel cough: vaccination against Bordetella bronchiseptica infection. *Vet. Rec.* **98**:156-157.

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

Mercer, T.T. (1973). Production and characterization of aerosols. *Arch. Intern. Med.* **131**:39-49.

Miniatis, O.P. and Johnson, J.A. (1980). Experimental atrophic rhinitis in gnotobiotic pigs. *Can. J. Comp. Med.* **44**:358.

Montaraz, J.A.; Novotny, P. and Ivanyi, J. (1985). Identification of a 68-Kilodalton protective antigen from Bordetella bronchiseptica. *Infect. and Immunity.* **47**(3):744-751.

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.

- Nakai, T.; Sawata, A.; Tsuji, A.; Samejima, Y. and Kume, K. (1984). Purification of dermonecrotic toxin from a sonic extract of Pasteurella multocida SP-72 serotype D. *Infect. Immun.* **46**: 429-434.
- Nakai, T.; Sawata, A. and Kume, K. (1985). Intracellular locations of dermonecrotic toxins in Pasteurella multocida and Bordetella bronchiseptica. *Am. J. Vet. Res.* **46**:870-874.
- Nakai, T.; Kume, K.; Yoshikawa, Y.; Oyamada, T. and Yoshikawa, T. (1986). *Jpn. J. Vet. Sci.* **48**:693-701.
- Nakai, T.; Nagano, H.; Horiguchi, Y. and Kume, K. (1988). Isolation and characterization of non-toxigenic mutant strains of Bordetella bronchiseptica. *Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Brazil.* p.35.
- Nakase, Y. (1957). Studies on Haemophilus bronchisepticus. I. The antigenic structures of Haemophilus bronchisepticus from guinea pigs. *Kitasato Arch. Exp. Med.* **30**:57-72.
- Nakase, Y. (1957). Studies on Haemophilus bronchisepticus. II. Phase variation of H. bronchisepticus. *Kitasato. Arch. Exp. Med.* **30**:73-77.
- Nakase, Y.; Kume, K.; Shimoda, K. and Sawata, A. (1980). Experimental atrophic rhinitis produced by cell-free extract of Bordetella bronchiseptica. *Proc. Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Copenhagen*, p.202.
- Nakai, T.; Kume, K. and Yamada, H. (1986). Purification of dermonecrotic-toxin from a sonic extract of Pasteurella multocida or Bordetella bronchiseptica. *Proceedings Int. Pig. Vet. Soc. Congress, España.* 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 Muffoz de Arenillas, J.R. Editorial Acibia, S.A.; Zaragoza (España). 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.

Nielsen, N.C.; Riising, H.J. and Bille, N. (1976). Experimental reproduction of atrophic rhinitis in pigs reared to slaughter weight. Proc. Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Iowa State Univ., p.202.

Novotny, P.; Chubb, K.; Cwnley, K. and Montaraz, J.A. (1988). Adenylate cyclase activity of a 68,000 molecular-weight protein isolated from the outer membrane of B. bronchiseptica. Infection and Immun. 50 (1):199-206.

Nugent, K.M. and Pesanti, E.L. (1982). Staphylococcal clearance and pulmonary macrophage function during influenza infection. Infect. and Immun. 38(3):1185-1191.

Oddy, J.G. and Evans, D.G. (1940). The effects produced by toxic and nontoxic extracts of H.pertussis and B. bronchiseptica on the blood sugar of rabbits. J. Pathol. 56:11-16.

Ogata, M.; Koshimizu, K.; Kang, B.; Atobe, H.; Yamamoto, K.; Kino, T. and Ikeda, A. (1970). Studies on the etiology of infectious atrophic rhinitis of swine. I. relationship between the disease and bacterial flora of nasal cavity of pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 32:185.

Olsen, R.G.; Hoover, E.A.; Mathes, L.E.; Heding, L. and Schaller, J. (1976). Immunization against feline oncornavirus disease using a killed tumor cell vaccine. Cancer. Res. 36:3642-3646.

Osborne, A.D.; Saunders, J.R.; Sebunya, T.K.; Willson, P. and Green, G.H. (1985). A simple aerosol chamber for experimental reproduction of respiratory disease in pigs and other species. Can. J. comp. Med. 49:434-435.

Papasian, C.; Downs, N.J.; Talley, R.; Romberger, D. and Hodgen, G. (1987). Bordetella bronchiseptica bronchitis. J. of Clin. Microbiol. 25(3) p.575-577.

Parker, C. (1976). Role of the genetics and physiology of Bordetella pertussis in the production of vaccine and the study of host-parasite relationships in pertussis. Adv. Appl. Microbiol. 20:27-42.

Pashov, T.V.; Kurbala, M.Y. and Sereda, D.I. (1967). Aetiology role of Pasteurella multocida and Bordetella bronchiseptica in porcine infectious atrophic rhinitis. Veterinariya. moscow. 14:48.

Pedersen, K.B. and Barford, K. (1977). Effect of vaccination of sows with Bordetella bronchiseptica on the incidence of atrophic rhinitis in swine. NBord. Vet. Med. 29:369.

Pedersen, K.B. and Barford, K. (1981). The aetiology significance of Bordetella bronchiseptica and Pasteurella multocida in atrophic rhinitis of swine. Nord. Vet. Med. 33:513.

Pedersen, K.B. and Elling, F. (1984). Persistent atrophic rhinitis induced by dermonecrotic Pasteurella multocida. J. of Comp. Pathol. 34:203-214.

Pedersen, K.B. and Jensen, P.T. (1980). The influence of passively acquired antibodies on the immune of piglets immunised with a B. bronchiseptica vaccine. Proc. 6th Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Copenhagen. p.176.

Pedersen, K.B. and Nielsen, N.C. (1983). Atrophic rhinitis of pigs. Comm. Eur. Communitis. Rep. EUR 8043 EN Luxemburg p.205

Pennings, A.M.; Storm, P.K. and Baars, J.C. (1984). Porcine atrophic rhinitis : Use of vero cell line monolayer for demonstration of thermolabile toxins and toxin-neutralizing capacity antisera. Proc. Int. Pig. Vet. Soc. Cong. Belgium.

Penny, R.H.C. (1977). The influence of management changes on the disease picture in pigs. Vet. Annu. 17:111.

Phillis, J.W. (1976). Veterinary physiology. W.B. Saunders Philadelphia.

Phillis, C.E. (1943). Bordetella bronchiseptica as a factor in porcine pneumonias. Can. Comp. Med. 7:58-59.

Pijoan, C.; Morrison, R.B. and Hilley, H.D. (1983). Serotyping of Pasteurella multocida isolated from swine lungs collected at slaughter; J. Clin. Microbiol. 17: (6); 1074-1076.

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

Pijoan, C.; Trigo and Hogg, A. (1988). Atrophic Rhinitis in pigs associated with a toxigenic strain of Pasteurella multocida serotype A. Proceedings Int. Pig Soc. Congress, Brazil p.32.

Pittman, M. (1974). Genos Bordetella Moreno-López, 1952, p.282-283. In R.E. Buchanan and N.E. Gibbons (ed). Bergey's manual of determinate bacteriology, 8th ed. The Williams and Wilkins, Co. Baltimore.

Radtke, G. (1938). Untersuchungen über die Ursache und das Wesen der schnuffelkrankheit des Schweinen. Arch. Wiss. Prakt. Tierheilkd 72:371.

- Ray, J.D. (1950). Bruceella bronchisepticus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 116:51
- Rebers, P.A. and Heddleston, K.L. (1974). Immunologic comparison of Westphal-type lipopolysaccharides and free endotoxins from an encapsulated and nonencapsulated avian strain of Pasteurella multocida; Am. J. Vet. Res. 35; 555-560.
- Richter, G.W. and Kress, Y. (1967). Electron microscopy of a strain of Bordetella bronchiseptica. J. Bacteriol. 94:1216-1224.
- Roberts, R.S. (1947). An immunological study of Pasteurella septica; J. of Comp. Path. 57; 261-278.
- Roop, M.R.; Veit, H.P.; Sinsky, R.J.; Veit, S.; Hewlett, E.L. and Kornegay, E. (1987). Virulence factors of Bordetella bronchiseptic associated with the production of infectious atrophic rhinitis and pneumonia in experimentally infected neonatal swine. Infect. and Immun. 55(1):217-222.
- Ross, R.F.; Switzer, W.P. and Duncan, J.R. (1967). Comparison of pathogenicity of various isolates of Bordetella bronchiseptica in young pigs. Can. J. Comp. Med. Vet. Sci. 31:53-57.
- Ross, R.F. (1984). Chronic pneumonia of swine with emphasis on mycoplasmal pneumonia. Proceedings American Association of swine Practitioners USA. P.79-96.
- Ross, R.F. and Harry.P.M. (1969). Histamine-sensitizing factor, muse protective antigens, and other antigens of some members of the genus Bordetella. J. Bacteriol. 99:57-64.
- Runnels, L.J. (1982). Infection atrophic rhinitis of swine symposium on diagnosis and tretment swine diseases. p. 301-318.
- Rutter, J.M. (1981). Quantitative observations on Bordetella bronchiseptica infection in atrophic rhinitis of pigs. Vet. Rec. 108:451.

Rutter, J.M. and Rojas, X. (1982). Atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets: Differences in the pathogenicity of Pasteurella multocida in combination infection with Bordetella bronchiseptica. Vet. Rec. 110:531.

Rutter, J.M.; Francis, L.M. and Samson, B.F. (1982). Virulence of Bordetella bronchiseptica from pigs with or without atrophic rhinitis. J. Med. Microbiol. 15: 105.

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

Rutter, J.M. and Collings, L.A. (1983). The virulence of Bordetella bronchiseptica in atrophic rhinitis of pigs. Atrophic rhinitis of pigs. Comm. Eur. Communities. Rep. EUR, Luxemburg, p.77.

Rutter, J.M. (1986). Virulence of P. multocida in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with B. bronchiseptica. Vet. Sci. 34 :287-295.

Sawata, A. and Kume, K. (1982). Nasal turbinate atrophy in young mice inoculated with Bordetella bronchiseptica of pig origin. Res. Vet. Sci. 34:287-295.

Sebunya, N.R.; Saunders, J.R. and Osborne, A.D. (1983). Dose response relationships of H. pleuropneumoniae aerosols in pigs. Can. J. Comp. Med. 47:54-56.

Semj'án, G. and Magyar, T. (1985). A bovine haemagglutinin of Bordetella bronchiseptica responsible for adherence. Acta Vet. hungarica. 33:129-136.

Schofield, F.W. and Jones, T.L. (1950). The pathology and bacteriology of infectious atrophic rhinitis in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 116:120.

Schoss, P. and Thiel, C.P. (1984). Occurrence of toxin producing strains of Pasteurella multocida and Bordetella bronchiseptica in pigs herds with atrophic rhinitis and in unaffected herds. Proc. Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Belgium. p.94.

- Schoss, P. (1987). Wiener Tierärztliche Monatschrift 74:301.
- Shimizu, T.M.; Nakagawa, M.; Shibata, S. and Suzuki, K. (1971). Atrophic rhinitis produced by intranasal inoculation of Bordetella bronchiseptica in hysterectomy produced colostrum deprived pigs. Cornell. Vet. 61: 696-671.
- Silveira, D.; Edington, N. and Smith, I.M. (1971). Ultrastructural changes in the nasal turbinate bone of pigs in early infection with Bordetella bronchiseptica. res. Vet. Sci. 33:37.
- Simmons, D.A. and Simpson, W. (1977). The biochemical and cultural characteristics of Pasteurella multocida. Med. Lab. Sci. 34:145-148.
- Skelly, B.J.; Pruss, M.; Pellegrino, R.; Andersen, D. and Abruzzo, G. (1980). Variation in degree of atrophic rhinitis with field isolants of Bordetella bronchiseptica. Proc. Int. Cong. Pig. Vet. Soc. Copenhagen, p.210.
- Smith, I.M.; Giphant, J.; Baskerville, A.J. and Giles, C.J. (1980). High prevalence of strains of Bordetella bronchiseptica resistant to potentiated sulphonamide in English pigs herds in 1978-1979. Vet. rec. 106:462.
- Smith, I.M.; Giles, C.J. and Bakerville, A.J. (1982). The immunisation of pigs against experimental infection with Bordetella bronchiseptica. Vet. Rec. 110:488.
- Switzer, W.P. (1931). Switzer, W.P. (1955). Studies on infections atrophic rhinitis. IV Characterization of pleuropneumonia-like organism isolated from the nasal cavities of swine. Am. J. Vet. Res. 16:540.
- Switzer, W.P. (1956). Studies of infectious atrophic rhinitis. V concept that several agents may cause turbinate atrophy. Am. J. Vet. Res. 17:478-484.
- Switzer, W.P. and L'Ecuyer, C. (1960). Detection of swine nasal virusess in cell culture. Am. J. Vet. Res. 21:967.
- Switzer, W.P. and Farrington, D.O. (1972). Progress in the



control of atrophic rhinitis caused by Bordetella bronchiseptica in swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 160:1325.

Switzer, W.P. and Farrington, D.O. (1975). Infectious atrophic rhinitis. In diseases of swine, 4th. ed Ed.H.W. Dunne and D. Lemar, Ames Iowa State Univ. press, p.687.

Switzer, W.P. (1981). Bordetellosis. p.497-507. In A.D. Lemar, R.D. Glock, W.L.; Mengelin, R.H.; Penny E.; Scholl, E, and Straw, B. (ed.) Disease of swine). 5th. ed. The Iowa State University Press. Ames.

Thomson, G.R. and Gilka, F. (1974). A brief review of pulmonary clearance of bacterial aerosols emphasizing aspects of particular relevance to veterinary medicine. Can. Vet. J. 15:99-106.

Thorp, F. and Tanner, F.W. (1940). Bacteriological study of the aerobic flora occurring in pneumonic lungs of swine. J. Am. Vet. Med. Assoc. 96:149-160.

Thigpen, J.E.; Clements, M.E. and Gupta, B.N. (1978). Isolation of Pasteurella aerogenes from the uterus of rabbits following abortion. Lab. Animal. Sci. 28:444.

Tornoe, N. and Nielsen, N.C. (1976). Inoculation experiments with Bordetella bronchiseptica starins in SPF pigs. Nord. Vet. 28:233-242.

Trigo, E. and Pijoan, C. (1988). Presence of pili in Pasteurella multocida strains associated with atrophic rhinitis. Vet. Rec. 122:19.

Trigo, E. and Pijoan, C. (1988). Effect of piliation hemagglutination and capsular serotype of Pasteurella multocida on the production of atrophic rhinitis in swine. Proc. Int. Cong. Vet. Brazil, p.31.

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

Whittlestone, P. (1982). Infectious agents associated with porcine respiratory diseases. Pig Vet. Soc. Proc. 9:71.

Wilson, M.P. and Miles, G. (1946). Bordetella bronchiseptica a re-assessment of its role in canine respiratory disease. Vet. Rec. 93:486-487.

Woodmins, (1980). The effect of medicated feed on the nasal microflora and weight gain of pigs. Can. J. Comp. Med. 36:49

Yokomizo, Y. and Shimizu, T (1979). Adherence of Bordetella bronchiseptica to swine nasal epithelial cells and its possible role in virulence. Res. Vet. sci. 27:15.

Zink, Ch. and Yaker, J. (1987). Experimental infection of piglets by aerosols of Rhodococcus equi. Can. J. Vet. Res. 51 p. 290-296.