

EVALUACIÓN DE LAS LESIONES MICROSCÓPICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE TRÁQUEAS DE POLLITOS INOCULADOS CON *Mycoplasma gallisepticum*

MA Petruccelli^{1,2}, MV Píscopo, MF Unzaga¹, RO Cerdá¹, FP Marino¹

¹Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos, ²Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: Diversos trabajos describen los cambios producidos en la tráquea de pollitos desde los 6 días pos desafío y en animales de variadas edades inoculados con *Mycoplasma gallisepticum*. El objetivo de este trabajo fue describir los cambios microscópicos y ultraestructurales de tráqueas de pollitos hasta los 18 días de vida, inoculados con una cepa patógena de *M. gallisepticum*, y sacrificados a las 24, 48 y 72 horas y 6, 12 y 18 días pos inoculación (PI). Las tráqueas fueron procesadas con técnicas convencionales de rutina, tanto para microscopía óptica (MO) como para microscopía electrónica de transmisión (MET). Mediante MO se observaron cambios a las 24 horas PI, con un ligero edema y presencia de células inflamatorias, principalmente linfocitos en la submucosa. Estos cambios fueron más evidentes a las 48 y 72 horas PI, y mucho más intensos a los 6, 12 y 18 días PI. Con MET a las 48 horas PI los micoplasmas se encontraron adheridos a las cilias, al mismo tiempo se observó pérdida de numerosas cilias y vacuolización en el citoplasma celular. Estas lesiones se observaron en muchas células epiteliales y se caracterizaron por la presencia de las mitocondrias vacuolizadas con pérdida de las crestas, el retículo endoplásmico dilatado y múltiples vacuolas en el citoplasma de variado tamaño. Se concluye que *M. gallisepticum*, es capaz de producir lesiones en las células epiteliales traqueales en pollitos de un día de vida tan pronto como 48 h PI.

Palabras claves: pollitos, *Mycoplasma gallisepticum*, lesiones traqueales tempranas

MICROSCOPIC AND ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF TRACHEAL LESIONS IN CHICKENS INDUCED BY *Mycoplasma gallisepticum*

ABSTRACT: Chronic Respiratory Disease caused by *Mycoplasma gallisepticum* has different clinical presentations. The respiratory form is the most important and is characterized by tracheitis, pneumonia and airsacculitis. Several works have been described tracheal changes produced since 6 days post inoculation in different ages animals. The purpose of this work was to describe microscopic and ultrastructural changes in 1 day old chickens tracheas. One-day-old chickens were inoculated with pathogen strain of *Mycoplasma gallisepticum*, and were sacrificed at 24, 48 and 72 hours, and at 6, 12 and 18 days post inoculation (PI). Changes at 24 hours post inoculation such as mild edema and presence of inflammatory cells, especially lymphocytes in the submucous membrane were observed with light microscopy. These changes were more evident at 48 and 72 hours PI being more intense at 6, 12 and 18 days PI. Mycoplasmas bound to cilias have been seen 48 hours PI, showing at the same moment loss of the cilias and vacuolization of the cytoplasm cell. These lesions become more severe, vacuolized mitochondrias, which had lost their cristae, and enlarged endoplasmic reticulum and many different size vacuoles in the cytoplasm were observed. The results showed that *M. gallisepticum* induced lesions in tracheal epithelium cells of chickens as early as 48 hours post inoculation

Key words: chickens, *Mycoplasma gallisepticum*, early tracheal lesions

Fecha de recepción: 29/12/03

Fecha de aprobación: 31/05/04

Dirección para correspondencia: M.A. Petruccelli, Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos. CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: petru@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La enfermedad respiratoria crónica producida por el *Mycoplasma gallisepticum*, es una enfermedad que tanto en sus formas clínica como subclínica, produce importantes pérdidas económicas en las explotaciones avícolas.

La presentación más importante es su forma respiratoria, afectando a la tráquea, pulmones y los sacos aéreos. Las lesiones más significativas son traqueítis, neumonía y aerosaculitis, la infección muchas veces subclínica predispone a la aparición de otras, sobre todo la presencia de *Escherichia coli*, que no hace más que agravar el cuadro produciendo mortalidades significativas en los lotes.

La relevancia de esta entidad se desprende por las pérdidas económicas que ocasionan en la industria avícola, debido básicamente al aumento del índice de conversión alimenticia y a la depreciación del valor de la canal y obviamente por la mortalidad.

Numerosos estudios (1, 2, 3) indican que el *M. gallisepticum* es un organismo extracelular, que se adhiere a la membrana celular a través de pequeñas gemaciones de la misma, induciendo cambios degenerativos en la célula huésped (1). Diversos trabajos describen los cambios producidos en la tráquea desde los 6 días pos desafío y en animales de variadas edades, tales como, 7, 35, 55 días y 10 semanas de vida (1, 4, 5).

El objetivo de este trabajo es el de describir los cambios microscópicos y ultraestructurales en tráqueas de pollitos hasta los 18 días de vida, inoculados con una cepa patógena de *M. gallisepticum* a partir de las 24 horas pos-inoculación (PI).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 18 pollitos parrilleros comerciales de 1 día de vida libres de anticuerpos contra *M. gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*, los que fueron desafiados vía aerosol con una cepa patógena de referencia de *M. gallisepticum* (K-781) con un título de 10^8 UFC/ml (unidades formadoras de colonias). Esta cepa fue adaptada al medio de cultivo de Frey con el agregado de 12% de suero porcino. Se realizaron pasajes de 0,2 ml de medio inoculado en medio fresco a fin de obtener colonias en fase de crecimiento logarítmico (colonias de 24 horas que hayan

cambiado el pH, detectado por cambio de color del medio, de rojo púrpura a amarillo anaranjado).

A las 24, 48 y 72 horas y 6, 12 y 18 días PI fueron sacrificados 3 pollitos por vez. Para estudios con microscopía óptica, las tráqueas fueron fijadas en formol neutro al 10%, embebidas en parafina, cortadas y coloreadas con Hematoxilina y Eosina. Para microscopía electrónica las tráqueas fueron fijadas en glutaraldehído al 2%, embebidas en resinas sintéticas, cortadas y contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranilo. Para realizar los estudios ultraestructurales se utilizó un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL, Jem 1200 EX II.

RESULTADOS

El estudio mediante microscopía óptica reveló cambios a las 24 horas PI, los mismos consistieron en ligero edema y la presencia de células inflamatorias, principalmente linfocitos, que comenzaron a observarse en la submucosa. Estos cambios se fueron haciendo más evidentes 48 y 72 horas PI. A los 6 días PI se observó un notable engrosamiento de la membrana mucosa, con aplanamiento de las células epiteliales, pérdida de las cilias y abundante exudado inflamatorio. Estos cambios fueron más intensos a los 12 y 18 días PI, donde el engrosamiento de la membrana mucosa fue más marcado, debido al exudado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, algunas células plasmáticas y muy pocos heterófilos. También se observó la desaparición de las cilias, núcleos picnóticos y vacuolización del citoplasma llegando en muchos lugares a la exfoliación de las células epiteliales.

El estudio ultraestructural reveló la presencia de estructuras compatibles con micoplasmas a las 24 horas PI, los mismos se observaron libres en la luz traqueal o incluidos en el mucus sin llegar a las cilias, presentaron una forma redonda u oval de aproximadamente 300 a 700 nm. El epitelio traqueal se observó sin alteraciones, se conservó tanto la integridad de las cilias y microvellosidades como en su número. A las 48 horas PI los micoplasmas se encontraron adheridos a las cilias y membrana celular (Foto 1), al mismo tiempo se comenzó a observar la pérdida de cilias y vacuolización en el citoplasma de las células epiteliales. A las 72 horas PI tanto la vacuolización del citoplasma como la dilatación del retículo endoplásmico se hicieron mucho más evidentes.

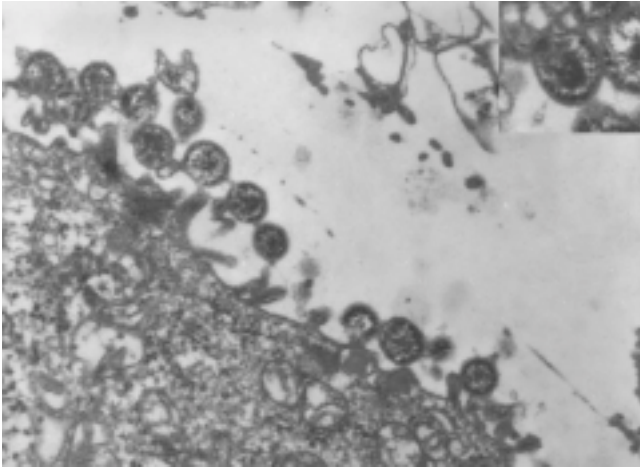


Foto 1. Fotografía electrónica: 48 horas PI. Numerosos *Mycoplasmas* adheridos a la pared celular y cilias, pérdida de cilias, vacuolización citoplasmática y pérdida de crestas mitocondriales. x 27.000 Insertado: se observa un micoplasma adherido a la pared por medio de su "bleb" o yema. x 67.500

Photo 1. Electron photography: 48 hours PI. Multiple *Mycoplasmas* bound to the wall cells and cilia, loss of cilia, cytoplasmic vacuolization and loss of mitochondrial cristae. x 27.000. Attached: A *Mycoplasma* bound to the wall cell by its bleb is observed x 67.500.

A partir de los 6 días PI, la vacuolización citoplasmática se incrementó, a los 12 y 18 días PI se observaron acumulo de micoplasmas adheridos a la superficie de las células por medio de sus yemas o "blebs" (Foto 1), la desaparición de las cilias fue total. En muchas células epiteliales las mitocondrias se observaron vacuolizadas con pérdida de las crestas, el retículo endoplásmico dilatado y múltiples vacuolas en el citoplasma de variado tamaño. También se observaron en la luz de la tráquea células epiteliales libres con procesos degenerativos y heterófilos libres. En el sitio de adhesión de los micoplasmas a las células fue claramente visible la integridad de las membranas (Foto 2), en algunos micoplasmas adheridos a la membrana celular apareció como si estuvieran fusionados a la pared celular, sin embargo no hubo fusión de membranas, siendo esto efecto del corte oblicuo.

DISCUSIÓN

La morfología, tamaño y ultraestructura del micoplasma coincidió con los hallazgos de Domermuth y col. (6) Las lesiones microscópicas y ultraestructuras observadas fueron similares a las halladas por diferentes autores. Sin embargo muchos de éstos han trabajado con

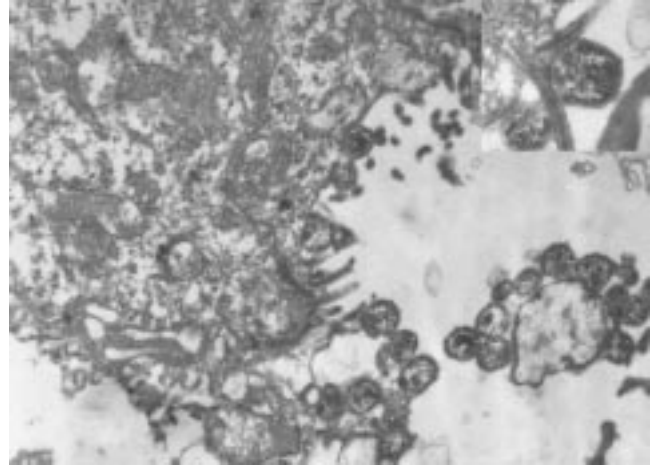


Foto 2 Fotografía electrónica: 6 días PI. Numerosos *Mycoplasmas* adheridos a la pared celular, pérdida de cilias, vacuolización citoplasmática y del retículo endoplásmico y pérdida de crestas mitocondriales. x 21.800 Insertado: un *Mycoplasma* adherido a la pared donde claramente se observa la integridad de las membranas. x 36.500.

Photo 2. Electron photography: 6 days PI. Multiple *Mycoplasmas* bound to the wall cells, loss of cilia, cytoplasmic and endoplasmic reticulum vacuolization and loss of mitochondrial cristae. x 21.800. Attached: A *Mycoplasma* bound to the wall cells showing membrane integrity. x 36.000

aves a partir de los 7 días de vida (1), 35 y 55 días (4) e incluso hasta las 10 semanas de vida (5). De la bibliografía consultada no se encontraron referencias de pollitos de 1 día de vida sometidos a una infección por *M. gallisepticum*, si consideramos la alta incidencia de este agente en nuestro medio, la posibilidad de infecciones tempranas son mucho más que posibles.

Tajima y col (1) y describen las lesiones histológicas a partir de los 6 días con engrosamiento de la membrana mucosa traqueal, edema y vacuolización de células epiteliales, pérdida de cilias y exudado inflamatorio con heterófilos y células necrosadas. Estas lesiones se hicieron más severas a los 12 días por inoculación, coincidiendo con el trabajo de Nunoya y col. (4) también fue posible observar acúmulos de linfocitos en la submucosa traqueal y perivascular, éstos son considerados como una respuesta normal del aparato inmune (7) para producir anticuerpos contra la invasión de micoplasmas.

Nuestro estudio por microscopía electrónica pudo demostrar que a las 48 horas PI los micoplasmas ya se encontraban adheridos a las cilias, comenzando a verse vacuolización del

citoplasma y pérdida de cilias. A los 6 días posinoculación numerosos micoplasmas se observaron adheridos a cilias y membrana celular a través de sus yemas o "bleb", esto es coincidente con diversos trabajos publicados (1, 2, 3), encontrándose también en las células epiteliales gran vacuolización en el citoplasma y en las mitocondrias, con pérdida casi completa de cilias y microvellosidades. Estos hallazgos concuerdan con los descritos por Tajima y col (1) y Charlier y col (8), mientras que difieren de lo expresado por Dykstra y col (9), quienes señalan que la pérdida de cilias de células individuales fue infrecuente.

Si bien dentro de los objetivos no se planteó el estudio de la signología clínica, la misma se consignó, no observándose signos hasta los 12 días de vida. Correlacionando éstos con las lesiones encontradas podemos inferir que el micoplasma puede invadir las vías respiratorias desde el primer día de vida, sin hacerse evidente clínicamente hasta varios días después. Estas observaciones refuerzan la idea de las medidas de bioseguridad que deben ser tomadas en la crianza de pollitos desde el momento mismo de la llegada a los galpones, el *M. gallisepticum*, tan pronto como 48 horas PI es capaz de producir lesiones en las células epiteliales traqueales en pollitos de 1 día de vida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tajima M, Nunoya T, Yagihashi T. An ultrastructural study on the interaction of *Mycoplasma gallisepticum* with the chicken trachea epithelium. *Am J Vet Res.* 1979; 40 (7): 1009-1014.
2. Levisohn SE. Early stages in the interaction between *Mycoplasma gallisepticum* and the chick trachea, as related to pathogenicity and immunogenicity. *Is J Med Sci.* 1984; 20 (10): 982-984.
3. Uppal PK, Chu HP. Attachment of *Mycoplasma gallisepticum* to the tracheal epithelium of fowls. *Res Vet Sci.* 1977; 22 (2): 259-260.
4. Nunoya T, Tajima M, Yagihashi T, Sannai S. Evaluation of respiratory lesions in chickens induced by *Mycoplasma gallisepticum*. *Jpn J Vet Sci.* 1987; 49: 621-629.
5. Yagihashi T, Tajima M. Antibody responses in sera and respiratory secretions from chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 1986; 30 (3): 543-550.
6. Domermuth CH, Nielsen M, Freundt EA, Birch-Andersen A. Gross morphology and ultrastructure of *Mycoplasma gallisepticum*. *J Bacteriol.* 1964; 88: 1428-1432.

7. Cassell G, Lindsey JR, Baker HJ. Immune response of pathogens-free mice inoculated intranasally with *Mycoplasma pulmonis*. *J Immunol.* 1974; 112: 124-136.

8. Charlier G, Meulemans G, Halen P. Microscopic and ultramicroscopic lesions from experimental mycoplasma infection in respiratory tract of chickens. Possible difference between pathogenic and non pathogenic strains. *Ann Rech Vet.* 1981; 12 (2): 183-191.

9. Dykstra MJ, Levinsohn S, Fletcher OJ, Kleven SH. Evaluation of cytopathologic changes induced in chicken trachea epithelium by *Mycoplasma gallisepticum* *in vivo* and *in vitro*. *Am J Vet Res.* 1985; 46 (1): 116-122.