

PROGRAMA DE INVESTIGACION SOBRE ENFERMEDADES INFECCIOSAS RESPIRATORIAS AGUDAS (MODELO CUNICOLA)

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS DE INTERRELACION HOSPEDERO PATOGENO - MICROAMBIENTE DE VIAS AEREAS SUPERIORES EN ENFERMEDADES INFECCIOSAS RESPIRATORIAS AGUDAS

Por: Carlos Ireguí. Dpto. de Patología Veterinaria, U. Nal. de Colombia

INTRODUCCION

Una consecuencia inmediata en la intensificación de los métodos de producción pecuaria, ha sido la aglomeración de animales en espacios reducidos. Estos cambios se han sucedido en un período de tiempo relativamente corto, apenas unas décadas. Es deducible pensar que un sistema fisiológico cuya evolución se llevó a cabo durante miles de años en espacios abiertos, tenga que sufrir de alguna manera, el impacto que supone el súbito confinamiento de los animales en lugares limitados, la mayoría de las veces con desconocimiento de los requisitos físicos y síquicos mínimos necesarios a ellos.

Las patologías más frecuentemente asociadas con los procesos intensivos de producción son las de origen infeccioso de diverso tipo (bacteriano y viral, principalmente). Las condiciones de mantenimiento arriba anotadas permitirían la virulentación de microorganismos considerados habitantes normales del tracto respiratorio, así como eventualmente aumentarían la susceptibilidad de los hospederos a patógenos recién introducidos por cualquier medio a los galpones de producción.

Los problemas respiratorios de origen infeccioso tienen un impacto importante sobre la producción de varias especies animales de interés industrial. Trabajos recientes desarrollados en los Estados Unidos y Canadá consideran a las neumonías con las más importantes enfermedades limitantes de la producción, desde el punto de vista económico. La situación parece ser similar para otras especies animales en diferentes latitudes. Los estudios adelantados en Colombia, han establecido la presencia de múltiples agentes microbianos involucrados en procesos respiratorios y aún cuando no se ha evaluado de manera sistemática la dimensión real de su impacto económico, hay consenso general entre los profesionales y productores del sector pecuario que aquél es grande. De otra parte, se sabe que para la población humana, las neumonías constituyen, no solo en Colombia sino a nivel mundial, una causa frecuente de hospitalización y muerte. Las estrategias de control de las variadas infecciones respiratorias en los animales domésticos han seguido, en general, tres líneas de aproximación, a saber: Antibioterapia. Vacunación y manejo del medio ambiente de las instalaciones; todas presentan ventajas y desventajas relativas, como se mostrará más adelante. El objetivo del programa es buscar con herramientas multidisciplinarias, respuestas a preguntas que tradicionalmente se han enfocado por vías aisladas e inconexas.

1. OBJETIVOS GENERALES

El objetivo primordial del programa de investigación aquí propuesto es el de estructurar un concepto orgánico e integral sobre una entidad patológica, a partir de un compromiso de interdisciplinariedad que incluya estudios sobre el hospedero, el agente bacteriano y el microambiente físico de las vías aéreas superiores, a fin de presentar eventuales propuestas de control para una enfermedad, que involucren criterios de racionalidad (ecológica y económica) y de desarrollo del pensamiento científico en el ámbito nacional (incentivar la búsqueda de otros puntos de vista a problemas tradicionales y otros no tanto). Para ello se implementa el concepto de modelo (capaz de motivar en el pensamiento la certeza de complejidad inherente a los fenómenos biológicos frente al enfoque unidimensional aislacionista patente aún en el ámbito investigativo internacional).

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar por aislamientos microbiológicos sistemáticos, si en realidad la infección es causada únicamente por bacterias del género Pasteurella multocida como lo describen muchos autores extranjeros (Flatt, 1974; Winsser, 1960), o si por el contrario, se pudiera tratar de infecciones mixtas por lo menos con otros tipos bacterianos (Bordetella bronchiseptica, por ejemplo).
- Detallar por serotipificación el tipo o tipos de Pasteurella multocida más frecuentemente involucrados en casos de neumonía enzoótica del conejo en Colombia.
- Correlacionar el avance del daño tisular y la respuesta del organismo con la distribución y concentración de Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica en cortes histológicos de tejido pulmonar y de vías respiratorias altas, por medio de técnicas de inmunomarcación de los patógenos.
- Estudiar por medio de técnicas de electrofisiología (Patch Clamp y microelectrodos extracelulares) la interacción patógeno-célula epitelial hospedera desde el punto de vista eléctrico (cambios en las corrientes iónicas) de las superficies de interrelación del agente y la célula epitelial.
- Caracterizar de manera preliminar, primordialmente componentes capsulares de la Pasteurella multocida y la Bordetella bronchiseptica aisladas de casos naturales, que pudieran inducir cambios del microambiente físico de la superficie epitelial y que eventualmente faciliten o promuevan la adherencia bacteriana a las células ciliadas o de cualquier tipo.

3. JUSTIFICACION

Antes de proceder a la justificación del proyecto en sí, parece apropiado explicar los motivos que obligaron a presentar la investigación como modelo y no como proyecto convencional.

La gran variedad de agentes infecciosos patógenos del aparato respiratorio, obliga, según las formas tradicionales de aproximación, a estudiar cada una de ellas por separado. Este tipo de enfoque tiene el inconveniente de dispersar esfuerzos humanos, técnicos y económicos en el estudio de diferentes agentes etiológicos y su eventual interacción con el hospedero, en lugar de aglutinar todos aquellos elementos, como parece ser lo indicado en estados de desarrollo como el actual en el país; ello hace suponer una optimización de los recursos antes descritos. Se parte del principio de que los mecanismos de los estadios iniciales de muchas enfermedades infecciosas, sobre todo aquellas que tienen que ver con aglomeración, así como las respuestas de defensa posibles del organismo, son limitadas. Esto explica en parte la elección del conejo como animal modelo de investigación. Por lo menos dos tipos de argumentos obligaron a su escogencia.

- Epistemiológicos
- Socioeconómicos

Los de carácter Epistemiológico incluyen el concepto según el cual la neumonía enzoótica del conejo es causada principalmente por un solo patógeno la *Pasteurella multocida*, conforme a lo reportado por la literatura internacional y por la experiencia personal de uno de los investigadores durante más de 10 años de diagnóstico. Otros patógenos bacterianos como la *Bordetella bronchiseptica* parecen tener un papel secundario (Flatt, 1974; Winsser, 1960).

Hasta la fecha no hay reportes sobre agentes virales involucrados en el proceso (Uzal, 1989). Esta unidad de causa proporciona una base sólida para la formulación de hipótesis, contrario a lo que podría suceder cuando se estudien especies animales cuyo sistema respiratorio es atacado por múltiples microorganismos bacterianos y/o virales. Este acercamiento, desde ya, tiene una gran ventaja económica: no se requieren, por el momento, condiciones experimentales costosas (los animales no deben reunir requisitos especiales -S.P.F. por ejemplo-, se parte de animales de campo; tampoco se requieren instalaciones especialmente diseñadas para el aislamiento de los animales).

Los de tipo económico incluyen, además de los descritos en el numeral anterior, aquellos que tienen que ver con el tamaño de la especie animal a estudiar. Una de las limitantes en los estudios morfológicos, no sólo en Colombia sino aún en países industrializados, ha sido precisamente el alto costo tanto para la toma y procesamiento de los tejidos de especies grandes como el bovino o porcino, como también el precio de adquisición del animal para experimentación. Esta consideración económica

tiene, a su vez, implicaciones epistemiológicas manifiestas en el tamaño de la población sometida a estudio. El uso del modelo permitirá procesar un número mayor de muestras, con resultados más significativos.

Si bien las aves comparten las ventajas del menor tamaño, también es cierto que presentan el mayor y más diverso grado de patologías respiratorias específicas, lo cual demandaría condiciones experimentales especiales.

El enfoque más frecuente en los intentos de control para las enfermedades en cuestión, ha seguido una tradición unidireccional que se concentra en uno solo de los múltiples factores que podrían entrar en juego en el desencadenamiento de las patologías. Así, en primera línea se busca la destrucción del microorganismos sobre la base de productos químicos (antibióticos), olvidando la alta capacidad de adaptación y supervivencia de aquellos, producto de una exitosa evolución. Esto obliga al desarrollo cada vez mayor, de productos más sofisticados, costosos y, por qué no, tóxicos para el consumidor final de la cadena alimenticia, el hombre. No de menor importancia es el fenómeno de desarrollo de resistencia en patógenos de este último, al ser expuestos a subdosificación prolongada por el consumo de carnes y productos provenientes de la industria pecuaria. Otro intento de control se ha verificado aumentando la resistencia específica de los hospederos frente a los agentes infecciosos, ésto es, la vacunación. Aunque desprovisto este enfoque de los inconvenientes de los antibacterinos, solamente toma en cuenta uno de los constituyentes del organismo superior, el sistema inmune.

Es de recordar que algunos patógenos potenciales, en nuestro caso la Pasteurella multocida, han desarrollado mecanismos complejos y sofisticados métodos bioquímicos para evadir todas las formas de defensa de organismo; por consiguiente, al desarrollar productos biológicos (bacterinas) cada vez más purificados contra determinantes antigénicos vitales de las bacterias, los obligará, a su vez, a diseñar nuevos mecanismos de evasión hasta ahora desconocidos y, por qué no, de mayor agresividad. Recientes estudios en México resaltan el carácter inconveniente de la vacunación en conejos contra Pasteurella multocida al producir en los animales vacunados, una vez son retados a una cepa homóloga de la vacuna, una fuerte reacción de tipo inmunopatológico en pulmón (Ramírez R. et al, 1990). A pesar de su conocida mayor eficiencia, las vacunas de origen viral, en algunas ocasiones, comienzan a demostrar debilidad cuando los agentes contra los que han sido preparados mutan y generan nuevas versiones antigénicas no reconocidas por los hospederos (Rosales et al, 1989). Desde esta perspectiva, se debería contar con la suficiente infraestructura de laboratorios de producción de biológicos, capaces de incorporar a una vacuna determinada la nueva variante antigénica detectada en el campo. Este parece no ser el caso de Colombia.

Otra área de investigación desarrollada especialmente durante la década de los setenta, buscaba la optimización de instalaciones para permitir controlar las variables que aparentemente tenían mayor influjo negativo sobre los animales

presentación de las enfermedades. Parece ser que el control puntual de tan sólo algunas variables del habitat no es suficiente para la prevención de entidades respiratorias, lo cual hace indispensable la implementación de sistemas altamente complejos, capaces de controlar simultáneamente y en forma automática múltiples factores del medio ambiente. No obstante, y aún en complejas unidades de producción porcina, se ha incrementado la prevalencia de enfermedades respiratorias en los animales (MacCormak, 1989). Aún en países con posibilidades de alta inversión en construcciones existen limitaciones para que los productores medianos y pequeños puedan acceder a la implementación de tales instalaciones en sus granjas (Marschang, 1989; y MacCormak, 1989).

De otro lado, la importancia de las enfermedades infecciosas respiratorias agudas parece no limitarse a las especies animales domésticas con interés económico; en países latinoamericanos, este tipo de afecciones tienen una elevada incidencia en la población humana, especialmente en los estadios infantiles. En Colombia, las neumonías ocupan el quinto lugar como causa de defunción en toda la población con un 3.5% del total. Incluso en países desarrollados como el Canadá y los EE.UU. las infecciones respiratorias agudas se ubican entre las primeras cinco causas de defunción en menores de un año y, para el primero, también en niños de uno a cuatro años (O.P.S.)

Ahora bien, la significancia de la Pasteurella multocida como agente capaz de inducir enfermedades respiratorias no se restringe únicamente al conejo; ella resulta patógena para diferentes especies animales (aves domésticas y silvestres, porcinos, bovinos, etc.). La Pasteurella multocida mantiene la reputación de producir el mayor número de muertes de todas las bacterias (Barnum, 1990). El control del cólera aviar, causado por la misma en pollos de engorde continúa siendo un problema a pesar de los programas de vacunación (Carpenter et al, 1989). En 1990, Choi et. al. concluyeron que la Pasteurella multocida tipo capsular A es el agente etiológico de la Pasteurellosis aviar, la cual es altamente contagiosa y una de las causas más serias de muerte en aves domésticas y silvestres de los EE.UU. Finalmente, durante el Simposio Internacional sobre el grupo de microorganismos Haemophilus-Actynobacillus-Pasteurella en junio de 1990, fue reportado que la Pasteurella multocida ha sido aislada de aves por más de una centuria y permanece hoy en día como un potente agente de enfermedad con una importancia socioeconómica severa (Barnum, 1990).

Estudios adelantados en Canadá y EE.UU. concluyeron que entre todas las enfermedades limitantes de los bovinos destetos, las neumonías son las que mayores pérdidas económicas producen. Algunas de estas neumonías se conocen comúnmente con el nombre de "Fiebre de embarque", debido a que casi siempre su presentación se relaciona con el transporte de los animales hacia los sitios de mercadeo. La morbilidad es una de las causas más obvias de pérdida económica, aunque se deben considerar los costos de tratamiento, prevención y el impacto negativo producido sobre el rendimiento de los animales recuperados. El estimado

de las pérdidas anuales que se atribuyen a las enfermedades respiratorias en bovinos de los EE.UU. superan los 500 millones de dólares (Morrison, 1986).

En cerdos, la rinitis atrófica causada por la Bordetella bronchiseptica y la Pasteurella multocida tipos A y D ocurre en el 80% de las piaras de norteamérica, ocasionando pérdidas relacionadas con crecimiento deficiente, ganancia de peso y eficacia nutritiva menores, así como mayor susceptibilidad a otras enfermedades. La forma subclínica también acarrea pérdidas considerables (Rosemberg, 1989). Las enfermedades del tracto respiratorio en cerdos presentan comúnmente una asociación estrecha de rinitis atrófica y neumonía, aceptándose, en general, que las lesiones producidas en los cornetes por la primera entidad disminuyen la resistencia del animal, haciéndolo más vulnerable a infecciones secundarias (Rosemberg, 1989).

En el anterior contexto, desde hace aproximadamente dos años se inició un intento de aproximación multifactorial, tomando en cuenta: condiciones del animal (estudios fisiopatológicos), del microorganismo (estudios fisiopatológicos) y del medio ambiente (estudios epidemiológicos), empleando para ello inicialmente, técnicas de rutina a fin de intentar caracterizar en primera instancia los fenómenos más sobresalientes del Síndrome Neumonía Enzoótica en conejos de la Sabana de Bogotá. Los estudios hasta ahora adelantados han aclarado aspectos importantes de la fisiopatología de la enfermedad (Mendoza, 1991; Murillo, 1992; Iregui and Mendoza, 1992), permitiendo la formulación de preguntas sobre el tipo de relación existente entre las bacterias y las células epiteliales en la vías respiratorias, especialmente en las aéreas superiores. Con el objeto de responder algunas de ellas, se han previsto estudios de inmunohistología, ultraestructura, bioquímica y electrofisiología; en tanto que algunos resultados preliminares de la investigación epidemiología permiten prever la necesidad de profundizar y prolongar en el tiempo las observaciones del efecto de variables como la humedad relativa sobre la presentación y el curso de la enfermedad. Para estas mediciones se requiere un equipo de registro continuo y preciso en lugar de las mediciones puntuales utilizadas hasta el presente (Huertas, 1992: comunicación personal). Finalmente, aunque se han hecho aislamientos bacterianos con fines diagnósticos, una caracterización más estricta tanto de la Pasteurella multocida como de la Bordetella bronchiseptica requiere atención en el corto plazo.

4. HIPOTESIS

Como propuestas centrales se parte de cuatro premisas:

1. La universalidad y permanencia de las leyes físicas desde el macro hasta el microcosmos frente a aquellas de carácter biológico permiten suponer que: a) Durante las fases iniciales de una infección de cualquier origen (bacteriana o viral), y por cualquier vía (respiratoria y/o digestiva), los primeros cambios que se suceden en el microambiente físico especialmente en el tracto respiratorio-digestivo superior

para su anclaje y posterior multiplicación. b) Que tales cambios físicos presentan menor cantidad de variables (tensión de O_2 , T_o , fuerza iónica y pH) (Wick, et. al 1991) que los cambios bioquímicos en idéntica región y, además, las alteraciones serían más constantes en el tiempo, entre diferentes enfermedades infecciosas de diversas etiología y entre animales de distinta especie, incluido el hombre.

2. La segunda premisa parte del hecho de que las posibilidades de respuesta defensiva específica e inespecífica de un organismo superior de cualquier especie ante un agente infeccioso son limitadas. En cuyo caso, se podría pensar que al buscar lo que las asemeja (enfoque, hasta ahora poco explorado) sobre lo que las diferencia (línea tradicional de investigación biológica) se podrían plantear mecanismos de control que intentarían prevenir no una, sino varios tipos de infecciones en especies disímiles.

3. Esta premisa, y como consecuencia de las anteriores, permite suponer que el empleo de modelos, en este caso uno natural, tendría varias ventajas sobre los estudios convencionales: a) No simplifica lo complejo, pues se trata de un animal completo y tomando en cuenta su entorno físico, social y fisiológico. Muchos modelos en especial aquellos in vitro, sufren tarde o temprano una crisis de simplificación; es decir, dificultad para la extrapolación hacia la realidad a partir del laboratorio. b) Economía: bastante información para medicina humana ha sido y continúa siendo obtenida hoy día a partir de modelos animales; algo similar podría implementarse en medicina veterinaria al observar los inconvenientes para el manejo de otras especies domésticas. (Ver justificación). c) Permitiría conformar una conciencia, inicialmente restringida, de la complejidad del fenómeno biológico; incentivaría los procesos de desarrollo del pensamiento bi y tridimensional (interrelación en el tiempo) frente a la percepción unidimensional (aislacionista: etiologista, morfologista, etc.), que entorpece la comprensión de las contradicciones y paradojas inherentes a los fenómenos de la vida y la naturaleza.

4. Por último se parte de una consideración de pertinencia sobre el tipo de investigación molecular que sería más urgente adelantar en nuestro contexto; así, se entiende que algunos procesos moleculares son comunes tanto a los países desarrollados como a aquellos que no lo son.

Por ejemplo, la respuesta inflamatoria (y, en general, aquellos procesos que se suceden del individuo hacia un interior) de un organismo superior es la misma aquí que en Japón, en cuyo caso sería más conveniente que en ese país investigaran los fenómenos moleculares propios de dicha respuesta, información que puede ser extrapolada por nosotros sin ninguna restricción; en cambio, los primeros estadios moleculares de la infección (los fenómenos moleculares de interfase, éste es, de las mucosas del individuo hacia el exterior) están fuertemente determinados por el medio ambiente particular de una región específica y, seguramente, los japoneses no estarán interesados en inquirir como se inicia una infección en la Sabana de Bogotá, mientras que, para nosotros, es una pregunta ineludible. Esta última

propuesta integra los universales particulares (provincialismo) con los universales globales, en una sana complementación de la necesaria temática mundial con la urgente e incipiente ciencia nacional.

5. LITERATURA

La estrecha asociación demostrada entre *Pasteurella multocida* con diversas patologías frecuentes en conejos, ha sido reiteradamente documentada (Flatt and Durngworth, 1971). Si bien todas las formas de presentación reportadas tienen algún grado de significancia económica, son las formas respiratorias (rinitis y neumonía) y la forma sistémica (septicemia) las de mayor efecto negativo en los planteles dedicados a la explotación comercial (Chengappa et. al., 1988) así como en animales criados para laboratorio (DiGiacomo et. al., 1983). Estudios recientes demuestran que en diferentes especies animales la *Pasteurella multocida* continúa siendo una de las principales fuentes de pérdida económica a nivel mundial (Barnum, 1990). En aves, la *Pasteurella multocida* tipo A es el agente etiológico del cólera aviar, el cual es altamente contagioso y una de las más serias causas de muerte en aves domésticas y silvestres (Choi et. al., 1990), el serotipo actuante en conejos ha sido agrupado dentro de las *Pasteurella multocida* tipo A, siendo más frecuentes aquellas del subserotipo 3 (Lu and Pakes, 1981; Digiacomo et. al., 1985).

En general, se sostiene que si bien la *Pasteurella multocida* es el patógeno más frecuentemente aislado de las entidades arriba descritas en conejo, igualmente se reportan aislamientos simultáneos de *Bordetella bronchiseptica* (Flatt, 1974; Winsser, 1960), especialmente en las afecciones respiratorias; no obstante, el papel jugado por esta última durante los procesos infecciosos no ha sido claramente definido (Winsser, 1960), especialmente en las afecciones respiratorias; no obstante el papel jugado por esta última durante los procesos infecciosos no ha sido claramente definido (Winsser, 1960). Una asociación similar entre *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* tipo D ha sido largo tiempo documentada en la rinitis atrófica del cerdo (Pedersen and Barford, 1981); y aunque durante mucho tiempo se especuló sobre la importancia de la *Bordetella bronchiseptica* como agente precedente y necesario para abrir la puerta a la menos adherente *Pasteurella multocida* (Jacques et. al., 1988), hallazgos recientes demuestran la capacidad de la tipo D para iniciar por sí sola y desarrollar infección en cerdos con todas las secuelas conocidas para la rinitis atrófica (Pijoan and Trigo, 1990).

Las vías aéreas superiores se consideran como el sitio de la permanencia de las pasteurellas; allí bajo circunstancias favorables, iniciarían un crecimiento descontrolado con posterior invasión a áreas más profundas del aparato respiratorio, o a su vez podrían ellas mismas diseminarse a todo el organismo, o algunos de los productos de su metabolismo como las endotoxinas podrían entrar al torrente circulatorio y producir el cuadro clínico patológico conocido para septicemia (Mendoza, 1991). La detección y observación de bacterias mediante técnicas de

polisacáridos heterogéneos ácidos, de alto peso molecular. La cápsula confiere resistencia a las bacterias contra el suero, permitiendo así su sobrevivencia antes del desarrollo de anticuerpos específicos: aparentemente, ellas no activarían el complemento por ninguna de sus dos vías (Kasper, 1986). El papel de los anticuerpos bactericidas en la defensa contra la infección para algunas de las pasteurellaceas también parece ser cuestionable (Inzana, 1990). Las bacterias encapsuladas son resistentes a la fagocitosis en el suero normal, y por consiguiente, no son retiradas del torrente circulatorio o de los tejidos de un hospedero deficiente en anticuerpos específicos. Entonces, la fagocitosis probablemente solo puede suceder mediante opsonización de las bacterias por receptores de anticuerpos y complemento sobre el fagocito. La imposibilidad de activar el complemento en ausencia de anticuerpos específicos hace a las bacterias encapsuladas resistentes a la fagocitosis (Inzana, 1990). La cápsula de polisacáridos es, en la mayor parte de los casos, antígeno T-independiente y, por consiguiente, sólo se puede obtener una respuesta escasa de anticuerpos (Inzana, 1990; Mathison, 1987).

6 MATERIALES Y METODOS

6.1 Estudio microscópico, Marcación y Localización de la Pasteurella multocida y la Bordetella bronchiseptica y su correlación con el avance infeccioso durante el síndrome neumonía enzoótica en conejos por la técnica de inmunoperoxidasa en cortes histológicos

6.1.1 Objetivos

- Producción de antisueros primarios hiperinmunes policlonales contra P. multocida y B. bronchiseptica y conjugación de un segundo antisuero contra los anticuerpos primarios por la técnica de peroxidasa aisladas de conejos con la enfermedad natural.
- Titulación de los antisueros y el conjugado, obtención de la dilución óptima de trabajo.
- Localización, apreciación de desplazamientos, cambios de densidad de la Pasteurella multocida y la Bordetella bronchiseptica en áreas determinadas de las vías aéreas superiores e inferiores de conejos sanos en diferentes edades (neonatos, lactantes, previo a la edad de mayor riesgo a manifestar la enfermedad y animales de matadero), así como enfermos en diferentes fases de la patología.
- Correlación de los hallazgos en los diferentes grupos antes enumerados con estudios de las presentaciones clínicas hasta ahora descritas y de variables ambientales (en progreso), así como con hallazgos fisiopatológicos del pulmón (estudios concluidos).

6.1.2. Metodología

Se emplearán **15 conejos** por cada uno de los grupos previstos en los objetivos (neonatos, lactantes, previo a la edad de mayor riesgo a manifestar la enfermedad animales de edad de matadero y enfermos en diferentes fases de la patología), para un total de 75 animales.

Los animales serán sometidos a anestesia general empleando para ello una combinación de Ketamine de 10 mg/kg y Xylaxine de 5 mg/kg. Esto con el fin de optimizar la fijación factor determinante del proceso total.

La fijación se hará exponiendo la cavidad torácica y a través del ventrículo derecho se procederá a un lavado vascular del pulmón con solución salina fisiológica y posterior perfusión de la sustancia fijadora (Formaldehído al 10% o Ito-Karnowski), se practicará una incisión de drenaje a nivel de la aorta torácica posterior; inmediatamente se expondrá el tracto respiratorio medio inferior (laringe y tráquea, y mediante una cánula localizada en la laringe se infundirá el mismo líquido fijador anterior a una presión de 25 cm., con el fin de expandir el pulmón a su tamaño aproximado in vivo. Finalmente, y después de practicar una ligadura en la tráquea, se sumergirán los pulmones en los correspondientes líquidos fijadores. Los tejidos se procesarán por la técnica de rutina para Hematoxilina-eosina utilizada por el laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (Luna, 1968).

Para la técnica de inmunomarcación de los patógenos (Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica) en los tejidos (pulmón y vías aéreas superiores), se procederá de la misma manera hasta el punto de cortar los tejidos en parafina, de aquí en adelante se procederá según la técnica de inmunoperoxidasa (IPO). Brevemente: se aislarán Pasteurella multocida y Bordetella bronchiseptica de animales enfermos con manifestaciones de enfermedad respiratoria (neumonía o septicemia, primordialmente), se procederá a su purificación y multiplicación hasta obtener una cantidad suficiente de bacterias para la preparación de un antisuero contra ellas. Para ello se procederá a inactivar las bacterias con formaldehído, se conocerá la concentración de proteína por mililitro por el método de Follin-Ciocalteau con ayuda del espectrofotómetro, se ajustará la concentración de proteína a 500 mcg-ml, se procederá a mezclarla con adyuvante completo e incompleto de Freund y preparar la dosis adecuada de inoculación. Se inoculará una oveja adulta sana para obtener un antisuero con anticuerpos primarios contra Pasteurella multocida y Bordetella Bronchiseptica. Otro paso a seguir es la purificación de IgG de ovino con el fin de fabricar un segundo antisuero anti IgG ovina en cobayo. Este segundo antisuero se procesará para obtener IgG purificada y se conjugará con peroxidasa utilizando la siguiente técnica. Brevemente:

1. Conjugación del antisuero secundario con peroxidasa:

a) Diálisis de la enzima. La peroxidasa se pone a dializar contra buffer acetato de sodio en membrana de diálisis.

Se ajusta la concentración de proteína del antisuero a 8 mg/ml, posteriormente se dializa contra buffer bicarbonato. b) conjugación. Después de dializado el antisuero y la enzima se mezclan en relación 1:1 volumen, la conjugación se realiza en un frasco oscuro, tapado y sellado que garantice oscuridad a medio ambiente y en agitación lenta y constante, la reacción se detiene con ácido ascórbico.

2. Desarrollo de la prueba:

a) Inactivación de la peroxidasa endógena. Los cortes histológicos requeridos se dejarán en solución de peróxido de hidrógeno y metanol absoluto. Luego se lavarán con PBS y agua destilada. b) Marcación. A los cortes tratados con el peróxido de hidrógeno se les agrega el primer antisuero, es decir las inmunoglobulinas antipasteurella o antibordetella, luego se agrega el segundo antisuero marcado con peroxidasa. c) Revelado. Transcurrido el tiempo de reacción se lava el sobrenadante, se adiciona Diaminobencidina como revelador y peróxido de hidrógeno para observar la reacción. Luego se lava el exceso. d) Tinción. Se hará coloración de contraste con Hematoxilina de Harris.

3. **Obtención de la dilución óptica de trabajo:** Se efectuarán diluciones de los antisueros de la siguiente manera:

Antisuero 1: Anti-pasteurella o antibordetella 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600.

Antisuero 3: Conjugado antioveja + peroxidasa: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400.

6.2 Estudios Electrofisiológicos de la Interacción Patógeno. Célula Epitelial Hospedera

En los últimos años, un gran avance se ha logrado en dilucidar los mecanismos involucrados en la secreción de fluidos por células epiteliales, usando la técnica de patch clamp ha sido posible determinar la presencia de canales iónicos tanto en tejidos glandulares - (células lacrimales y pancreáticas) como en tejido nervioso y muscular. Es así como se ha determinado la importancia que tienen los canales de cloruro y de potasio ubicados respectivamente en la membrana apical (mucosa) y en la membrana basolateral de las células epiteliales.

El estudio de la interacción hospedero-patógeno, desde el punto de vista electrofisiológico, se centrará en la determinación de las posibles modificaciones provocadas en las membranas apical y basolateral de las células epiteliales, como

rutina (microscopia de luz) ha probado hasta ahora ser un método poco confiable (Pijoan and Trigo, 1990). En estudios recientes, evaluando la forma septicémica del síndrome neumónico en conejos (Mendoza, 1991; Murillo, 1992), se pudo apreciar la escasa o casi nula presencia de bacterias en diferentes niveles examinados del pulmón, especialmente cuando se empleó la microscopia de luz, mientras que al implementar la técnica de microscopia electrónica, fue posible apreciar un mayor número de bacterias (sobre todo aquellas adheridas a las células ciliadas), que en el primer método habían pasado desapercibidas. Empero, al considerar lo engorroso de aquella técnica, así como su baja cobertura, algunos autores han optado por implementar técnicas de marcación con anticuerpos específicos contra bacterias, virus, etc. (Hamid *et. al.*, 1990; Parsons, 1984); no obstante, tales trabajos se han concentrado primordialmente en detectar los microorganismos en estrecha asociación con las lesiones tisulares por ellos producidas o estimuladas (Haritani *et al.*, 1989; Uzal, 1989), y algunas veces en determinar su avance a lo largo de vías de invasión (Narita *et al.*, 1991); poco se sabe sobre la ubicación de dichos patógenos potenciales, en los estadios previos al desarrollo de enfermedad.

La adhesividad a las células epiteliales es uno de los primeros factores de virulencia expresado por un microorganismo para poder desarrollar sus posteriores efectos patogénicos (Isberg, 1991). La aproximación a este tópico se ha llevado a cabo primordialmente empleando técnicas de aislamiento microbiológico (Flatt and Dungworth, 1971) o replicación de experimentos *in vitro* tendientes a demostrar la presencia de tales factores de adherencia (Matsuyama and Takino, 1980). Sin embargo, estudios recientes demuestran los inconvenientes de extrapolar resultados obtenidos de los estudios *in vitro*, frente a aquellos adelantados *in vivo* (Pijoan and Trigo, 1990). Entre los factores importantes que serían obviados o destruidos al realizar los experimentos *in vitro* se encuentra la capa de moco que normalmente esta recubriendo las superficies epiteliales respiratorias en los animales vivos y, cuya producción se dificulta en tales condiciones (Pijoan and Trigo, 1990). Como posible mecanismo de adhesión de las pasteurellas a las células epiteliales del aparato respiratorio de conejos, se considera la presencia de fimbrias en serotipos aislados de especie multocida tipo A (Glorioso *et. al.*, 1982). En el caso de la rinitis atrófica en cerdos se ha demostrado un sinergismo aparente entre cepas toxigénicas de Bordetella bronchiseptica y de Pasteurella multocida donde ésta, a pesar de ser capaz de adherirse al epitelio, lo hace en número relativamente bajo, mientras que en presencia de la primera el número de bacterias invasivas aumenta. Al parecer la citotoxina de Bordetella bronchiseptica produciría un aumento de la colonización por cepas de Pasteurella multocida toxigénica (Chanter, 1990).

Muchas de las especies más patógenas de la familia Pasteurellaceas son encapsuladas (Inzana, 1990). Tales cápsulas son importantes para la virulencia de las bacterias patógenas, al proveer al microorganismo con una barrera protectora contra las defensas del hospedero (Inzana, 1990). Cada una de las cápsulas de las pasteurellaceas que ha sido purificada y analizada está constituida por

consecuencia de la actividad patógena de la Pasteurella multocida y/o Bordetella Bronchiseptica. Específicamente, se determinarán las características de los canales iónicos presentes en las membranas de la célula epitelial del tracto respiratorio del conejo y las posibles modificaciones producidas en ellos por acción directa o indirecta de la Pasteurella multocida y/o Bordetella Bronchiseptica.

Para tal efecto, se utilizará la técnica de Patch Clamp inicialmente en la configuración no invasiva de Célula Unida a la pipeta (Cell Attached). Esto permite determinar la existencia de corrientes iónicas a través de la membrana, originadas por pulsos depolarizantes e hiperpolarizantes aplicados con una micropipeta (electrodo de registro). La corriente medida es aquella que fluye por el área de membrana definida por la punta de la micropipeta. Posteriormente se usará la configuración de célula total (Whole cell), en donde la corriente medida es aquella que fluye a través de toda la membrana celular.

El montaje para realizar los experimentos de Patch Clamp requiere de una cámara experimental donde se depositan las células, un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata (Ag/AgCl) en contacto con la solución extracelular (baño) y conectado a tierra y un electrodo de registro.

Los registros de las señales celulares pueden realizarse a voltaje (V) controlado o a corriente (I) controlada. Para ello se utiliza un instrumento denominado Axopatch - 1C (Axon Instrument, CA. USA). Este instrumento permite transformar los registros de corriente a voltaje mediante el convertidor de Corriente-Voltaje (C I - V), al cual van conectados los electrodos de referencia (tierra) y de registro. Consta además de una interfase análoga-digital, la cual permite almacenar directamente las señales en un computador, donde posteriormente se analizan.

MICROELECTRODOS

En la elaboración de los microelectrodos de registro se usan tubos de vidrio tipo hematocrito sin heparinizar (assistant No. 564) 1,1 mm diámetro interno. Estas pipetas de vidrio se estiran verticalmente en un Puller Kopt (CA, USA.), se llenan con la solución fisiológica respectiva y se les introduce un alambre conductor (Ag/AgCl). La resistencia de la punta de estos electrodos en una solución externa de 140 mM de KCl debe estar en el rango de 3-5 megaohmios. Una vez llenos con la solución respectiva, se realiza la formación del sello entre la punta del electrodo y la membrana respectiva de la célula epitelial. El seguimiento de la formación del sello se realiza bajo observación directa al microscopio, y los cambios en la resistencia del electrodo al aproximarse a la superficie de la membrana se observan en un osciloscopio. El sello se logra cuando se alcanza una resistencia entre 1-10 gigaohmios.

El protocolo experimental consiste en estimular la célula epitelial desde su potencial de membrana (-60 mV) con un tren de potenciales hiper- y depolarizantes (-100 mV

a + 50 mV). La presencia de canales iónicos dependientes del voltaje en la membrana celular originarán flujos de entrada o de salida de corrientes iónicas, bajo estas condiciones experimentales. Conjuntamente se estudiará el efecto de agentes farmacológicos y hormonales sobre los canales iónicos que se detecten.

6.3 Estudio Bioquímico de Constituyentes de la Cápsula de Pasteurella multocida y Bordetella Bronchiseptica

Se aislarán cepas de Pasteurella multocida y Bordetella Bronchiseptica de campo de casos clínicos de neumonía enzoótica. Dichas cepas serán clasificadas por métodos bioquímicos y biológicos y serán parte de la colección, a partir de la cual se realizarán los ensayos de patogenicidad, tanto in vivo como in vitro (estudios de electrofisiología). Tales ensayos se llevarán a cabo con gérmenes completos así como con elementos particulares de los mismos, con miras a establecer el compromiso individual de los constituyentes bacterianos en los cambios morfológico-fisiológicos de los estadios iniciales de la infección, así como en las posibles fluctuaciones del microambiente físico de las membranas celulares. Dentro del proceso se utilizarán métodos tales como rompimiento bacteriano por sonicación, reparación por centrifugación diferencial, ultracentrifugación en gradientes de densidad, electroforesis en geles de poliacrilamida y cromatografía líquida (filtración, afinidad e intercambio iónico).

7. COSTOS

Descripción de equipos a utilizar:

Laboratorio de Histopatología:

- Microscopio de luz
- Micrótopo de rotación
- Autotechnicon
- Dispensador de parafina