



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

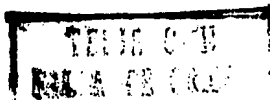
EFECTO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE
AUJESZKY (PSEUDO - RABIA) SOBRE LA
PRESENTACION DE LA PLEURONEUMONIA
CONTAGIOSA PORCINA.

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
ALFONSO FALCON NERI

Director: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

Asesores: DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN
MC. JOSE CAMACHO MACHIN

1989





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO	página
Resumen	i
Abstract	iii
Lista de cuadros	v
Lista de figuras	vi
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIAL Y METODOS	8
3.1. Experimento I estudio de rastro	8
3.1.3. Bacteriología	8
3.1.4. Serología	10
3.2. Experimento II determinación de la dosis mínima de <u>A. pleuropneumoniae.</u>	10
3.2.1. Animales	10
3.2.1.1. Alojamiento	10
3.2.1.2. Alimentación	10
3.2.1.3. Vacunación	11
3.2.2. Cepa de desafío	11
3.2.2.1. Medios de cultivo	12
3.2.3. Cámara de nebulización	13
3.2.4. Diseño experimental	13
3.2.4.1. Necropsia	16
3.2.4.2. Histopatología	16
3.2.4.3. Recuperación del agente inoculado	16
3.3. Experimento III desafío de cerdos vacunados con VPR y <u>A. pleuropneumoniae</u>	17
3.3.1. Diseño experimental	17

3.3.2. Preparación de inoculos	18
3.3.3. Evaluación de los signos clínicos	19
3.3.4. Necropsia	20
3.3.5. Ganancia de peso y conversión alimenticia	20
4. RESULTADOS	
4.1. Resultados experimento I	21
4.2. Resultados experimento II	21
4.2.1. Evaluación de los signos clínicos	21
4.2.2. Lesiones macroscópicas	23
4.2.3. Lesiones microscópicas	23
4.2.4. Bacteriología	23
4.3. Resultados experimento III	24
4.3.1. Evaluación de los signos clínicos	24
4.3.2. Lesiones macroscópicas	24
4.3.3. Lesiones microscópicas	25
4.3.4. Identificación de los agentes inoculados	26
4.3.5. ganancia de peso y conversión alimenticia	26
5. DISCUSION	53
6. CONCLUSIONES	58
7. BIBLIOGRAFIA	59

RESUMEN

Para determinar la posible asociación de el virus de la pseudo rabia (VPR) en la presentación de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP) se realizaron dos estudios. En el primero se utilizaron 60 pulmones con lesión de PCP y 40 sin lesiones aparentes así como la sangre acantonada en el corazón de cerdos sacrificados en rastro. Se usaron técnicas bacteriológicas para el aislamiento de A. pleuropneumoniae y serológicas (ELISA) para la detección de anticuerpos contra el VPR. En el segundo estudio se utilizaron 12 cerdos híbridos recién destetados, libres de anticuerpos contra cólera porcino, erisipela y VPR, se vacunaron contra pseudo-rabia y distribuyeron en tres grupos de cuatro animales cada uno, se designaron al azar los siguientes tratamientos: grupo 1 testigo, grupo 2 inoculado por vía intranasal con 1800 TCID del VPR cepa Shope y el grupo 3 que recibió el mismo tratamiento anterior mas una nebulización con 14 ml de una suspensión bacteriana que contenía 2×10^4 de A. pleuropneumoniae serotipo 1/ml., dos días después de la inoculación del virus, se registraron los signos clínicos. se determinó el área pulmonar afectada y se realizó bacteriología, histopatología e inmunofluorescencia de los órganos afectados. En el primer estudio se logró el aislamiento de la bacteria en 57 (95 %) de los pulmones con lesión, de los cuales 46 (76.7%) resultó positivo al VPR. De un pulmón con lesión que no se logró aislar la bacteria resultó positivo a VPR. De los pulmones sin lesión no se

obtuvo aislamiento bacteriano y 14 (35%) de ellos resultaron positivos a VPR, encontrándose evidencia estadística ($P < 0.01$) de la asociación entre los dos agentes en la presentación de PCP. En el segundo estudio los cerdos del grupo 1 no presentaron cambios clínicos ni lesiones patológicas, los cerdos del grupo 2 mostraron signos respiratorios leves y fiebre, se sacrificaron siete días postinoculación y a la necropsia se encontró lesión en los lóbulos pulmonares apicales y cardíacos que abarcaron el 32% de la superficie pulmonar. Microscópicamente se encontró neumonía exudativa con edema, congestión y hemorragias se observaron corpúsculos de inclusión intranucleares y el exudado fue de células polimorfonucleares. Los cerdos del grupo 3 presentaron signos respiratorios severos, fiebre, vómito y hemoptisis unas horas antes de la muerte, los pulmones estaban afectados en todos sus lóbulos y las lesiones se extendían en el 51% de la superficie. Microscópicamente se encontró neumonía exudativa de células mononucleares, pleuritis, necrosis coagulativa, trombos, edema, células transformadas y corpúsculos de inclusión intranucleares. Se aisló la bacteria inoculada, de los pulmones de los cerdos del grupo 3 y se detectó la presencia del virus en todos los pulmones de los grupos 2 y 3, la extensión de la lesión fue estadísticamente mayor ($P < 0.05$) en los pulmones de los cerdos del grupo 3. La asociación del virus con la bacteria ocasionó lesiones más severas que causaron la muerte del animal.

ABSTRACT

Two studies were conducted in order to attempt to establish the role of Pseudorabies Virus (PRV) in porcine pleuropneumoniae (PP). A) for the first trial one hundred paired samples were collected at the slaughterhouse from the same animal blood and lung samples were obtained. The blood was allowed to clot and used for ELISA test for PRV antibodies and the lungs were prepared for bacteriology. Of the 100 samples, 60 were from animals with PP lesions and the remaining 40 were without lesions. B) on a second study three experimental groups of four swine each were established. The first group of four swine was left as non treated control, the second group was inoculated with 1800 TCID₅₀ of PRV, Shope strain and the third group was first inoculated with 1800 TCID₅₀ of PRV Shope strain and two days latter with 2X10⁴ CFU of A. pleuropneumoniae by aerosol route. The animals were eutanized when moribund or when the test was ended at 7 days. During the illness, clinical signs were observed and recorded and after death, gross lesions and samples for pathology were collected and further microscopic evaluation of lesions was conducted. On the first trial A. pleuropneumoniae was isolated from 57 (95%) lungs with lesions and 46 (76.7%) of these were also positive to PRV. From the lungs without lesions no A. pleuropneumoniae was isolated, while 14 (35%) were positive to PRV antibodies. On the second trial the animals remained healthy and without fever during the trial. No lungs lesions were found upon slaughter.

Pigs on the second group showed hyperthermia, dyspnea and loss of appetite and the pigs were sacrificed on day 7 post inoculation. Their lungs had lesions in 23 to 38% of their surface. Prior the death the swine showed hemoptysis. On the third group, inoculed with PRV and A. pleuropneumoniae all pigs died within 50 hours PI and their lungs showed lesions in 26 to 68% of their surface and were the most severe observed. A. pleuropneumoniae was recovered from all lungs and PRV was observed by FA both in lungs and tonsils.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	pag.
1. Tablas de contingencia y resultados de la prueba de χ^2 para tipo de pulmón y aislamiento bacteriano, serología y aislamiento bacteriano, serología y tipo de pulmón.	28
2. Tabla de contingencia y resultados de χ^2 , para todos los factores estudiados.	29
3. Promedio de lesión pulmonar, mortalidad y tiempo de muerte en los cerdos inoculados con la bacteria.	31
4. Recuperación de la bacteria a partir de los órganos de los cerdos inoculados.	50
5.- Identificación de VPR por la técnica de inmunofluorescencia a partir de los órganos de los cerdos inoculados.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura	pag.
1. Bacteriología y serología del estudio de rastro	27
2. Cerdo con hemorragias antes de la muerte	30
3.A. Esquema de la vista dorsal y ventral de los pulmones de los cerdos del experimento II, grupos A, B y C	33
3.B. Esquema de la vista dorsal y ventral de los pulmones de los cerdos del experimento II, grupos D y E	35
4. Regresión lineal del área pulmonar afectada contra la dosis de bacterias inoculadas	36
5. Lesiones macroscópicas causadas por la bacteria	37
6. Lesiones macroscópicas causadas por la bacteria	38
7. Histopatología de los pulmones de los cerdos inoculados con la bacteria	39
8. Medias de la temperatura corporal de los cerdos de los tres grupos	40
9, 10 y 11. Lesiones macroscópicas en los pulmones de los cerdos inoculados con VPR	42
12.A, B, C. Esquema de la vista dorsal y ventral de los pulmones de los cerdos de los tres grupos	44, 46 y 48
13 y 14. Histopatología de los pulmones del grupo III	49
15. Ganancia diaria de peso de los cerdos de los tres grupos	52

1.- INTRODUCCION

En la presentación de neumonías en los cerdos Jericho, (1968), Huhn (1970), Little, (1975) y Watt, (1978) comunicaron una variedad de agentes etiológicos como son: bacterias, virus, micoplasmas y parásitos. Algunos de estos actúan como patógenos primarios, tal es el caso de Haemophilus pleuropneumoniae, Mycoplasma hyopneumoniae, virus de la influenza porcina, Adenovirus, Reovirus, virus del cólera porcino y el virus de la enfermedad de Aujeszky o pseudo-rabia (VPR). Haemophilus pleuropneumoniae ha sido implicado en numerosas ocasiones como causa de pleuroneumonías severas y a menudo fatales en los cerdos (Shope, 1964, Little, 1970). Dentro del género Haemophilus, se encuentran bacterias gram negativas, pleomórficas, que para su crecimiento requieren de medios de cultivo enriquecidos con hemina o nicotinamin adenin dinucleótido (NAD) denominados factor X y V respectivamente. H. pleuropneumoniae requiere únicamente del factor V, con la característica de ser hemolítico por lo que se le consideró sinónimo de Haemophilus parahemolyticus (Biberstein y col, 1977). El haemofilus Beta hemolítico de origen humano que originalmente se denominó Haemophilus parahaemolyticus, fue separado del grupo H. pleuropneumoniae/parahaemolyticus con base en sus diferencias fenotípicas, contenido de Guanina-Citosina en su ADN, su marcada diferencia de patogenicidad para el cerdo y su dependencia del factor V, asignándosele después el nombre de Haemophilus parainfluenzae biotipos II y III (Kilian, 1976). Usando técnicas

de homología de ADN se pudo demostrar que las bacterias del género *Haemophilus* -*Pasteurella* -*Actinobacillus* mostraron un alto nivel de relaciones genéticas y por lo tanto podrían ser incluidas en un solo grupo denominado grupo HPA (Pohl 1981). El hallazgo de que las bacterias "Pasteurella-like" son capaces de producir lesiones similares a pleuroneumonía en cerdos, así como las cepas NAD dependientes (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) y cepas NAD independientes (llamadas Pasteurella-like) que se aíslan del tracto respiratorio de los cerdos, son fenotípicamente idénticas, se ha propuesto el cambio de nomenclatura de *Haemophilus pleuropneumoniae* a *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Nicolet, 1985).

El virus de la Pseudo-rabia está clasificado en el cuarto reporte del Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus, dentro de la familia: Herpesviridae, subfamilia: Alphaherpesvirinae, género: grupo I de los Herpes Virus Suinos, especie: Herpesvirus suis I (Pseudo-rabia) (Matthews, 1982).

El virus ocasiona un proceso infeccioso, de curso agudo, con signos clínicos nerviosos, generalmente fatal para los animales domésticos y salvajes, a excepción de los cerdos en los que se presenta un cuadro benigno, salvo en lechones (Gustafson, 1975).

La enfermedad en el cerdo se caracteriza principalmente por signos clínicos nerviosos y lesiones en el sistema nervioso central (Olander, y col., 1966), sin embargo se ha señalado que los signos respiratorios pudieran ser la principal característica de la enfermedad (Corner, 1965, Baskerville, 1971, Baskerville y col., 1971). Las diferencias observadas en cuanto a la patogenicia

de la enfermedad se atribuyen a: edad del cerdo, cepa del virus, dosis de exposición, susceptibilidad individual y estado inmune (Baskerville y col., 1971, Baskerville, 1972, Baskerville y col., 1973, Alva-Valdes y col., 1983).

En cuanto a la edad se ha observado que los lechones hasta la segunda semana de vida son más severamente afectados, presentando mortalidades de hasta el 100%, tasa que disminuye progresivamente hasta alcanzar un nivel del 5-20%, a las cinco semanas de edad (Baskerville y col., 1973).

En los cerdos de engorda la sintomatología no es muy clara y puede pasar desapercibida, detectandose por la transmisión a otras especies animales o por estudios serológicos (Toma, 1980).

En los reproductores, se presentan signos nerviosos sólo en raras ocasiones presentándose ligera elevación de la temperatura corporal y pérdida del apetito, en las cerdas gestantes se pueden presentar abortos, mortinatos y momificaciones como secuela de la enfermedad (Thawley y col., 1980).

Existen diferentes cepas del virus, algunas de ellas producen altos índices de mortalidad en cerdos de engorda (McFerran y col., 1979).

Se han aislado cepas de campo del virus de la Pseudo-rabia espontáneamente atenuadas para el cerdo, que pueden causar problemas respiratorios (Bodon y col., 1968), así como cepas que principalmente son neumotropas y mantienen en menor o mayor grado la capacidad de invadir el sistema nervioso central (Corner, 1965, Baskerville, 1971, Baskerville y col., 1971).

La inmunidad posinfección, calostrual o posvacunal no protege de

la infección pero si atenua los signos y disminuye la mortalidad, no protege de la infección latente ni evita la excreción del virus (Mc Ferran y Dow, 1973, 1975, Andries y col., 1978).

En cuanto a la dosis se ha demostrado dependencia entre dosis, periodo de incubación, tiempo de aparición de fiebre, gravedad de los síntomas y lesiones y el periodo entre infección y muerte (Baskerville, 1972b).

Las diferencias en la susceptibilidad individual no es debida a la presencia de anticuerpos específicos (Gutekunst y Pirtle, 1979). El estado inmune del animal se ha relacionado con formas más leves de la enfermedad (McFerran y col., 1979).

La latencia es la capacidad del genoma viral de integrarse al ADN celular y reactivarse en determinadas situaciones provocando la recurrencia de la enfermedad o la infección de animales susceptibles (Rouse y Babiuk, 1978, Smith, 1979); Wittman y col., (1982) reactivaron el virus con la aplicación de corticosteroides en cerdos, provocando fiebre, anorexia, salivación y en un caso, neumonía severa.

Asociación de virus y bacterias en las neumonías del cerdo.

Existen evidencias de que los agentes considerados como secundarios, por la falta de patogenicidad que exhiben cuando actúan por si solos, se tornan patógenos cuando existe una primo infección produciendo por ejemplo severas neumonías tanto en animales como en el hombre, cuando se sobreponen a una infección viral (Jakab 1981, Yates 1982), mostrando claramente el fenómeno de interacción. Encontrándose tambien el efecto de sinergismo

cuando dos agentes primarios se asocian para producir lesiones más severas que las ocasionadas por los mismos por separado, un ejemplo de este fenómeno es el descrito por Pattison y col. (1957), Matthews y Pattison (1961), quienes encontraron que al inocular cerdos intratraquealmente con virus del cólera porcino se desarrollaron síntomas de la enfermedad con una ligera lesión pulmonar, mientras que al adicionar Haemophilus parainfluenzae al inóculo que contiene el virus se agravaron los signos clínicos y fueron más severas las lesiones en tracto respiratorio. Kasza y col. (1969), reportaron una acción sinérgica en cerdos gnotobióticos inoculados simultáneamente con Adenovirus y Mycoplasma hyopneumoniss. Smith y col. (1973), encontraron resultados similares al inocular cerdos con Enterovirus tipo 2 y Pasteurella multocida. Pijoan y Ochoa (1978), demostraron que los cerdos que recibieron una dosis de cepa vacunal del virus de cólera porcino mostraron lesiones más severas cuando fueron inoculadas con una cepa de Pasteurella multocida.

En un estudio previo de rastro, se muestrearon 106 pulmones, de los cuales el 68% fueron de tipo neumónico y el 32% de tipo normal, en 87% de los pulmones neumónicos se encontró serología positiva al virus de pseudo-rabia mientras que en los normales solo el 32% presentó serología positiva. De los pulmones neumónicos en un 51% se aisló algún tipo de Pasteurella, mientras que de los normales solo se logró aislar en un 9% (Badiola y Pujols, 1984).

En otro estudio, se demostró la interacción del virus de la pseudo-rabia y P. multocida en ratones, aquí se midió la remoción

bacteriana pulmonar y se hicieron curvas de mortalidad y un estudio histopatológico. Los resultados obtenidos mostraron una marcada disminución de la eliminación bacteriana del pulmón hacia el día 11 posinoculación con el virus de pseudo-rabia (Badiola y Fujols, 1984).

De estos trabajos se desarrolló un experimento con cerdos convencionales previamente vacunados con una cepa inactivada del virus de pseudo-rabia y se consideró como parámetro principal la remoción pulmonar de P. multocida a diferentes días posdesafío con una cepa virulenta del virus, se encontro que la remocion pulmonar se vió afectada de los días 7 al 15 posinfección con el virus (Caballero, 1985).

En otro estudio se infectaron cerdos por vía intranasal con el virus de pseudu-rabia patógeno cepa Shope (con titulo de 10 TCID) y siete días después con una mezcla de P.⁵⁰multocida tipos A y D: se observó que el virus causó interferencia en la fusión del fagosoma-lisosoma, que era necesario para inactivar las bacterias fagocitadas, por lo tanto la infección viral previa se permitió la superinfección con P.multocida (Fuentes y Pijoan, 1984).

No existe información en la literatura acerca de la asociación que pudiera existir entre el virus de la psuedo-rabia y el A. pleuropneumoniae en la presentación de pleuroneumonia contagiosa porcina, sin embargo si existen reportes en los cuales se discute la patogenicidad de las diferentes cepas del virus de la psuedo-rabia. Howarth y de Paoli (1968) encontraron cepas que

producen alta mortalidad en cerdos de engorda: Corner, 1965), Baskerville, (1971), Baskerville y col., (1971) describen cepas con fuerte afinidad por el tracto respiratorio sin perder su capacidad invasora para el sistema nervioso central. Toma (1980), observó que después de la vacunación con virus inactivado se disminuyeron el número de focos anuales y las pérdidas económicas, pero aumentaron el número de departamentos afectados por una sintomatología, sobre todo de presentación pulmonar. Por lo anterior y tomando en cuenta la inquietud de algunos porciicultores, que han observado que después de la vacunación contra pseudo-rabia se presentan brotes severos de pleuroneumonía contagiosa, se planteó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

2.- OBJETIVOS

El objetivo principal fué el de conocer si existía una posible acción sinérgica entre el Virus de la Pseudo-rabia (VPR) y el Actinobacillus pleuropneumoniae en la presentación de la pleuroneumonía contagiosa porcina (PCP).

Objetivos particulares:

- 1.- Encontrar la relación existente entre la presentación de PCP y la serología positiva a VPR en cerdos de abasto.
- 2.- Establecer la dosis mínima de Actinobacillus pleuropneumoniae que produzca signos clínicos sin causar la muerte de los cerdos.
- 3.- Estudiar la existencia del fenómeno de sinergia entre el Virus de Pseudo-rabia y el A. pleuropneumoniae cuando son inoculados en cerdos convencionales.

3.- MATERIAL Y METODOS

3.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL I.

3.1.1. Correlación entre la serología positiva al virus de la Pseudo-rabia y al aislamiento de Actinobacillus pleuropneumoniae.

3.1.2.- Muestreo de pulmones con y sin lesión de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP) y sangre.

De los cerdos sacrificados en el rastro frigorífico de Ferrería en el D.F., se colectaron 60 pulmones con lesión característica de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP) y 40 pulmones sin lesión, al mismo tiempo se colectó la sangre acantonada en el corazón de los mismos cerdos.

3.1.3. Bacteriología de los pulmones colectados.

Para el aislamiento de A. pleuropneumoniae, los pulmones fueron trabajados de acuerdo a Little y Harding (1980); una muestra de aproximadamente un centímetro cúbico del tejido pulmonar se colocó en un tubo de cultivo el cual contenía 8 ml de medio de infusión cerebro corazón (BHI) al que previamente se adicionó 10% de extracto fresco de levadura, posteriormente se realizaron diluciones logarítmicas de 10^{-1} a 10^{-6} con el mismo medio de cultivo, se incubaron a 37 C en una estufa bacteriológica Marca THELCO MOD. 8M. durante 24 horas, después de este tiempo se sembraron tres alícuotas en placas de agar sangre, con una asada de una cepa nodriza de Staphylococcus aureus, esto se realizó únicamente con las diluciones más bajas que presentaron crecimiento bacteriano, se incubaron a 37 C durante 24 horas y las colonias que presentaron satelitismo se identificaron con las pruebas bioquímicas de rutina (Cowan, 1974).

3.1.4. Serología de los cerdos de abasto.

La sangre colectada se centrifugó a 1500 xg 4 C durante 15 minutos, una vez obtenido el suero, en el laboratorio de Diagnóstico de la Dirección General de Sanidad Animal (SARH) en Sta. Ana Tecamac, Edo. de México, se llevó a cabo la detección de anticuerpos contra el virus de la Pseudo-rabia por medio de la técnica de ELISA.

Los resultados fueron evaluados por las pruebas de independencia de Ji-cuadrada

3.2. ESTUDIO EXPERIMENTAL II.

Determinación de la dosis mínima de *A. pleuropneumoniae*.

3.2.1. Animales.

a) Se utilizaron 22 lechones híbridos recién destetados, de una granja libre de Pseudo-rabia y de Cólera Porcino, seleccionados de diferentes camadas y con un promedio de 12 Kg de peso. Estos animales se encontraron libres de anticuerpos contra Cólera Porcino, Erisipela y Pseudo-rabia. No hubo evidencias de signos clínicos característicos de Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

3.2.1.1. Alojamiento.

Los cerdos se alojaron en una de las unidades de aislamiento de la Comisión México Americana para la Erradicación de la Fiebre Aftosa en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología (CENID-Microbiología), ubicado en Palo Alto D.F. Se adaptaron comederos y bebederos para que tuvieran alimento y agua disponible ad libitum.

3.2.1.2. Alimentación.

La alimentación de los cerdos fue a base de un concentrado elaborado en la fábrica de alimentos del CENID-Microbiología, con la siguiente formulación:

Sorgo de grano	71.507	Kg
Pasta de soya	26.493	Kg
Roam fosfórica	0.700	Kg
Carbonato de calcio	0.500	Kg
Sal común	0.300	Kg
Premezcla de vitaminas y minerales.	0.500	Kg

El concentrado fue elaborado para que proporcionara lo siguiente:

Energía metabolizable	3150.0	Kcal.
Proteína cruda	18.0	%
Lisina	0.9	%
Calcio	0.6	%
Fósforo	0.5	%

El alimento fue servido diariamente a la misma hora (8.00 AM) pesando los residuos para calcular el consumo diario de alimento. Los cerdos tuvieron un periodo de adaptación hasta alcanzar los 25 Kgs. de peso.

3.2.1.3. Vacunación:

Los cerdos fueron vacunados contra la Pseudo-rabia cinco días después de que fueron recibidos, cada animal fue inoculado con 2 ml por vía intramuscular profunda de una vacuna comercial que contiene un emulsionado del virus inactivado de una cepa aislada en México.

3.2.2. Cepa de desafío.

La bacteria utilizada fue una cepa de A. pleuropneumoniae aislada de un pulmón con lesión característica de pleuroneumonía contagiosa, procedente de un cerdo sacrificado en el rastro frigorífico de Ferreria en el D.F., esta bacteria fue tipificada por serología como serotipo 1 (Ciprian y col., 1986), para conservar la bacteria el pulmón fue congelado a -70 C y para su recuperación se siguió el procedimiento de Rosendal y col.(1986).

3.2.2.1. Medios de cultivo.

a)- Para el aislamiento bacteriano se utilizó el medio base para agar sangre (Bioxon de México) suplementado con sangre de bovino al 5% (v/v), así como caldo infusión cerebro corazón (BHI, Bioxon de México).

b)- Extracto de levadura.

Se suspendieron 50 gr de levadura fresca de panadería en 100 ml de KH₂PO₄ 0.2M se calentó a 80-85 C durante 20 minutos, se clarificó mediante la filtración en cartuchos Millipore "Lifegard" CP-15, se ajustó el pH a 7.2 con una solución 1 N de NaOH. Se esterilizó por filtración con membranas Millipore de 0.22 µm se almacenó a -20 C hasta su uso (Carter, 1975; Boughton y Thorns, 1976).

c) Soluciones.

1.- Solución Salina Bufferada de Fosfatos (PBS)

NaCl 8.00 g

KCl 0.20 g

Na HPO₄ 1.15 g

2 4

KH PO 0.29 g
2 4
Agua desionizada cbp 1 l.

d) Medios y pruebas de identificación bioquímica (Cowan y Steel 1974).

3.2.3. Cámara de nebulización.

Se utilizó una cámara de 140 cm X 125 cm X 81 construida y estandarizada en la Unidad de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM la cual en una de sus caras se le adaptaron tres nebulizadores médicos (Devilbiss, Somerset, PA, modelo 450) conectados a un compresor de aire modelo B131-C (Industrias G. Murguía S. A., México D. F.) y en otra de las caras tres tubos de salida conectados a un matrás Kitazato, que contenía una solución de fenol adaptada a una bomba de vacío FE-1500 (Industrias F. B. S. A. Zapopan Jal. Méx.). La presión de entrada y salida se reguló a 143 PCI p 3 Kg/cm, las partículas resultantes de la nebulización tuvieron un diámetro estimado de 0.5 a 5 μ m.

3.2.4. Diseño experimental para determinar la dosis mínima de A. pleuropneumoniae.

Se utilizaron 10 cerdos de los anteriormente descritos los cuales después de un periodo de adaptación contaban con un peso promedio de 30 Kg. Fueron distribuidos al azar en cinco grupos (A, B, C, D y E) de dos animales cada uno para ser inoculados por medio de aerosoles. La cepa de A. pleuropneumoniae se cultivó toda la noche en una botella de Roux con medio BHI adicionado con 10% de extracto de levadura, a 37 C y se recuperó por agitación vigorosa

con perlas de vidrio y PBS, posteriormente se realizaron cuentas viables por la técnica de Miles y Misra (1938) y diluciones para obtener las dosis de inoculación que fueron las siguientes:

Grupo	N	Dosis UFC/ml.	Volumen	No. de bacterias /l.
A	2	2×10^4	17	265
B	2	2×10^5	17	2655
C	2	2×10^6	17	26541
D	2	2×10^7	17	265417
E	2	2×10^8	17	2654178

Para calcular el número de bacterias por litro en la cámara se utilizó la siguiente fórmula: $\text{UFC} \times \text{ml en cámara} = \text{el volumen de la cámara} = \text{bacterias /l.}$ (Sebunya y col., 1983) el volumen de la cámara = 1281.3 l.

Un volumen fijo de la suspensión estandarizada fue nebulizado en forma constante (17 ml por grupo animal en 30 min.) en la cámara de nebulización que con este fin fue construida y estandarizada en la Unidad de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

Después de la inoculación los cerdos se mantuvieron en zahurdas separadas para evitar la contaminación entre ellos. Tuvieron libre acceso al alimento y al agua, como se describió anteriormente.

El tiempo de la inoculación se consideró como hora 1 y a partir del cual se evaluaron en cada grupo los siguientes parámetros: signos clínicos, presentación de signos respiratorios, temperatura corporal, tiempo de muerte, lesiones macroscópicas, tales como extensión y aspecto de las lesiones pulmonares, examen

histopatológico de rutina y la recuperación del agente. Los animales sobrevivientes fueron sacrificados siete días después de la inoculación y los pulmones fueron evaluados de la misma manera que en los muertos.

Los resultados fueron evaluados por medio de un modelo de regresión lineal cuya recta se define de la siguiente manera:

$$Y_i = \alpha + \beta X + E_i$$

Y_i = i-ésimo % de lesión

α = intercepto de la recta con el eje de las "Y"

β = coeficiente de regresión

X = las dosis bacterianas utilizadas

E_i = error aleatorio.

3.2.4.1. Necropsia.

A todos los cerdos que murieron de PCP, se les realizó la necropsia. Todos los pulmones fueron removidos y las áreas de lesión pleuroneumónica fueron evaluadas de acuerdo al sistema de Ciprián, (1988). Los cerdos que sobrevivieron se sedaron con azaperona (2 mg/Kg de peso, vía intramuscular), anestesiados con clorhidrato de metomidato (1.5 mg/Kg de peso, vía intravenosa) y se sacrificaron por choque eléctrico y exsanguinación.

3.2.4.2. Histopatología.

Muestras de 1 cc de los lóbulos diafragmáticos se colocaron en frascos con formalina amortiguada al 10%, se incluyeron en parafina y se obtuvieron cortes de 8 µm de espesor los cuales se tñeron con hematoxilina-eosina (Sanford y Josephson 1981).

3.2.4.3. Recuperación del agente.

Actinobacillus pleuropneumoniae se recuperó de acuerdo a Szazados y Kadas (1981). El pulmón lesionado se sembró directamente sobre una placa de agar sangre la cual se cruzó con una asada de Staphylococcus aureus, el cual sirvió como cepa nodriza, las colonias que se desarrollaron mostrando satelitismo fueron resenbradas en una placa de agar infusión cerebro corazón suplementada con 10% de extracto de levadura, la caracterización de la bacteria se realizó de acuerdo a los criterios de Cowan y Steel (1974).

3.3. ESTUDIO EXPERIMENTAL III.

Estudio in vivo en cerdos inoculados con la dosis mínima de A. pleuropneumoniae y el virus de Pseudo-rabia.

3.3.1. Diseño experimental.

a) 12 cerdos híbridos de diferentes camadas con un peso promedio de 35.8 Kg fueron distribuidos al azar en tres grupos de cuatro cerdos cada uno, todos los animales fueron vacunados contra la Pseudo-rabia como se describió anteriormente y fueron sometidos a los siguientes tratamientos: Grupo I, testigo solamente recibió medio de cultivo en las inoculaciones. Grupo II, inoculado por vía intra nasal con 1800 TCID₅₀ del virus de Pseudo-rabia; Grupo III, inoculado por vía intranasal con 1800 TCID₅₀ del virus de Pseudo-rabia e inoculado por medio de aerosoles con 20000 UFC de A. pleuropneumoniae en la cámara de nebulización.

Para realizar la inoculación del virus, los cerdos fueron tranquilizados con asaperona (dos mg / Kg de peso corporal por vía intra muscular profunda), una vez sedados los cerdos se les introdujo una sonda por vía intranasal a través de la cual fue pasado el inóculo.

Para analizar las variables estudiadas se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = M + T_i + E_{ij}$$

donde

Y_{ij} = % de lesión pulmonar

M = media común a todos los datos

T_i = i-ésimo tratamiento (i = 1, 2, 3)

E_{ij} = error aleatorio.

b) Los cerdos se alojaron en cuatro unidades de aislamiento de la Comisión México Americana para la Erradicación de la Fiebre Aftosa en el CENID-Microbiología ubicado en Palo Alto D.F., con agua y alimento ad libitum.

3.3.2. Preparación de los inoculos.

a) Virus de la Pseudo-rabia. A un monoestrato confluyente de células PK15 se le adicionaron 10 ml de una suspensión del virus de la cepa Shope de Pseudo-rabia. Se incubó durante una hora a 37 C para que se adsorbiera, después de este tiempo se agregaron 20 ml de medio de cultivo F15 ("GIBCO" catalogo 410-1500) suplementado con 1% de suero fetal bovino y antibióticos, se incubó a 37 C revisándose diariamente para detectar el efecto citopático, después de la aparición de dicho efecto el monoestrato celular infectado fue sometido tres veces a un proceso de congelación descongelación de -70 C a 18 C, se centrifugó a 5000 xg durante 30 minutos y el líquido sobrenadante fue titulado por la técnica descrita por Rovozzo y Burke (1973).

b) Antibióticos: En 100 ml de solución salina isotónica se disolvió una mega unidad de penicilina G sódica y un gramo de estreptomocina. Se distribuyó en alícuotas de un ml y se almacenó en congelación a -20 C. Al agregar un ml de esta solución a 100 ml de medio de cultivo, resultara una concentración final de 100 UI de penicilina y 100 mg de estreptomocina por ml (Cumming, 1970).

c) La cepa de A. pleuropneumoniae se incubó toda la noche en una botella de Roux con el mismo medio de cultivo, a 37 C y se recuperó por medio de agitación vigorosa con perlas de vidrio y

PBS realizando cuentas viables por el método de Miles y Misra (1938) y diluciones para obtener el inóculo el cual consistió en 17 ml de PBS con 2×10^4 UFC/ml y un total de 265 bacterias por litro de aire en la cámara.

3.3.3. Evaluación de los signos clínicos.

El tiempo de inoculación se consideró como la hora 1 y apartir de esta se evaluaron en cada grupo: la temperatura, los signos clínicos, el tiempo de muerte y la extensión y aspecto de las lesiones pulmonares. Además, en el momento de efectuar la necropsia se tomaron muestras de tejidos: pulmon, tonsila, encéfalo y ganglio linfático, las cuales se separaron en tres porciones para ser trabajadas de la siguiente manera: una porción se fijó en formol al 10%, para ser trabajada para histopatología por la técnica descrita por Sanford y Josephson (1981). La segunda porción se utilizó para el aislamiento bacteriano por la técnica de Szazados y Kadas (1981) y la última fue congelada a -70 C para identificar el virus de la Pseudo-rabia por medio de la técnica de inmunofluorescencia de Allan y col., (1984).

En un microtomo criostato IEC Modelo CTI se realizaron cortes de 6 μ m de grosor que fueron montados en laminillas, fijados con acetona durante 30 minutos, se lavaron en dos ocasiones con PBS y dos más con agua destilada. se tinieron con un conjugado fluoresceinado anti Pseudo-rabia y se observaron al microscopio de luz ultravioleta.

(El conjugado fue proporcionado por el Departamento de Diagnóstico de la Universidad de AMES IOWA).

3.3.4. Necropsia.

A todos los cerdos que murieron se les realizó la necropsia. Todos los pulmones fueron removidos y las áreas pleuroneumónicas fueron evaluadas de acuerdo con el sistema de Ciprián (1988). Los cerdos que sobrevivieron fueron sedados, anestesiados y sacrificados como se describió anteriormente.

3.3.5. Evaluación de la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia:

Los cerdos de cada grupo fueron pesados una vez por semana durante el periodo de adaptación, el día de la inoculación y el día de la muerte o sacrificio. El alimento ofrecido y los residuos fueron pesados diariamente para obtener el consumo de alimento.

La ganancia diaria de peso se obtuvo al dividir la diferencia del peso final menos el peso inicial entre el número de días. La conversión alimenticia se obtuvo al dividir la diferencia de peso final menos el peso inicial entre el total de alimento consumido. El peso inicial se consideró una vez que los cerdos alcanzaron los 20 Kg de peso.

4. RESULTADOS.

4.1. ESTUDIO EXPERIMENTAL I

De los 100 pulmones estudiados 60 (60%) correspondieron a los que presentaron lesión característica de PCP y 40 (40%) se encontraron aparentemente normales. De los pulmones con lesión se logró el aislamiento bacteriano en 57 de ellos (95%), identificándose el Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1. De los pulmones normales no se logró el aislamiento del actinobacilo, descartándose el crecimiento de cualquier otro tipo de bacteria.

En cuanto a la serología 46 (76.7%) sueros de los 57 en los que se logró el aislamiento bacteriano, resultaron positivo a VPR por la prueba de ELISA y 11 (18.3%) se encontraron negativos. De los tres sueros correspondientes a los pulmones en los que se encontró lesión y no se logró el aislamiento de la bacteria un suero (1.7%) fue positivo a VPR y los otros dos (3.4 %) fueron negativos. Catorce sueros provenientes de cerdos cuyos pulmones se encontraron normales resultaron positivos a VPR y 26 resultaron negativos, representando el 35% y 65% respectivamente (fig. 1.) (Cuadros 1 y 2).

4.2. ESTUDIO EXPERIMENTAL II

Determinación de la dosis mínima de bacterias (Actinobacillus pleuropneumoniae) capaz de producir signos clínicos de neumonía sin causar la muerte de los cerdos:

Temperatura corporal: después de la inoculación de la bacteria, los cerdos de los diferentes grupos no presentaron elevación de la temperatura manteniéndose esta dentro de los parámetros

observados durante el tiempo de adaptación con un promedio de 38.7°C.

Signos respiratorios: Los animales de los grupos C, D y E presentaron disnea de reposo, tos, anorexia y hemoptisis antes de que ocurriera la muerte. Los cerdos de los Grupos A y B no presentaron disnea de reposo pero si cuando fueron forzados al ejercicio. Un cerdo del grupo A y otro del grupo B presentaron disnea de reposo, tos, anorexia y hemoptisis antes de que ocurriera la muerte (Fig. 2). Dos cerdos sobrevivieron de todo el lote experimental (grupos A, B, C, D y E). La mortalidad, tiempo de muerte y % de lesión pulmonar se encuentra en el cuadro 1, Fig. 3A y 3B.

En el grupo A murió un animal que tenía el 14% del área pulmonar afectada, con lesiones características de PCP en los lóbulos diafragmáticos, sin embargo también se encontró una lesión similar a las causadas por mycoplasmas en el lóbulo apical derecho, en el grupo B solo murió un animal pero en este el área pulmonar afectada fue de mayor tamaño (29.6%), presentando las lesiones principalmente en los lóbulos cardiaco y diafragmático. El tiempo de muerte en ambos grupos fue mayor de 100 hs, en los demás grupos murieron todos los animales. El área pulmonar afectada fue de 28 a 67.7%, y el tiempo de muerte fue de 16 a 98 hs.

El resultado de la regresión lineal del área pulmonar afectada contra la dosis de bacterias utilizadas se representan en la Fig. 4.

4.2.2. Lesiones macroscópicas:

En todos los casos las lesiones se encontraron principalmente en los lóbulos cardíacos y^s diafragmáticos, presentando áreas de consolidación de color rojo púrpura, con zonas de infarto rojo de dos a 10 cm de largo asociadas con pleuritis fibrinosa, hemorragias, congestión, edema y pleuresia. Se encontró espuma sanguinolenta con fibrina en tráquea y bronquios (Fig. 5 y 6).

4.2.3. Lesiones microscópicas:

En el examen histopatológico las lesiones correspondieron a las producidas por A. pleuropneumoniae se encontró pleuritis, hemorragias, congestión, trombosis, células transformadas, (son macrófagos que por efecto de las toxinas bacterianas se alargan y agrupan formando "remolinos"), necrosis coagulativa, acumulos de bacterias infiltración de polimorfonucleares (Fig. 7), no se encontró diferencia en las lesiones en las diversas dosis pero si en el área pulmonar afectada.

4.2.4. Bacteriología de los pulmones:

De todos los pulmones con lesión característica de PCP se recuperó A. pleuropneumoniae que correspondió al mismo serotipo inoculado. Del cerdo del grupo A que murió se recuperó un Mycoplasma spp del lóbulo pulmonar apical derecho, el cual presentó una lesión diferente a las demás.

4.3. ESTUDIO EXPERIMENTAL III.

4.3.1. Evolución de los signos clínicos.

Temperatura corporal:

La temperatura en los cerdos del grupo I se mantuvo dentro de los parámetros normales durante el tiempo del experimento, mientras que en los grupos II y III se elevó a 41 y 40.7 C respectivamente, en los animales del grupo III se mantuvo elevada hasta la muerte de estos, mientras que en los del grupo II empezó a descender a partir del quinto día excepto en un animal que la mantuvo alta (Fig.8).

Signos respiratorios:

En los animales del grupo testigo no se observaron cambios en el ritmo y tipo de respiración, mientras que en los del grupo II y III mostraron disnea, primero de reposo y posteriormente de esfuerzo, siendo cada vez menos evidente. En el grupo III después de la inoculación con la bacteria los signos se agravaron y antes de la muerte se encontró polipnea, tos productiva, estornudos, vómito y hemoptisis.

4.3.2. Lesiones macroscópicas.

A la necropsia no se encontraron lesiones patológicas en los órganos de los cerdos del grupo testigo, en los animales que se inocularon únicamente con el virus se apreciaron lesiones en los lóbulos apicales, dichas lesiones tenían una apariencia gelatinosa de color rojo violáceo con edema muy aparente en los intersticios y las pleuras (Fig. 9, 10 y 11), la superficie pulmonar afectada en promedio fue de 32% (22.8 al 38.4%). En el grupo que recibió los dos microorganismos las lesiones fueron más

generalizadas, encontrándose lesiones en todos los lóbulos pulmonares, las lesiones eran de color rojo púrpura con zonas de necrosis, adherencias y pleuritis, el área afectada varió de 26.3 al 68.9% con un promedio de 52% (Fig. 12A, 12B, y 12C). En el análisis de varianza se encontró que el modelo utilizado fue altamente significativo ($P < 0.001$) y un coeficiente de determinación de 0.83, encontrándose también diferencias significativas entre la magnitud de las lesiones en los diferentes tratamientos ($P < 0.05$).

4.3.3. Lesiones microscópicas.

En los cortes histológicos que correspondieron al grupo testigo no se encontraron cambios patológicos en los tejidos, mientras que en los cortes de pulmón del grupo II se encontró neumonía exudativa, con abundancia de células polinucleares en bronquiolos, congestión, hemorragia, pleuritis fibrinosa, infiltración linfocitaria peribronquial, corpúsculos de inclusión intra nucleares en células epiteliales (Fig. 13), sin encontrar cambios patológicos en otros tejidos. Los cortes histológicos del tejido pulmonar de los cerdos del grupo III, se caracterizaron por presentar congestión, hemorragias, trombosis, edema alveolar e intersticial, pleuritis con exudado de mononucleares, hemorragia subpleural, necrosis cuagulativa, algunas células transformadas (Fig. 13 y 14), corpúsculos de inclusión intranucleares y acúmulos de bacterias. En los cortes de páncreas y parótida se observó avanzada destrucción, necrosis y corpúsculos de inclusión intra nucleares, en los otros tejidos no se encontraron cambios patológicos.

4.3.4. Aislamiento e identificación de los agentes inoculados.

Se aisló *A. pleuropneumoniae* de los pulmones de los cerdos del grupo III, que correspondió al serotipo inoculado, se aisló *Pasteurella multocida* de el pulmón de un cerdo del grupo II y no se logró aislamiento bacteriano de los otros tejidos (Cuadro 4). Evidencia del virus de la Pseudo-rabia en los tejidos.

Por medio de la inmunofluorescencia se detectó la presencia de antígenos virales en los tejidos que anteriormente presentaron corpusculos de inclusión, se observaron en los pulmones del grupo II y III; en dos tonsilas del grupo II, una tonsila, parótida y pancreas de los cerdos del grupo III (Cuadro 5).

4.3.5. Ganancia diaria de peso y conversión alimenticia.

El comportamiento de los cerdos se puede observar en la figura No. 15 donde se muestra que durante la fase de adaptación los grupos I y II tuvieron una ganancia diaria de peso de 600 y 650 gr., respectivamente y en el grupo III la ganancia diaria de peso fue de 456 gr, después de el día de inoculación el grupo I mantuvo su crecimiento en forma normal en tanto que los grupos II y III perdían peso rápidamente. Los cerdos del grupo II perdieron más peso debido a que el consumo de alimento fue nulo y sobrevivieron hasta el sacrificio mientras que los del grupo III murieron después del desafío. En cuanto a la conversión alimenticia se encontró que los cerdos del grupo I fue de 3.23 Kg, para el grupo II de 2.97 Kg y para el grupo III de 3.77 Kg de alimento consumido por kilogramo de peso vivo.

FIGURA 1 : Gráfica que muestra los resultados Bacteriológicos y serológicos de los pulmones de cerdos sacrificados en rastro.

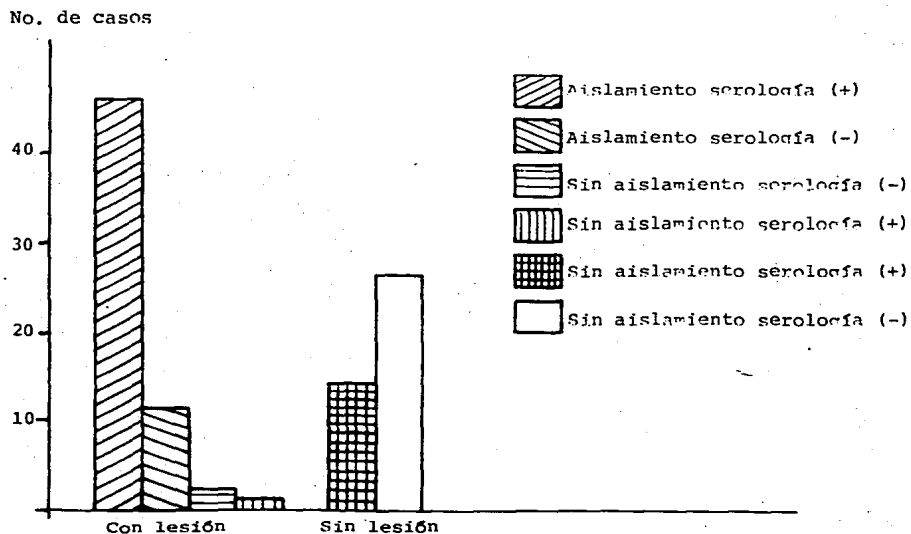
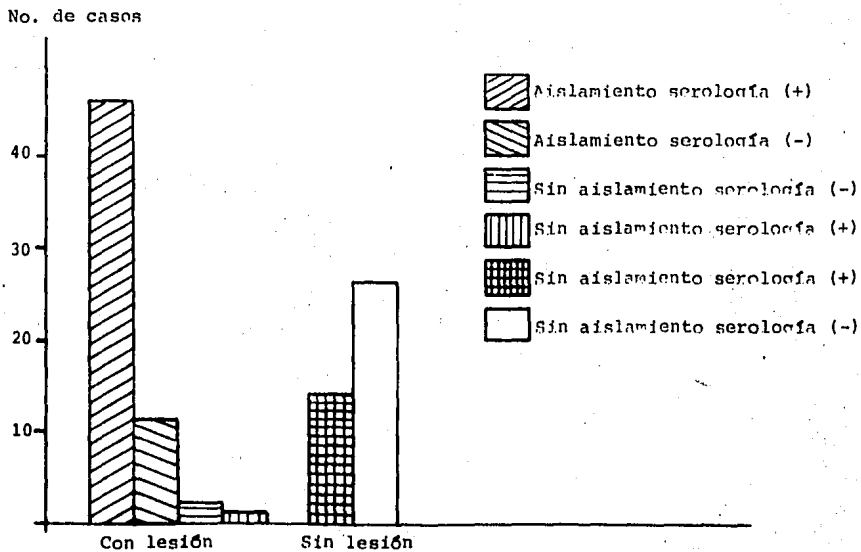


FIGURA 1 : Gráfica que muestra los resultados Bacteriológicos y serológicos de los pulmones de cerdos sacrificados en rastro.



CUADRO 1. Tabla de contingencia y resultado de la prueba de χ^2 para el análisis de tipo de pulmón y aislamiento bacteriano.

	Aislamiento	No Aislamiento	
pulmón c/ lesión.	57	3	60
pulmón s/ lesión.	0	40	40
	57	43	100

$$\chi^2 = \frac{(ob - esp)^2}{esp} = 88.3$$

Tabla de contingencia y resultado de la prueba de χ^2 en el análisis de serología y aislamiento bacteriano.

	Aislamiento	No Aislamiento	
sueros +	46	1	47
sueros -	11	26	37
	57	27	84

$$\chi^2 = \frac{(ob - esp)^2}{esp} = 44$$

Tabla de contingencia y resultado de la prueba de χ^2 en el análisis de serología y tipo de pulmón.

	Pulmón c/ lesión	Pulmón s/ lesión	
sueros +	47	14	61
sueros -	11	26	37
	58	40	98

$$\chi^2 = \frac{(ob - esp)^2}{esp} = 21.3$$

$$\chi^2 \text{ de tabla con } \alpha = 0.005 = 7.88$$

CUADRO 2. Tabla de Contingencia y Resultados de χ^2 , para el análisis de todos los factores estudiados.

	Aislamiento	No Aislamiento	
Pulmón c/lesión serología +	46	1	47
Pulmón c/lesión serología -	11	2	13
Pulmón s/lesión serología +	0	14	14
Pulmón s/lesión serología - ✓	0	26	26
	57	43	100

$$\chi^2 = \frac{(ob - esp)^2}{esp} = 89.05$$

FIGURA 2 : Fotografía que muestra un cerdo minutos antes de la muerte, se puede observar la hemorragia por fosas nasales y boca.



CUADRO 3 : Promedio de lesión pulmonar, mortalidad y tiempo de muerte en cerdos inoculados experimentalmente con A. pleuropneumoniae.

GRUPO ^a	DOSIS ^b	% DE LESION	MORTALIDAD	TIEMPO DE MUERTE
A	2X10 ⁴	14	1/1	134 Hs
B	2X10 ⁵	29.6	1/1	110 Hs
C	2X10 ⁶	33.6	2/2	90 Hs
D	2X10 ⁷	49.1	2/2	76 Hs
E	2X10 ⁸	60.5	2/2	32 Hs

a). - de dos animales cada uno.

b). - inoculados por aerosoles.

FIGURA 3A : Esquema de la vista dorsal y ventral de los pulmones de los cerdos del experimento II, que muestran la extensión de las lesiones.

a Grupo inoculado con 2×10^4 UFC/ml

b Grupo inoculado con 2×10^5 UFC/ml

c Grupo inoculado con 2×10^6 UFC/ml

* Lesión diferente a la causada por A. pleuropneumoniae, provocada por Mycoplasma spp.



c

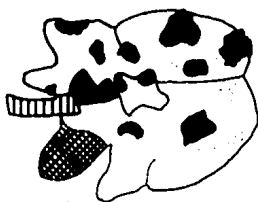
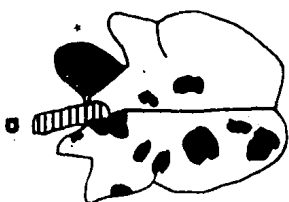
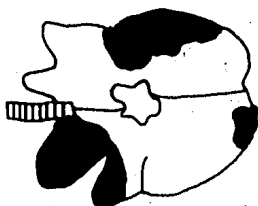
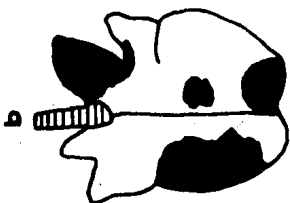
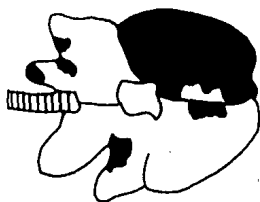
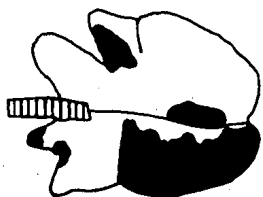


FIGURA 3B : Esquema de los pulmones de los cerdos del experimento II que muestra la extensión de las lesiones.

d Grupo inoculado con 2×10^7 UFC/ml

e Grupo inoculado con 2×10^8 UFC/ml



P

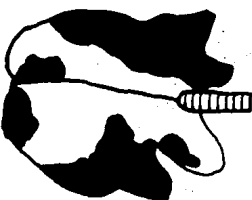
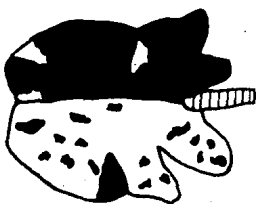


FIGURA 4 : Gráfica de la regresión lineal del Area Pulmonar Afectada contra la Dosis de Bacterias Inoculadas.

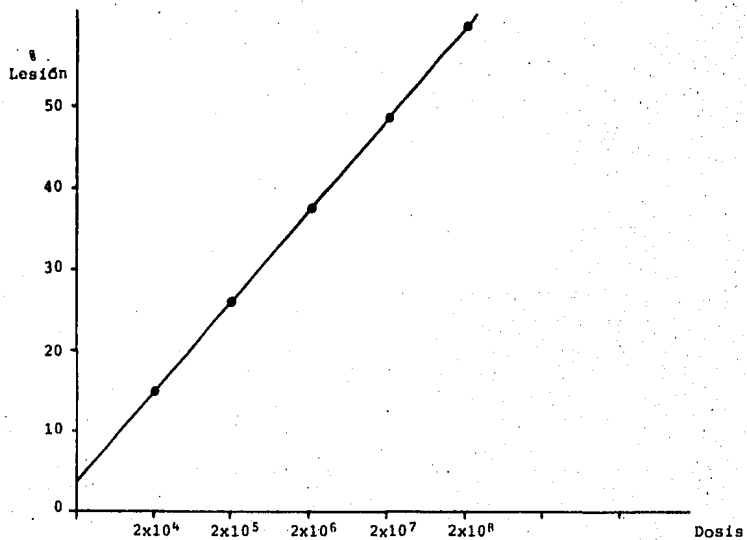


FIGURA 5 : Lesiones macroscópicas en pulmón causadas por A. pleuropneumoniae, se aprecian zonas de infarto rojo, pleuritis y hemorragias.



RA 6 : Detalle de pulmón de cerdo afectado por A.
pleuropneumoniae. se aprecia edema, congestión y
hemorragia.



FIGURA 7 : Histopatología de pulmón de cerdo afectado por *A. pleuropneumoniae*, se puede observar edema, hemorragia y células transformadas formando remolinos.

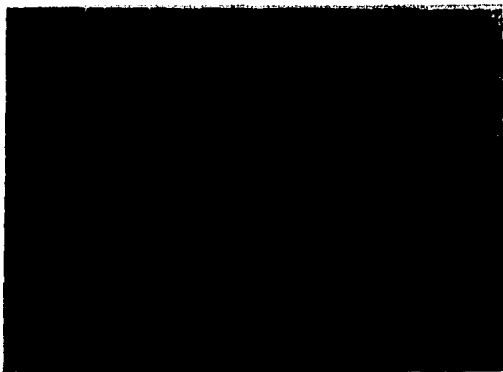


FIGURA 8 : Medias de las temperaturas en los tres grupos. La flecha a marca la inoculación con el virus, se observa un pico de temperatura el día 7. La flecha b marca la inoculación de la bacteria.

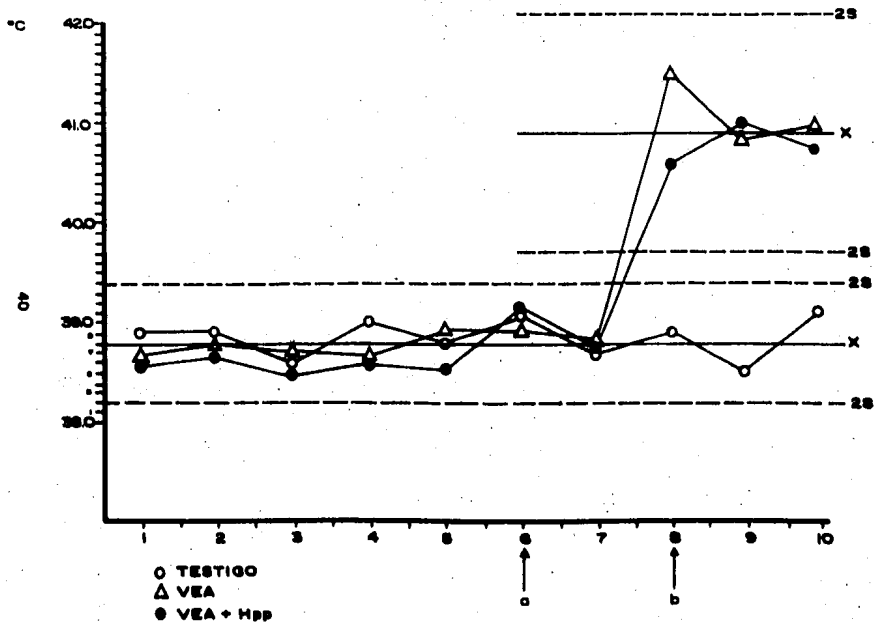


FIGURA 9, 10 y 11 : Lesiones macroscopicas de los pulmones de los cerdos inoculados con el virus. Se puede observar la magnitud de la lesión, la gran cantidad de liquido contenido en el espacio subpleural e instestisial que le da aspecto gelatinoso a la lesión.



FIGURA 12A : Esquema de la vista dorsal y ventral de los pulmones de los cerdos del grupo control.

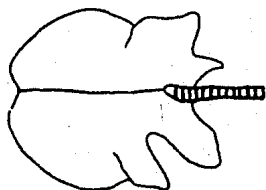
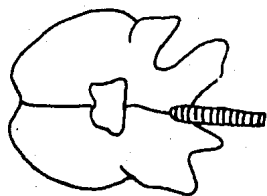
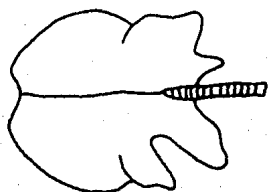
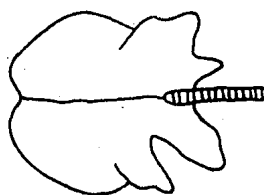
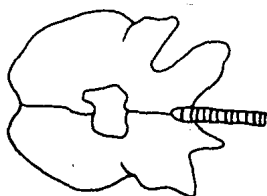
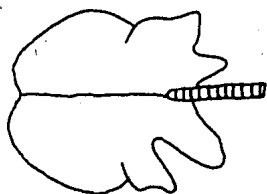
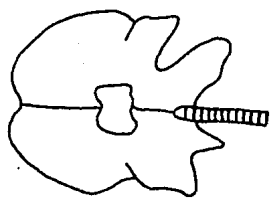


FIGURA 12B : Esquemas de la vista dorsal y ventral de los pulmones de los cerdos del grupo inoculado con VPR. Se observa el área pulmonar afectada.

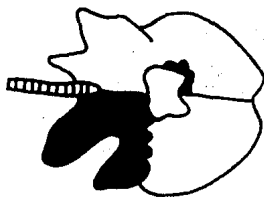
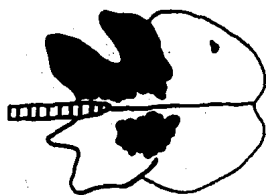
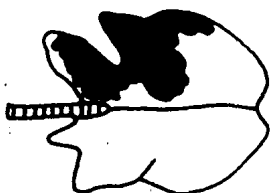
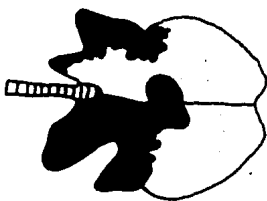
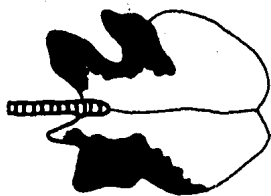


FIGURA 12 C : Esquema de la vista dorsal y ventral de los pulmones de los cerdos inculados con VPR y AL pleuropneumoniae.

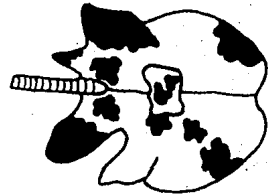
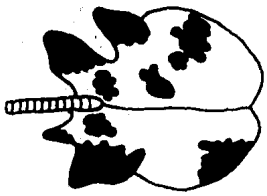
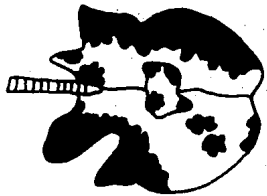
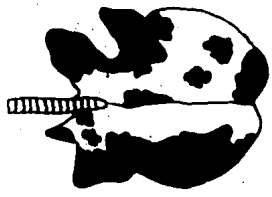
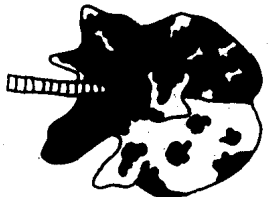
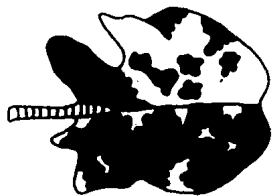
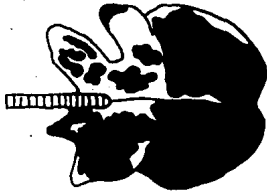
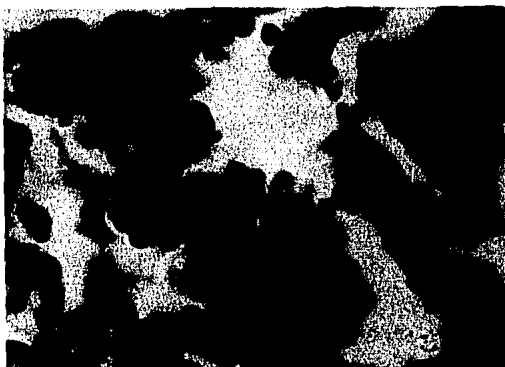


FIGURA 13 y 14 : Histopatología de los pulmones del grupo III. Se observa edema, infiltración de células mononucleares, hemorragia, células transformadas (A) y corpúsculos de inclusión intranucleares (B).



CUADRO 4: Recuperación de A. pleuropneumoniae a partir de órganos de los cerdos inoculados.

ORGANO	GRUPO [*]		
	I	II	III
PULMON	negativo	negativo**	positivo
TONSILA	negativo	negativo	negativo
CEREBRO	negativo	negativo	negativo
G. LINF.	negativo	negativo	negativo
BAZO	negativo	negativo	positivo
HIGADO	negativo	negativo	positivo

* cuatro cerdos por cada grupo

** se aislo P. multocida de un pulmón.

CUADRO 5: Identificación del VPR por la técnica de Inmunofluorescencia a partir de los órganos de los cerdos inoculados.

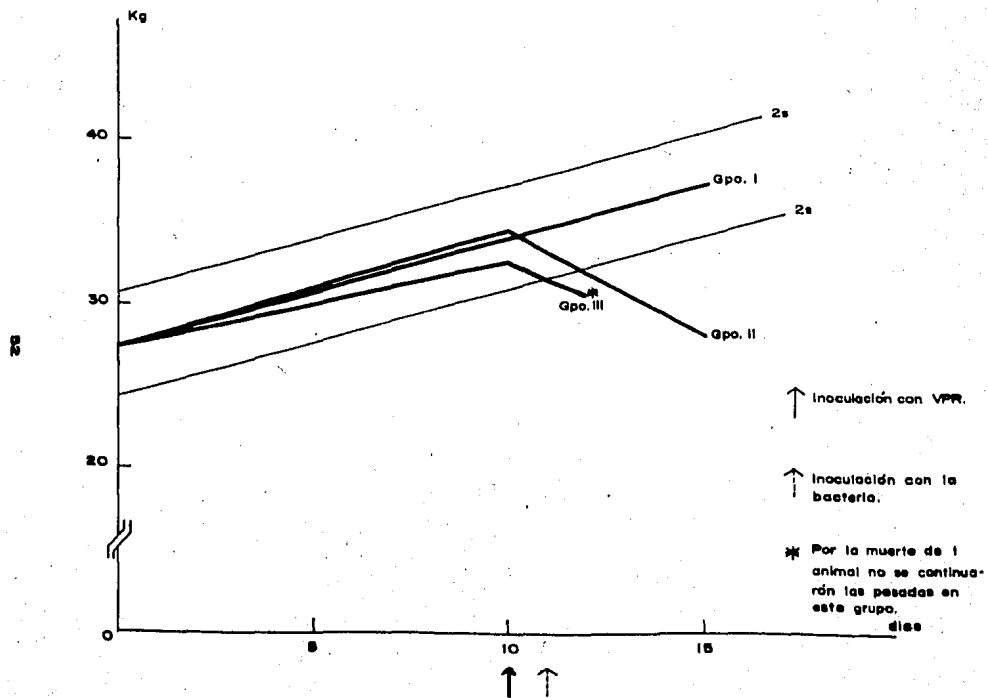
ORGANO	GRUPO ^a		
	I	II	III
PULMON	negativo	positivo	positivo
TONSILA	negativo	positivo ^b	positivo ^c
CEREBRO	negativo	negativo	negativo
G. LINF.	negativo	negativo	negativo
PAROTIDA	negativo	positivo ^b	negativo
PANCREAS	negativo	positivo ^b	negativo

a) cuatro animales por grupo

b) en un caso

c) en dos casos

FIGURA 15. Comportamiento de los cerdos en los tres grupos



5. DISCUSION:

En la primera parte del trabajo del total de sueros estudiados, el 61% se encontraron positivos a VPR cifra que concuerda con las mostradas por otros autores en estudios realizados en diferentes partes del país (Medina y Correa, 1977, Mercado y col., 1982). Se observó que en los cerdos de abasto con lesión neumónica característica de PCP, un alto porcentaje de ellos (76.7%) presentaban anticuerpos contra Pseudo-rabia, mientras que los sueros procedentes de animales sin lesión pulmonar solo el 35% resultó positivo a VPR, resultados similares reportaron Badiola y Pujols (1984) en un estudio en el que encontraron la relación positiva entre aislamiento de Pasteurella multocida y serología contra VPR en pulmones con y sin lesión de cerdos de abasto. Los resultados se analizaron por la prueba de independencia de Ji-cuadrada que nos proporcionó evidencia estadística ($P < 0.01$) para afirmar que la relación existente entre el aislamiento de A. pleuropneumoniae y la serología positiva a VPR es alta (Cuadros 1A, 1B, 1C y 2).

En el segundo experimento se encontró que la PCP se reprodujo cuando el agente causal A. pleuropneumoniae fue inoculado por medio de aerosoles, situación comprobada anteriormente por Sebunya y Col. (1983ab). Mediante una nebulización con una suspensión de 20000 UFC/ml de Actinobacillus pleuropneumoniae en 17 ml de PBS durante 30 min. se reprodujeron los signos de PCP sin causar la muerte de los cerdos, aunque en este experimento uno de los animales murió se puede atribuir la muerte a la asociación encontrada de A. pleuropneumoniae con Mycoplasma spp.,

se ha encontrado que una infección previa con Mycoplasma hyopneumoniae actúa como un factor predisponente que exagera la PCP (Yagihashi y col., 1984).

Dosis superiores a 2×10^5 mataron a todos los animales desafiados. En un estudio anterior Nicolet (1985) observó que los cerdos inoculados con dosis de 100 bacterias por vía intratraqueal eran suficientes para producir signos clínicos y 10000 para producir la muerte, lo que nos demostró que la vía de inoculación jugó un papel muy importante. Por la vía intratraqueal todo el inoculo alcanza las vías respiratorias mientras que por aerosoles, dependerá del tamaño de las gotas en las que se encuentre suspendida la bacteria (Jericho, 1968) y por la cantidad de aire inspirada por el cerdo durante el tiempo de inoculación, sin embargo la distribución de las partículas en el tracto respiratorio es homogénea. Los signos clínicos observados en este trabajo fueron similares a los mostrados por Olander (1963) aún cuando inocula por diferentes vías algunas cepas de Haemophilus. La temperatura corporal fue tomada por primera vez 12 horas después de la inoculación, encontrándose dentro de los parámetros obtenidos antes del desafío. Olander, (1963) en el estudio mencionado encontró que la temperatura se eleva durante las primeras ocho horas después del desafío, para posteriormente descender incluso a niveles sub normales (34.4C) y en algunos casos retornar a la normalidad entre seis y doce horas post-inoculación, presentando elevaciones eventuales ocasionalmente, algo similar pudo haber ocurrido en este estudio ya que al tomar la temperatura 12 horas después de la inoculación no detectamos

ninguna elevación. La patología de los pulmones correspondió con las lesiones características causadas por la acción de Actinobacillus pleuropneumoniae. siendo similar a la reportada por otros autores en estudios anteriores (Olander, 1963, Shope, 1964, Little y Harding, 1971, Gunnarson y col. 1978).

Olander (1985) demostró que al inocular por vía respiratoria Actinobacillus pleuropneumoniae actúa como agente primario causando enfermedad, sin embargo no descarta la posibilidad que bajo ciertas circunstancias actúe como agente secundario después de la acción de un virus o alguna bacteria.

En el presente estudio se observó que los cerdos vacunados contra VPR cuando son desafiados con 1800 TCID₅₀ del virus por vía intranasal desarrollaron un proceso neumónico, y el tejido del sistema nervioso central no fue afectado ya que los estudios de histopatología e inmunofluorescencia lo demuestran, contrastando con el trabajo de Alva-Valdes y col (1963) quienes encontraron que el desafío de cerdos vacunados con diferentes vacunas contra la VPR no murieron sin embargo presentaron signos clínicos nerviosos y respiratorios, así como severos cambios patológicos en sistema nervioso central como: meningoencefalitis eosinofílica con áreas focales de edema, desmielinización, infiltración de leucocitos, en cerebro, nódulos de microglia, satelitocis y neuronofagia, también encontraron lesiones en tracto respiratorio como fueron congestión de los cornetes con exudado purulento en la cavidad nasal, neumonía con congestión, consolidación y áreas blancas que median de 2 a 5 mm., necrosis tonsilar así como agrandamiento, congestión y edema de los ganglios linfáticos

regionales. Existen reportes en los cuales se discute la patogenicidad de las diferentes cepas del virus. Howard y de Paoli (1968), encontraron cepas que producen alta mortalidad en cerdos de engorda: Corner, (1965), Baskerville, (1971), Baskerville y col. (1971) describen cepas con fuerte afinidad por el tracto respiratorio produciendo neumonias pero sin perder su capacidad invasora para el sistema nervioso central. Las lesiones macroscópicas encontradas en los pulmones de los cerdos del grupo II inoculado con VPR, no difieren con las encontradas por otros autores (Corner, 1965, Baskerville, 1973). En cuanto a las lesiones microscópicas concuerdan con las descritas en la literatura para las vias respiratorias (Baskerville 1973), pero no en las encontradas en sistema nervioso central ya que en nuestro caso tales lesiones no se encontraron en dicho tejido.

Los cerdos del grupo II que fueron sacrificados, a la necropsia se encontró que las lesiones solo comprometían los lóbulos apicales del pulmón. Los cerdos del grupo III después de la segunda inoculación mostraron signos clínicos más severos muriendo los cerdos, entre las 18 hs. y las 50 hs pos-inoculación. Se apreciaron lesiones más extensas y severas en todos los lobulos pulmonares, resultados similares a los reportados por Pattison y col (1957), Matthews y Pattison, (1961) cuando desafiaron cerdos intratraquealmente con el virus de cólera porcino se desarrollaron los signos clínicos de la enfermedad, pero además se encontraron pequeñas lesiones en la porción anteroventral del pulmón, agravandose los signos y presentando lesiones más severas cuando se inoculó el virus con

Haemophilus para-influenzae.

Se ha demostrado que los cerdos vacunados con cepas inactivadas o atenuadas de VPR desarrollan inmunidad, pero esta no impide la infección aunque si atenua los signos y disminuye la mortalidad. (McFerran y Dow, 1973, 1975); se observó que en los cerdos vacunados y desafiados con VPR se afectó la remoción pulmonar de E. multocida (Caballero, 1985), en otro estudio Fuentes y Pijoan (1984) observaron que se afectó la fusión fagosoma-lisosoma, que es necesaria para inactivar las bacterias fagocitadas, lo que permite que la super infección con bacterias se realice. Estas evidencias y los resultados obtenidos en este trabajo pudieran explicar las observaciones hechas en granjas porcinas en las cuales se presentan brotes severos de neumonia una vez que se realiza la vacunación con VPR. En los cerdos de dichas granjas, si se presenta la infección viral pos-vacunación los animales no mueren, pero si presentan lesión pulmonar que facilita la superinfección con A. pleuropneumoniae, presentándose el fenómeno de sinergia, por lo tanto, la enfermedad es más severa y con alta mortalidad.

6. CONCLUSIONES

Se encontró que existe una fuerte relación entre el aislamiento de A. pleuropneumoniae de pulmones con lesión característica de Pleuroneumonia Contagiosa Porcina y la serología positiva a pseudo-rabia en los cerdos de abasto.

Se logró determinar la dosis mínima de A. pleuropneumoniae serotipo 1 que inoculada por aerosoles provoca infección respiratoria sin ocasionar la muerte de los cerdos.

Se encontró que los cerdos vacunados contra pseudo-rabia, quedan protegidos de la infección nerviosa y de la muerte, pero no de la infección respiratoria que lesiona el tejido pulmonar cuando son desafiados con una cepa virulenta del virus por vía respiratoria.

Los cerdos vacunados contra pseudorabia cuando son desafiados primero con una cepa virulenta del virus y después con una dosis mínima de A. pleuropneumoniae desarrollan un proceso grave de pleuroneumonia que los mata en pocas horas.

La ganancia diaria de peso se ve afectada cuando los cerdos son inoculados, sin embargo la pérdida es total cuando interactúan los dos agentes.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alva Valdes, R., Glock, R. D., Kluge, J.P. and Keune, C. M., 1983, Effects of vaccination on lesion development in Pseudorabies Virus-challenge swin, Am. Vet. Res.: 44:588-595
- 2.- Allan, C. M., McNulty, M. S., McCracken, R. M. and McFerran, J. B., 1994, Rapid diagnosis of Aujeszky's disease in pigs by immunofluorescence, Res. Vet. Sci. 36:235-239
- 3.- Andries, K., Pensaert, H. and Vandeputte, J., 1978, Effect of experimental infection with pseudorabies virus on pigs with maternal immunity from vaccinated sows. Am. J. Vet. Res. 39(8):1282-1285
- 4.- Badiola, S. J. I. y Pujols, R. J. 1984, Estudio sobre la interacción del Virus de Aujeszky con Pasteurella multocida en los procesos neumónicos del cerdo. Tesis de Maestría en Ciencias (area Microbiología) FES-C UNAM.
- 5.- Baskerville, A. 1971, The histopathology of pneumonia produced by aerosol infection of pig with a strain of Aujeszky's disease virus: Res. Vet. Sci. 12:590-592.
- 6.- Baskerville, A., 1972a, Ultra estructural changes in the pulmonary airways of pigs with a strain of Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 13:127-132.
- 7.- Baskerville, A. 1972b, The influence of dose of virus on the clinical signs in experimental Aujeszky's disease virus. Br. Vet. J. 138:394.

- 8.- Baskerville, A., 1973, The histopathology of experimental pneumonia in pigs produced by Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 14: 223-228.
- 9.- Baskerville, A., McCracken., R. M. and McFerran, J., B., 1971, The histopathology of experimental rhinitis in pigs produced by a strain of Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 12: 323-326.
- 10.-Baskerville, A., McFerran, J. B. and Dow. C., 1973, Aujeszky's disease in pigs. Vet. Bull. 43:465-480
- 11.-Biberstein, E. L., Gunnarson, A. and Hurvell, B., 1977, Cultural and biochemical criteria for the identification of Haemophilus spp from swine: Am. J. Vet. Res.: 38: 7-11.
- 12.-Bodon, L., Meszaros, J., Papp-Vid, G. and Rovary, J., 1968, Properties of Aujeszky's disease virus strains isolated from swine pneumonia cases. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 18:107-109.
- 13.-Boughton, E. and Thorns, C., 1976, Mycoplasma laboratory handbook; Ministry of Agriculture, Fisheries and Food; Central Veterinary laboratory; New Ham, Weybridge, Surrey, England.
- 14.-Caballero, S. C., 1985, Efecto del virus de Aujeszky sobre la remoción de Pasteurella multocida en cerdos de engorda, Tesis de Maestría en Ciencias (area Microbiología) FES-Cuautitlán, UNAM.

- 15.-Carter, G. R., 1975 Diagnostic procedures in Veterinary Microbiology. Second Edition; Charles C. Thomas publisher; Springfield Illinois, USA.
- 16.-Ciprián, C. A., 1987, Interacción entre Mycoplasma hyopneumoniae y Pasteurella multocida en las neumonías de los cerdos: Tesis de Doctorado en Ciencias (area Microbiología) FES-C UNAM Méx.
- 17.-Ciprián, C. A., Medina, A. G., Fuentes, R. M., 1988, Pijoan, A. C. Torres, A. O., Colmenares, V. G. y Camacho, M. J.: Serotipificación de Haemophilus pleuropneumoniae aislados de cerdos en México. Vet. Méx. Vol. XIX (3).
- 18.-Corner, A. H., 1985, Pathology of experimental Aujeszky's disease en piglets: Res. Vet. Sci. 6: 337-343
- 19.-Cowan, S. T., 1974, En Cowan and Steel's Manual for the identification of Medical Bacteria. 2nd Edit. Cambridge University Press. Cambridge USA.
- 20.-Cunning, H., 1970, Virology Tissue Culture, Butterworth & Co., Ltd. 88 Kingsway, London, England.
- 21.-Fuentes, M. and Pijoan, C., 1984, Studies on the interaction between vaccinal and patogenic Aujeszky's virus and Pasteurella multocida in young pigs, Proceedings Int. Pig Vet. Soc. congress Belgium, p. 28.

- 22.-Gunnarsson, A., Huevel, B. and Biberstein, E. L., 1978, Serologic studies of porcine strains of Haemophilus parahemolyticus (pleuropneumoniae) antigenic specificity and relationship between serotypes. Am. J. Vet. Res. 39: 1286-1292.
- 23.-Gustafson, D. P., 1975, Pseudorabies in: Diseases of swine, H. Dunne and A.D. Leman (eds), 4th Iowa State Univ. Press. Iowa pp. 391-410.
- 24.-Gutekunst, D. E., Pirtle, E. C., 1979, Humoral and cellular immune responses in swine after vaccination with inactivated pseudorabies virus, Am. J. Vet. Res. 40 (10):1343-1346.
- 25.-Howarth, J. A. and De Paoli, A., 1968, An enzootic of pseudorabies in swine in California. J.A.V.M.A. 152: 114-118.
- 26.-Huhn, R. G., 1970, Swine enzootic pneumonia: Incidence and rate of body weight gain. Am. J. Vet. Res. 31:1097-1108.
- 27.-Jakab, G. B., 1981, Interactions between Sendai virus infection and bacterial pathogens in the murine lung: A review: Lab. Anim. Sci. 31:170-176.
- 28.-Jericho, K. W. F., 1968, Pathogenesis of pneumonia in pigs. Vet. Rec. 82: 509-516.
- 29.-Kasza, L., Hodges, R. T., Beets, A. O. and Trexler, P. C., 1969, Pneumonia in gnotobiotic pigs produced by simultaneous inoculation of a swine Adenovirus and Mycoplasma hyopneumoniae. Vet. Rec. 84:262-267.

- 30.-Kilian, M., 1976, Taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. J. Gen. Microbiol. 93:9-62
- 31.-Little, T., W., A., 1970, Haemophilus infection in pigs. Vet. Rec. 87: 399-402.
- 32.-Little, T., W., A., 1975, Respiratory diseases in pigs. A study: Vet. Rec. 98:540-544.
- 33.-Little, T., W., A. and Harding, J., O., 1971, The comparative pathogenicity of two porcine *Haemophilus* species: Vet. Rec. 89:540-545.
- 34.-Little, T., W., A. Harding, J. D., 1980, The interaction of *Haemophilus parahaemolyticus* and *Pasteurella multocida* in the respiratory tract of pig. Br. Vet. J. 136:371-383.
- 35.-McFerran, J. B. and Dow, C., 1973, The effect of colostrum derived antibody on mortality and virus excretion following experimental infection of piglets with Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 15:208-214.
- 36.-McFerran, J. B. and Dow, C., 1975, Studies on immunisation of pigs with Bartha strain of Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 19(1): 17-22.
- 37.-McFerran, J. B., Dow, C. and McCracken, R., M., 1978, Experimental studies in weaned pigs with three vaccines against Aujeszky's disease. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 2:327-334.

- 38.-Matthews, P. E. J. and Pattison, I. H., 1969. The identification of a Haemophilus like organism associated with pneumonia and pleuresy in the pig: J. Comp. Path. 71: 44-52.
- 39.-Matthews, R. E. P., 1982, Clasificación y nomenclatura de los virus de vertebrados. Intervirology 17: 1-3.
- 40.-Medina, L. R. y Correa, P., 1977, Presencia de anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky en sueros de cerdos de diferente procedencia. Tec. Pec. Mex. 32:93-96.
- 41.-Mercado, S., Rosales, J. C. y Martell, M. D., 1982, Avances de los resultados serológicos en el estudio epizootológico de la enfermedad de Aujeszky en México: Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México.
- 42.-Miles, A. A. and Misra, S.S., 1938. The estimation of the bactericidal power of blood. J. Hyg. 38;732-746.
- 43.-Nicolet, J., 1985, Haemophilus pleuropneumoniae, Bacteriology and Epidemiology. In Haemophilus pleuropneumoniae compendium: Ann. Meet. of the Am. Ass. of swine practitioners Des Moines, IOWA.
- 44.-Olander, H. J., 1973, A septicemic disease of swine and its causative agent Haemophilus paraaerolyticus: PhD. Tesis, University of California, Davis, USA.

- 45.-Olander, H. J., Saunders, J.R., Gustafson, D. P. Jones, R.K., 1966. Pathologic findings in swine affected with a virulent strain of Aujeszky's virus. Path. Vet. 3 :64-82.
- 46.-Olander. H. J.. 1985, The pathology of Haemophilus pleuropneumoniae infection of swine. In Haemophilus pleuropneumoniae compendium. Ann. Meet. of the Am. Ass. of swine practitioners. Des Moines IOWA, USA.
- 47.-Pattison, I. H., Howel, D. C. and Elliot, J., 1957, A Haemophilus-like organism isolated from pig lung and the associated pneumonic lesion: J. Comp. Path. 67: 320-329.
- 48.-Pijoan, A. C. y Ochoa, G., 1978, Interaction between a hog colera vaccine and Pasteurella multocida in the production of porcine pneumonia: J. Comp. Path. 88: 167-170.
- 49.-Pohl, S., 1985, DNA relatedness among members of Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus. Citado por Nicolet.
- 50.-Rosendal, S., Miniats, O. P., Sinclair, P., 1986, Protective efficacy of capsule extracts of Haemophilus pleuropneumoniae in pigs and mice; Vet. Microbiol. 12: 229-240.
- 51.-Rouse, B. T. and Babiuk, L. A., 1978, Mechanism of recovery from herpesvirus infections. A review. Can. J. Comp. Med. 42: 414-427.
- 52.-Rovozzo, G. C. and Burke, C. N., 1973, A manual of basic virological Techniques. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey.

- 53.-Sanford, S. E. and Josephson, G. K. A., 1981, Porcine Haemophilus pleuropneumoniae epizootic in Southwestern Ontario: Clinical, Microbiological, Pathological and some Epidemiological findings. Can. J. Comp. Med. 45: 2-7.
- 54.-Sebunya, T. N. K. and Saunders, J. R., 1983, Haemophilus pleuropneumoniae infection in swine: J. Am. Vet. Ass. 182: 1331-1337.
- 55.-Sebunya, T. N. K., Saunders, J. R. and Osborne, A. D., 1983, A model aerosol exposure system for induction of porcine Haemophilus pleuropneumoniae. Can. J. Comp. Med. 47: 48-53.
- 56.-Sebunya, T. N. K., Saunders, J. R. and Osborne A. D., 1983, Dose response relationship of Haemophilus pleuropneumoniae aerosols in pigs. Can. J. Comp. Med.: 47: 54-56.
- 57.-Shope, R. E., 1964, Porcine contagious pleuropneumonia I: Experimental transmission, etiology and pathology J. Exp. Med. 119: 357-368.
- 58.-Smith, I. M., Betts, A. O., Watt, K. G. and Hayward, A. H. S., 1973, Experimental infections with Pasteurella septica (sero-group A) and a Adeno or Entero virus in gnotobiotic piglets. J. Comp. Path. 83: 1-12.
- 59.-Smith, P. C., 1978, Research and diagnostic techniques used in chronic pseudorabies virus infections of swine. Proc. Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc. 83:432-443.

- 60.-Szazados, I. and Kadas, I., 1981, Identification of Haemophilus parahaemolyticus pleuropneumoniae among normal slaughter pigs. Act. Vet. Acad. Sci. Hung. 29;(3): 301-306.
- 61.-Thawley, D. G., Wright, J. C. and Solorzano, R. F., 1980, Epidemiologic monitoring following an episode of pseudorabies involving swine, sheep and cattle. J.A.V.M.A. 176:1001-1003.
- 62.-Toma, B., 1980. La maladie d'Aujeszky en France en 1979. Rec. Méd. Vet. 155:491-494.
- 63.-Watt, R. G., 1978, Virological study of two commercial pig herds with respiratory disease. Res. Vet. Sci. 24:147-153.
- 64.-Wittman, G., Rziha, H. J. and Doller, P. C., 1982, Currence of clinical Aujeszky's disease in immunosupressed latently infected pigs. In Aujeszky's Disease. G. Wittman S. A. Hall. (Eds.), Louxembourg.
- 65.-Yagihashi, T., Nonuya, T., Mitni, T. and Tajima, M., 1984, Effect of Mycoplasma hyopneumoniae infection on the development of Haemophilus pleuropneumoniae pneumoniae in pigs. Jpn. J. Vet. Sci. 46: 705-713.
- 66.-Yates, W. D. G., 1982. A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacteria synergisms in respiratory diseases of cattle. Can. J. Comp. Med. 46: 225-263.