

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNITARIA
FRENTE A Pasteurella multocida y Bordetella
bronchiséptica EN EL CONEJO

J.L. Argüello Villares
Laboratorios Ovejero, S.A., León

F. Rejas Garcia
Dpto. de Microbiología, Facultad de Veterinaria, León

A. Garrido Pertierra
Dpto. de Bioquímica, Facultad de Biología, León

J. Rojo Vázquez
Laboratorios Ovejero, S.A., León

Nuestras investigaciones sobre la patología del conejo nos han conducido a poder afirmar que las enfermedades infecto-contagiosas de naturaleza bacteriana que tienen su asiento en el aparato respiratorio, son, posiblemente, las más frecuentes en nuestros conejares, tomando ocasionalmente carácter enzótico.

A conclusiones semejantes llega el Instituto de Patología Aviar de la Universidad de Milán (6) que, estima que, en Italia, las enfermedades respiratorias ocasionan un 28,60% de las muertes que se producen en las naves de engorde; Morisse (12) determinó en una explotación francesa de 100 reproductoras híbridas la tasa de eliminación durante seis meses, y de la que el 38,23% correspondió a transtornos respiratorios y auriculares; e incluso Camps (2) en España, clasificando las enfermedades de los conejares nacionales por su importancia, situa a la Pasteurelisis en cuarto lugar cuando se trata de pequeñas explotaciones (de menos de 30 madres) y en el primer lugar cuando se refiere, a las cada vez mas frecuentes, explotaciones medianas y grandes (más de 100 hembras).

Estas consideraciones dirigieron nuestras investigaciones a la vacunación específica frente a Pasteurella multocida y Bordetella bronchiséptica, gérmenes que indudablemente intervienen en problemas respiratorios (4, 5, 9, 10, 11, 15, 18).

Material y métodos

1. Animales y locales de experimentación:

Todos los conejos utilizados en las pruebas de laboratorio fueron de raza neozelandesa, con una edad de 7-8 semanas al comienzo de la experiencia.

Los animales estuvieron alojados en locales semi-herméticos, con posibilidad de aumentar el caudal de aire de entrada hasta poder establecer corrientes en el habitáculo.

Se constituyeron tres lotes, dos de ellos, destinados a la vacunación, estaban formados por 20 animales (A y B) actuando el tercero, constituido por 10 animales, como lote testigo (C).

También se citan dos experiencias de campo, la primera sobre 150 reproductores de razas neozelandesa y californiana, alojados en una nave de reciente construcción y con ventilación estática; y la segunda sobre 400 reproductores y su recría, de raza neozelandesa y californiana, que constituían una explotación montada al aire libre.

2. Vacunas y vacunación:

2a. Pruebas de laboratorio:

En el lote A se empleó una bacterina elaborada con diversas cepas de Pasteurella multocida y Bordetella bronchiséptica, aisladas de procesos respiratorios del conejo, inactivadas por el formol, precipitadas por sulfato aluminico-potásico y potenciadas por extractos de Corynebacterium parvum.

Cada ml. de bacterina contenía un mínimo de $1,5 \times 10^9$ microorganismos de cada especie.

En el lote B se empleó una bacterina elaborada con las mismas cepas y técnica, pero la concentración por ml. fué de 6×10^{10} microorganismos de Bordetella bronchiséptica y 8×10^9 microorganismos de Pasteurella multocida.

Todas las cepas de B. bronchiséptica que se integraron en las bacterinas fueron comprobadas en su cá

pacidad de producción de dermonecrotoxina termolábil, por considerar que en la patogenia de los procesos respiratorios este factor tiene suma importancia.

Las cepas de P. multocida tenían siempre un origen septicémico o pulmonar, puesto que, de acuerdo con los trabajos de Okerman y col. (13) debemos considerar a las cepas desencadenantes de rinitis, de virulencia baja o moderada.

Las bacterinas fueron aplicadas por vía subcutánea, con 2 cc. del producto vacunante, seguida de revacunación en idénticas condiciones a los 15 días.

2b. Pruebas de campo:

Además de una Bacterina comercial del tipo de la utilizada en el grupo A, se empleó una autovacuna elaborada con Streptococcus pyogenes procedente de los aislamientos efectuados en la explotación ubicada al aire libre.

3. Toma de muestras:

3a. Pruebas de laboratorio:

En el momento de la vacunación, revacunación, y los días 21, 51 y 81 de realizada ésta, se ha sangrado a los animales por punción cardiaca.

La muestra de sangre recogida, una vez coagulada y al comenzar la retracción del coágulo, fué centrifugada a 4.500 r.p.m., en centrífuga convencional, durante 15 minutos, conservándose el suero así obtenido, a +4°C hasta finalizadas todas las determinaciones.

3b. Pruebas de campo:

Los análisis bacteriológicos de los animales de las pruebas de campo, se realizaron sobre distintas zonas del aparato respiratorio de animales previamente sacrificados y autopsiados. Se empleó agar triptosa y agar triptosa sangre para el aislamiento general de gérmenes y particular de Pasteurella multocida, y agar Mac Conkey para el aislamiento de Bordetella bronchiseptica.

4. Determinación de anticuerpos aglutinantes:

Se ha medido la respuesta inmunitaria humoral por

los títulos obtenidos en seroaglutinación lenta frente a antígenos de Bordetella y Pasteurella llevados a una concentración de 2.000 millones por ml. por comparación nefelométrica.

En todas las determinaciones se comprobó la no aglutinación espontánea del antígeno.

5. Electroforesis de las proteínas séricas:

La electroforesis se ha realizado sobre tiras de acetato de celulosa (Cellogel) y puente de 8,5 cm. La solución reguladora utilizada fué Dietil-barbiturato sódico 0,04 M.

La aplicación de 1,5 microlitros/9 mm. de suero a 2 cm. del borde catódico permitió una longitud de migración de 38-40 mm. El tiempo de migración en atmósfera húmeda fué de 30 minutos, manteniéndose el voltaje constante a 200 voltios (fuente de alimentación ATOM 500).

Después de la electroforesis, las tiras fueron coloreadas con Negro-amidoschwartz y transparentadas con una mezcla formada por 85 partes de metanol, 14 de ácido acético y 1 de glicerol.

Posteriormente se realizó la lectura de las tiras con ayuda de un fotodensitómetro automático (ELVI, modelo Seroscan 146), con corrector de albúmina y registrador incorporado.

El porcentaje de cada fracción protéica nos fué suministrado directamente por el fotodensitómetro en el caso de fraccionamiento neto, o calculado manualmente en caso de acaballamiento en las diferentes fracciones.

6. Contenido en proteínas séricas:

Las proteínas séricas han sido determinadas directamente en un refractómetro Erma modelo 4816, con escala específica incorporada.

7. Challenge:

Transcurridos dos meses de la vacunación, se pro-

cedió a aumentar el flujo del aire, creándose corrientes en el interior del local, factor que consideramos predisponente para el desencadenamiento de problemas respiratorios.

Resultados y discusión

Pruebas de laboratorio:

Los resultados obtenidos se reflejan en las tablas I, II y III, pudiendo obtenerse de su estudio los siguientes datos:

Serología:

Los niveles iniciales de aglutininas están dentro de los que autores como Jenkins (7) y Sung (16) consideran positivos, lo que, teniendo en cuenta que los animales procedían de una explotación clínicamente exenta de rinitis y problemas pulmonares y en la que no se practicaba vacunación frente a Pasteurella y Bordetella nos confirma la gran incidencia que estos gérmenes tienen en la cunicultura española, y que corrobora cuanto señalábamos en un principio.

Al cabo de los tres meses del comienzo de la experiencia hemos podido observar cómo los títulos seroaglutinantes permanecen ligeramente por encima de los obtenidos antes de la primera vacunación o, en algunos casos, al mismo nivel, lo que nos viene a indicar la necesidad de proceder a una nueva vacunación en estos momentos.

La mayor concentración de antígeno ha conducido, tanto frente a Bordetella como a Pasteurella, a una mayor respuesta en aglutininas, aún cuando los niveles alcanzados con la concentración inferior son significativamente indicativos del proceso inmunitario. Estos resultados nos hacen recomendar la vacunación con Bacterinas concentradas cuando las condiciones ambientales se aparten significativamente de las idóneas, en tanto que, la concentración normal está perfectamente indicada en explotaciones en las que los factores ambientales no se desvían del óptimo tanto como, para ser predisponentes de problemas respiratorios.

A nivel individual hemos podido comprobar que, cuando los animales partían con serología negativa, tuvieron menores elevaciones en su respuesta serológica en la primovacunación, que el resto de los animales, si bien, realizada la revacución, los niveles de aglutininas alcanzados no fueron significativamente distintos. Este hecho conduce a pensar en la necesidad de comenzar los protocolos de vacunación frente a Pasteurella y Bordetella, mediante vacunación y revacunación, aun cuando, en intervenciones posteriores será suficiente, al ser ya todos los animales serológicamente positivos, con la vacunación mediante una dosis única.

Por otra parte, en animales que al principio de la experiencia presentaban flujo nasal muco-seroso, se ha observado una curación clínica, que pudiera coincidir con el llamado "aclaramiento" de vías respiratorias por autores como Brandenburg (1) y Kang (8), hecho de indudable importancia en la disminución de gérmenes eliminados por parte de los animales afectados.

TABLA I: Títulos Seroaglutinantes frente a Bordetella y Pasteurella.

	Vacu <u>ción</u>	Revacu <u>ción</u>			
Día	0	15	36	66	96
Testi <u>gos</u>	1:25	1:25	1:50	1:25	Coriza y problemas respiratorios
A	1:25	1:50	1:100	1:100	1:50
B	1:25	1:200	1:200	1:200	1:100

Bordetella

LOTES

Testi <u>gos</u>	1:50	1:50	1:50-100	1:100	Coriza y problemas respiratorios
A	1:50	1:50-100	1:100	1:100	1:50
B	1:50	1:200	1:400	1:400	1:100

Pasteurella

Determinación de proteínas séricas:

Estos datos, reflejados en las tablas II y III, nos indican lo siguiente:

En principio, nuestros valores normales tienen algunas desviaciones en relación con los obtenidos por Vaissaire y col. (3, 14 y 17) en las fracciones alfa, beta y gamma.

Pensamos que la fracción gamma, al reflejar de alguna manera los procesos infecciosos anteriores y las vacunaciones, puede perfectamente admitir esa desviación.

En las fracciones alfa y beta debemos admitir, de acuerdo con autores citados, un frecuente acaballamiento, en especial entre las fracciones alfa sub dos y beta sub uno, lo que puede dar lugar a distintos valores relativos en estas globulinas, hecho que nos ha aconsejado, por otra parte, hacer la lectura sin separar las distintas fracciones que pueden apreciarse en cada globulina.

A los 15 días de la vacunación (cuadro II) se produce una disminución en el contenido relativo de albúmina que, sin embargo, 21 días después ha alcanzado sus valores normales.

De los valores obtenidos en la serie alfa observamos que, en el momento de la revacunación (15 días después de la vacunación), existe un ligero aumento, prueba indudable del proceso inflamatorio.

Transcurridos 21 días de la revacunación, su contenido porcentual bajó a valores muy inferiores a los considerados normales, volviendo a la normalidad un mes más tarde. Este hecho parece no tener explicación.

Las globulinas beta permanecen en las dos primeras determinaciones con valores ligeramente superiores a los tomados por nosotros como normales, hecho que parece indicar una intervención hepática en el proceso inmunitario, posiblemente como proceso de detoxicación.

TABLA II: Valores Porcentuales de las Fracciones Protéicas del Suero

Valores
Normales
(Vaissaire
y Col.)

62,8	Albúmina	61,2
10,9	Globulinas Alfa	11,9
15,1	Globulinas Beta	13,9
11,1	Globulinas Gamma	12,8

Valores
Normales
(Argüello y
Col.)

LOTE A

LOTE B

15	36	66	96	Dias	15	36	66	96
51,6	59,6	59,0	60,2	Albumina	51,2	58,2	59,9	61,1
12,9	5,1	11,8	11,7	Globulinas Alfa	12,7	5,6	11,0	11,8
15,5	14,7	14,5	14,3	Globulinas Beta	15,5	15,0	14,1	14,1
19,8	20,5	14,4	13,6	Globulinas Gamma	20,4	21,1	14,8	13,1

TABLA III: Valores absolutos de las Fracciones Protéicas del Suero en gramos por litro.

Valores absolutos normales
(Vaissaire y Col.)

56,7	Contenido total en proteínas	58,5
35,6	Albumina	35,8
6,18	Globulinas Alfa	6,96
8,56	Globulinas Beta	8,13
6,29	Globulinas Gamma	7,48

Valores absolutos normales
(Argüello y Col.)

LOTE A

LOTE B

15	36	66	96	Dias	15	36	66	96
69,80	61,80	58,00	59,00	Contenido total en proteínas	71,60	68,00	60,00	57,00
36,01	36,83	34,22	35,51	Albumina	36,65	39,57	35,94	34,82
9,00	3,15	6,84	6,90	Globulinas Alfa	9,09	3,80	6,60	6,72
10,81	9,08	8,41	8,43	Globulinas Beta	11,09	10,2	8,46	8,63
13,82	12,66	8,35	8,02	Globulinas Gamma	14,60	14,34	8,88	7,46

La fracción globulínica gamma, como era de esperar, alcanza valores elevados en la vacunación, que aún aumentan después de la revacunación, permaneciendo, incluso después de dos meses de iniciada la experiencia, por encima de los valores obtenidos en los testigos no vacunados.

La tabla III nos refleja el contenido total de proteínas y los valores absolutos de las distintas fracciones a lo largo de los tres meses que dura la experimentación.

Vemos un claro incremento en el contenido de proteína total en el suero al principio del proceso; de aquí que, al pasar los datos porcentuales de las distintas fracciones protéicas a valores absolutos, no se observe realmente disminución de la albúmina en ningún momento, permaneciendo siempre sus valores dentro de los normales.

Al mismo tiempo vemos que el contenido absoluto de la fracción gamma, aun cuando en valores relativos - seguian aumentando hasta 21 días después de la revacunación, tiene una disminución entre los valores obtenidos por vacunación y revacunación, situación sin duda debida a la pronta desaparición de las IgM.

Resultados del Challenge:

El desafio a que sometimos a los animales, mediante el claro empeoramiento del ambiente por aumento del caudal de aire y creación de corrientes en el local que los alojaba entre los dos y los tres meses después de la vacunación, condujo a la presentación de rinitis y problemas respiratorios graves en los animales testigos, sin que se afectasen ni clínica ni serológicamente los animales vacunados, cualquiera que hubiese sido la concentración de gérmenes en la bacterina.

"Fallos vacunales" en el campo:

Se detectaron en dos explotaciones que aplicaban protocolos semejantes a los nuestros, "fallos vacunales".

En la primera de ellas, nave convencional con ventilación estática, el problema surgió en un cierto porcentaje de reproductoras, en las que, a pesar de repetidas vacunaciones, aparecía insidiosamente el problema.

De los animales afectados se aisló un Staphylococcus spp., coagulasa positivo, sensible a penicilina. Mediante la antibioterapia adecuada se resolvió el problema, habiendo, sin embargo, un elevado porcentaje de bajas por la pérdida de funcionalidad del aparato respiratorio. A partir del momento de la erradicación de este problema la vacunación ha dado excelentes resultados.

El segundo caso se dió en animales explotados al aire libre. Una vez aparecido el problema respiratorio tanto en reproductores como en gazapos, con alta mortalidad y, sospechada pasteurelosis clínica, se procedió a la vacunación con resultados descorazonadores. Estudiado el problema a nivel de laboratorio, se aisló de animales enfermos un Streptococcus pyogenes que, integrado en una autovacuna, resolvió el problema.

Conclusiones

Vistos los resultados obtenidos podemos concluir que:

El conejo responde adecuadamente a estímulos antigénicos frente a Pasteurella y Bordetella (e incluso a Streptococcus pyogenes) desarrollando una inmunidad activa, que conduce a la protección del animal, aun en condiciones ambientales deficientes en un periodo de al menos tres meses, desencadenando incluso un posible fenómeno de aclaramiento de vías respiratorias altas, que puede conducir a la curación clínica de animales afectados.

Resumen

Se refieren las experiencias de vacunación específica frente a P. multocida y B. bronchiséptica.

Los niveles de aglutininas inicialmente hallados, demostraban la gran incidencia de estos gérmenes en

en las explotaciones de conejos.

Se ha observado una correlación directa entre la concentración del antígeno y la respuesta en aglutininas. De igual manera la elevación de la tasa de -- aglutininas fué inferior con ocasión de la primovacunación en los animales inicialmente negativos en serología, si bien con posterioridad (después de la revacunación), los niveles alcanzados fueron semejantes.

El análisis de las proteínas séricas nos confirma la implicación de las alfa-globulinas en los procesos inflamatorio-inmunitarios y el claro aumento de las gamma globulinas después de la vacunación y revacunación, haciendo sospechar los valores absolutos - de esta fracción la intervención en las primeras determinaciones relativas de la IgM.

Hemos observado en los animales afectados con flujo nasal muco-seroso, un "aclaramiento" de sus vías respiratorias altas, así como el desencadenamiento de problemas de rinitis y respiratorios graves en los testigos, al someterlos a corrientes de aire, en tanto que los animales vacunados permanecieron indemmes.

Summary

The experiments carried out on the specific vaccination against P. multocida and B. bronchiséptica - are reported in this work.

The levels of agglutinins initially found demonstrated the great incidence of these organisms in rabibit exploitations.

A direct correlation between the concentration of the antigen and the response in agglutinins has been observed. In the same way, the increase of agglutinin rate was lower at the moment of the primovacunation in the animals initially negative in serology, though afterwards (after revaccination) the levels - obtained were similar.

The analysis of serum proteins confirms us the implication of alpha-globulins in the inflammatory-inmunitarian processes and the evident increase of --

gamma-globulins after vaccination and revaccination, the absolute values of this fraction making to suspect the intervention in the first relative determinations of IgM.

We have observed in the animals affected with mucoserous nasal flux a "clearing" in their high respiratory tract, as well as the formation of some rhinitis and respiratory serious problems in the blanks on subjecting them to some drafts, while vaccinated animals remained unhurt.

Bibliografia

- (1) Brandenburg, A.C., (1978) Canadian Journal Of Comparative Medecine 42 (3) 286-292.
- (2) Camps, J., (1976) Primer Congreso Internacional de Cunicultura. Dijon.
- (3) Coudert, P y col. (1978) Recueil Médecine Vétérinaire 154 (5) 437-440.
- (4) Galassi, D., y Giulioni, A., (1971) Veterinaria (Milano) 20 (5) 239-248.
- (5) Instituto de Patologia Aviar de la Universidad de Milán (1976) Coniqlicoltura 13 (1) 21-29.
- (6) Instituto de Patologia Aviar de la Universidad de Milán (1977) Selezione Suinavicunicola 4 (44) 20-22.
- (7) Jenkins, E.M. (1978), Canadian Journal of Comparative Medecine 42 (3) 286-292.
- (8) Kang, B. K. (1978) Korean Journal of Veterinary Research 18 (1) 51-60.
- (9) López i Ros, J.P., (1977) II Symposium Nacional de Cunicultura. Pamplona.
- (10) Lleonart, F., (1978), Cunicultura, III (1) 52-62.

- (11) Maeda, M., y Shimizu, T(1975), National Institute of Animal Health Quarterly, 15 (1) 29-37.
- (12) Morisse, J.P., (1978) Cuniculture 5 (2) 71
- (13) Okerman y col, (1979) Journal of Comparative Pathology 89 (1) 51-55.
- (14) Renault, y col, (1976) Primer Congreso Internacional de Cunicultura, Dijon.
- (15) Rossi, G., (1975) Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 82 (7) 276-280.
- (16) Sung, H.T (1975) Taiwan Journal of Veterinary Medicine and Animal Husbandry (26) 31-35.
- (17) Vaissaire, J.P., y Col., (1976), Recueil Médecine Vétérinaire 152 (4) 249-253.
- (18) Watson, W.T. y col. (1975) Laboratory Animal Science 25 (4) 459-464.