

XX REUNION NACIONAL AMVEO 85

TITULO ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DEL EFECTO DE UNA EXOTOXINA HAEMOPHILUS PLEUROPNEUMONIAE EN CONEJOS
AUTOR (es) Noguera M. de Regules J.; Tórtora J.; Ciprián A. y Camacho J.
INSTITUCION FACULIAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUHTLAN - UNAM
AREA SANIDAD ANIMAL (TESIS)

INTRODUCCION

Las cuantiosas pérdidas económicas ocasionadas por las infecciones respiratorias de *Haemophilus pleuropneumoniae* han llevado a realizar a muchos investigadores estudios tendientes a conocer la patogenia y las posibles formas de control de esta enfermedad. Desafortunadamente se conoce todavía poco acerca de ella, por lo que aún no ha sido posible elaborar toxoides, vacunas unas atenuadas o bacterinas capaces de prevenirla totalmente.

Las infecciones por *Haemophilus pleuropneumoniae* están ampliamente distribuidas y han sido reportadas en diferentes lugares del mundo. Esta enfermedad se presenta principalmente en cerdos de 10 a 12 semanas de edad, aunque cualquier edad es susceptible. Se puede presentar en forma aguda (extension fibrinohemorrágica) la cual presenta una alta mortalidad que puede llegar hasta un 100% en algunos casos, y en una forma crónica (localizada y necrozante) que afecta los parámetros productivos de los animales, incrementando el costo de producción. En cuanto a la patogenia, se sabe que el agente penetra por vía aérea y las evidencias sugieren que la enfermedad ocurre cuando el invasor escapa a los mecanismos de defensa del tracto respiratorio superior, permitiendo la multiplicación del microorganismo a nivel alveolar. Se ha sugerido que *Haemophilus pleuropneumoniae* es citotóxico para los macrófagos alveolares, lo cual podría contribuir al curso rápido y fulminante de la enfermedad. Los sobrenadantes del cultivo de la bacteria no solo son tóxicos para macrófagos, sino que también pueden inducir neumonía localizada la cual es similar microscópicamente a la causada por la bacteria viable.

Por lo anteriormente mencionado, se ha sugerido que la patogenia de *Haemophilus pleuropneumoniae*, está probablemente asociada a la producción de una exotoxina.

El objetivo del presente trabajo es el de evaluar histopatológicamente el efecto de una exotoxina de *Haemophilus pleuropneumoniae* parcialmente purificada en su capacidad de producir un cuadro de pleuroneumonía fibrinonecrótica en conejos.

MATERIAL Y METODOS:

- Purificación de la exotoxina de *Haemophilus pleuropneumoniae*.

El sobrenadante de una cultivo masivo de 6 hrs. de *Haemophilus pleuropneumoniae* fué concentrado en un sistema de ultrafiltración (MSH No. UHP-76) a 40°C hasta reducir su volumen original (5 lts.) a un final de 300 ml. Estos se liofilizaron y se resuspendieron en 60 ml. y se alicuotaron en frascos conteniendo 5 ml. cada uno, a esta fracción se le denominó liofilizado crudo. En cada paso se determinó la proteína por el método de Lowry.

Se empaco una columna de sephadex 6-50 de una longitud de 14.5 cm., y un diámetro aproximado de 1.2 cm. La columna se lavó varias veces con solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) y se determinó el volumen de exclusión con azul de dextrán. Las diferentes fracciones eluidas se les determinó proteínas por absorbencia a 250 nm en el espectrofotómetro. La pureza de las fracciones fué analizada por electroforesis en gel de poliácridamida-SDS y por electroenfoco analítico.

- Prueba de toxicidad

Se utilizaron conejos califonia con pesos aproximados entre 250 y 300 g. el liofilizado crudo y la toxina parcialmente purificada se resuspendieron en 5 ml. y se esterilizaron por filtración en filtros Millipore de .22µ. antes de ser administrados por vía intranasal. La distribución de los grupos experimentales y las

dosis administradas se muestran en las tablas 1 y 2.

Una vez sacrificados los animales se efectuó el estudio histopatológico y se tomaron muestras para aislamiento bacteriano.

RESULTADOS

En el presente trabajo fué posible purificar y caracterizar una exotoxina de *Haemophilus pleuropneumoniae*, la cual por electroforesis en Gel de poli(acrilamida)-SDS tuvo un peso molecular de 14,000 y por electroenfoque un pI de 4.2.

Electrofoque analítico:

El liofilizado crudo y la proteína purificada, provocaron en los animales inoculados, los siguientes signos clínicos: Debilidad general, notable disminución de crecimiento y peso corporal, congestión de vías respiratorias superiores, estornudos, estertoria, en algunos casos aparición de cinosis en nariz, orejas, boca y uñas. En lesiones macroscópicas observadas en los pulmones de los conejos tratados con el liofilizado crudo, se observó la presencia de abundantes focos hemorrágicos y zonas de consolidación.

Las lesiones macroscópicas observadas en los conejos tratados con la proteína purificada, resultaron ser de menor intensidad a las observadas en los animales tratados con el liofilizado crudo.

Los conejos que no fueron tratados con ninguna sustancia (lote No. 1) y los tratados con BHI más 5% de extracto de levadura (lote No. 2), no presentaron ninguna alteración macroscópica ni microscópica.

Los estudios histopatológicos de los pulmones de los animales tratados con el liofilizado crudo y con la proteína purificada, mostraron en forma constante y a diferencia de los controles, los siguientes cambios que se consideraron significativos:

- En todos los casos fué notorio el incremento de eosinófilos infiltrados en los septos alveolares y en acúmulos perivasculares bronquiales.
- Otro elemento constante, fué la presencia de grandes células de citoplasma acidófilo y núcleos grandes de cromatina clara. Estas células de aspecto "blastoides", se observaron engrosando los septos y en acúmulos que aparentemente ocupaban las luces alveolares. Por su aspecto, éstas células pueden corresponder a fibroblastos, considerando que en algunos casos aparecieron formando cordones o con citoplasma estrellado.
- La presencia de mononucleares en la luz vascular y alrededor de los vasos sanguíneos, se observó en diferentes casos, incluso con aparente discontinuidad de la pared vascular.
- En las zonas de pulmón con abundantes eosinófilos, no se presentaban o eran escasas las células de tipo fibroblasto antes mencionadas.
- Proliferación linfocítica perivascular y peribronquial con presencia de linfoblastos, en dos de los casos, tratados con el liofilizado crudo.

Los cambios señalados anteriormente fueron más notables en los animales tratados con el liofilizado crudo, que en los tratados con la proteína purificada.

En general, las zonas afectadas mostraron marcado colapso y engrosamiento de septos alveolares. Observándose en tres de las muestras la presencia de focos hemorrágicos.

Los aislamientos bacterianos realizados a partir de los pulmones lesionados, sólo detectaron la presencia de *Bacillus*, spp.

DISCUSION:

Los experimentos reportados por Rosendal y colaboradores en el año de 1980, en los cuales se demostró, que el sobrenadante de cultivo de *H. pleuropneumoniae* libre de bacterias, era capaz de producir neumonía, similar microscópicamente a la causada en cerdos infectados experimentalmente con la bacteria viable y los resultados de Bendixen y colaboradores en 1981, en los que se demostró también la toxicidad de los sobrenadantes de cultivo de la bacteria para macrófagos alveolares de pulmón de cerdo, sirvieron como evidencias para suponer que *H. pleuropneumoniae*, es capaz de excretar sustancias tóxicas (exotoxinas), responsables de los efectos observados por los investigadores antes mencionados.

La toxicidad de la exotoxina en su forma cruda y purificada, quedó demostrada con la prueba final de toxicidad. En esta prueba, se observaron mayores lesiones macroscópicas y microscópicas en los conejos inoculados con el liofilizado crudo, hecho que nos hace pensar que el método de purificación no se efectuó adecuadamente, o bien, que hubo una disminución de la actividad tóxica de dicha sustancia, al ser separada del extracto crudo.

La presencia de eosinófilos revelada en los estudios histopatológicos de los pulmones afectados, puede interpretarse como parte de un posible fenómeno alérgico, inducido por la toxina, o bien, por algún elemento contaminante.

Las células blastoides que han sido interpretadas como fibroblastos, pueden corresponder a las formas previas de las células modificadas que se observan en los pulmones neumónicos de cerdos afectados por *H. pleuropneumoniae*, o bien, ser la modificación correspondiente en conejos. Con menos probabilidad, debe considerarse la posibilidad de que se trate de macrófagos o células epiteliales, aunque esta posibilidad no debe descartarse totalmente. Estas observaciones, permiten suponer algún efecto del liofilizado crudo y purificado sobre las células, que indujo su transformación.

Las lesiones vasculares: trombosis, hemorragias que se presentan en los pulmones neumónicos de cerdos afectados por la bacteria, no fueron observados en los conejos tratados con la exotoxina (cruda y purificada), pero los cambios observados en algunos de los vasos sanguíneos de los conejos lesionados, podrían ser el preámbulo a estos cambios. Sin embargo, debe recordarse que la trombosis ha sido asociada a la endotoxina de la bacteria.

El infiltrado de mononucleares perivascular, observado en los conejos tratados con la exotoxina, es un elemento también presente en los cerdos afectados por *haemophilosis*.

Por lo anteriormente dicho, es evidente que las lesiones encontradas en estos conejos, no indican una neumonía fibrinonecrótica como la observada por Rosendal y colaboradores en 1981, esto puede deberse a que el modelo experimental fué diferente y el conejo puede estar dando una respuesta distinta a la del cerdo. Además, las lesiones descritas en los conejos, sugieren un efecto presumiblemente tóxico y de mayor especificidad que el observado por el investigador antes mencionado, quien utilizó el sobrenadante de cultivo completo, el cual probablemente contenían entre otras cosas, endotoxina, resultante de la lisis bacteriana.

El no haber observado polimorfonucleares en los pulmones afectados, sugiere que las lesiones observadas no pueden ser atribuidas a contaminantes bacterianos. Este hecho quedó reforzado por el resultado de los aislamientos bacterianos de los pulmones lesionados, en los cuales no se encontró ningún microorganismo que pudiera estar asociado a las lesiones encontradas.

TABLA 1. DISTRIBUCION DE LOS CONEJOS UTILIZADOS EN LA PRUEBA FINAL DE TOXICIDAD.

LOTE No.	CONEJU No.	PESO APROXIMADO	SUSTANCIA ADMINISTRADA	VIA DE ADMINISTRACION
1	1	250 g.	-	-
	2	300 g.	-	-
	3	350 g.	-	-
2	4	250 g.	BHI más 5% de extracto de levadura	Intranasal
	5	300 g.	BHI más 5% de extracto de levadura	Intranasal
	6	350 g.	BHI más 5% de extracto de levadura	Intranasal
3	7	250 g.	Liofilizado crudo	Intranasal
	8	300 g.	Liofilizado crudo	Intranasal
	9	350 g.	Liofilizado crudo	Intranasal
4	10	300 g.	Proteína purificada	Intranasal
	11	300 g.	Proteína purificada	Intranasal

TABLA 2. CALENDARIO DE INOCULACION Y DOSIS ADMINISTRADAS (ml/día), POR LOTE DE CONEJOS.

DIA	LOTE No.	1	2	3	4
1		-	1.0 ml.	1.0 ml.	1.0 ml.
2		-	1.0 ml.	1.0 ml.	1.0 ml.
3		-	1.0 ml.	1.0 ml.	1.0 ml.
4		-	1.0 ml.	1.0 ml.	1.0 ml.
5		-	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
6		-	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
7		-	0.5 ml.	0.5 ml.	0.5 ml.
8		-	-	-	-
21		*	*	*	*

(*) día de sacrificio de todos los animales