

# EVIDENCIA POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO DEL DAÑO AL EPITELIO MUCOCILIAR PRODUCIDO POR LA INTERACCION ENTRE *Mycoplasma hyopneumoniae* Y *Pasteurella multocida* EN PULMON DE CERDO<sup>a</sup>

Nora González Rosales<sup>b</sup>

Tonatiuh Cruz Sánchez<sup>b</sup>

Susana Mendoza Elvira<sup>b</sup>

Eliseo Hernández Baumgarten<sup>b</sup>

Germán Colmenares Villadomat<sup>c</sup>

Andrés Romero Rojas<sup>b</sup>

Jorge Tórtora Pérez<sup>b</sup>

Abel Ciprián Carrasco<sup>b</sup>

## RESUMEN

González RN, Cruz ST, Mendoza ES, Hernández BE, Colmenares VG, Romero RA, *et al.* *Téc Pecu Méx.* 1999;37(3)31-42. Las interacciones entre microorganismos son un fenómeno importante para el entendimiento de su patogenicidad. En este trabajo se decidió explorar los posibles mecanismos de patogenicidad del *Mycoplasma hyopneumoniae* que permiten la invasividad de la *Pasteurella multocida*, utilizando técnicas de microscopía electrónica de barrido. Se formaron cuatro grupos de cerdos libres de neumonía enzoótica, los cuales recibieron diferentes preparaciones de estos microorganismos. El grupo A se inoculó sólo con medio de cultivo libre de *M. hyopneumoniae* y no presentó lesiones macroscópicas, ni microscópicas. El grupo B inoculado con *M. hyopneumoniae* al inicio del experimento, presentó lesiones macroscópicas características de la neumonía enzoótica; microscópicamente se observaron cambios en los epitelios, abundantes bacterias, fibrina y células fagocíticas. El grupo C se inoculó con *P. multocida* el día 23 y no presentó lesiones macroscópicas ni microscópicas. El grupo D inoculado al inicio con *M. hyopneumoniae* y el día 23 con *P. multocida*, también desarrolló lesiones de neumonía enzoótica; a nivel microscópico se observaron las mismas características que en el grupo B con cilios apelmazados y abundantes bacterias. La acción del *M. hyopneumoniae* causa la falta de actividad ciliar y permite la instalación de la *P. multocida* y otras bacterias oportunistas.

**PALABRAS CLAVE:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, Neumonías, Microscopía electrónica.

Las enfermedades respiratorias del cerdo, hoy en día están consideradas como uno de los problemas de salud animal más

importantes en la producción porcina (1). En neumonía enzoótica (NE), *Mycoplasma hyopneumoniae* es considerado como el agente bacteriano primario más importante (2,3), seguido de *Actinobacillus pleuropneumoniae* que causa pleuroneumonía contagiosa porcina (4,5). El agente secundario que con mayor frecuencia se aísla es *Pasteurella multocida* una vez que las defensas de pulmón han sido alteradas, agravándose el problema en una pasteurelisis pulmonar (PP) (6). La

a Recibido el 6 de marzo de 2000 y aceptado para su publicación el 8 de mayo de 2000.

b Coordinación General de Estudios de Posgrado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, A.P. 222, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México. C.P. 54700. Tel y Fax 623-20-58. Correo electrónico: abelciprian@correoweb.com

c CENID-Microbiología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias.

interacción entre *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* después de una infección secuencial ya ha sido demostrada (7,8,9). Existe mucha información sobre las lesiones patológicas de NE, y los estudios se encaminan a identificar los mecanismos de patogenicidad de *M. hyopneumoniae* cuando se analizan por microscopía óptica y electrónica de barrido y de transmisión, complementando estos estudios con autoradiografía, a partir de pulmones con NE (10,11,12). El propósito del presente trabajo fue visualizar por microscopía electrónica de barrido, la interacción de *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* en cerdos infectados en forma secuencial con estos dos agentes.

De una granja convencional libre de neumonía enzoótica, se adquirieron 19 cerdos de cinco semanas de edad recién destetados, procedentes de tres camadas, de hembras de quinto parto. Tres se utilizaron para desafiarlos con *Mycoplasma hyopneumoniae* y tener inóculos en homogeneizados pulmonares; y con los demás se formaron cuatro grupos experimentales de cuatro cerdos cada uno, los cuales se distribuyeron por parejas en áreas separadas, con comederos y bebederos independientes (con un peso promedio de 15.9 kg y peso total 61.6 kg). Antes de iniciar el experimento, los animales se mantuvieron durante una semana en los nuevos corrales, para permitir la aclimatación y adaptación, tanto de las instalaciones, como al alimento. Los lechones fueron alimentados con raciones comerciales peletizadas, libre de antibióticos.

La cepa de *Mycoplasma hyopneumoniae* 194 en homogeneizado pulmonar, fue

donada por el Dr. Richard Ross, del Veterinary Medical Research Institute, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, y la cepa de *Pasteurella multocida* tipo A, procedente de un caso clínico, fue donada por el Dr. Carlos Pijoan.

Los grupos experimentales quedaron como sigue: Grupo A, testigo no infectado, sólo inoculado con medio de Friis (peso promedio: 15.5 kg; peso total 62.2 kg); Grupo B, inoculado con *Mycoplasma hyopneumoniae* el primer día de experimentación (peso promedio: 16.7 kg; peso total: 67.0 kg). Grupo C, inoculado el día 23 con *Pasteurella multocida* (peso promedio: 15.9 kg; peso total 63.6 kg) y Grupo D, inoculado el primer día con *Mycoplasma hyopneumoniae* y el día 23 con *Pasteurella multocida*. A los lechones de todos los grupos se les proporcionó alimento comercial sin antibióticos, dosificado según el peso del animal: cuando los cerdos pesaron entre 11 y 16 kg se suministró 1 kg /día, cuando los animales pesaron entre 16 y 28 kg, 1.5 kg/día y entre 28 y 38 kg de peso, se les suministró 2 kg/día).

Se inocularon tres lechones libres de gérmenes con la suspensión de *Mycoplasma hyopneumoniae* cepa 194 (con un título de  $10^4$  Unidades Cambiantes de Color, UCC/ml), utilizándose 20 ml por animal, administrados por vía endotraqueal con una sonda, para lo cual los cerdos fueron previamente sedados con clorhidrato de metomidato (1.5mg/kg vía intravenosa). Los lechones fueron observados diariamente y se sacrificaron por choque eléctrico, después de la sedación/anestesia y exsanguinación cuando presentaron los

signos clínicos de neumonía (día 19 posinoculación). Los lóbulos pulmonares con las áreas neumónicas, se obtuvieron asépticamente y con ellos se preparó un homogeneizado al 10% (peso/volumen) en medio de Friis, con morteros TenBroeck, (2). El homogeneizado se distribuyó en alícuotas de 2 ml, se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se sometió a un panel de pruebas de control de calidad para determinar la ausencia de otras especies de *Mycoplasma*, así como de *Pasteurella multocida*, *Bordetella sp.*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus sp.* porcino y virus respiratorios, para asegurarse tanto de la pureza del material, como de la identidad del microorganismo causante de las lesiones. Para titular el homogeneizado se utilizaron muestras de 0.5 ml, que se diluyeron seriadamente en medio de Friis y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de aire y  $\text{CO}_2$  al 10 % durante cinco a siete días; a las colonias sospechosas se les realizaron pruebas de identificación bioquímica y serológica. Se tomó una alícuota para determinar la concentración de los organismos viables en UCC. El homogeneizado diluido conteniendo  $10^4$  UCC/ml se usó para inocular a los animales de los grupos B y D, usando el mismo procedimiento descrito. El día de la inoculación se designó como el primer día del experimento.

La cepa A de *Pasteurella multocida* fue cultivada en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI: DIFCO, Laboratories, Detroit, Michigan, US) por ocho horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ ; la suspensión bacteriana se ajustó a una densidad óptica de 0.70, a 660 nanómetros en un espectrofotómetro Spectronic 20, equivalente a  $1 \times 10^8$  unidades formadoras

de colonias (UFC) por ml. Cada grupo de cerdos de los grupos C y D fue inoculado con 22 ml de la suspensión bacteriana ( $10^8$  células/ml) empleando una cámara de aerosolización modificada para cerdos conteniendo tres nebulizadores médicos (De Vilbiss, Somerset, Pennsylvania) (13,14) ajustados para aplicar el inóculo en 30 minutos. La inoculación con *Pasteurella multocida* fue realizada el día 23, cuatro días después de haberse iniciado la hipertermia producida por la infección con *M. hyopneumoniae*, en los cerdos de donde se obtuvo el homogeneizado para la inoculación de los grupos B y D.

Para la evaluación de las lesiones macroscópicas, se midió la extensión de las lesiones neumónicas mediante planimetría de los diagramas pulmonares normalizados, de vista dorsal y ventral. Se calculó el promedio del área dañada por ambas vistas, y se calculó el porcentaje del área ocupada por las lesiones neumónicas, tomando como base el porcentaje del área total del pulmón, realizándose el análisis estadístico por la prueba de "t" de Student. También se registró el aspecto de las lesiones neumónicas, así como la presencia de adherencias en ellas.

Para la evaluación de las lesiones microscópicas, los fragmentos representativos de los pulmones afectados (lóbulos craneal y cardiaco derechos) se fijaron en formalina amortiguada al 10%, se incluyeron en parafina para la obtención de cortes de 6 mm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las lesiones microscópicas se evaluaron de acuerdo al método de Morrison *et al* (6) modificado;

este método de evaluación subjetiva consistió en la infiltración linfocitaria e infiltración de polimorfonucleares (PMN) en la luz bronquial, y dependiendo de su relativa abundancia en cada sección, se calificaron de 1 a 4 puntos.

Para la microscopía electrónica, se colectaron muestras de un centímetro cúbico, de las zonas neumónicas previamente expandidas y fijadas por perfusión alveolar con glutaraldehído al 3%. Las muestras se rebanaron en secciones de 3 mm y se continuaron fijando en la misma solución durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron en PBS y se deshidrataron en etanol a 15, 30, 50, 70, 95, y 100% durante 15 minutos, con tres cambios de alcohol absoluto, se infiltraron gradualmente con acetato de amilo y se mantuvieron en acetato de amilo puro durante 30 minutos y con tres cambios; finalmente se deshidrataron a punto crítico con CO<sub>2</sub> y por último se recubrieron con una capa de oro de un espesor de 100 amstrons con un evaporador de iones (Fine Coat, ion sputter modelo Samdri-780 A, marca Tousimis Res. Corp.). Las observaciones fueron hechas con un microscopio electrónico de barrido, modelo JSM-25 SII, marca Jeol; se tomaron fotografías directamente de la pantalla del microscopio empleando diferentes tipos de película (15).

Los inóculos preparados resultaron contener un solo tipo de microorganismo; hasta donde pudimos determinar, el homogeneizado pulmonar sólo parecía contener *Mycoplasma hyopneumoniae*, y la suspensión bacteriana sólo contenía *Pasteurella multocida*.

Estudios previos, han demostrado la participación sinérgica entre *M. hyopneumoniae* y *P. multocida* en las neumonías del cerdo (7,8), sin embargo, pocos trabajos describen cuáles son los mecanismos de patogenicidad y de cómo ocurre la interacción en el pulmón (16,17). En este trabajo se encontraron evidencias importantes de cómo ocurre el fenómeno de interacción, que complementan los estudios anteriores.

Los cerdos del grupo A testigo y los del grupo C inoculados solamente con *P. multocida*, no tuvieron lesiones pulmonares, excepto un animal del grupo testigo, en el que se encontró una pequeña área neumónica que abarcó el 3% de la superficie pulmonar, del cual se aisló *M. hyorhinis* (Figura 1) y aunque la participación de este micoplasma en las neumonías es polémico, existen cepas que en cerdos gnotobióticos producen neumonías (18) y se le atribuye la causa de poliserositis y artritis en lechones (3) y en forma esporádica se ha aislado de lavados bronquiales de pulmones con y sin lesiones (19). Se encontraron lesiones en los pulmones de todos los animales del grupo B inoculado sólo con *Mycoplasma hyoneumoniae*; las áreas consolidadas eran gris rojizas con adherencias, y menos extensas que las del grupo inoculado con ambos agentes, abarcando del 4 al 17% de superficie pulmonar. Todos los animales del grupo D, inoculado primero con *M. hyopneumoniae* y 23 días después con *P. multocida*, presentaron áreas de consolidación que eran rojizas y gris rojizas, con adherencias en un solo caso. En este grupo de animales inoculados con ambos agentes, las áreas de consolidación

variaron del 22 al 26% y se clasificaron como severas (7,8,9). Los porcentajes de lesiones observados entre tratamientos fueron, significativos ( $P < 0.05$ ).

Con el estudio de microscopía óptica, en los cortes histológicos de los pulmones del grupo A no se observaron cambios patológicos, excepto en la lesión de la que se aisló el *M. hyorhinitis*. En ésta se encontraron abundantes leucocitos polimorfonucleares (PMN) en los alvéolos y en la luz bronquial, proliferación de macrófagos alveolares y reacción linfocitaria perivascular con depósitos de fibrina; en el pulmón de este grupo testigo las lesiones fueron proliferativas como las causadas por agentes infecciosos primarios (1,16). La inoculación con *P. multocida* al grupo C no provocó lesiones microscópicas; Lara *et al* (14) han determinado que los cerdos sanos convencionales remueven fácilmente *P. multocida* cuando se utiliza un sistema de inoculación por medio de aerosoles.

Los cortes de las áreas consolidadas en los cerdos del grupo B presentaron zonas colapsadas con congestión, engrosamiento de septos alveolares, proliferación linfocitaria peribronquial, dos o tres linfocitos por septo y un ligero incremento de los macrófagos alveolares; en este grupo *M. hyopneumoniae* produjo lesiones proliferativas.

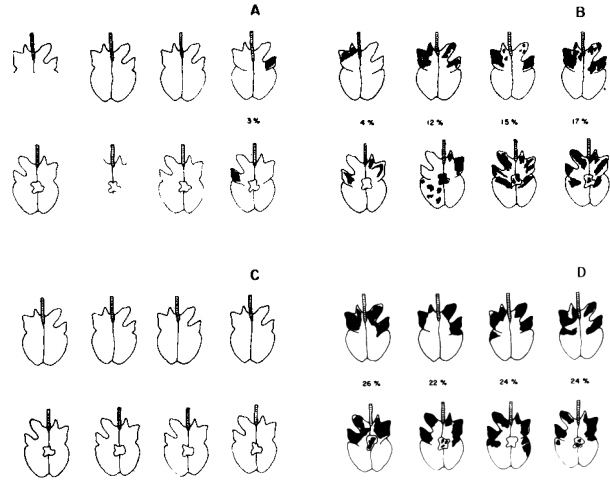


Figura 1. Extensión de las lesiones pulmonares con diferentes inóculos. Grupo A con medio de Friis; grupo B con *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mh); grupo C con *Pasteurella multocida* (Pm); grupo D con Mh y Pm.

Los cortes de las áreas consolidadas del grupo D presentaron engrosamiento de septos, abundantes PMN en los alvéolos y luz bronquial, congestión y hemorragia alveolar e intersticial, gran proliferación de macrófagos alveolares, reacción linfocitaria perivascular y depósitos de fibrina. Sin embargo, las lesiones microscópicas de los cerdos de este grupo inoculados secuencialmente con ambos agentes infecciosos fueron de tipo exudativo, como las comúnmente producidas en las infecciones secundarias (7,8,9). Se ha demostrado que la infección previa por *M. hyopneumoniae* favorece la colonización y el daño pulmonar por *P. multocida*, que no es patógeno *per se*. La evaluación subjetiva basada en la acumulación de puntos dependiendo del grado de lesión, se resume en el Cuadro 1.

El grupo de cerdos inoculados primero con *M. hyopneumoniae* y después con

**Cuadro 1. Descripción de las lesiones microscópicas encontradas por el estudio histopatológico\* en los pulmones de los diferentes grupos de cerdos inoculados.**

Grupos experimentales No. Cerdo	Infiltración linfocitaria (1 a 4)**	Infiltración de PMN en la luz bronquial (1 a 4)**	Total de puntos acumulados
----- Grupo A -----			
	0	0	
2	0	0	
3	2	0	
4+	3	4	9
----- Grupo B -----			
5	3	1	
6	3	1	
7	3	2	
8	2	2	17
----- Grupo C -----			
9	2	0	
10	2	0	
11	0	0	
12	0	0	4
----- Grupo D -----			
13	3	4	
14	3	3	
15	3	3	
16	3	3	25

\* De acuerdo a Morrison *et al.* (6)

\*\* Rango de posibles puntos por acumular dependiendo del grado de lesión.

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

PMN = Polimorfonucleares

*P. multocida* mostraban esencialmente los mismos cambios que se encontraron en el grupo B, con la adición de que los epitelios ciliados mostraron zonas carentes de cilios y micoplasmas evidentes en ellos formando cilios apelmazados, así como de abundantes bacterias. Es de hacer notar que en las lesiones del tejido ciliado de los bronquiolos, se encontró evidencia morfológica tanto de micoplasma como de pasteurela en el mismo campo visual, que indudablemente cubre un área muy pequeña.

Con este modelo experimental, se analiza por interpretación de las imágenes de microscopía electrónica, los posibles mecanismos de patogenicidad de *M. hyopneumoniae* que permiten la invasividad de *P. multocida*. La técnica de preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido, sobre todo con la distensión de los espacios alveolares con la infusión del fijador, indicaban la posibilidad de que las bacterias y micoplasmas fueran desalojados de las lesiones, sin embargo

esto no sucedió así, ya que se encontraban abundantes bacterias en las lesiones estudiadas. Las áreas de consolidación pulmonar, así como los septos de las zonas afectadas confirman las observaciones de microscopía óptica, pero dado que la microscopía electrónica de barrido no permitió la observación de estructuras internas sino solamente de superficies, la complejidad de los materiales acumulados en los alvéolos, resultó poco informativa.

La microscopía electrónica de barrido reveló que los pulmones testigo y los que fueron inoculados únicamente con *P. multocida*, no mostraron cambios patológicos (Figuras 2 y 4); en los pulmones de estos grupos, se observó que el fondo alveolar expuesto en otras áreas, aparece limpio y libre de perforaciones, lo cual aunado a la ausencia de polvo y bacterias, confirman que se trata de un animal joven, en el cual estos elementos no han tenido mucha oportunidad de depositarse. Tampoco se hicieron evidentes bacterias ni macrófagos alveolares, confirmando que se trata de un pulmón sano. El epitelio bronquial fue normal, en donde numerosas células caliciformes mostraban su típica cubierta de papilas y cilios cortos, así como células epiteliales ciliadas con sus característicos

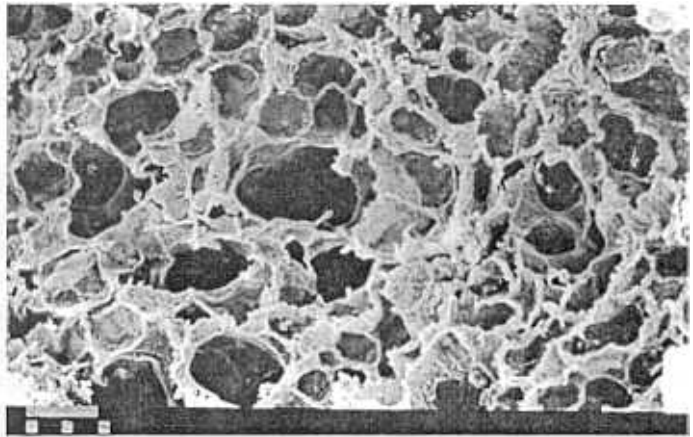


Figura 2. Pulmón normal (100x). Se aprecia el espesor de las tabiques intraalveolares así como el fondo de algunos alvéolos limpios y libres de perforaciones. La barra clara representa 50  $\mu\text{m}$  de longitud.

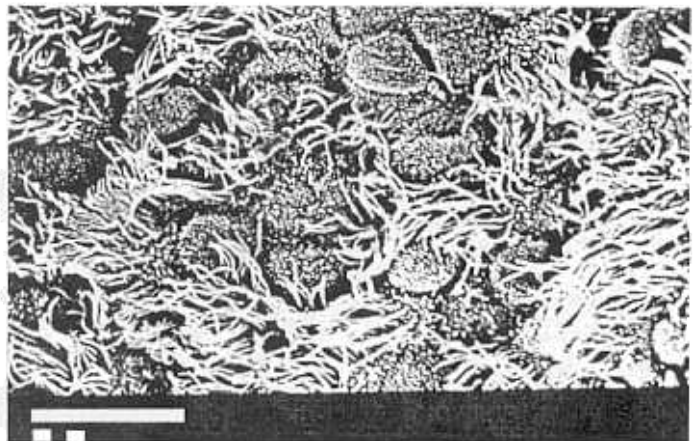


Figura 3. Epitelio bronquial normal (300x). Numerosas células caliciformes, células epiteliales; espacios intercelulares evidentes. Sin presencia de moco. La barra clara representa 10  $\mu\text{m}$  de longitud.

cilios largos (Figura 3); los espacios intercelulares son evidentes, no se sabe si por mostrar un inicio de proceso patológico o por un defecto de fijación.

La técnica de preparación de la muestra parece haber sido adecuada ya que si bien

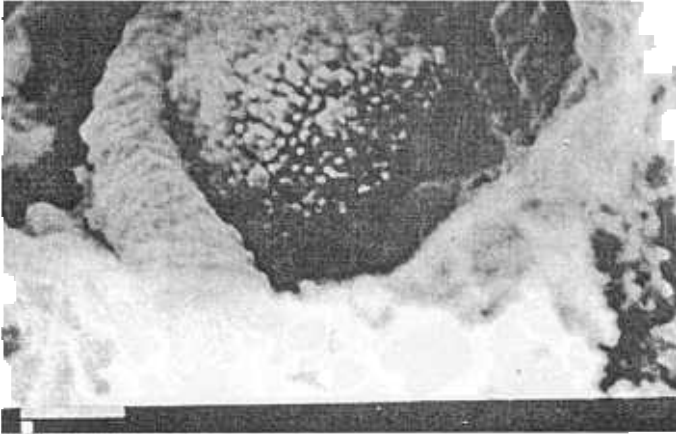


Figura 4. Célula calciforme a gran aumento (10,000x). Se aprecia un gran número de microvellocidades y cilios cortos. La barra clara representa 1  $\mu$ m de longitud.

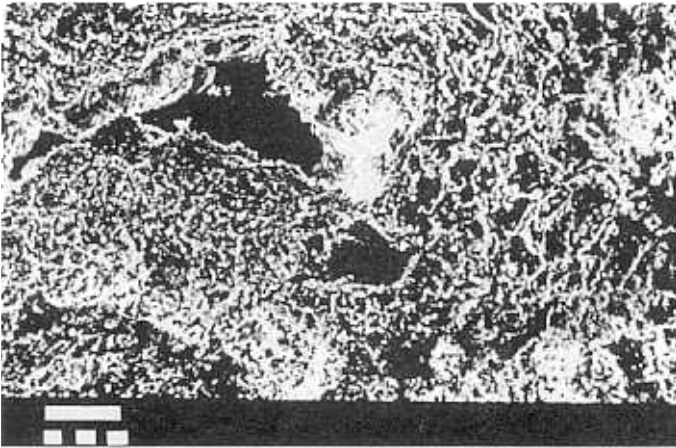


Figura 5. Area pulmonar afectada (100x). Los alvéolos se han borrado por exudados, células y bacterias. La consolidación pulmonar observada no permite distinguir si hay bronquiolos pulmonares. La barra clara representa 50  $\mu$ m de longitud.

glándulas unicelulares encargadas de producir el moco que normalmente cubre a estos epitelios. Todo esto a su vez parece indicar que el epitelio estaba funcionando normalmente como parte del escalador traqueobronquial, ya determinado por Lara *et al* (14) en los cerdos sanos convencionales que removieron fácilmente *P. multocida* aerosolizada. Blanchard *et al* (10) observaron en las tráqueas de lechones no infectados, la membrana celular, los cilios, las microvellocidades y algunas gotas de moco durante las fases iniciales de la enfermedad, el proceso de eliminación de cilios en el epitelio del tracto respiratorio fue notorio.

Los pulmones de los cerdos inoculados con *M. hyopneumoniae* tuvieron consolidación pulmonar evidente a menores aumentos (Figura 5); a mayores aumentos (Figuras 6 y 7) se observaron cambios en los epitelios ciliados, abundantes bacterias, fibrina y células fagocitarias alveolares en gran cantidad; en

se removió el moco que normalmente cubre a estos epitelios, los cilios muestran partículas de polvo todavía adheridos cerca de la punta. En la célula calciforme a gran aumento (10,000x), se aprecia un gran número de microvellocidades y cilios cortos (Figura 4); estas células son

estos pulmones el área pulmonar afectada (Figura 5) mostraba alvéolos semejantes a los de la Figura 2, pero ahora los alvéolos fueron borrados por los exudados, células y bacterias, mientras que la consolidación pulmonar observada no permitió distinguir los bronquiolos pulmonares. Los cilios del



epitelio respiratorio (Figura 6) estaban adheridos unos a otros formando mechones o macollos característicos de una afección por micoplasma. Generalmente la patogenicidad de los micoplasmas es por la habilidad de adherirse a la célula huésped, más aún cuando ya se ha mencionado que existe una asociación estrecha entre la cito-adsorción y cito-patogenicidad en el caso de las diferentes especies de micoplasmas (20,21). Ya se había encontrado en condiciones *in vitro* que *M. hyopneumoniae* interfiere con las ondulaciones normales del cilio (20), y que también ocurría la eliminación de los cilios después de la infección con *M. hyopneumoniae* (11,12). Así mismo, se observó que cuando el *M. hyopneumoniae* se multiplica en la tráquea y en los bronquios, el evento primario de la infección fue la adhesión de los micoplasmas a las células ciliadas, lo que desencadenó un efecto citopático y una exfoliación de las células epiteliales (21). En este estudio, el epitelio de los animales del grupo D estaba entrando en degeneración, debido a la interacción de *M. hyopneumoniae* y *P. multocida*, y por lo tanto el escalador traqueo bronquial como forma de eliminación de contaminación del pulmón había dejado de funcionar. Se apreció en la superficie de



Figura 6. Cilios amacollados (7,000x). Adheridos unos a otros formando mechones o macollos característicos; se observan cocoides pleomórficos característicos de micoplasmas. La barra clara representa 30 µm de longitud.

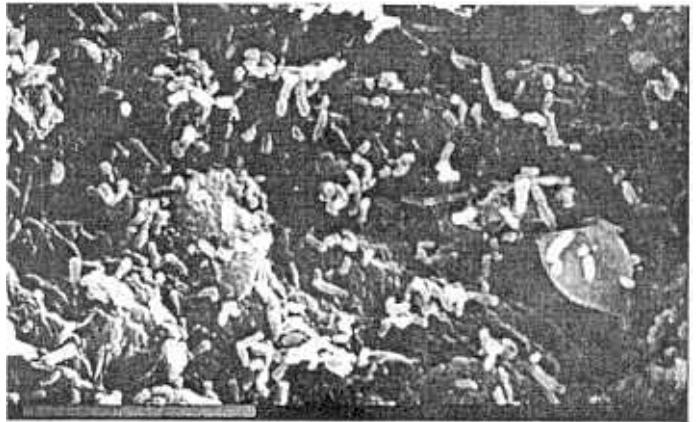


Figura 7. Epitelio respiratorio cubierto de bacterias (4,500x). Epitelio ciliado casi nulo, aumento de distancia entre células; abundantes bacterias. La barra clara representa 20 µm de longitud.

los cilios tanto bacilos como cocos, lo que parecería corresponder a pasteurelas y micoplasmas, respectivamente (Figura 7). Sin embargo la identificación fue puramente morfológica. Así mismo, el epitelio respiratorio estaba cubierto de bacterias, el grado de afección lo había

privado de los cilios que normalmente se encontraban en este tejido. La distancia entre las células aumentó considerablemente, indicando que las células epiteliales además de haber perdido todos sus cilios, se encontraban desprendiéndose del tejido subyacente en un aparente inicio de apoptosis. Toda el área se encuentra generosamente salpicada de bacterias en forma de bastoncitos de diferente longitud, pero del mismo grueso, tratándose aparentemente de *Pasteurella multocida*.

Este estudio no permite responder a la pregunta de si el o los factores de virulencia del micoplasma actúan solamente en forma local, o si se difunden a otros tejidos para ejercer su acción patógena. Si bien este estudio no excluye la posible existencia de toxinas difusibles de acción a distancia, resulta claro que las áreas desprovistas de cilios que provocan las toxinas del micoplasma, son rápidamente aprovechadas como sitios de colonización por la pasteurrela inoculada posteriormente. La acción conjunta de estos dos microorganismos no sólo causa la transvasación de plasma en los alvéolos, en donde la falta de actividad ciliar permite la permanencia del patógeno primario, sino además la de los oportunistas y el ejercicio de sus respectivas actividades patógenas, de tal manera que las zonas de consolidación pulmonar no sólo permiten la multiplicación microbiana, sino además crean una barrera a la penetración de medicamentos capaces de eliminarlos. Los epitelios ciliados por otra parte, no sólo muestran la pérdida de la motilidad por la formación de mechones, sino además la pérdida de los cilios y de las células de recubrimiento en la mucosa respiratoria.

Esta solución de continuidad crea un sitio ideal para la invasión de oportunistas terciarios presentes en el aire, y representa un reto importante a la capacidad de defensa del animal.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Rodolfo Robles por su asistencia técnica, fotográfica y de microscopía electrónica así como a la MC Sofía González G. por su asistencia técnica en la toma y preparación de muestras para microscopía electrónica. Proyecto parcialmente financiado por la cátedra de Enfermedades Bacterianas y Virales del Cerdo, de la FES-Cuautitlán, UNAM.

## SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC EVIDENCE OF DAMAGE TO THE MUCOCILIAR EPITHELIUM OF PIG LUNGS PRODUCED BY THE INTERACTION OF *Mycoplasma hyopneumoniae* AND *Pasteurella multocida*

## ABSTRACT

González RN, Cruz ST, Mendoza ES, Hernández BE, Colmenares VG, Romero *et al.* *Téc Pecu Méx.* 1999;37(3)31-42. An understanding of the pathogenicity of interactions between microorganisms is very important. In this work scanning microscopy was used to explore the possible role of *Mycoplasma hyopneumoniae* in facilitating invasion by *Pasteurella multocida*. Four groups each of 4 pigs (about 16 kg live weight) and free of enzootic pneumonia each received different preparations of these microorganisms. Group A

was inoculated with bacteria free culture media and this group did not show any lesions. Group B was inoculated with *M. hyopneumoniae* at the beginning of the experiment, and formed macroscopic lesions characteristic of enzootic pneumonia. Changes in epithelium, abundant bacteria, fibrin and phagocytic cells were observed microscopically. Pigs from group C were inoculated with *P. multocida* on day 23 and did not develop either macroscopic or microscopic lesions. Group D was inoculated with *M. hyopneumoniae* at the beginning of the experiment and on day 23 with *P. multocida*; these animals developed enzootic pneumonia with flat cilia and abundant bacteria. *M. hyopneumoniae* activity led to the lack of ciliary activity and allowed the establishment of *P. multocida* and other opportunistic bacteria.

**KEY WORDS:** *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, Pneumonia, Scanning electron microscopy.

## LITERATURA CITADA

- Loeffen WLA, Kamp EM, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Survey of infectious agents involved in acute respiratory disease in finishing pigs. *Vet Rec* 1999;(145):123-126.
- Piffer IA, Ross RF. Effect of age on suseptibility of pigs to *Mycoplasma hyopneumoniae* pneumonia. *Am J Vet Res* 1984;(45):478-481.
- Ross RF. Mycoplasmal diseases. Straw B, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ editors. In: *Diseases of swine*. 8<sup>th</sup> ed. Ames, Iowa, US: Iowa State University Press; 1999:495-509.
- Sebunya TNK, Saunders JR. *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in swine: a review. *JAVMA* 1983;(182):1331-1336.
- Ciprián A, Medina G, Fuentes M, et al. Serotificación de *Haemophilus pleuropneumoniae* aislados de cerdos en México. *Vet Mex* 1988;(19):205-210.
- Morrison RB, Pijoan C, Hillel HD, Rapp V. Microorganism associated with pneumonia in slaughter weight swine. *Can J Comp Med* 1985;(49):129-137.
- Smith IM, Hodges RT, Betts AO, Hayward AHS. Experimental infections of gnotobiotic piglets with *Pasteurella septica* (sero-group A) alone or with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *J Comp Path* 1973;(83):307-321.
- Ciprián A, Pijoan C, Cruz T, et al. *Mycoplasma hyopneumoniae* increases the suseptibility of pigs to experimental *Pasteurella multocida* pneumonia. *Can J Vet Res* 1988;(52):434-458.
- Amass SF, Clark LK, Uah Alstine WG, Boversock TL, Murphy DA, Knox KE, Albrechts SR. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. *J Am Vet Med Assoc* 1994;(204):102-107.
- Blanchard B, Vena MM, Cavallier A, Lelannie J, Gouranton J, Kobish M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Microbiol* 1992;(30):329-341.
- Tajima M, Yagihasi T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infect Immun* 1982;(37):1162-1169.
- Gabridge MG, Brigh MJ, Richards HN. Scanning electron microscopy of *Mycoplasma pneumoniae* on the membrane of individual ciliated tracheal cells. *In Vitro* 1982;(1):55-62.
- López A, Thompson RG, Savan M. The pulmonary clearance of *Pasteurella haemolytica* in calves infected with bovine parainflunza-3 virus. *Can J Comp Med* 1976;(40):385-391.
- Lara V, Caballero S, Alarcón F, Camacho J, Ciprián A. Remoción pulmonar de *Pasteurella multocida* en cerdos de engorda. Resúmenes de la XX reunión anual de AMVEC. Mérida Yucatán. 1985:144-147.
- Goldstein J, Newbury D, Eclin P, et al. Scanning electron microscopy and X ray microanalysis. A text for biologist, materials scientist and geologist. New York, US: Plenum Press; 1981.
- Fuentes MC, Pijoan C. Pneumonia in pigs induced by intranasal challenge exposure with pseudorabies virus and *Pasteurella multocida*. *Am J Vet Res* 1987;(48):1446-1448.
- Underdahl NR, Kennedy GA, Ramos AS Jr. Duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in gnotobiotic pigs. *Can Vet J* 1980;(21):258-262.
- Gois M, Kuksa E. Intranasal infection of gnotobiotic piglets with *Mycoplasma hyorhinis* differences in virulence of strain and influence of age on the development of infection. *Zentral Vet* 1974; (B)21:352-361.
- Hensel A, Ganter M, Kipper S, et al. Prevalence of aerobic bacteria in bronchoalveolar lavage

- fluids from healthy pigs. *Am J Vet Res* 1994;(55):1697-1701.
20. Williams PP, Gallager JE. Cytopathogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal ring and lung explant organ cultures alone and in combination with monolayer cultures of fetal lung fibroblasts. *Infect Immun* 1978;(20):495-502.
21. Mebus CA, Underdhal NR. Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Am J Vet Res* 1977;(38):1249-1254.