

# APORTACIONES DE LA FES-CUAUTITLAN UNAM, EN LAS INVESTIGACIONES DE LAS AFECIONES RESPIRATORIAS DEL CERDO.

DR. ABEL CIPRIÁN CARRASCO Y C DR. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA



Coordinación General de Estudio de Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Apdo. Postal 222, Cuautitlan Izcalli 54750, Estado de Mexico.

## INTRODUCCION.

Durante mas de quince años, el Programa de Posgrado en Microbiología de la Coordinación General de Estudios de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (~UNAM), ha venido estudiando intensamente los problemas respiratorios que afectan a los cerdos.

En las etapas iniciales, siempre fue la preocupación del grupo de microbiólogos que dirigía el Dr. Carlos Pijoan Aguade que tipo de enfermedades virales eran importantes en las infecciones secundarias bacterianas, sobretudo en las involucradas con el aparato respiratorio; y aunque tales afecciones estaban bien documentadas tanto en el hombre como en los animales domesticos('6 25 42). La idea de que pudiera existir una cooperación entre virus y bacterias en las neumonías fue conceptuada a raíz de las pandemias de influenza humana, ocurridas durante el siglo pasado. Aun hoy en día, la neumonía por agentes bacterianos secundarios es una de las complicaciones de la influenza 2').

Por lo anterior, la primera comprobación de que una bacteria per se no provocaría daño alguno y que interactuaría con un virus en el proceso neumónico fue realizado por Pijoan y Ochoa(32), quienes demostraron una marcada sinergia entre el virus vacunal de la Fiebre Porcina Clásica (antes Colera Porcino) y la Pasteurella multocida.

Después de este trabajo considerado como clásico, para el grupo de Microbiólogos de FES-Cuautitlán que fue creciendo (grupo multidisciplinario de investigadores), y además fue estimulante, es así que se sientan las bases para continuar los estudios de "interacción virusbacteria en las neumonías del cerdo", con una variante, que una vez demostrado el fenómeno, se estudiaron intensamente métodos de diagnóstico y agentes inmunizantes.

### Interacción entre el virus de la Fibre Porcina Clásica y Pasteurella multocida.

En México, se ha descrito el desencadenamiento de la pasteurelosis pulmonar por medio de cepas vacunales del virus de la Fiebre Porcina Clásica (virus del cólera porcino), lo cual tiene gran importancia práctica, debido a la inmunosupresión de la vacuna, ya que favorece la colonización de la P multocida(34). Este experimento clásico de interacción virus bacteria fue realizado por Pijoan y Ochoa(32), en este trabajo, ellos demostraron que el virus de la Fiebre Porcina Clásica (FPC), incluso en forma de cepas "atenuadas" vacunales (cepa china del virus de la FPC), podría predisponer a los cerdos a quedar colonizados por P. multocida. Los cerdos fueron primeramente vacunados con dicho virus y cuando presentaron los signos posvacunales se infectaron con P. multocida. Encontraron que en los días 3 y 4 de posvacunación los cerdos presentaron mayores lesiones neumónicas en contraste con las encontradas el da 14 que fueron menores, en todos los casos se realizo P. multocida.

### Interacción entre el virus de la Enfermedad de Aujeszky y Pasteurella multocida

#### 1. Fenómeno de Interacción.

La pasteurelosis pulmonar es una de las enfermedades respiratorias más comunes en el cerdo de nuestro país. La Pasteurella multocida y no así la P haemolytica, es el agente que con mayor frecuencia se relaciona con las lesiones pulmonares(33). Un aspecto importante de P multocida es su aparente baja virulencia y la necesidad de factores externos para colonizar el pulmon y desencadenar la enfermedad, esto incluye diversos factores climaticos como, humedad y frío(34) y algunas virosis como el enterovirus tipo 2 y P multocida que participan sinérgicamente en el desarrollo de las neumonías del cerdo(40). Sin embargo, este virus es poco comun y no explica la alta prevalencia de la enfermedad; de ahí el problema de encontrar cuales virus están involucrados de manera rutinaria(31).

El virus de la enfermedad de Aujeszky ha sido poco estudiado en cuanto a su participación como agente primario en las neumonías del cerdo.

En un estudio de rastro, donde se muestrearon un total de 106 pulmones, el 68% fueron de tipo neumonico y el 32% de tipo normal. De los casos neumonicos en un 67% se observo serología positiva al virus de la enfermedad de Aujeszky, mientras que en los casos normales sólo en un 32%. De los pulmones neumonicos, en un 51% se aislo algun tipo de Pasteurella; de los normales solo en un 9% (5).

En otros estudios se demostró la interaccion del virus de la enfermedad de Aujeszky y P. multocida en ratones; aquí se midio la emoción bacteriana pulmonar y se hicieron curvas de mortalidad y estudios histopatologicos. Los resultados obtenidos mostraron una marcada disminucion de la eliminación bacteriana del pulmon hacia el día 11, posinfeccion, con el virus de la enfermedad de Aujeszky(3).

Con base en estos trabajos se desarrollo otro experimento con cerdos convencionales, previamente vacunados con una cepa inactivada del virus de la enfermedad de Aujeszky, considerando como parametro principal la remoción pulmonar de P. multocida a diferentes días posdesafio con una cepa virulenta del virus de la enfermedad de Aujeszky. Se encontro que el virus afecta la remoción pulmonar de la bacteria a partir del dia 7 al 15 posinfeccion(10).

### 2. Evaluación de un Inmunógeno Bivalente del Virus de la Enfermedad de Aujeszky y Pasteurella multocida.

En este trabajo que se realizó en 1992, se evaluó una vacuna bivalente, elaborada con el virus de la pseudorabia y Pasteurella multocida, los parámetros utilizados para la evaluación fueron, temperatura rectal. Signos respiratorios, grado de lesión pulmonar, (macro y microscópica) serología contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA) y aislamiento bacteriano. El estudio se realizó utilizando cerdos SPF, libres a Fiebre Porcina Clásica (FPC), VEA y Parvovirus porcino. Se formaron 5 grupos de 4 cerdos cada uno: el grupo I (Desafiados solo P. multocida); el grupo 2 (Desafiado con PRV y P. multocida); el grupo 3 (Vacunado contra P. multocida y PRV, desafiados con PRV y P. multocida); el grupo 4 (vacunados contra PRV, desafiados con PRV y P. multocida) y el grupo 5 (vacunado con VEA y P. multocida, desafiado con VEA y P. multocida) fué en el que se evaluó la vacuna bivalente.

El trabajo se desarrolló cronológicamente de la siguiente forma: el día 1 del experimento se vacunaron a los grupos III, IV y V: el desafío con el virus de la pseudorabia a los grupos II, IV y V fue el día 11, utilizando 1800 TCID, con 2 ml vía intranasal: el día 15 se desafió con P. multocida a los 5 grupos, en una cámara de nebulización; la nebulización fue con 3 x 10<sup>8</sup> bacterias/ml (total 14 ml en 30 minutos).

En los animales de los grupos I y III la temperatura fué normal, no observándose algún signo respiratorio después del desafío con P. multocida. El grupo II mostró ligera apatía y anorexia al cuarto día posdesafió con PRV, hipertemia del segundo al quinto día después de este desafío; a los 2 días posdesafió con P. multocida los signos de apatía y anorexia fueron aún más marcados, sin observarse la Pasterelosis Pulmonar esperada. El grupo IV no presentó cambio alguno después del desafío con PRV, al tercer día posdesafió con P. multocida manifestaron hipertemia con una ligera apatía y ligera anorexia, sin signos respiratorios macroscópicamente en todos los animales de este grupo se observaron lesiones pulmonares hemorrágicas, abarcando de un 23 al 25% de la superficie pulmonar. En el grupo V la temperatura fué normal sin manifestar signos respiratorios en dos animales de este grupo se observaron lesiones pulmonares macroscópicas, el primero presentó una de tipo hemorrágica abarcando con 25% de la superficie pulmonar, el segundo animal presentó una lesión típica de Actinobacillus pleuropneumoniae, mostrando una área de consolidación en un 20% de la superficie pulmonar con aspecto gris rojizo fibrinohemorrágico con adherencias.

En todos los grupos se reaisló P. multocida a partir de muestras pulmonares.

El grupo 2 a partir del 3er sangrado (día 18 del experimento) 4/4 animales fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra PRV. El grupo IV 1/4 fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra PRV a partir del 2do. sangrado (día 11 del experimento), pero al 3er sangrado 4/4 fueron positivos a dicha prueba. En el grupo 5 al 2do. sangrado 3/4 y al 3er sangrado 4/4 fueron positivos a la presencia de anticuerpos contra PRV.

La diferencia en la respuesta inmune entre los grupos 4 y 5 probablemente se debe a que la vacuna bivalente grupo V, la presencia del antígeno bacteriano y sus componentes quimiotáctico, pudieran favorecer una respuesta inmune en el grupo 4.

Estos resultados demuestran, que la dosis de desafío empleada en animales no vacunados (grupo 2), sirvió como antígeno capaz de producir una respuesta inmune y no así una inmunosupresión pulmonar, debido a que los animales vacunados y posteriormente desafiados con el virus (grupo 4), se comportaron serológicamente igual al grupo 2, con excepción al animal que salió positivo al 2do. sangrado; pero a los 7 días después del desafío con PRV ambos grupos fueron 100% positivos.

Debido a que el grupo V (vacuna bivalente) presentó menor número de animales con lesiones pulmonares con respecto del IV, (vacuna contra PRV), el cuál presentó anorexia, apatía e hipertemia, después del desafío con P. multocida; planteando así la posibilidad de que la utilización de la vacuna bivalente tiene mejor resultado en la prevención de la Pasterelosis Pulmonar inducida por la PRV, que la vacunación sola con Aujeszky.

Sinergia entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y Actinobacillus Pleuropneumoniae.

#### 1. Fenómeno de sinergia.

La Pleuroneumonía Contagiosa Porcina (PCP) producida por Actinobacillus pleuropneumoniae está ampliamente distribuida en muchos países; entre ellos, por supuesto, México (12-17)

A. pleuropneumoniae es considerado hoy en día como el agente etiológico y, además, primario de la PCP (12 I')

Debido a los estudios sobre las bases fenotípicas y sobre el ADN de estas bacterias, hicieron que se transfiriera la especie Haemophilus pleuropneumoniae a la A. pleuropneumoniae, dependiente de NAD (nicotinamida adenina dinucleótido) biovariedad 1 y P. haemolytica-like a la especie A. pleuropneumoniae no dependiente de NAD biovariedad 2 (38). En México, ya ha sido informada la presencia de A. pleuropneumoniae biovariedad 2 en casos de PCP aguda (28); más en la literatura no existe información sobre la posible asociación de esta bacteria con el virus de la enfermedad de Aujeszky.

Para determinar esta posible asociación se realizaron tres estudios. En el primero, se utilizaron 60 pulmones con lesiones características de PCP y 40 sin lesiones aparentes; aplicando las técnicas bacteriológicas para el aislamiento de A. pleuropneumoniae y serológicas para la detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Aujeszky. Los resultados mostraron que A. pleuropneumoniae se recuperó en 57 (95 %) de los pulmones con lesiones; mismos que resultaron positivos a la serología contra el virus de la enfermedad de Aujeszky. En cuanto a los pulmones sin lesiones aparentes, no se logró aislar

A. pleuropneumoniae; pero 14 (35 %) de ellos resultaron positivos al virus de la enfermedad de Aujeszky, por serología. El análisis estadístico reveló la asociación entre estos dos agentes(21).

Un segundo estudio consistió en determinar la dosis mínima de A. pleuropneumoniae, por lo que se formaron cinco grupos de cerdos desafiados por nebulización con las dosis de 2 X 104 hasta 2 X 108; y también se determinó el grado de lesión pulmonar, y el de mortalidad, así como el tiempo de muerte. La dosis encontrada fue de 2 X 104 (41).

En el tercer estudio se buscó comprobar la hipótesis anterior. Para ello se utilizaron cerdos recién destetados que se encontraban libres de anticuerpos contra el cólera porcino y de la enfermedad de Aujeszky. Se vacunaron contra el virus de la Pseudorrabia y se distribuyeron en cuatro grupos de cuatro animales cada uno; designándose al azar en los siguientes tratamientos: Grupo I, testigo; II, nebulizado (en grupo, en una cámara de nebulización para cerdos) con 14 ml de una suspensión bacteriana que contenía 2 X 104 de A. pleuropneumoniae serotipo I; Grupo m, inoculado por vía intranasal con 1800 DICT50 del virus de la enfermedad de Aujeszky cepa Shope, y Grupo IV, inoculado por vía intranasal con 1800 DICT50 del virus y, posteriormente (3 a 5 días), nebulizado con 14 ml de una suspensión bacteriana que contenía 2 X 104 de A. pleuropneumoniae serotipo 1. Se registraron los signos clínicos, en la necropsia se determinó el % de área pulmonar afectada y se realizaron estudios bacteriológicos, histopatológicos y de inmunofluorescencia de los órganos afectados. Los resultados de este tercer estudio revelaron que los cerdos que fueron vacunados contra el virus de la Enfermedad de Aujeszky quedaron protegidos contra la infección nerviosa y, por supuesto, contra la muerte; pero no así contra la infección respiratoria cuando fueron desafiados con la cepa virulenta (Grupo III). Los cerdos vacunados, al ser primero desafiados con el virus y después con una dosis mínima de A. pleuropneumoniae, desarrollaron un proceso grave de pleuroneumonía. Los animales murieron en término de pocas horas y las lesiones agudas de PCP encontradas abarcaron más del 60 % de la superficie pulmonar; siendo semejantes a las presentadas con la dosis de 2 X 108 de A. pleuropneumoniae (20)

Estas evidencias explican que la vacunación contra el virus de la enfermedad de Aujeszky no fue capaz de prevenir la multiplicación del virus en el tracto respiratorio, ya que una dosis mínima de A. pleuropneumoniae fue suficiente para colonizar y matar a todos los cerdos, por lo que se considera que existe una interacción entre el virus de la enfermedad de Aujeszky y A. pleuropneumoniae. Probablemente esté sucediendo lo mismo en el campo, dado que después de presentarse la enfermedad de Aujeszky aparece la pleuroneumonía contagiosa porcina en forma epizootica(20~21)

## 2. Evaluación de un Inmunógeno Bivalente del Virus de la Enfermedad de Aujeszky y Actinobacillus pleuropneumoniae.

Este estudio realizado en 1994, se realizó con 20 lechones de un mes de edad, obtenidos del centro piloto de producción de cerdos SPF, a Fiebre Porcina Clásica, Virus de la Enfermedad de Aujeszky (VEA), Paramixovirus porcino y Actinobacillus pleuropneumoniae (Ap) serotipos 1, 3, 5 y 7. Se formaron 5 grupos con 4 lechones cada uno tomados al azar: grupo 1 (vacunado contra el VEA y desafiado contra la misma), grupo 2 (vacunado contra Ap y desafiado contra el mismo), grupo 3 (vacunado contra el VEA, desafiado contra la misma y Ap), grupo 4 (sin vacunar y desafiado con Ap), grupo 5 (vacuna contra VEA y Ap y desafiados con los mismos), que fué el grupo de evaluación del inmunogeno bivalente.

El día 1 se vacunaron los grupos 1,2,3 y 5, el desafío con el VEA fué el día 10, a los grupos 1,3, y 5, con una dosis de 1800 TCID, con 2 ml intranasalmente, el día 14 se desafió con APP con los grupos 2,3,4, y 5 por medio de una cámara de nebulización a una dosis de 3 x 108 bacterias/ml, total 14 ml en 30 minutos, los grupos 1,2,3, y 5 manifestaron anorexia, postración, ligera disnea y una ligera hipertemia, los signos clínicos observados posdesafío fueron los siguientes, grupo 1 manifestó disnea, anorexia, elevación de la temperatura corporal hacia el día 11 hasta el 18, el grupo 2 presentó una marcada anorexia, disnea, postración y un incremento en la temperatura corporal del día 14 al 21 del grupo 3 un solo animal mostró signos de disnea a los 5 días y todo el grupo manifestó un ligero aumento de temperatura corporal hacia el día 14, por lo que respecta al grupo 4 presentaron signos de tipo neumónico y elevación de la temperatura corporal del día 14 al 18 en el grupo 5 los signos antes descritos fueron marcados en forma más leve y presentaron dos picos de ligera hipertemia, uno hacia el día 10 y otra hacia el día 15. A la necropsia, solo se encontró daño en el aparato respiratorio del grupo 2 con un 8% de lesión pulmonar del tipo fibrinohemorrágico agudo con adherencias pleurales, con el grupo 3 25-30% de lesión pulmonar del tipo Pleuroneumina crónica, el grupo 4, presentó un 17% de superficie pulmonar dañada, con lesiones del tipo pleuroneumónico crónico, por lo que respecta al grupo 5 solamente 2 animales presentaron lesiones con un 7% de lesión pulmonar, de tipo consolidativa con adherencias.

Por medio de la técnica de anticuerpos fluorescentes se determinó la presencia de VEA en pulmón, corazón, riñón, hígado, bazo, y encéfalo, resultando negativa para todos los grupos en los primeros 5 órganos, y por lo que respecta al encéfalo se le determinaron dos negativos, el grupo 3 4/4 positivos a la IFD, el grupo 4 (negativo), grupo 5 (4/4 positivos). En el aislamiento e identificación de APP se encontró que el grupo 1 fué negativo, el grupo 2 1/4 fué posible el aislamiento de Actinobacillus pleuropneumoniae, el grupo 3 4/4 aislamientos e identificaciones del mismo, grupo 4 se aisló y se identificó el microorganismo en dos de 4 muestras, grupo 5 solamente 1 de 4 muestras se recuperó el agente, las recuperaciones cuando fueron positivas se realizaron a partir de los pulmones de los animales, de los diferentes grupos, siendo negativas en todos los grupos los aislamientos a partir de corazón, riñón, hígado y bazo. En la evaluación serológica contra el APP se utilizó el KIT de PLEUOTEST encontrándose lo siguiente: grupo 1 negativo durante los 6 segundos, grupo 2 positivo a partir del 40 segundo, de igual forma el grupo 3,4, 5, solamente al serotipo 1.

En base a los datos anteriores, se determina que la vacunación contra VEA y el desafío con VEA y APP se ven más afectados



que los no vacunados contra el VEA, también se encontró que los animales vacunados contra el APP no morían, pero presentaban signos y lesiones típicas de pleuroneumonía. Así mismo se encontró que los animales no vacunados y desafiados con APP presentaban signos neumónicos y lesiones (grupo 4) pero en menor grado que los vacunados con el VEA y desafiados con el mismo y APP (grupo 3) demostrándose una sinergia entre los dos agentes por lo que respecta a los animales que fueron vacunados con el inmunógeno bivalente y desafiados con el VEA (grupo 5), presentaron menos signos clínicos y menor grado de lesión pulmonar.

Desarrollo de una colonia de cerdos SPF para el estudio de inmunógenos a base del virus de la enfermedad de Aujeszky y bacterias del aparato respiratorio

La FES-Cuautitlán y el CENID-Microbiología Veterinaria, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de la SAGDR (antes Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos), en conjunto, evaluaron varios inmunógenos a base del virus de la enfermedad de Aujeszky y de las bacterias más importantes aisladas de cerdos con problemas neumónicos, para prevenir este problema neumónico que deja como secuela de la infección primaria dicho virus. Las investigaciones concluyeron: para ello se tuvieron que realizar varios proyectos: Solicitar apoyo financiero al CONACYT (P124CCOT-894490); Desarrollar una colonia de cerdos libre de patógenos específicos SPF (14); Evaluar las pruebas de inocuidad de las vacunas en animales de laboratorio, y evaluar estos inmunógenos en varias camadas de lechones SPF. Los resultados son altamente satisfactorios, y el Centro para la Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México, los está considerando para determinar el perfil financiero de esta adaptación tecnológica, y darla a conocer a la comunidad técnico-científica del país.

Infección Experimental con el Virus del Ojo Azul y *Pasteurella multocida* en cerdos convencionales.

Este trabajo se realizó en cooperación con el Departamento de Producción Animal: Cerdos, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. En este estudio se utilizó el virus del Ojo Azul o Paramyxovirus Porcina, aislado en la Piedad, Mich., propagado en la línea celular PK-15; así mismo, se utilizó una *Pasteurella multocida* tipo A y D. Se formaron cuatro grupos de cuatro cerdos cada uno. El Grupo I, cerdos inoculados con el Paramyxovirus; Grupo II, cerdos inoculados con *Pasteurella multocida* tipo A y D; Grupo III, cerdos inoculados primero con el Paramyxovirus Porcino y posteriormente con *Pasteurella multocida* Tipo A y D; y el Grupo IV, cerdos inoculados con medio de cultivo estéril. Todos los grupos fueron aerosolizados, con los inoculos virales y bacterianos

El grupo infectado con el paramyxovirus y *P. multocida* no se observó opacidad en la cornea, sin embargo el estornudo fue más prolongado además que presentaron tos ligera en reposo. Las lesiones macroscópicas encontradas en este grupo fueron irrelevantes y no se logró recuperar a la *P. multocida*.

En este trabajo fue posible reproducir el cuadro clínico de la Enfermedad del Ojo azul en forma experimental, utilizando un sistema de aerosolización.

Desarrollo de una colonia de cerdos SPF para el estudio de inmunógenos a base del virus de la enfermedad de Aujeszky y bacterias del aparato respiratorio

La FES-Cuautitlán y el CENID-Microbiología Veterinaria, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de la SAGDR (antes Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos), en conjunto, evaluaron varios inmunógenos a base del virus de la enfermedad de Aujeszky y de las bacterias más importantes aisladas de cerdos con problemas neumónicos, para prevenir este problema neumónico que deja como secuela de la infección primaria dicho virus. Las investigaciones concluyeron: para ello se tuvieron que realizar varios proyectos: Solicitar apoyo financiero al CONACYT (P124CCOT-894490); Desarrollar una colonia de cerdos libre de patógenos específicos SPF (14); Evaluar las pruebas de inocuidad de las vacunas en animales de laboratorio, y evaluar estos inmunógenos en varias camadas de lechones SPF. Los resultados son altamente satisfactorios, y el Centro para la Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México, los está considerando para determinar el perfil financiero de esta adaptación tecnológica, y darla a conocer a la comunidad técnico-científica del país.

Relación *Mycoplasma-Pasteurella* en las neumonías del cerdo.

Existen pocos estudios sobre la influencia de *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* en la neumonía crónica del cerdo. Smith et al (40) encontraron que al infectar experimentalmente por vía intranasal o endotraqueal a cerdos gnotobióticos con *M. hyopneumoniae* o con *P. multocida* tipo A o la combinación de ambas especies bacterianas, las lesiones mostradas fueron diferentes en cuanto a la extensión y severidad, ya que estas fueron muy similares cuando se inocularon los microorganismos en forma individual (solo pequeñas áreas neumónicas en los lóbulos apical y cardiaco derechos por los días 12 y 19 postinoculación), mientras que la combinación de ambas bacterias produjo lesiones más graves y severas (áreas neumónicas en los lóbulos apical y cardiaco derecho e izquierdo, así como la parte anteroventral del lóbulo diafragmático derecho y accesorio por el día 19 postinoculación). Estos autores sugirieron que se establezcan investigaciones futuras con bases estadísticas para determinar la posibilidad de que estos 2 organismos actúen en forma aditiva o quizá sinérgica.

Morrison y cols. (30) han demostrado que los pulmones neumónicos (colectados en rastro) que presentan tanto *M. hyopneumoniae* (correlación positiva entre fluorescencia y neumonía  $r=0.46$ ;  $p \sim 0.001$ ) como *P. multocida* (correlación positiva entre el número

de colonias y neumonía,  $r=0.60$ ;  $p<0.001$ ) presentan estadísticamente lesiones de mayor severidad que pulmones con los mismos microorganismos por si solos. sin embargo en otro trabajo se ha detectado por aislamiento que M. hypopneumoniae se encuentra en mayor proporción en pulmones con lesiones ligeras neumónicas que aquellos que presentan lesiones severas y concluyen que M. hypopneumoniae no es una especie de marcada actividad patogénica y que se establece solo en lechones(23).

#### 1. Interacción entre Mycoplasma hypopneumoniae y Pasteurella multocida.

En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan (FES- Cuautitlan), UNAM, en conjunto con la Universidad de Minnesota y el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, han demostrado en forma experimental la interacción entre Mycoplasma hypopneumoniae y P. multocida empleando cerdos convencionales(13).

Este trabajo analiza la interacción de Mycoplasma hypopneumoniae en la infección experimental de cerdos convencionales. Para ello se formaron los siguientes cuatro grupos de cuatro cerdos cada uno: I testigo, II inoculado solamente con M hypopneumoniae, III inoculado solamente con P. multocida y IV inoculado primero con M hypopneumoniae y después con P. multocida. Los cerdos fueron de la raza Yorkshire destetados a la quinta semana y se sacrificaron a los 36 días.

En cuanto a los signos clínicos, en los cerdos del grupo I la temperatura fue normal y no se observó tos o disnea, no presentaron lesiones pulmonares, excepto uno de ellos (pequeña zona de 3%) del cual se aisló Mycoplasma hyorhinis de la lesión, que fue de tipo proliferativo, no se aislaron los agentes infecciosos que fueron inoculados en los otros grupos y los índices de crecimiento fueron normales. El grupo III presentó temperatura y signos respiratorios normales, no se encontraron lesiones macroscópicas ni microscópicas, no se aisló P. multocida y los índices de crecimiento fueron normales, P multocida solo no fué capaz de infectar y colonizar el pulmón.

La inoculación con M. hypopneumoniae en el grupo II provocó hipertermia los días 19 al 23 y los cerdos presentaron tos y disnea moderada y con signos de recuperación, las lesiones macroscópicas abarcaron del 4 al 17% de la superficie pulmonar y fueron de tipo proliferativo, se aisló el micoplasma en todos los pulmones y la ganancia diaria de peso fue normal aunque el consumo de alimento fue mayor. En los cerdos del grupo IV inoculado con ambos agentes se agravó y se prolongó la hipertermia, presentaron tos y disnea de mayor severidad y con signos de agravamiento, las lesiones macroscópicas abarcaron del 22 al 26% y fueron de tipo exudativo, se recuperó M hypopneumoniae de todos los pulmones y solo se recuperó en tres animales P. multocida, 13 días después de aún inoculada, cuyos pulmones estaban previamente infectados con el micoplasma y fueron capaces de eliminar a pasteurela.

Los grupos mostraron índices de crecimiento similares en la ganancia diaria de peso, sin embargo en el grupo inoculado con ambos agentes el consumo de alimento fue mayor. El grupo testigo tuvo un índice de crecimiento normal y la inoculación con P. multocida tampoco afectó el crecimiento ni la conversión alimenticia de los lechones. Por otra parte, aunque la inoculación con M hypopneumoniae no modificó la ganancia diaria de peso, los cerdos de este grupo consumieron 32% más alimento que los del grupo testigo. La infección secuencial con ambos agentes infecciosos provocó que los lechones consumieran 59% mayor cantidad de alimento que los cerdos del grupo testigo, aunque su ganancia diaria de peso fué normal.

La inoculación secuencial, primero con M. hypopneumoniae y segundo con P multocida en forma de aerosoles, y utilizando cerdos convencionales, fué para simular las condiciones de las explotaciones porcinas. Con este trabajo se confirmó la interacción aditiva entre M. hypopneumoniae y P. multocida en el desarrollo de la neumonía crónica de los cerdos. Además se demostró que la infección previa por M hypopneumoniae favorece la colonización y el daño pulmonar por P. multocida que no es patógena por ella misma. Con este modelo experimental que aquí se describió, se podrán ahora analizarse los mecanismos de patogenicidad de esta interacción aditiva, además, se podrán evaluar inmunógenos o vacunas, así como antibióticos específicos contra M. hypopneumoniae, y olvidarse de atacar inutilmente a P multocida.

#### 2. Estudio de dos inmunógenos a base de Mycoplasma hypopneumoniae, para prevenir la neumonía enzoótica.

Se evaluaron dos diferentes inmunógenos elaborados a partir de M. hypopneumoniae y administrados en cerdos por vía intraperitoneal. Se emplearon 12 cerdos convencionales machos raza Yorkshire de 8 semanas de edad. Con ellos se formaron tres grupos experimentales de 4 cerdos cada uno: Grupo I, inoculado con 2.0 ml. medio de Friis por vía intraperitoneal (I/P); Grupo II, inoculado con 2.0 ml. de una suspensión de M. hypopneumoniae a base de células completas sin adyuvante por vía I/P; Grupo III, inoculado con 2.0 ml. de una suspensión de M. hypopneumoniae a base de células completas en adyuvante oleoso por vía intraperitoneal. Todos los cerdos se desafiaron por vía intratraqueal con 20 ml. de homogeneizado pulmonar conteniendo M. hypopneumoniae cepa 194, el día 28 posvacunación. Los cerdos se sacrificaron el día 50 posvacunación ( 32 días posdesafió) y se evaluaron las lesiones macroscópicas de los pulmones y se tomaron muestras de ellos para los estudios bacteriológicos e histopatológicos.

También se tomaron muestras de cornetes nasales para su estudio bacteriológico. Se encontró en el grupo I una media de 13% de lesión neumónica, mientras que los grupos II y III fueron de 3 y 6% respectivamente; las lesiones neumónicas encontradas correspondieron a zonas de consolidación rojiza y resolutivas. El adyuvante empleado no produjo lesiones en peritoneo parietal y visceral. Por lo menos en un cerdo de cada grupo se encontraron lesiones microscópicas caracterizadas por una infiltración linfocitaria peribronquial. El aislamiento de M. hypopneumoniae se logró de cuatro animales, uno del grupo I, uno del II y dos del grupo III. El estudio bacteriológico general reveló que por lo menos un cerdo de cada grupo tenía P multocida. Las lesiones

encontradas en los cornetes nasales variaron en grado y aspecto, de ellas se aisló *Bordetella bronchiseptica* y *P. multocida*. Los resultados que se obtuvieron en este ensayo, basados en las lesiones encontradas, mostraron que la vacuna de *M. hyopneumoniae* sin adyuvante y aplicada por vía intraperitoneal indujo mejor protección contra el desafío experimental con el homogenizado pulmonar con micoplasma. Sin embargo el aislamiento de *P. multocida* en un cerdo de cada grupo inmunizado, nos sugiere que la protección con los inmunógenos de *M. hyopneumoniae* no previno la colonización del micoplasma lo que favoreció el establecimiento de *P. multocida* que se encontraba presente en los cornetes nasales, en los cerdos aparentemente sanos. En este estudio se observó que al igual que para vacunas ensayadas por otros grupos de investigación, ninguno de los dos inmunógenos protegió totalmente, pues aunque se logró la disminución de las lesiones, no se previno la colonización del pulmón(8).

### 3. Diagnóstico de *Pasteurella multocida*.

Se desarrolló un paquete tecnológico, sencillo y práctico, denominado prueba del anillo en sangre completa correlacionando los resultados de la prueba tamiz (suero y sangre) con las lesiones pulmonares y el aislamiento bacteriológico. En los cerdos la prueba resultó negativa tanto en los animales vacunados como los controles, solo fueron positivos una semana después cuando se desafiaron con *Pasteurella multocida*. La evaluación de las lesiones pulmonares reveló que fueron el 37% en los pulmones con lesiones tipo consolidación gris-rojiza, el 33.6% de las lesiones era de tipo fibrinohemorrágica y el 29.5% SCPA. En cuanto a los aislamientos se encontró que en los pulmones con lesiones de los 3 tipos se recuperó *Pasteurella multocida* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* y otros microorganismos no identificados. En la lesión grisrojiza, se obtuvo un mayor aislamiento de *P. multocida*, encontrándose los tipos A y D.

La sensibilidad fue regular (P. m. tipo A=69.9% y tipo D=41.8%). La prueba fue altamente específica (P. m. tipo A=91% y tipo D=89.6%). Los resultados de esta prueba nos orienta a utilizarla como prueba tamiz, para determinar los problemas ocasionados como agente secundario en la Pasteurelisis Pulmonar del cerdo. Este desarrollo tecnológico se hizo acreedor de una Mención Honorífica en el premio CANIFARMA Dr. Alfredo Tellez Girón Rode de la Industria Farmacéutica Veterinaria en el año de 1991.

### 4. Desarrollo de Metodología Diagnóstica para *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Recientemente, este grupo multidisciplinario viene trabajando sobre la metodología diagnóstica, elaborando antisueros y antígenos para identificar el *Mycoplasma hyopneumoniae* en tejido pulmonar o anticuerpos del suero. Se han elaborado conjugados para las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa; se elaboró un antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae* Tween 20 y se han modificado algunas técnicas rápidas para identificar cultivos *M. hyopneumoniae*. Esta serie de trabajos serán presentados en esta X- Convención anual de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos (AMVEC), Manzanillo, Col. 1995.

### Relación *Mycoplasma-Actinobacillus* en la Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

Por otro lado se ha estudiado el efecto de *M. hyopneumoniae* sobre el desarrollo de la pleuropneumonía contagiosa producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y se ha encontrado que la infección previa con micoplasma actúa como un factor predisponente que exacerba la pleuropneumonía en los cerdos(3). Este tipo de evidencias en las que *Mycoplasma hyopneumoniae* participa como agente primario, en una afección respiratoria como lo es la PCP que también es primaria, deben de tomarse en cuenta para entender lo que algunos consideran como el complejo respiratorio de los cerdos. Es importante señalar que las granjas que se consideran libres de la Neumonía Enzootica también se consideran libres de los problemas respiratorios secundarios, aún en aquellas granjas donde el problema es pleuroneumonía, debido a que por mucha inmunidad que se tenga contra la PCP, *M. hyopneumoniae* favorece la colonización de *A. pleuropneumoniae*, ya que el micoplasma "barrio" con el sistema mucociliar de remoción bacteriana del árbol respiratorio.

### Pleuroneumonía Contagiosa Porcina: Estudios de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en México.

#### 1. Primeros aislamientos, identificaciones y serotipificaciones.

En México a partir de 1976, se observaron violentas epizootias de neumonía en granjas porcícolas del Bajío y del Estado de Tlaxcala. Estos casos se caracterizaron por la elevada morbilidad (80-90%) y mortalidad (10-30%), que inicialmente afectó a los cerdos adultos y con el tiempo se fue quedando como una infección enzootica de los lechones. La enfermedad no respondió al tratamiento usual con antibióticos ni con inmunizantes usuales a base de pasteurelas, estreptococos, corinebacterias y salmonelas.

Debido a la severidad de los casos el Dr. Carlos Pijoan y sus colaboradores (22) decidieron hacer una investigación sobre la etiología de este problema. El estudio fue realizado en dos granjas mixtas (cría y engorda) localizadas una en el Edo. de Tlaxcala y otra en la zona de La Piedad Michoacán. Se sacrificaron un total de 29 animales de diferentes edades (entre 2 y 6 meses) que presentaban signos avanzados de enfermedad respiratoria, 6 de la zona de Tlaxcala y 23 de La Piedad, Mich. Los pulmones fueron observados para las lesiones macroscópicas y después se les realizó un estudio histopatológico.

A partir de los pulmones, después de flamear la superficie, se sembraron en agar nutritivo, agar sangre y agar chocolate con una colonia de *Staphylococcus aureus* o *Micrococcus* spp como nodriza a 37 C en atmósfera normal. Los métodos que se utilizaron para la identificación de las colonias aisladas fueron los ya descritos en la literatura.

En 3(50%) de los pulmones provenientes de Tlaxcala y 5(21.7%) de La Piedad, se obtuvo crecimiento de colonias beta hemolíticas que fueron clasificadas como *Haemophilus parahemolyticus* (*pleuropneumoniae*). El aislamiento y la rápida identificación de

los hemófilos de cerdos ha cobrado especial relevancia debido a la aparición de estos brotes (22).

En México, se ha aislado el serotipo 1 (2), en este estudio que se realizó en el rastro de Ferrería del D.F. a la inspección que se llevó a cabo durante 8 meses, se observaron 41,060 cerdos de abasto. Se encontró que 11,572 (28.2%) presentaron lesiones neumónicas. De las lesiones neumónicas un 2.73%\*316( se caracterizaron como lesiones tipo "pleuropneumónico" (1.84% de tipo agudo y 0.88% de tipo crónico).

A los aislamientos sospechosos se le realizaron la pruebas bioquímicas convencionales. La serotipificación se realizó en el Departamento de Grandes especies de la Universidad de Minnesota E.I.J.A. y se corroboró en el Instituto de Investigación de Medicina Veterinaria de la Universidad de Iowa, por el Dr. Ross. La técnica que se empleó fué la aglutinación en placa por lo que se realizó la suspensión de la bacteria en solución formolizada al 0.1% y se enfretó con los antisueros correspondientes a los serotipos del 1 al 9 de Actinobacillus pleuropneumoniae.

Todos los actinobacilos aislados se identificaron como Actinobacillus pleuropneumoniae serotipo 1. Con este trabajo se demostro que los 9 serotipos que se han reportado en diferentes partes del mundo sólo el serotipo 1 de A. pleuropneumoniae se encuentra en México, sin embargo, no hay que descartar la idea que el serotipo 5 u otros se encuentren en nuestro país, debido a que los Estados Unidos los serotipos predominantes son el 1 y el 5. Se recomienda que se realice la serotipificación por epifluorescencia con proteína A conjugada empleando bloques de agar con colonias de los primoaislamientos y no hacer clonación, debido a que existe una alta probabilidad de que la infecciones sean mixtas.

En otro estudio sobre el aislamiento y serotipificación de Actinobacillus pleuropneumoniae de pulmones de cerdos con pleuropneumonia en diferentes estados de la república Mexicana, se estudiaron 114 pulmones de cerdos de los cuáles 74 se obtuvieron de animales con pleuropneumonia procedentes de granjas porcinas de 9 estados de la Rep. Mex. Jalisco (20), Michoacán (15), Guanajuato (13), Puebla (11), Estado de México (9), Sonora (3), Querétaro (1), Yucatán (1) y D.F. (1) y 40 con diferente tipo de neumonia procedentes de cerdos sacrificados en un rastro del D.F. Los aislamientos correspondientes a las muestras obtenidas de 1984 a 1988. Los cultivos identificados como Actinobacillus pleuropneumoniae se tipificaron por la prueba de aglutinación en placa utilizando antisueros preparados en conejos con cepas tipo (del 1 al 9) proporcionadas por el Dr. Nicolet del Inst. Vet. Bact. Univ. Berne, Suiza.

El aislamiento de Actinobacillus pleuropneumoniae a partir de 64 pulmones con lesiones de pleuroneumónicas, de los diferentes estados de la República Mexicana, indica que la pleuroneumonia ocasionada por este microorganismo esta ampliamente difundida por el país. De los cuales 55 correspondieron a serotipos específicos y los 11 restantes se distribuyeron de la siguiente forma: 7 no tipificables con los 9 serotipos utilizados del (1 al 9), 3 pulmones tuvieron infección mixta, dos en Michoacán y uno en Guanajuato, las dos cepas restantes autoaglutinaron por lo que se eliminaron del estudio (una de Sonora y una de Jalisco), el principal serotipo aislado fué el 1 con 36 aislamientos (10%).

Los otros serotipos se aislaron con mayor frecuencia, el serotipo 9 no se identificó en ninguno de los A. pleuropneumoniae aislados de los pulmones estudiados. El hecho de que se recuperara este microorganismo de los 9 Estados estudiados, confirma que el de pleuropneumonia está ampliamente difundida en el país. El principal serotipo aislado fue el 1, el cual se considera responsable de los brotes más severos de pleuropneumonia en el campo.

Los serotipos de A. pleuropneumoniae aislados en los diferentes estados de la República muestran que en Jalisco se identificaron los serotipos 1,2,3,5, y 8; en Michoacán el 1,5,6,7, y el 8; en Guanajuato el 1,4, y el 5; en Puebla el 1,2,3,4 y el 5; en el estado de México el 1 y el 5; en Sonora y Querétaro el 1 y en Yucatán el 5. Dos de los serotipos identificados, correspondieron con el serotipo 8 el cuál no ha sido identificado en el continente americano, actualmente se esta trabajando para verificar si corresponde al serotipo 8 ó es producto de una reacción cruzada con 3 ó 6. Seis de los aislamientos no pudieron ser identificados (5).

## 2. Estudios sobre Fimbrias citoadherentes.

En México se han realizado una serie de trabajos que mostraron que cuando se inocularon por nebulización con Actinobacillus pleuropneumoniae (en una cámara de aerosoles) a cerdos, conejos, ratones y cuyes, solo los cerdos se infectaron y murieron con inoculos que variaron de de 2 X 10<sup>4</sup> hasta 2 X 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias/ml (~JFC/ml). Estas evidencias muestran la alta especificidad de especie de Actinobacillus pleuropneumoniae hacia el cerdo, sugiriendo probablemente, que el cerdo posee receptores específicos hacia el factor de adherencia de esta bacteria (26).

En otros estudios se han identificado Actinobacillus pleuropneumoniae estructuras semejantes a fimbrias o pilis citoadherentes, denominadas tambien adhesinas. Sin embargo, no se han encontrado estos apendices extracelulares en Actinobacillus pleuropneumoniae cultivados *in vitro*, y al parecer solo la bacteria expresa estos antígenos en el cerdo. Se han identificado estas estructuras mediante microscopia electrónica y estudios de patogenicidad en cerdo SPF, en donde se demuestra que Actinobacillus pleuropneumoniae tiene y presenta factores de adherencia o pilis citoadherentes en el cerdo, mientras que solo se mantienen estos pilis en los primeros pases de la bacteria en medios de cultivo *in vitro* ( ver utrera y pijoan 1991).

Garibay y cols. en 1993 encontraron fimbrias de un diámetro de hasta 2 nm, no obstante que tambien encontraron otras fimbrias de 2 a 7 nm de diámetro, lo cual se sugiere que A. pleuropneumoniae este expresando dos clases de estructuras fimbriales que se han encontrado en E. coli, una la "rígida" que tiene un diámetro de 2 a 5 nm y que esta involucrada en la conjugación y la otra "flexible" con diámetros de hasta 2 nm, involucradas unicamente en la adherencia, al igual que el estudio anterior estas



estructuras se fueron perdiendo en los subsecuentes pases.

### 3. Estudios sobre las Exotoxinas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

En los sobrenadantes de los cultivos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* se ha encontrado actividad tóxica sobre diferentes células, tales como linfocitos y macrófagos alveolares pero principalmente contra glóbulos rojos, esta actividad funcional ha determinado que a esos factores tóxicos se le denominen "hemolisinas" o "citolisinas".

Se han identificado tres distintos tipos de citotoxinas en *A. pleuropneumoniae*: citolisina I (antes ClyI, hoy ApxI), citolisina II (antes ClyII, hoy ApxII) y citolisina III (antes ClyIII, hoy ApxIII). Se ha encontrado que la citolisina I la producen los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11; la citolisina II es excretada por todos los serotipos excepto el 10 y la citolisina III solo la producen los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8 (2 ojo). (24).

En cuanto a las propiedades biológicas de las citolisinas se ha encontrado "in vitro" que estas interfieren con la fagocitosis, esto se ha demostrado con cepas mutantes originadas a partir de *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipo 2, denominada HK 361; que produce la citolisina III y II (+120 Kd y +109 Kd) y que mataron a los macrófagos en el tiempo "cero"; la cepa mutante "E" que produce la citolisina III (+120 Kd), pero no la citolisina II (-109 Kd) también mató a los macrófagos en el tiempo "cero", sin embargo, la cepa mutante "H" que no produce citolisinas (-120 Kd y -109 Kd) no ocurrió la muerte de los macrófagos, por lo tanto no interfirió con la fagocitosis.

Estas hemolisinas no muestran diferencias antigenicas entre serotipos, aunque son antigénicamente diferentes entre ellas. La actividad hemolítica de esta proteína es probablemente la responsable de las lesiones iniciales de la PCP, caracterizadas por ser hemorrágicas y necróticas.

Los estudios "in vivo" de las citolisinas I, II y III han mostrado en cerdos que la ApxI, cuando se inoculó por vía I/T produjo lesiones macroscópicas de tipo pleuroneumónicas, fibrino hemorrágicas, necrosis focal, pleuritis y ganglios linfáticos aumentados de volumen; en cuanto a la citolisina ApxII, esta produjo lesiones menos severas que consistieron en lesiones neumónicas que variaron de catarrales pequeñas a fibrinosas, y no hubo pleuritis; la citolisina ApxIII produjo lesiones neumónicas hemorrágicas y catarrales leves y pleuritis.

#### 3.1. Efecto de la combinación de las Citolisinas.

Para demostrar este fenómeno de sinergia o antagonismo, se utilizaron cuatro serotipos de *A. pleuropneumoniae*: 1, 3, 5 y 7. Cada serotipo de inóculo a medios de cultivo unos con calcio y otros con fierro y se determinaron las curvas de producción de citolisinas, tomando muestras cada dos horas hasta las 24 horas de incubación.

Los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 60 minutos y los sobrenadantes se filtraron con membranas Millipore de 0.22  $\mu$ m de diámetro. Posteriormente este filtrado se ultrafiltró con una membrana de exclusión de 100,000 de P.M. y se trabajó solo con el retenido.

Para determinar la actividad hemolítica, se emplearon eritrocitos de bovino, los g.r. se lavaron tres veces con PBS y se ajustaron al 1% en 0.15 M de NaCl. Las muestras (solo de los retenidos) de los diferentes serotipos y a diferentes tiempos se diluyeron (diluciones dobles) en una solución salina tris-bufferado de calcio (TBCS). Se incubaron a 37 C durante 1 hora, los tubos se centrifugaron a 8000 rpm/1 minuto y las lecturas de los sobrenadantes se realizaron con un espectrofotómetro (longitud de onda A-545) (3).

Para determinar el efecto aditivo o sinérgico, los retenidos de los serotipos 1, 3, 5 y 7 se combinaron entre sí, quedando de la siguiente manera: 1 y 3; 1 y 5; 1 y 7; 3 y 5; 3 y 7; 5 y 7, y 1, 5y7. Asimismo se invirtió el proceso 3y1; 5y1; 3y5; 3y7; 7y1; 7y5; 7y5y1. Los resultados obtenidos de las citolisinas de *A. pleuropneumoniae* en forma individual, se comportaron como era de esperarse, sin embargo, no encontramos un efecto adicional cuando se combinaron las citolisinas entre ellas, sobretodo con 1, 5 y 7; con la citolisina del serotipo 3 no existió efecto alguno. Nos sorprende que a pesar de esperar un efecto sinérgico entre las citolisinas de los serotipos 1, 5 y 7, lo encontrado fue un completo antagonismo, ya que no se obtuvo hemólisis en las muestras tratadas. Por el momento desconocemos que fue lo que ocurrió.

En el cuadro 2, se muestran las absorbancias obtenidas con las diferentes combinaciones entre los serotipos 1, 5 y 7:

#### 3.2. Importancia de identificar el serotipo.

Es importante tener en cuenta y entender que los factores de virulencia de los 12 serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* juegan un papel primordial en la patogénesis de la pleuroneumonía contagiosa porcina PCP. Por un lado las citolisinas son las responsables de las lesiones pleuroneumónicas, cada una de ellas con diferentes características patológicas y por el otro, el cerdo en algunas granjas se ha infectado con más de un serotipo, al respecto se encontró poca información sobre el efecto aditivo o sinérgico de estas citolisinas en condiciones naturales, el entendimiento de este fenómeno biológico permitiría utilizar con estrategia posibles inmunógenos a base de citolisinas inactivadas o toxoides; de ahí de vital importancia el identificar el o los serotipos involucrados en la granja, así como el comportamiento de los mismos en las diferentes etapas de la producción.

#### 3.3. Diagnóstico de la PCP en México.

El diagnóstico de la PCP en países como México y en los demás de Latinoamérica, se limita solo a eso, al diagnóstico, y no a



la evaluación del "status inmune" de la granja, mediante la utilización de evaluación serológica en las diferentes etapas de la producción o perfiles serológicos, para la prevención y control de la enfermedad.

Una de las principales aportaciones que ha realizado el grupo multidisciplinario del Posgrado en Microbiología de la FES-Cuautitlán UNAM, es quizás el desarrollo tecnológico denominado "PLEUROTEST". Este paquete tecnológico se hizo acreedor del Premio CANIFARMA "Dr. Alfredo Tellez Girón Rode" en 1989. El "PLEUROTEST" es un KIT de diagnóstico serológico que además de discriminar a los animales que son vacunados, detectando solo a los infectados; identifica a los serotipos prevalentes en la granja. La presentación inicial del KIT es con los serotipos 1, 3, 5 y 7; en un futuro saldrá un segundo KIT con los serotipos 2, 4, 6 y 8 de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Con estos paquetes de diagnóstico se podrán realizar completamente los perfiles serológicos en las granjas a estudiar.

### 3.4. Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana.

El grupo también ha trabajado en colaboración con la Industria Farmacéutica Veterinaria, y lo ha hecho determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de varios antibióticos tales como: Kítasamicina, Tiamulina, Eritromicina, Tetraciclinas; Tilosina, Estreptomycin y Cefalosporinas, también algunos quimioterapéuticos tales como: quinolonas de diferentes generaciones. Los resultados muestran que los diversos serotipos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* tienen un Patrón de susceptibilidad diferente.

Literatura Consultada.

1. Akkermans, J.P.W.M.: Aujeszky's disease. *Ann. Med. Vet.* 120: 295-306 (1976).
2. Pensaert, M.B. and Kluge, J.P.: Pseudorabies virus (Aujeszky's disease). In: *Virus infections of porcines*. Edited by: Pensaert, M.B., 39-64. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 1989.
3. Andries, K., Pensaert, M., and Vandeputte, J.: Virological examination of pig with acute respiratory disorders. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 50: 236-241 (1981).
4. Badiola, S.J.I. y Pujols, R.J.: Estudios sobre la Interacción del virus de Aujeszky con *Pasteurella multocida* en los procesos neumónicos del cerdo. Tesis de maestría. *Facu. de Est. Sup. Cuautitlán*, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán, Izcalli, Edo. de México, 1984.
5. Bartha, A.: Attenuation of the virulence of Aujeszky's disease virus. *Magn. Allatorv. Lapja.* 16: 42-45 (1961).
6. Baskerville, A.: The histopathology of experimental pneumonia in pigs produced by Aujeszky's disease virus. *Res. vet. Sci.* 14: 223-228 (1973).
7. Baskerville, A.: Ultrastructural changes in the lungs of pigs infected with Aujeszky's disease virus. *Res. Vet. Sci.* 14: 229-233 (1973).
8. Bitsch, V. and Andersen, J.B.: On the Epidemiology of Aujeszky's disease in Denmark and the Possibilities of its Control. In: *G. Wittmann and S.A. Hall (Eds.), vol. 17: 227-236. Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*. Martinus Nyhoff. (1982).
9. Bodon, L., Meszaros, J., Papp-Vid, G. and Romvary, J.: Properties of Aujeszky's disease virus strains isolated from swine pneumonia cases. *Acta vet. Acad. Sci. hung.* 18: 107-109 (1968).
10. Bran, L., Suhaci, I. and Ursache, R.: Experimental production of Aujeszky's disease by nasal instillation of culture virus. *Arch. Vet.* 5: 83-87 (1968).
11. Buddle, B.M.; Herceg M. and Dacies, D.H.: Experimental infection of sheep with *Mycoplasma ovipneumoniae* and *Pasteurella haemolytica*. *Veterinary Microbiology*, 9: 543-548 (1984).
12. Caballero, C.S.: Efecto del virus de Aujeszky sobre la remoción pulmonar de *Pasteurella multocida* en cerdos de engorda. Tesis de maestría. *Fac. de Est. Sup. Cuautitlán*, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán, Izcalli, Edo. de México, 1985.
13. Oirschot van, J.T. and Gielkens, A.L.J.: In vivo and in vitro reactivation of latent pseudorabies virus in pigs born to vaccinated sows. *Am. J. vet Res.* 45: 567-571 (1984).
14. Ciprián, C.A., Medina, A.G., Fuentes, R.M., Pijoan, A.C., Torres, A.O., Colmenares, V.G. y Camacho, M.J.: Serotipificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. *Vet. Mex.* 19: 205-210 (1988).
15. Ciprián, A., Pijoan, C., Cruz, T., Camacho, J., Tortora, J., Colmenares, G., Lopez-Revilla, R. and Garza de la, M.: *Mycoplasma hvopneumoniae* increases the susceptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can. J. Vet. Res.* 52: 434-438 (1988).
16. Ciprián, C.A., Paz de, V.O., Gonzalez, V.L.E., Hernandez, R.D., Fernandez, B.M., Lana, P.H.J., Colmenares, V.G. y Hernandez-Baumgarten, E.: Desarrollo de una colonia de cerdos libres de patógenos específicos. Memorias del XXV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos 1990. Puerto Vallarta, Jal. 1990. 113 - 114. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos Puerto Vallarta, Jal., México (1990).
17. Corner, A.H.: Pathology of experimental Aujeszky's disease in piglets. *Res. vet. Sci.* 6: 337-343 (1965).
18. Cruz Sanchez, T.A.: Evaluación de dos inmunógenos de *Mycoplasma hvopneumoniae* en cerdos convencionales. Tesis de Maestría. *Fac. Est. Sup. Cuautitlán*, Universidad Nacional Autónoma de México Cuautitlán, Izcalli, Edo. de Mex. 1991.
19. Degre, M. and Solberg, L.A.: Synergic effect in viral-bacterial infection. III Histopathological changes in the trachea of mice following viral and bacterial infection. *Acta path. microbiol. scand.* 75: 129-136 (1971).
20. Diaz, C., Gonzalez, M., Jimenez, E. y Stephanou, A.: Identificación de diferentes serotipos de *Actinobacillus aemophilus* pleuropneumoniae aislados en México de cerdos con pleuroneumonía de 1985 a 1988. *Vet. Mex.* 20: 157-160 (1989).
21. Easterday, B.C.: Swine influenza. In: *Diseases of Swine*. Edited by: Dunne, H.W., Leman, A.D., 141-167. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1975.
22. Facion, N.A., Paz de, V.O., Morales, J., Batalla, C.D., Alvarado, A., Sierra, N., Tortora, P.J., Mendoza, A.S., Hernandez, B.E., Camacho, M.J. y Ciprián, C.A.: Sinergia entre el virus de la pseudorrabia (*Pseudorabies virus*) y *Haemophilus pleuropneumoniae* en la pleuroneumonía contagiosa. Memorias de la Reunion Anual de Investigacion Pecuaria en México en 1987. México, D.F. 1987. 83-84. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1987).

# XXX AMVEC

23. Gois, M.; Kuks, F. and Sisak. Microbiological findings in the lungs of slaughter pigs. Proceeding. Int. Pig Vet. Soc. Coneress, 1980. Denmark, p.124 (1980)
24. Houghton, S.B. and Gourlay: Synergism between Mycoplasma bovis and Pasteurella haemolytica in calf pneumoma. Vet. Rec. 113: 41-42.(1983)
25. Iglesias, G.: Estudios sobre los métodos de transmisión del virus de la enfermedad de Aujeszky. Medicina Veterinaria. : 81-84 (1987).
26. Kaska, L.; Hodges, R.T. Betts, A.O. and Trexler, P.C. (1969) pneumonia in gnotobiotic pigs produced by simultaneous inoculation of a swine Adenovirus and Mycoplasma hvopneumoniae; Vet. Rec. 84: 262-267.(1969)
27. Kojnok, J.: The role of carrier sows in the spreading of Aujeszky's disease to suckling pigs, data on Aujeszky's virus carriership among fattening pigs. Acta vet. Acad. Sci. hung. 15: 281-295 (1965).
28. Livingston, C.W., Stair, E.L., Underdahl, N.R. and Mebus, C.A.: Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. Am. J. vet. Res. 33: 2249-2258 (1972).
29. Lugo, R.C., Torres, A.O., Mendoza, E.S., Tortora, P.J. y Ciprian, C.A.: Presencia de Actinobacillus pleuropneumoniae Biovariedad 2 de casos de PCP aguda. Memorias del XXV Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos, Morelia, Michoacan. 1989. 353-355. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en Cerdos. Morelia, Michoacan, Mexico (1989).
30. Morrison, R.B.; Pijoan, C.; Hillel, H.D. and Rapp, V. Microorganisms associated with pneumonia in slaughter weight swine; Can.J. Comp. Med. 49: 129-137. (1985)
31. Pijoan, A.C., Ochoa, U.G. y Trigo, T.F.: Aislamiento e identificación de bacterias de pulmones neumónicos de cerdo. Tec. Pec. Mex. 29: 46-49 (1975).
32. Pijoan, C. and Ochoa, G.: Interaction between a hog cholera vaccine strain and Pasteurella multocida in the production of porcine pneumonia. J. comp. Path. 88: 167-170 (1978).
33. Pijoan, A.C.: Neumonía del cerdo. En: Encuentro Sobre Enfermedades Infecciosas del Cerdo. Editado por: Correa, G.P. Morilla. A.G. . 85-99. Asociación Mexicana de Veterinarios Especialistas en cerdos., Mexico, D.F., 1985.
34. Pijoan, A.C. y Trigo, T.F.: Pasteurella. En: Enfermedades de los Cerdos. Editado por: Ramirez, R.N. Pijoan, A.C., 270-274. Diana. Mexico. D.F., 1987.
- 19/0 (~
35. Platt, K.B., Mare, C.J. and Hinz, P.N.: Differentiation of vaccine strains and field isolates of pseudorabies virus: thermal sensitivity and rabbit virulence markers. Archs. Virol. 60: 12-23 (1979)
36. Platt, K.B., Mare, C.J. and Hinz, P.N.: Differentiation of vaccine strains isolates of pseudorabies (Aujeszky disease) virus: Trypsin sensitivity and mouse virulence markers. Archs. Virol. 63: 107-114 (1980).
37. Platt, K.B.: Genetic stability of the thermal, trypsin, rabbit and mouse markers of Aujeszky disease (Pseudorabies) virus in the pig. Vet. Microbiol. 6: 225-232 (1981).
38. Pohl, S., Bertschinger, H.U., Frederiksen, W. and Mannheim, W.: Transfer of Haemophilus pleuropneumoniae and the Pasteurella haemolytica-organism causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus Actinobacillus (Actinobacillus pleuropneumoniae comb. nov.) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness. Int. J. Syst. Bact. 33: 510-514 (1983).
39. Shope, R.E.: Swine Influenza. III. Filtration experiments and etiology. J. exp. Med. 54: 373-385 (1931).
40. Smith, I.M., Betts, A.O., Watt, R.G. and Hayward, H.H.S.: Experimental infections with Pasteurella septica (sero-group A) and an adeno or enterovirus in gnotobiotic piglets. J. comp. Path. 83: 1-12 (1973).
41. Tenorio, G.V., Falcon, N.A., Ciprian, C.A. y Camacho, M.J.: Patogenicidad de Haemophilus pleuropneumoniae en animales de laboratorio. Memorias de la Reunion Anual de Investigacion Pecuaria en Mexico. Mexico, D.F. 1987. 9. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos - Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico, D.F. (1987).
42. Per-t, M.B. and Kluge, J.P.: Pseudorabies virus (Aujeszky's disease). In: Virus infections of porcines. Edited by: Pensaert, M.B., 39-64. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo, 1989.
43. Yagihashi, T., Nunovya, T. and Tajima, M.: Effect of Mycoplasma hvopneumoniae infection on the development of Haemophilus pleuropneumoniae pneumonia in Pigs. Jpn.J. Vet. 46: (5): 705-713 (1984).

**CUADRO 1. FACTORES ETIOLOGICOS EN LAS NEUMONIAS DEL CERDO**

FACTORES AMBIENTALES	FACTORES INFECCIOSOS		AFECCION
<b>HUMEDAD</b>	PRIMARIOS VIRUS	SECUNDARIOS BACTERIAS	
<b>STRESS</b>	Fiebre Porcina Clásica	P.multocida	NEUMONIA CRONICA
<b>SOBREPOBLACION</b>	Enfermedad de Aujeszky	P.multocida	NEUMONIA CRONICA
<b>GASES</b>	Enfermedad de Aujeszky	Actinobacillus pleuropneumoniae	BROTOS DE PCP
<b>TEMPERATURA</b>	Paramixovirus	P.multocida	¿¿ ??
<b>HUMEDAD</b>	MYCOPLASMAS		
<b>NUTRICION</b>	M. hyopneumoniae		MPS
	M. hyopneumoniae	P. multocida	CRP
	M. hyopneumoniae	Actinobacillus pleuropneumoniae	PCP GRAVE
	ACTINOBACILLUS		
	Actinobacillus pleuropneumoniae		PCP

PCP : Pleuropneumonia contagiosa porcina MPS : Neumonía micoplasmica porcina  
CRP : Complejo respiratorio porcino.

**CUADRO 2.**

SEROTIPOS	CITOLICINAS	COMBINACIONES	ABSORBANCIA
1	I	-	0.556
3	III	-	0.000
5	II	-	0.111
7	II	-	0.629
	I-II	1 y 7	0.000
	II-I	7 y 1	0.000
	I-III	1 y 3	0.050
	III-I	3 y 1	0.048
	I-II	1 y 5	0.000
	II-I	5 y 1	0.000
	II-III	5 y 3	0.088
	III-II	3 y 7	0.612
	II-III	7 y 3	0.588
	II-II	5 y 7	0.000
	II-II	7 y 5	0.000
	I-II-II	1,5 y 7	0.000
	II-II-I	7,5 y 1	0.000