

Efecto de la inmunización pasiva sobre la reacción de Shwartzman en el pulmón del conejo empleando lipopolisacárido de *Pasteurella haemolytica**

Rafael Ramírez Romero**
Kim A. Brogden***
Randall C. Cutlip***

Resumen

La reacción local de Shwartzman (RS) puede inducirse en pulmón del conejo, empleando lipopolisacárido (LPS) de *Pasteurella haemolytica*. Se ha considerado que las lesiones provocadas por este fenómeno reflejan, al menos en parte, aquellas que se reconocen en casos naturales de pasteurelosis (PN) en el ganado. En este estudio se examinó la influencia de la inmunidad pasiva en el desarrollo de las lesiones pulmonares provocadas por la RS. Se emplearon dos grupos de conejos, el primer grupo recibió, por vía subcutánea, 4 ml de suero hiperimmune de conejo, preparado contra la cepa de *P. haemolytica* 82-25. El título de este suero contra el LPS de la bacteria fue de 1:2560, determinado por la prueba de hemoaglutinación pasiva. El segundo grupo no recibió suero hiperimmune, sino solución salina fisiológica (SSF). Veinticuatro horas después, los grupos fueron subdivididos. La RS se provocó inoculando por vía endotraqueal 50 µg del LPS de la misma cepa de *P. haemolytica* y, 24 h más tarde, administrando 100 µg del mismo compuesto por vía endovenosa; a estos inóculos se les denominó preparatorio y desencadenante, respectivamente. Este procedimiento se realizó tanto en animales inmunizados como no inmunizados. Además, se incluyeron animales que recibieron solamente el inóculo preparatorio o el desencadenante. Todos los animales fueron sacrificados a las 36 h posinoculación; es decir, 60 h después de la inmunización pasiva y de la administración de SSF. Se emplearon secciones del pulmón derecho para observar los cambios patológicos, mientras que el pulmón izquierdo se empleó para realizar lavados bronquioalveolares (LBA) y

determinar el número total de células y su conteo diferencial. Las lesiones reconocidas en los pulmones de los animales con RS fueron similares en severidad a las que se registraron en los conejos que recibieron únicamente la inoculación endotraqueal del LPS. Los animales que recibieron la inmunización pasiva presentaron una desproporción en las lesiones pulmonares; algunos mostraron lesiones discretas, pero en otros, éstas fueron mucho más severas que en los animales no inmunizados. Estadísticamente, se identificaron diferencias entre los animales inmunizados y los no inmunizados en lo que concierne a número total de células y conteos diferenciales, siendo los valores mayores para los conejos inmunizados. También pudo corroborarse que la respuesta inflamatoria por vía aerógena es más intensa que la generada por la vía endovenosa y que, por lo tanto, la inflamación pulmonar que se provoca en la RS ocurre primordialmente por el inóculo endotraqueal. Además, la respuesta inflamatoria inducida por la administración endotraqueal del LPS es la técnica que se potencializa cuando los animales han recibido la inmunización pasiva.

Introducción

Existen opiniones contrarias con respecto a la influencia de la inmunización pasiva sobre el desarrollo de las manifestaciones patológicas que caracterizan al estado de endotoxemia; en algunos casos se ha demostrado un efecto inhibitorio, mientras que en otros, no se ha reconocido influencia alguna.^{3,4,5,9,20} Recientemente se ha intentado inhibir la acción patológica de los LPS, mediante anticuerpos dirigidos contra las citocinas mediadoras de los efectos deletéreos.^{7,8}

Los procedimientos anteriores se han empleado para evaluar su acción sobre la RS, ya que esta es considerada como un buen indicador de los efectos patológicos de las endotoxinas.^{3,7,8,9} Recientemente se ha propuesto que la RS inducida en el pulmón presenta lesiones similares a las que ocurren naturalmente en la PN y que, por lo tanto, comparten mecanismos patológicos similares.¹⁶

En un modelo de pasteurelosis en el ratón, se han referido efectos protectores cuando se administran pasivamente anticuerpos de bovino contra *P. haemolytica*.¹⁰ Por otra parte,

Recibido para su publicación el 9 de enero de 1996.

* Este trabajo forma parte de la tesis doctoral del primer autor y fue financiado parcialmente por la SEP mediante el convenio 90-07-0201-901592 y el apoyo 91-06-017.

** Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Lázaro Cárdenas 4600, Unidad Mederos, 64930, Monterrey, Nuevo León, México.

*** Respiratory Disease Research Unit, National Animal Disease Center, Agriculture Research Service, USDA. PO Box 70. Ames, IA. 50010. USA.

Cuadro 1
DISEÑO EXPERIMENTAL

	24 horas Inmunización pasiva*	0 horas Inoculación endotraqueal	24 horas Inoculación endovenosa	36 horas sacrificio
Grupo 1	No	LPS <i>P. haemolytica</i> 50 µg/1.5 ml SSF		1 ml SSF
Grupo 2	No	1.5 ml SSF		LPS <i>P. haemolytica</i> 100 µg/ 1 ml SSF
Grupo 3	No	LPS <i>P. haemolytica</i> 50 µg/1.5 ml SSF		LPS <i>P. haemolytica</i> 100 µg/l ml SSF
Grupo 1a	Sí	LPS <i>P. haemolytica</i> 50 µg/1.5 ml SSF		1 ml SSF
Grupo 2a	Sí	1.5 ml SSF		LPS <i>P. haemolytica</i> 100 µg/1ml SSF
Grupo 3a	Sí	LPS <i>P. haemolytica</i> 50 µg/1.5 ml SSF		LPS <i>P. haemolytica</i> 100 µg/1 ml SSF

se ha informado que anticuerpos monoclonales producidos en ratón contra el LPS de la bacteria, no muestran capacidad bactericida mediada por complemento; empero, facilitan la fagocitosis *in vitro*.¹⁹ Recientemente se ha logrado éxito cuando se administra suero hiperimmune de bovino inmunizado con *P. haemolytica* viva a becerros privados de calostro, previo a un desafío intrabronquial con la bacteria.¹² Con base en lo anterior, se ha realizado este experimento que tuvo como objetivo valorar el efecto de la administración de un suero hiperimmune sobre la respuesta inflamatoria generada por el LPS de *P. haemolytica* en el pulmón de conejos mediante la RS.

Material y métodos

Animales

Al inicio del experimento, se emplearon 30 conejos Nueva Zelanda,* machos, de 2.2 kg de peso. Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales con alimento comercial y agua *ad libitum*.

Serología

Previamente, se determinó en los conejos la presencia de anticuerpos contra el LPS de *P. haemolytica*, mediante una prueba de hemaglutinación pasiva con eritrocitos de borrego adsorbidos con el LPS correspondiente.^{14*}

* Small Stock Industries, Pea Ridge, AR. USA.

** Difco, Laboratories, Inc., Detroit, MI. USA.

*** SS-34 rotor, Sorvall Centrifuge, DuPont, Wilmington, DE. USA

Coleman Model 35, Spectrophotometer, Bacharach, Inc., Pittsburgh, PA. USA.

Difco Laboratories, Inc., Detroit, MI. USA.

Lipopolisácarido

Se extrajo el LPS de una cepa de *P. haemolytica* tipo A1 denominada 82-25. El procedimiento se realizó empleando una solución compuesta por fenol, cloroformo y éter de petróleo en proporción 2:5:8, respectivamente.⁶

Antisuero

Para preparar la vacuna se usó la cepa 82-25 de *P. haemolytica* A1. La bacteria fue cultivada durante toda una noche a 37°C en 10 placas de dextrosa almidón agar.** El cultivo fue removido de las placas y suspendido en 50 ml de una solución salina 0.85 % con 0.3 formalina para mantenerlo toda una noche a temperatura ambiente. Las células bacterianas muertas se sedimentaron por centrifugación a 5900 xg*** por 5 min y luego se volvieron a suspender en una solución salina con formalina, similar a la anterior. Las células se lavaron una vez más y subsecuentemente se ajustó su concentración a 1.0×10^9 UFC/ml, empleando un espectrómetro calibrado a 600 nm. Para preparar la vacuna se emplearon 16 ml de adyuvante incompleto de Freund, depositados en un tubo de 50 ml mantenido en agitación en hielo. Luego se añadieron 15 ml de solución salina con formalina y 1.0 ml de las células de *P. haemolytica* (1.0×10^9 UFC/ml) para emulsificarse por sonificación durante 1 min en hielo. La concentración final fue de 3.1×10^8 UFC/ml de vacuna.

Se vacunaron dos conejos machos de 2.5 kg con 3.2 ml del biológico, siguiendo el procedimiento recomendado en la literatura.¹ Posteriormente, se obtuvo el suero de estos animales cuyo título contra el LPS de *P. haemolytica* cepa 81-25 fue de 1:2560, determinado mediante la prueba de hemaglutinación pasiva.¹⁴

Inmunización pasiva

Se aplicaron 4 ml del suero hiperinmune por vía subcutánea a 15 conejos; los restantes recibieron SSF.

Inoculación del LPS

Veinticuatro horas después de que los animales recibieron suero hiperinmune o SSF, se establecieron 6 grupos. Tres ellos correspondieron a los animales inmunizados pasivamente y los otros tres a los que no se inmunizaron. La RS se provocó inoculando por vía endotraqueal 50 µg del LPS de la misma cepa de *P. haemolytica* y, 24 h más tarde, administrando 100 µg del mismo compuesto por vía endovenosa; a estos inóculos se les denominó preparatorios y desencadenantes, respectivamente. Este procedimiento se realizó tanto en animales inmunizados como no inmunizados. Además, se incluyeron animales que sólo recibieron el inóculo preparatorio o el desencadenante. Los procedimientos de la inoculación preparatoria y desencadenante se han descrito con anterioridad.¹⁶ En el cuadro 1 se presenta el diseño experimental.

Necropsia y recolección de las muestras

Todos los animales fueron sacrificados a las 36 h posinoculación; es decir, 60 h después de la inmunización y de la administración de SSF. Las particularidades del procedimiento ya han sido descritas, lo mismo que el manejo de las muestras para los procedimientos histológicos.¹⁶

Lavados bronquioalveolares

El procedimiento de los LBA y el manejo de las muestras también se ha descrito con anterioridad.¹⁶

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos de los LBA concernientes al total de células, macrófagos, polimorfonucleares (PMN), linfocitos y monocitos, fueron comparados entre los diferentes grupos mediante el análisis de varianza con un diseño completamente al azar.¹⁷ Subsecuentemente, cuando se demostraron diferencias entre los grupos, se realizó una comparación mediante contrastes,¹⁷ confrontando primero los grupos inmunizados contra los no inmunizados y luego, grupos que recibieron el LPS por diferentes vías, sin importar que fueran inmunizados o no.

Cuadro 2
PLANEACION DE LOS CONTRASTES REALIZADOS ENTRE LOS DIFERENTES GRUPOS, PARA CADA UNO DE LOS VALORES OBTENIDOS DE LOS LBA

Contraste	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo la	Grupo2a	Grupo3a
1	1	1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	0	1	-1	0
3	1	0	-1	1	0	-1
4	0	1	-1	0	1	-1
5	1	0	0	-1	0	0

Como puede apreciarse en el Cuadro 2, en el contraste 1 se comparó el efecto de la inmunización pasiva. En el contraste 2 se comparó el efecto de la administración endotraqueal del LPS contra la endovenosa, incluyendo a los conejos inmunizados como a los no inmunizados.

El contraste 3 se comparó la administración endotraqueal del LPS contra la endotraqueal seguida de la endovenosa (RS), tanto en los conejos inmunizados como en los no inmunizados. En el contraste 4 se comparó la administración endovenosa del LPS contra la endotraqueal seguida de la endovenosa (RS), incluyendo a los conejos inmunizados y a los no inmunizados. Finalmente, en el contraste 5 se comparó la administración del LPS por la ruta endotraqueal en los animales inmunizados contra el mismo procedimiento de desafío en los animales no inmunizados. Para estas comparaciones se utilizaron los valores T (Totales).

Resultados

Serología

Mediante la prueba de hemoaglutinación pasiva se determinó que los animales de todos los grupos resultaron negativos al LPS de la cepa 82-25 de *P. haemolytica*.

Patología

Los conejos del grupo 1 que recibieron LPS de *P. haemolytica* por vía endotraqueal y luego, 24 h más tarde, SSF por vía endovenosa, presentaron cambios macroscópicos en sus pulmones, caracterizados por falta de colapso y pequeñas áreas de consolidación rojo-grisáceas. Cambios similares a los anteriores se apreciaron en los animales del grupo la, quienes recibieron el LPS por la misma vía, empero 24 h antes fueron inmunizados pasivamente. No obstante, vale señalar que algunos de estos animales presentaron lesiones hemorrágicas más intensas en sus pulmones.

Microscópicamente se apreció, tanto en los animales del grupo 1 como del grupo la, congestión en septos alveolares con infiltración de numerosos PMN. En la mayoría de los bronquiolos y alveolos se observó un edema rico en proteína, acompañado de numerosos PMN. En las zonas de consolidación se observó necrosis, hemorragias y un exudado serofibrinoso, también con numerosos PMN (Figuras 1 y 2). En los pulmones de los animales del grupo 2, que recibieron SSF por vía endotraqueal y posteriormente LPS por vía endovenosa, se aprecio, macroscópicamente,

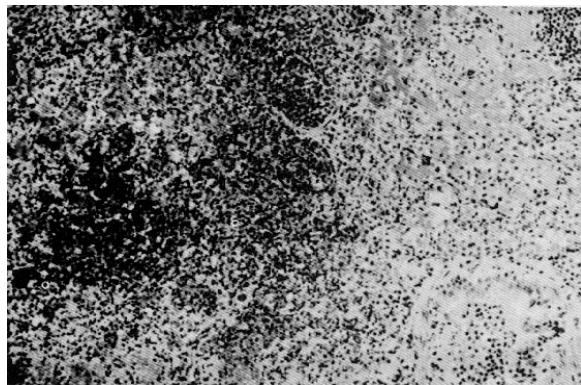


Figura 1. Pulmón. Se presenta un área de extensa consolidación con áreas de necrosis. Conejo perteneciente al grupo 1. H & E, 100x.

congestión y falta de colapso. Microscópicamente se observó edema intersticial y, en algunas áreas, alveolar.

Los PMN se encontraron infiltrando los septos y sólo ocasionalmente la luz alveolar. Estos cambios fueron similares para el grupo 2a.

Los animales de los grupos 3 y 3a que recibieron el LPS, primero por vía endotraqueal y luego endovenosa, presentaron lesiones macroscópicas y microscópicas similares a las de los grupos 1 y 1a; sin embargo, las hemorragias fueron más notorias y la presencia de un exudado alveolar serofibrinoso fue más consistente. Asimismo, las lesiones vasculares fueron más evidentes, reconociéndose vasculitis y trombosis (Figuras 3 y 4).

Lavados bronquioalveolares

Los análisis de varianza demostraron que hay diferencias entre los grupos, cuando se compara el número total de células ($P < 0.005$), macrófagos ($P < 0.05$), PMN ($P < 0.005$), linfocitos ($P < 0.005$) y monocitos ($P < 0.005$). En el Cuadro 3 se presenta el conjunto de datos. A partir de lo anterior, se buscó el origen de estas diferencias mediante los contrastes previamente planeados (Cuadro 2). Los resultados obtenidos se describen a continuación.

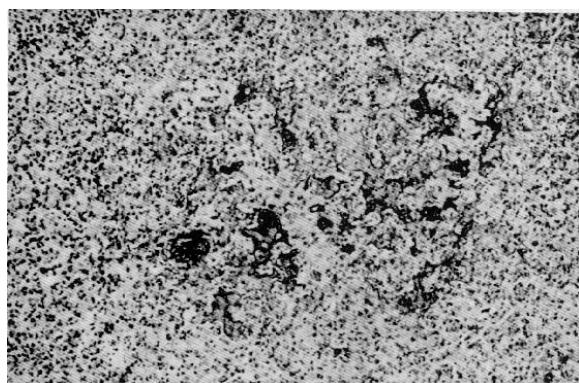


Figura 3. Se observa positividad a la presencia de fibrina en un área de consolidación y necrosis. Conejo perteneciente al grupo 3. 160x. (Lendrum Acid Picro-Mallory).

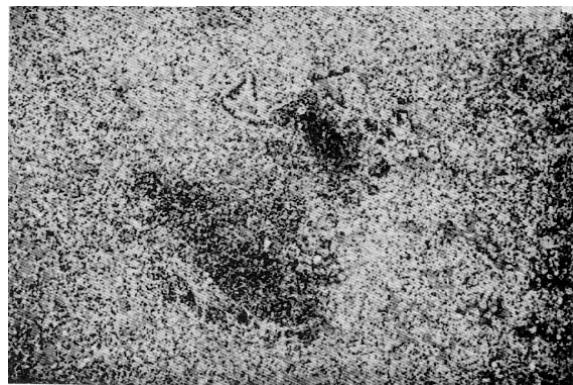


Figura 1. Pulmón. Se muestra una zona de extensa consolidación con necrosis. También se observa un exudado serofibrinoso el alveolos. Animal incluido en el grupo 1^a. H & E, 160x.

En lo concerniente al número total de células, el contraste 1, para comparar el efecto de la inmunización pasiva en los tres grupos que fueron inmunizados contra los otros tres que no lo fueron, demostró que los primeros tuvieron valores realmente mayores; sin embargo, 1 diferencias más significativas se reconocieron en los contrastes 2 y 3, en donde se demuestra que la inoculación endotraqueal (sin importar que los animales fueran o no inmunizados) es más flogística que las otras. En cambio, en el contraste 4 no se reconoce diferencia entre inoculación endovenosa y la endotraqueal seguida de 1 endovenosa (RS). Finalmente, el contraste 5 demuestra que la inoculación endotraqueal puede exacerbarse significativamente cuando los animales reciben una inmunización pasiva. En el Cuadro 4 se presentan los procedimientos.

Respecto de los valores de macrófagos alveolares, contraste 1, para comparar el efecto de la inmunización pasiva en los tres grupos que fueron inmunizados contra los otros tres que no lo fueron, fue el único que demostró diferencia. En este caso, los animales inmunizado aportaron valores mayores que los no inmunizados. El

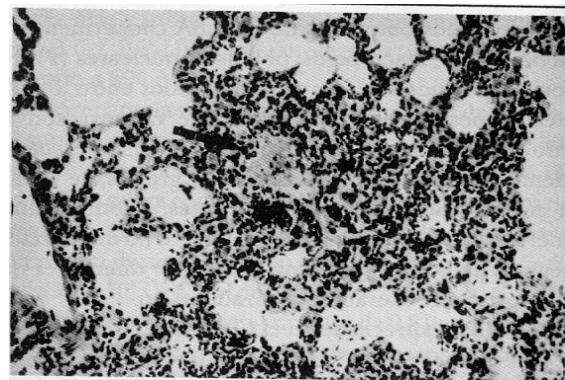


Figura 4. Se muestra un área de consolidación parcial en donde se aprecia necrosis y hemorragia. Se señala un pequeño vaso sanguíneo con vasculitis y trombosis. Conejo incluido en el grupo 3a. H & E, 400x.

Cuadro 5 muestra los procedimientos correspondientes. el caso de los PMN se demostró que no existió diferencia entre los grupos inmunizados y los no inmunizados (contraste 1). Las diferencias se presentaron cuando se comparó la ruta de inoculación endotraqueal contra la endovenosa y contra la

endotraqueal seguida de la endovenosa (RS), en los contrastes 2 y 3, respectivamente, sin importar que los animales fueran o no inmunizados. En cambio, no hubo diferencia cuando se comparó la inoculación endovenosa contra la endotraqueal seguida

Cuadro 3
PRESENTACION DE LOS VALORES: TOTAL DE CELULAS, MACROFAGOS, PMN, LINFOCITOS Y MONOCITOS

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 1 ^a	Grupo 2 ^a	Grupo 3 ^a	
Total de células	9,700.00 970.00 533.43	5,600.00 560.00 96.60	7,000.00 700.00 402.76	15,300.00 1,530.00 794.49	7,600.00 760.00 271.62	7,500.00 750.00 84.98	T M DE
Macrófagos	5,136.00 513.60 256.96	4,072.00 407.20 163.17	4,730.00 473.00 218.82	7,054.00 705.40 220.30	6,538.00 653.80 229.56	5,936.00 593.60 74.60	
PMN	4,103.00 410.30 296.17	1,237.00 123.70 138.80	1,996.00 199.60 173.49	6,888.00 688.80 561.92	713.00 71.30 38.78	1,273.00 127.30 49.72	
Linfocitos	172.00 17.20 14.71	92.00 9.20 5.45	77.00 7.70 6.23	445.00 44.50 31.02	125.00 12.50 35.61	105.00 10.50 6.41	
Monocitos	348.00 34.80 17.71	219.00 21.90 8.41	233.00 23.30 14.84	1,068.00 106.80 86.98	311.00 31.10 26.54	223.00 22.30 12.22	

T: Total; M: Media; DE: Desviación estándar. Los valores han sido estimados por ml.

Cuadro 4
COMPARACION DE LOS VALORES: TOTAL DE CELULAS, MEDIANTE CONTRASTES OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS

	$Q=\Sigma c_i y_i$	$r^{\wedge} \Sigma c_i t^2$	$SS(Q)=Q^2 / r \Sigma c_i 2$	$SS(Q)/s^2$	F	F_t	
C1	-8,100	10 (6)	1,093,500	1,093,500/MSE	5.61*	>	4.96 (1/10 gl; α 0.05)
C2	11,800	10 (4)	3,481,000	3,481,000/MSE	17.87**	>	12.83 (1/10 gl; α 0.005)
C3	10,500	10 (4)	2,756,250	2,756,250/MSE	14.15**	>	12.83 (1/10 gl; α 0.005)
C4	-1,300	10 (4)	42,250	42,250/MSE	0.21	<	3.29 (1/10 gl; α 0.01)
C5	-5,600	10 (2)	1,568,000	1,568,000/MSE	8.05**	>	6.94 (1/10 gl; α 0.025)

^a Los valores r corresponden a 10 en todos los contrastes empleados porque se realizaron dos estimaciones, tanto del número total de células como de los conteos diferenciales, de cada una de las muestras obtenidas de los LBA. Un procedimiento similar se realizó en el experimento previamente referido.¹⁶

Cuadro 5
COMPARACION DE LOS VALORES: MACROFAGOS ALVEOLARES, MEDIANTE CONTRASTES OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS

	$Q=\Sigma c_i y_i$	$r^{\wedge} \Sigma c_i t^2$	$SS(Q)=Q^2 / r \Sigma c_i 2$	$SS(Q)/s^2$	F	F_t	
C1	5,590	10 (6)	520,801.66	520,801.66/MSE	12.63**	>	10.04 (1/10 gl; α 0.01)
C2	1,580	10 (4)	62,410.00	62,410.00/MSE	1.50	<	3.29 (1/10 gl; α 0.10)
C3	1,524	10 (4)	58,064.40	58,064.40/MSE	1.40	<	3.29 (1/10 gl; α 0.10)
C4	56	10 (4)	78.40	78.40/MSE	0.00	<	3.29 (1/10 gl; α 0.10)
C5	1,918	10 (2)	183,936.20	183,936.20/MSE	4.46	<	4.96 (1/10 gl; α 0.05)

Cuadro 6 COMPARACION DE LOS VALORES: POLIMORFONUCLEARES, MEDIANTE CONTRASTES OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS						
	$Q = \sum ci_{iy}$	$r^2 \sum ci^2$	$SS(Q) = Q^2 / r \sum ci^2$	$SS(Q)/s^2$	F	Ft
C1	1,538	10 (6)	39,424.06	39,424.06 /MSE	0.51	<
C2	9,041	10 (4)	2,043,492.02	2,043,492.02 /MSE	26.83**	>
C3	7,722	10 (4)	1,490,732.10	1,490,732.10 /MSE	19.57**	>
C4	1,319	10 (4)	43,494.02	43,494.02 /MSE	0.57	<
C5	2,785	10 (2)	387,811.25	387,811.25 /MSE	5.09*	>

de la endovenosa (contraste 4). Finalmente, la inoculación endotraqueal es capaz de exacerbarse cuando previamente se inmuniza a los animales (contraste 5). Los datos respectivos se presentan en el Cuadro 6.

Cuando se analizaron los valores de linfocitos, el contraste 1, para comparar el efecto de la inmunización pasiva en los tres grupos que fueron inmunizados contra los otras tres que no lo fueron, demostró alta significancia. Lo mismo sucedió en los contrastes 2 y 3 en donde se comparó la ruta de administración endotraqueal del LPS contra la ruta endovenosa y contra la endotraqueal seguida de la endovenosa (RS), respectivamente. En estos contrastes se demostró que la ruta endotraqueal es la que provoca una respuesta inflamatoria más intensa, sin importar que los animales fueron o no inmunizados. En cambio, el contraste 4 no demostró diferencias entre la ruta endovenosa y la endotraqueal seguida de la endovenosa. Finalmente, en el contraste 5 se confirma que la ruta endotraqueal puede generar una respuesta mayor cuando los animales han sido previamente inmunizados. En el caso de los monocitos los valores de significancia encontrados en los contrastes fueron similares. Los procedimientos se detallan en los Cuadros 7 y 8, respectivamente.

Discusión

Los anticuerpos contra los LPS bacterianos tienen una relevante participación en las infecciones por bacterias Gram-negativas; por esta razón, la terapia con anticuerpos se ha considerado como un posible recurso para el tratamiento del estado de endotoxemia y choque séptico en humanos.¹⁵

Desafortunadamente, aún no se establecen categoríicamente sus efectos protectores.²⁰ Inclusive, existe debate entre la utilidad práctica de diseñar anticuerpos altamente específicos dirigidos contra la región hipervariable O del LPS o producir anticuerpos capaces de reaccionar de manera amplia contra estructuras filogenéticamente conservadas de la macromolécula, como el núcleo y el lípido A.¹⁵

Se ha considerado al LPS de *P. haemolytica* como el factor de virulencia más importante en el desarrollo de la severa bronconeumonía fibrinopurulenta que caracteriza a la pasterelosis neumónica del ganado.¹⁵ Recientemente, se ha informado de un modelo experimental en el conejo en el cual se emplea LPS de *P. haemolytica* para provocar una RS en el pulmón.¹⁶ Ahora, este modelo se ha reproducido incluyendo como variable la administración previa de suero hiperinmune, para conocer sus efectos en el desarrollo de la inflamación pulmonar.

En el presente experimento se demostró que la administración previa de suero hiperinmune no redujo la intensidad de las lesiones ni tampoco la afluencia de células inflamatorias en los alvéolos, ante un desafío con el LPS de *P. haemolytica* por cualquiera de las vías empleadas.

Esta aseveración se fundamenta tanto en las observaciones histológicas como en el análisis estadístico de los valores de las células recuperadas mediante LBA. Lo anterior concuerda con otras investigaciones en las que se refiere que la inmunización pasiva no disminuye los efectos patológicos de las endotoxinas,^{4,9,20} asimismo con un estudio en ovinos en el que se demostró que la inmunización pasiva no reduce los efectos patológicos de un desafío con *P. haemolytica*

Cuadro 7 COMPARACION DE LOS VALORES: LINFOCITOS, MEDIANTE CONTRASTES OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS						
	$Q = \sum ci_{iy}$	$r^2 \sum ci^2$	$SS(Q) = Q^2 / r \sum ci^2$	$SS(Q)/s^2$	F	Ft
C1	334	10 (6)	1,859.26	1,859.26 /MSE	8.42**	>
C2	400	10 (4)	4,000.00	4,000.00 /MSE	18.12**	>
C3	435	10 (4)	4,730.62	4,730.62 /MSE	21.43**	>
C4	35	10 (4)	30.62	30.62 /MSE	0.13	<
C5	273	10 (2)	3,762.45	3,762.45 /MSE	16.88**	>

Cuadro 8
COMPARACION DE LOS VALORES: MONOCITOS, MEDIANTE CONTRASTES OBTENIDOS DE LOS DIFERENTES GRUPOS

	$Q = \Sigma ciyi$	$r^2 \Sigma ci^2$	$SS(Q) = Q^2 / r \Sigma ci^2$	$SS(Q)/s^2$	F	F_t
C1	802	10 (6)	10,720.06	10,720.06 /MSE	7.12** >	6.94 (1/10 gl; α 0.025)
C2	886	10 (4)	19,624.90	19,624.90 /MSE	13.04** >	12.83 (1/10 gl; α 0.005)
C3	960	10 (4)	23,040.00	23,040.00 /MSE	15.31** >	12.83 (1/10 gl; α 0.005)
C4	74	10 (4)	136.90	136.90 /MSE	0.09 <	3.29 (1/10 gl; α 0.10)
C5	-720	10 (2)	25,920.00	25,920.00 /MSE	17.23** >	12.83 (1/10 gl; α 0.005)

administrada por aerosol.¹⁸ En un informe reciente en el que se describen efectos favorables mediante el uso de suero hiperimmune en becerros privados de calostro, debe destacarse que el inmunógeno utilizado para producir el suero hiperimmune fue *P. haemolytica* viva.¹² En cambio, cuando se utilizaron como inmunógenos el sobrenadante del cultivo y el LPS de la bacteria, los sueros hiperinmunes correspondientes demostraron una capacidad de protección mínima o nula.¹² Estas observaciones también son compatibles con los resultados del presente experimento porque el suero hiperimmune que aquí se utilizó se obtuvo de la inmunización con una bacterina convencional y, por ende, tuvo un título elevado contra el LPS de la bacteria.

Con base en lo anterior puede afirmarse que los anticuerpos producidos mediante procedimientos de inmunización rutinarios, utilizando bacterinas convencionales de *P. haemolytica*, no ofrecen protección cuando se utilizan para proveer de un estado de inmunidad pasiva contra las neumonías causadas por esta bacteria. Por el contrario, en este experimento la respuesta inflamatoria y el daño pulmonar fueron más intensos en los animales que recibieron el suero hiperimmune. Al respecto, existen informes en los que se destaca la presentación de una respuesta inflamatoria desfavorable cuando los bovinos son inmunizados con bacterinas convencionales y luego se someten a un desafío con *P. haemolytica*, a pesar de que se logra inducir una intensa respuesta inmune humoral.^{2,11}

Por otra parte, las lesiones que aquí se produjeron son similares a las referidas en un experimento anterior, en donde se describe la histopatología de la reacción de Schwartzman en el pulmón;¹⁶ empero, también son parecidas a las que se describen en modelos de inflamación pulmonar mediados por complejos inmunes.^{13,21} Es probable que la razón de estas similitudes, a pesar de las evidentes diferencias en los mecanismos patológicos para generar el daño pulmonar, estriba en que, al igual que en otros tejidos, el pulmón responde de manera estereotipada ante el insulto y no permite discernir el origen de un fenómeno inflamatorio agudo.

En este experimento se advierte que la respuesta inflamatoria generada por la administración endotraqueal del LPS, es la que contribuye mayormente a generar la respuesta inflamatoria pulmonar, en tanto que la contribución flogística de la subsecuente administración endovenosa en el desarrollo de la RS es menor. Esta situación ya había sido reconocida en el experimento anterior,¹⁶ en donde se señala que la

administración endovenosa de LPS produce un secuestro masivo de PMN en los capilares pulmonares y que por esto se recuperan menos células de los LBA.¹⁶

El presente trabajo confirma la utilidad del conejo para el estudio de la respuesta inflamatoria pulmonar con LPS de *P. haemolytica*, lo que a su vez confirma también la relevancia de este factor de virulencia en la patogenia.

Abstract

The local Schwartzman reaction (SR) can be induced in the lungs of rabbits with *Pasteurella haemolytica* (type A1) lipopolysaccharide (LPS). Lesions resemble, in part, those seen in pneumonic pasteurellosis of cattle. In this study, the effect of antibodies on the intensity of the SR was examined in rabbits. One group was passively immunized with 4 ml of antiserum obtained from rabbits immunized with a whole-cell bacterin (*P. haemolytica* strain 82-25, IHA titre to strain 82-25 LPS was 1:2560). The other group was not immunized. At 24 h post-immunization (PI) rabbits in both groups were subdivided. The SR was induced in both, immunized and non-immunized rabbits by injecting a 50 Ng preparatory dose of LPS intratracheally (IT), followed 24 h later (48h PI) by a 100 Ng provocative dose of LPS intravenously (IV). Control groups received LPS IT/pyrogen free saline (PFS) IV or PFS IT/LPS IV. At 12 h after IV inoculation (60 h PI), all rabbits were euthanized and exsanguinated. Sections of the right lung were taken to determine histopathological changes and the left lung was lavaged (bronchoalveolar lavages [BAL]) to determine total and differential cell counts. The histopathological changes seen in the SR were similar to those seen in rabbits that received LPS IT/PFS IV, indicating that lesions were primarily in response to IT LPS inoculation. Passive immunization of rabbits resulted in a variable inflammatory response to the LPS; some rabbits had mild lung lesions, but others had more severe lesions than non-immunized rabbits. There were also differences in the total and differential BAL cell counts between immunized and non-immunized rabbits. The passive immunized groups had higher cell counts. It can be concluded that, IT LPS inoculation was more inflammatory than IV LPS and IT LPS/IV LPS (SR) in either passively or non-immunized rabbits and that passive immunization exacerbates the lung inflammatory response.

Literatura citada

1. Al Aubaidi,J. and Fabricant,J.: Characterization and classification of bovine *Mycoplasma*. *Cornell Vet.*, 61:490-518 (1971).
2. Alwis de, M.C.L.: Pasteurellosis in production animals: A review. Proceedings No. 43. Pasteurellosis in Production Animals. Bali, Indonesia. 1992.11-22. *Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)*. Canberra, Australia (1993).
3. Braude, A.I.: Endotoxin immunity. In: Advances in Internal Medicine.Vol. 26. Edited by: Stollerman, G.H., 427-445. *Year Book Medical Publishers*, Chicago, Illinois, 1980.
4. Cullor,J.S.: Shock attributable to bacteremia and endotoxemia in cattle: Clinical and experimental findings. *J. Am. vet. med. Ass.*, 200: 1894-1902 (1992).
5. Danner, R.L.: Mediators and endotoxin inhibitors. *Ann. Intern. Med.*, 113:235-237 (1990).
6. Galanos,C.,Luderitz,O. and Westphal,O.: A new method for extraction of R-lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem*, 9: 245-249 (1969).
7. Grau, G.E., Vesin, C., Groote de, D., Delacroix, D., Gysler, C., Piguet, P.F. and Lambert, P.H.: Prevention of human TNF-induced cutaneous Shwartzman reaction and acute mortality in mice treated with anti-human TNF monoclonal antibodies. *Clin. exp. Immunol.*, 84: 411-414 (1991).
8. Heremans, H., Damme van, J., Dillen, C., Dijkmans, R. and Billiau, A.: Interferon, a mediator of lethal lipopolysaccharide induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J exp. Med.*, 171:1853-1869 (1990).
9. Mashimo, J. Mizutani, T., Mita, A. and Kasai, N.: Neutralization of Shwartzman-inducing activity by antibodies recognizing the Recore or lipid A structures of lipopolysaccharide from *Salmonella minnesota* R595 and *Pseudomonas vesicularis* JCM1477. *Microbiol Immunol*, 35:423-434 (1991).
10. McVey, D.S. and Loan, R.W.: Antibody complement-dependent bacteriolysis in experimentally induced pasteurellosis in mice. *Am. J vet. Res.*, 50:762-768 (1989).
11. Mosier, D.: Prevention and control of pasteurellosis. Proceedings No. 43. Pasteurellosis in Production Animals. Bali, Indonesia. 1992.121-134. *Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)*. Canberra, Australia (1993).
12. Mosier, DA., Simons, K.R. and Vestweber,J.G.: Passive protection of calves with *Pasteurella haemolytica* antiserum. *Am J vet. Res.*, 56: 1317-1321 (1995).
13. Olenchock, SA.: Animal models of hypersensitivity pneumonitis: A review. *Ann. Allergy*, 38:119-126 (1977).
14. Phillips, M., Rimler, R.B. and Rebers, PA.: Failure of ribosomes from nonencapsulated *Pasteurella multocida* to protect CF-1 mice. *Am. J vet. Res.*, 42:1769-1774 (1981).
15. Pollack, M., Koles, N.L., Preston, M J., Brown, B J. and Pier, G.B.: Functional properties of isotype-switched immunoglobulin M (IgM) and IgG monoclonal antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, 63: 4481- 4488 (1995).
16. Ramírez-Romero, R., Brogden, KA. y Cutlip, R.C.: Inducción de la reacción de Shwartzman en el pulmón del conejo mediante el empleo de lipopolisacárido de *Pasteurella haemolytica*. *Vet. Méx.*, 27: 299-307 (1996).
17. Steel, R.G.D. and Torrie, J.H.: Principles and Procedures of Statistics. A Biometrical Approach. 2nd ed. *McGraw-Hill Singapore*, 1981.
18. Wells, P.W., Evans, H.B., Burrells, C., Sharp JM. Gilmour, N J.L., Thompson, DA. and Rushton, B.: Inability of passively acquired antibody to protect lambs against experimental pasteurellosis. *Infect. Immun.*, 26.25-29 (1979).
19. Wilson, C.F., Sutherland, A.D., Inglis, L. and Donachie, W.: Characterization and biological activityof monoclonal antibodies specific for *Pasteurella haemolytica* Al capsule and lipopolysaccharide. *Vet. Microbiol*, 31:161-168 (1992).
20. Wolff, SM.: Monoclonal antibodies and the treatment of Gram-negative bacteremia and shock. *New Engl. J. Med.*, 324: 486-487 (1991).
21. Yoshizawa, Y., Tanoue, M., Yano, H., Sato, T., Ohtsuka, M., Hasegawa, S. and Kimura, Y.: Sequential changes in lung injury induced by preformed immune complexes. *Clin. Immunol. Immunopath.*, 61:376-386 (1991).