

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias
Veterinarias

EFFECTO DE LA INTOXICACION CRONICA CON AFLATOXINA B1 SOBRE LA
RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR PASTEURELLA MULTOCIDA EN CONEJOS

María Cecilia Venturini

DIRECTOR
Dr. Carlos J. Perfumo

Lugar de trabajo: Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos
Instituto de Patología "Dr. Bernardo Epstein"
Facultad de Ciencias Veterinarias. U.N.L.P

AÑO 1989

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Presidente : Dr. Angel Plastino

Vicepresidente : Lic. Angel Tello

Secretario General : Ing. Carlos Rastelli

Secretario de Coordinación
Institucional de la Presidencia : Lic. Julio Barandiarán

Secretario de Asuntos Académicos : Prof. Ural Pérez

Secretario de Ciencia y Técnica : Dr. Osvaldo Ferrer

Secretario de Extensión Cultural
y Difusión : Odont. Marcelo Seghini

Prosecretaria General : Cra. Mercedes Molteni

Secretario de Asuntos Económico-
Financieros : Cr. Aldo Rossi

Guardasellos : Ing. Andrés Ringuelet

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Decano : Dr. Alberto Dibbern

Vice-Decano : Dr. Eduardo Pons

Secretario de Asuntos Académicos : Dr. Rogelio Bruniard

Secretario de Extensión Universitaria : Dra. Sandra Arauz

Secretario de Supervisión Administrativa: Cr. Edgardo Silvera

Secretaria Administrativa : Nelly Erdmann

Directora de Biblioteca : Marta Bernardi

Directora de Enseñanza : Clelia Norma Giuffre

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

CATEDRAS

PROFESORES A CARGO

PRIMER AÑO

Anatomía Descriptiva	Dra. Cristina Alonso
Histología y Embriología	Dr. Félix Moreno
Bioquímica	Dr. Angel Catalá
Introducción a la Biofísica	Dr. Miguel Noia

SEGUNDO AÑO

Anatomía Comparada	Dra. Cristina Alonso
Patología General	Dr. Alcides Martín
Fisiología	Dr. Eduardo Zaccardi
Microbiología	Dr. Juan Martino
Genética y Biometría	Ing. Fernando Dulout

TERCER AÑO

Anatomía y Fisiología Patológicas	Dr. Alcides Martín
Semiología y Propedéutica	Dr. Jorge Andreatta
Farmacología, Farmacot. y Terapéutica	Dr. Jorge Errecalde
Medicina Operatoria	Dr. Pablo Videla
Parasitología y Enf. Parasitarias	Dra. Lucila Venturini
Zootecnia General y Agrostología C.A.	Dra. Liliana Lagreca

CUARTO AÑO

Zootecnia Especial I Parte (O.S.C.)	Dr. Eduardo Marotta
Zootecnia Especial II Parte (B.E.)	Dr. Benjamín Rodríguez
Zootecnia Especial III Parte (A.P.)	Dr. Rodolfo Perotti
Economía Agraria	Dr. Erico Panzoni
Enfermedades Infecciosas	Dr. Carlos Amasino
Patología Médica	Dr. Fortunato Iseas
Pat. Quirúrgica y Podología	Dr. Francisco Boccia
Pat. de Aves y Pilíferos	Dr. Néstor A. Menéndez

QUINTO AÑO

Tecnología y Sanidad de los Alimentos	Dr. Jorge Lasta
Higiene, Epidemiología y Salud Pública	Dr. Emilio Gimeno
Inmunología General Aplicada	Dr. Enrique Pennimpe
Reproducción Animal	Dr. Miguel Russo
Clínica de Pequeños Animales	Dra. Lydia Pracca
Clínica de Grandes Animales	Méd. Vet. Juan Renner

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos y cada uno de los que se hayan sentido partícipes en la elaboración de este trabajo y en particular a:

El Dr. Carlos Perfumo quien me ha guiado en mi formación científica, brindándome su permanente estímulo, apoyo y colaboración.

Al personal docente y no docente de la Cátedra de Patología de Aves y pilíferos por haberme acompañado afectuosamente.

Al Dr. Carlos Gomez y al Dr. Enrique Pennimpe, de quienes he recibido colaboración desinteresada y aportes creativos en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Miguel Risso por su dedicación en la elaboración del diseño experimental y en el análisis estadístico de los resultados, así como su constante colaboración.

A la Dras. Celina Buscaglia y Cecilia Di Lorenzo, quienes amablemente han compartido mi trabajo.

A la Dra. Lucila Venturini, por haberme orientado en el inicio de mi formación profesional.

Al Dr. Angel Catalá por haberme ofrecido su laboratorio para realizar una parte de este trabajo.

A la Dra. Cecilia Castellano, quien también colaboró en la corrección de esta tesis.

I N D I C E

RESUMEN.....	I
SUMMARY.....	III
1. INTRODUCCION	1
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y METODOS:	
3.1. Fuente de Aflatoxina	7
3.2. Animales de experimentación	7
3.3. Diseño de los experimentos	8
3.4. Vacuna experimental de <i>Pasteurella multocida</i>	10
3.5. Primer experimento:	
3.5.1. Determinación de anticuerpos vacunales	11
3.5.2. Desafío con la bacteria viva	12
3.5.3. Estudio anatomopatológico macro y microscópico	13
3.5.4. Evaluación estadística de los resultados	15
3.5.5. Control Clínico	15
3.6. Segundo experimento:	
3.6.1. Determinación de la inmunidad mediada por células	15
3.6.2. Prueba cutánea de hipersensibilidad	18
3.6.3. Determinación de la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares (M.A.).....	18
3.6.4. Evaluación estadística de los resultados	20
3.7. Evaluación de la ganancia semanal de peso	20
4. RESULTADOS	21
5. DISCUSION	25
6. CONCLUSIONES	30

TABLAS Y GRAFICOS.....	31
FOTOS.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	68

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comprobar el efecto inmunodepresor de las aflatoxinas(AFL) en el conejo, evaluado mediante la comparación,entre grupos tratados y no tratados con la misma, del grado de protección conferido por una vacuna experimental contra la pleuroneumonía producida por Pasteurella multocida(P.m). Para ello se realizaron dos experimentos utilizando 18 conejos en cada uno, distribuídos en bloques aleatorizados y divididos en tres grupos: grupo T, testigos; grupo V, vacunados con 2 dosis de una vacuna oleosa doble emulsión contra P.m serotipo 3,12:A, con 15 días de intervalo; grupo VA, vacunados y a los que se les suministró 0.05 mg/kg de peso de AFL B1 equivalente, durante 44 y 69 días.

No se observaron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos vacunales entre los grupos V y VA. Luego del desafío con la cepa viva de P.m serotipo 3,12:A, hubo diferencias en la extensión de las lesiones macroscópicas en el pulmón, entre los tres grupos, la que fue significativamente mayor en el grupo T con respecto a los vacunados y en el grupo VA con respecto al V. En cuanto a las lesiones microscópicas, clasificadas de 0 a 3 de acuerdo a su severidad, para el grado 3 el grupo V no presentó lesiones.

El índice de estimulación (IE), utilizado para expresar los resultados de la prueba de transformación blástica de los linfocitos periféricos, fue superior en el grupo V, con respecto a T y VA, en los que se obtuvieron valores menores a 1. No se observaron diferencias,entre los grupos V y VA, en la prueba cutánea con fitohemaglutinina(PHA). Mediante la prueba de capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares(MA), se comprobó que los MA de los animales del grupo T en presencia de sus propios sueros, fueron los que presentaron valores más altos de fagocitosis, mientras que los macrófagos de los animales del grupo V, en presencia de sus sueros, presentaron el mayor porcentaje de adherencia.

Sobre la base de los resultados obtenidos se demuestra una menor resistencia adquirida frente al desafío en el grupo VA y que la misma no está relacionada con los títulos de anticuerpos, sugiriéndose en parte un compromiso de la inmunidad mediada por células. No se observó un efecto estimulador de la capacidad fagocítica de los MA por acción de la vacuna, si en cambio un mayor porcentaje de adherencia. Así mismo, no se comprobó un efecto negativo de la AFL B1 sobre la capacidad fagocítica de los MA. Se discuten los hallazgos con aquellos obtenidos por otros autores.

SUMMARY

The aim of this research was to assess the immunosuppressive effect produced by aflatoxins (AFL) in rabbits. This was performed through the comparative study of the level of protection provided by an experimental vaccine against Pasteurella multocida (P.m) pleuropneumonia. Two experiments were carried out with 18 rabbits each, randomly assigned into blocks and divided in 3 groups: group T, control; group V, vaccinated with an oil adjuvated 3,12:A serotype P.m experimental vaccine, twice at 15 days intervals; group VA, vaccinated plus aflatoxin B1, 0.05 mg/kg/day, P.O during 44 and 69 days. Significant differences were not observed in the titers of agglutinating antibodies between groups V and VA. Significant differences in the extent of macroscopic lung lesions among the 3 groups were observed after the challenge with a 3,12:A strain of P.m; the higher score occurred in group T, as compared to the vaccinated groups, and in group VA as compared to group V. Microscopic lesions were classified according to their severity in grades 0 to 3. No grade 3 lesions were detected in group V.

The stimulation index (IE) used to express the results of the lymphocyte transformation test, was higher in group V as compared to groups T and VA, in which the obtained values were under 1. No differences were observed in the phytohemagglutinin (PHA) intradermal skin test between groups V and VA. Phagocytic capacity test of alveolar macrophages (MA) demonstrated that MA from animals belonging to group V in the presence of their own sera showed the highest phagocytic percentage and that from animals belonging to group V in the presence of their own sera presented the higher adherence percentage.

Results demonstrated that group VA possessed a lower acquired resistance to the challenge and that this did not correlate to the antibody titers,

this findings suggests an impaired cellular immune response. An stimulating effect of the vaccine on phagocytic capacity of MA was not observed but a higher adherence was detected. A negative effect of AFL B1 on phagocytic capacity of MA was not recognized. Results are discussed and compared with those observed by other authors.

1. INTRODUCCION

Las aflatoxinas (AFL) son metabolitos tóxicos producidos por ciertas cepas de hongos del género *Aspergillus*, de las especies *flavus* y *parasiticus*, -- las que desarrollan sobre diferentes tipos de substratos, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad. Las mismas son responsables de cuadros naturales de intoxicaciones (aflatoxicosis), de la aparición de tumores hepáticos y de procesos de inmunodepresión en distintas especies. Químicamente se las ha -- caracterizado por derivados difuranocumarínicos, estables al calor, habiéndose identificado diferentes fracciones, de las cuales, las más frecuentes en condiciones naturales son las siguientes: B1 (del inglés "blue": azul), G1 (del inglés "green": verde), B2 y G2, denominación derivada de la fluorescencia que -- presentan a la luz ultravioleta. Asimismo se han descrito, entre otras, las -- fracciones M1 (del inglés "milk": leche) y M2 en la leche de animales previamente expuestos a las fracciones B1 y B2. La mayor toxicidad y el mayor poder carcinogénico corresponde a la AFL B1 (4,6,17,25,31).

Las fuentes más frecuentes de intoxicación son los cereales y sus subproductos, como así también, aquellas raciones de las que forman parte. La presencia de los hongos y eventualmente de sus metabolitos se ve favorecida por el -- deterioro de los granos debido a la acción de insectos, al manipuleo y a los -- prolongados períodos de almacenamiento en ambientes húmedos con temperaturas -- altas y constantes (25,54).

Se han descrito cuadros experimentales y naturales de intoxicaciones -- agudas, subagudas y crónicas en diversas especies domésticas, animales de labo

ratorio y en el hombre. Las aves son más susceptibles que los mamíferos y entre ellas, los patitos resultan afectados con mayor frecuencia, habiéndose establecido para ellos una Dosis Letal 50% (DL 50) de 0,3 mg/kg de peso vivo de AFL B1 (18,39). Entre los mamíferos, los cerdos y los conejos son muy sensibles. En estos últimos la DL 50 es de 0,3 mg/kg de peso, siendo necesarias dosis de 0,05 mg/kg de peso vivo durante períodos no menores de 14 días, para producir un cuadro crónico (13, 14, 35)

Se ha considerado a esta última especie como un modelo animal adecuado para el estudio de la aflatoxicosis, debido a que las dosis tóxicas, los signos clínicos y las lesiones macro y microscópicas son similares a los hallados en cerdos, cabras y bovinos.

A continuación se indican las DL 50 en distintas especies: (1,17,25,39)

<u>Especie animal</u>	<u>DL 50 (mg/kg de AFL B1)</u>
Pato	0,3
Conejo	0,3
Pavo	0,5
Visón	0,5 - 0,6
Cerdo	0,6
Gato	0,6
Trucha	0,8
Perro	0,8 - 1
Cobayo	1,4 - 2
Rata	5,5 - 17,9
Pollo	6,3
Ratón	9
Hamster	10,2

Las aflatoxinas son absorbidas en el intestino y de allí transportadas al hígado. A nivel microsomal del Retículo Endoplásmico Liso del hepatocito son degradadas a diferentes fracciones; como resultado de este proceso se forman compuestos activos 8 - 9 epóxido de AFL B1, los que uniéndose a los ácidos nucleicos ejercen su acción carcinogénica (1, 12). Se ha comprobado que las células traqueales no ciliadas del conejo presentan una gran sensibilidad a la acción de las AFL, lo que se debería al elevado nivel de unión de estas últimas con el ADN celular, sugiriéndose que este mecanismo podría actuar como desencadenante de tumores primarios del tracto respiratorio(15).

Además de la acción carcinogénica precedentemente descrita, y que surge de la ingestión prolongada de AFL, éstas son responsables de intoxicaciones -- agudas o crónicas, cuyo órgano blanco es el hígado. La gravedad de las lesiones que en él se producen guarda relación con las dosis ingeridas, la edad y la especie (39,40).

La respuesta temprana a la intoxicación crónica es la hiperplasia de los conductillos biliares, cambios grasos en los hepatocitos y proliferación de tejido conectivo. En la intoxicación aguda se observan necrosis y hemorragias hepáticas (18,39). Los signos clínicos más notables son la inapetencia y la reducción en la ganancia de peso (1, 13, 48)

Los efectos de las AFL sobre la inmunidad y la resistencia adquirida a las infecciones varía de acuerdo a la especie afectada y a los agentes bacterianos involucrados (51,53).Se ha demostrado su actividad inhibitoria sobre la enzima ADN polimerasa, lo que interfiere el proceso de transcripción (43,56); se altera así la síntesis proteica, hecho que podría relacionarse con una re-

ducción en la producción de anticuerpos (53,63). Experimentos realizados en pavos y cerdos con distintas dosis de AFL, demostraron la reducción en la respuesta inmune adquirida frente al desafío con *Pasteurella multocida* y *Erysipelothrix rhusiopathiae* respectivamente (16,23,50) sin que se comprobara una disminución en los títulos de anticuerpos (44,50). Además, conejos intoxicados con AFL B1 equivalente, respondieron a la vacunación contra *Bordetella bronchiseptica* evidenciando una menor resistencia adquirida frente al desafío con la cepa bacteriana; ésto se manifestó por una mayor severidad de las lesiones pulmonares macro y microscópicas, sin que se hallaran diferencias en los títulos de anticuerpos, con respecto a los controles (68). En general se considera que las dosis muy altas de aflatoxinas provocarían la reducción de la respuesta inmune mediada por anticuerpos, mientras que en las intoxicaciones crónicas o subclínicas el mecanismo que estaría más comprometido, sería el de la inmunidad mediada por células (52,57). La actividad de los linfocitos T periféricos de distintas especies, está reducida por el efecto de la AFL B1, lo que se detectó mediante pruebas de transformación blástica de los mismos y pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada (3,45,52). Se ha descrito el efecto inhibitorio de las AFL sobre la capacidad fagocítica de los macrófagos, lo que a su vez estaría relacionado con la acción que las mismas producen sobre factores inespecíficos de reacción orgánica, tales como el complemento u otros factores opsonizantes que estarían presentes en el suero (59,64). Al estar afectada la actividad fagocítica, también podría estarlo el procesamiento del antígeno por parte del macrófago y por lo tanto la inducción de la respuesta inmune mediada por células y/o anticuerpos (9,26,28,30,41,65).

Como se ha indicado anteriormente, si bien se conoce la acción inmunodepresora de las aflatoxinas en distintas especies, se desconoce su efecto en --afecciones respiratorias del conejo producidas por *Pasteurella multocida*, teniendo en cuenta además que la vía de entrada de estas bacterias al organismo, es diferente que en la mayor parte de los modelos experimentales estudiados. -- En la producción de esta entidad prevalecen los serotipos somáticos-capsulares 3:A y 12:A, caracterizándose la presentación aguda por la producción de un cuadro septicémico, observando como consecuencia de ello, lesiones histopatológicas correspondientes a un shock endotóxico. La forma subaguda o crónica se localiza en particular en el aparato respiratorio y comprende los cuadros descritos como coriza (rinitis y sinusitis crónica mucopurulenta), neumonía enzoótica (bronconeumonía) y pleuroneumonía. Es causante además de otros procesos inflamatorios tales como otitis media, conjuntivitis, metritis, mastitis y abscesos cutáneos. Se ha considerado a la pleuroneumonía como una forma terminal de la neumonía enzoótica (21), o bien como una entidad en particular -- (49), que representa la forma respiratoria más severa de la pasteurelisis. -- Desde el punto de vista microscópico se la define como neumonía aguda exudativa intersticial, con bronquiolitis, inflamación del tejido conectivo intersticial, vasculitis, linfangitis e infiltración celular. Asociada a esta lesión -- es posible observar pericarditis y peritonitis (49).

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue comprobar el efecto de la AFL B1 como depresora del aparato inmunocompetente, a través del estudio comparativo -- del grado de protección conferido por una vacuna experimental contra *Pasteurella multocida* en conejos.

Para el logro del mismo se procedió a:

- Determinar los títulos de anticuerpos vacunales, las lesiones pulmonares macro y microscópicas y los signos clínicos presentados.
- Evaluar la inmunidad mediada por células.
- Determinar la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Fuente de aflatoxina

Se utilizó AFL cruda proveniente de cultivos de *Aspergillus flavus*, -- provista por el Dr. H. Godoy del Departamento de Microbiología Agrícola del INTA Castelar. Las muestras contenían una mezcla de AFL B₁ y AFL G₁. Esta -- última, de acuerdo con la bibliografía consultada (59), se considera la -- mitad de tóxica con respecto a la AFL B₁. Sumando los miligramos de AFL B₁ de la muestra a la mitad del contenido de AFL G₁, surge el valor de AFL B₁ -- equivalente, que fue el que se tuvo en cuenta para la administración de la dosis. La AFL B₁ equivalente fue suministrada luego de disolverla con 1 ml de acetona, diluída en aceite mezcla comestible, con una concentración final de 0,2 mg/ml.

3.2. Animales de experimentación

Se emplearon 36 conejos convencionales de ambos sexos, con un peso promedio de 2,5 kg, provenientes de un establecimiento sin antecedentes de bordetelosis y pasteurelisis. Los animales se mantuvieron durante 2 meses anteriores al inicio de los experimentos y hasta su finalización, en un ambiente con condiciones adecuadas de temperatura y humedad. Se les controló previamente los títulos de anticuerpos aglutinantes para *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida*, así como la ganancia semanal de peso y se

les administró coccidicidas. Se alojaron en jaulas de engorde, recibiendo agua y alimento comercial "ad-libitum" libre de micotoxinas (en particular de AFL). El análisis de alimento se realizó en el Departamento de Microbiología Agrícola del INTA de Castelar.

3.3. Diseño de los experimentos

El diseño constó de 2 experimentos, con 18 animales cada uno, realizándose por bloques aleatorizados (33). Los conejos se dividieron en 3 grupos, constituidos por 6 individuos, denominándose a cada grupo de la siguiente forma: 1) Grupo T, testigos, formado por animales sin tratamiento. 2) Grupo V, vacunado con una vacuna oleosa doble emulsión de *Pasteurella multocida*. 3) Grupo VA, vacunados con la misma vacuna y a los que se les suministró AFL B1 equivalente, por vía bucal.

Los animales se distribuyeron al azar para constituir 6 Bloques, compuesto cada uno de ellos por un representante de cada grupo, como se indica a continuación:

Bloques (B)	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Animales
Grupos	T	T	T	T	T	T	6
	V	V	V	V	V	V	6
	VA	VA	VA	VA	VA	VA	6
						Total	18

Los individuos pertenecientes a cada bloque, fueron alojados en jaulas vecinas, recibiendo el mismo tipo de alimentación.

El Primer experimento tuvo una duración de 52 días.

La muestra de AFL utilizada contenía 81,81% de AFL B1 (63 mg) y 18,18% de AFL G1 (14 mg), resultando 90,9% de AFL B1 equivalente. La misma se diluyó en aceite comestible mezcla, para obtener una concentración de 0,23 mg/ml. La dosis administrada al grupo VA fue de 0,05 mg/kg de peso vivo de AFL B1 equivalente, durante 44 días, desde el día 1 del experimento.

Los animales de los grupos V y Va fueron vacunados los días 1 y 15, -- coincidiendo la primera vacunación en el último grupo con el inicio de la -- administración de AFL.

Para la determinación de los anticuerpos séricos vacunales de los grupos V y VA se extrajo sangre periférica de la arteria central o de la vena marginal de la oreja, semanalmente, a partir de la primera vacunación, durante 6 semanas. Al grupo T se le efectuó el control de serología negativa.

Los tres grupos fueron desafiados con la cepa viva de *P. multocida* el día 44 del experimento, siendo sacrificados por bloques (1T, 1V, 1VA) los días 48, 49, 50, 51 y 52 (los dos bloques restantes).

El Segundo Experimento tuvo una duración de 92 días.

La muestra de AFL utilizada contenía 81,08% de AFL bl (22,5 mg) y -- 18,91% de AFL gl (5,25 mg), resultando 90.45% de AFL B1 equivalent. La AFL se diluyó en aceite comestible mezcla para obtener una concentración de --

0,25 mg/ml. La dosis administrada al grupo VA fue de 0,05 mg/kg de peso vivo de AFL bl equivalente durante 69 días. Los animales de los grupos V y VA fueron vacunados los días 1 y 15, coincidiendo la primera vacunación en el grupo VA, con el inicio de la administración de la AFL.

Para la determinación de la inmunidad mediada por células "in vitro", se realizó la prueba de transformación blástica, para lo cual se obtuvieron linfocitos de sangre periférica el día 57; y la determinación de la inmunidad mediada por células "in vivo" mediante una prueba cutánea con fitohemaglutinina, se efectuó 48 horas antes del sacrificio de los animales, por bloques. La evaluación de la actividad endocítica de los macrófagos alveolares se realizó los días 72, 76, 78, 82, 86 y 92, coincidente con el sacrificio por bloques de los animales.

3.4. Vacuna experimental de *Pasteurella multocida*

Se elaboró con una cepa de *Pasteurella multocida* aislada de un caso de campo de pleuroneumonía fibrinopurulenta, la que fue serotificada por el Dr. Keith Rhoades, del National Animal Disease Center, Ames, Iowa., como en el serotipo somático 3,12 y serogrupo capsular A. La bacteria que se mantenía liofilizada, fue cultivada inicialmente en agar chocolate durante 24-48 hs. a 37° C. Como medio de cultivo para la producción se utilizó agar tripticosa soja (ATS Oxoid) más 10% de sangre ovina y agar Tripticasa Soja más 5% de suero equino normal, incubando 18-20 hs a 37° C. Se efectuó control de pureza y de patogenicidad inoculando 5 ratones por vía intraperitoneal. Luego -

de efectuar la cosecha de la cepa con PBS (solución buffer de fosfato), se inactivó con calor a 37° C más el agregado de formol (Merck) al 4 % durante 48 hs. Se realizó el control de esterilidad sembrando en medios de cultivo para bacterias aerobias, anaerobias y para hongos, y se determinó la concentración de la suspensión madre con el Patrón Internacional de Opacidad. La vacuna terminada contenía una concentración de 3 UIO (unidades internacionales de opacidad)/ml equivalente a 3×10^9 bacterias/ml, en adjuvante oleoso doble emulsión tipo Herbert (aceite mineral: Marcol 86 ml; emulsificante: - Arlancel 4 ml; detergente Tween 80 al 2%) (8,11).

El plan de vacunación consistió en la administración de dos dosis de 1 ml con 15 días de intervalo.

En los puntos siguientes se detallan los procedimientos utilizados en particular, en cada experimento.

3.5. Primer Experimento

3.5.1. Determinación de anticuerpos vacunales

Para la detección de anticuerpos aglutinantes contra *Pasteurella multocida* se utilizó la prueba de hemoaglutinación pasiva en placa, según lo indicado por Rimler y Brodjen (60). Para elaborar el antígeno se utilizó una cepa de *P. multocida* de conejo recuperada de los ratones inoculados para la prueba de patogenicidad. Para evitar la pérdida de la cápsula bacteriana, se repicó nuevamente inoculando ratones

por vía intraperitoneal. Las bacterias así recuperadas se cultivaron en agar Tripticasa Soja (Oxoid) más suero equino normal (5%). Con posterioridad a efectuarles el control de pureza, se cosecharon con 2 ml de PBS, luego de 18 hs de incubación a 37° C. Se agregaron: 1 ml de solución de hyaluronidasa (150 U/ml PBS) y 0,05 ml de tolueno, calentado durante media hora a 100° C. Posteriormente la suspensión bacteriana fue centrifugada a 12.000 xg durante 20 minutos, ajustando el sobrenadante a 4,5 ml con PBS. Este último, que contenía el polisacárido capsular, fue mezclado con 0,5 ml de glóbulos rojos de pavo (lavados 3 veces con PBS), incubando durante 1 hora y media a 37° C. Los glóbulos rojos, así sensibilizados, se lavaron 3 veces con PBS, conservándolos en solución Alsever hasta ser usados, momento en que se suspendieron al 0,5% en PBS. Se utilizaron placas para microtitulación efectuando diluciones seriadas de los sueros, sobre base 2 en 50 ul de PBS, agregando a cada pocillo igual cantidad de glóbulos rojos sensibilizados, incubando a temperatura ambiente durante 1 hora y media antes de efectuar la lectura. (7,60).

La extracción de sangre de los animales pertenecientes a cada bloque, se realizó de la vena marginal de la oreja, semanalmente a partir de la primera vacunación, durante 6 semanas, conservando los sueros congelados a -20° C hasta realizar la prueba.

3.5.2. Desafío con la bacteria viva

La cepa de *P. multocida* utilizada fue la misma que la empleada

para la elaboración de la vacuna, recuperada del pasaje por ratones. Se cultivó en agar tripticasa soja más 5% suero equino normal. La concentración para realizar el desafío fue de 7.6×10^8 U.F.C./ml inoculando 0,5 ml en cada nostrila, previa anestesia local con xilocaína.

3.5.3. Estudio anatomopatológico macro y microscópico

Los animales fueron sacrificados al finalizar el experimento, por bloques con dos o tres días de intervalo entre sí. Se les efectuó la necropsia completa. Se registraron los pesos de los pulmones, hígados y bazos; protocolizando las lesiones observadas en los pulmones, - incluyendo el registro fotográfico de los mismos de cara dorsal y ventral. Estas fotografías fueron empleadas para evaluar la extensión de las lesiones macroscópicas por métodos morfométricos (58). El método utilizado consistió en superponer a cada fotografía una trama constituida por 2592 puntos. Contando el número de puntos que constituía cada pulmón, se estableció el número correspondiente al área lesionada, estableciendo luego, estadísticamente, las diferencias entre los valores correspondientes a cada pulmón.

Para el estudio histopatológico se extrajeron muestras de pulmón derecho del lóbulo cranial e intermedio de cada animal, se fijaron en formol neutro al 10% incluyéndolas en parafina. Se colorearon con hematoxilina y eosina. De igual manera se procedió con muestras de bazo e hígado de cada animal. Al observar microscópicamente cada pulmón se asignó un valor de 0 (normal) a 3 (lesión muy severa) para las vías aéreas.

reas, tejido alveolar y tejido linfoideo, de acuerdo a la gravedad de la lesión. Se consideró grado 0 para las vías aéreas, ausencia de cambios en la luz de los bronquios y bronquiolos, así como en la pared. Grado 1: presencia de exudado en la luz sin cambios en la pared de bronquios y bronquiolos (Foto 4). Grado 2: lo indicado en 1 más la descamación e infiltración en la pared de polimorfonucleares o mononucleares (Foto 5). Grado 3: bronquiolitis obstructiva (Foto 6). Para los alvéolos Grado 0: sin lesiones. Grado 1: ligero o moderado engrosamiento de la pared alveolar por células inflamatorias. Luz alveolar más bien limpia (Foto 7). Grado 2: lo indicado en 1 más una marcada infiltración de mononucleares o polimorfonucleares en la luz alveolar, y presencia de exudado en la mayor parte del preparado (Foto 8). Grado 3: lo indicado para Grado 2 más consolidación o necrosis (Foto 9). Para la evaluación del tejido linfoide peribronquial se consideró Grado 0: ausencia. Grado 1: se visualiza ligera hiperplasia del tejido linfoideo - - . Grado 2: moderada hipertrofia con deformación de la luz bronquiolar (Foto 10). Grado 3: severa hipertrofia con colapso bronquiolar. Con respecto al tejido linfoide perivascular, se asignó Grado 1: se visualiza (Foto 11). Grado 2* muy marcado. También se diferenciò la presencia o no de pleuritis en cada caso (Foto 13).

Se observaron asimismo hígados y bazos, indicando la presencia o ausencia de lesiones.

Se establecieron estadísticamente las diferencias en cuanto a las lesiones microscópicas y sus grados entre los tres grupos. También

(*)Foto 12

se efectuó el estudio bacteriológico de todos los animales sacrificados con el fin de aislar *Pasteurella multocida*.

3.5.4. Evaluación estadística de los resultados

Se analizaron las diferencias en la ganancia semanal de peso entre los tres grupos V, VA y T por análisis de varianza (Prueba de Fisher) utilizándolo asimismo para evaluar los resultados de los títulos aglutinantes correspondientes a las pruebas serológicas, expresados en título geométrico medio. Las diferencias entre los pesos de hígados, pulmones y bazo de los animales fueron analizados por ensayo de covarianza, prueba de Fisher.

Para evaluar los resultados de las lesiones anatomopatológicas macro y microscópicas, se utilizó el método de chi cuadrado. (33)

3.5.5. Control clínico

Durante cinco días previos al desafío y hasta el momento del sacrificio se controló diariamente la temperatura y el peso corporal, indicando los signos clínicos observados.

3.6. Segundo Experimento

3.6.1. Determinación de la inmunidad mediada por células

Para el estudio de la inmunidad mediada por células se efectua-

ron extracciones de sangre con anticoagulante (EDTA, Anticoagulante w, Lab. Wiener, Rosario, Argentina) de la vena marginal o de la arteria central de la oreja. La sangre obtenida (5 ml) se diluyó al medio en PBS estéril. Se colocaron 3 ml de sangre sobre un gradiente de Ficoll (Ficoll Paque, Pharmacia, Uppsala, Suecia) de 1,5 ml. Se centrifugaron durante 20 minutos a 1.500 rpm. Se obtuvo la capa de glóbulos blancos ubicados en la interfase, lavándolos una vez con PBS. Las células se resuspendieron en MEM (Eagle's minimum essential medium) adicionado de 200 U.I. de penicilina, 500 µg/ml de estreptomycin, l-glutamina (0,15 mg/ml), 20% de suero fetal bovino y 10 mM de HEPES (buffer), para obtener una concentración de 1×10^6 células por ml. La viabilidad fue determinada con colorante de azul tripán. Las células fueron cultivadas en microplacas para cultivos de tejidos (Cell Wells, Corning, N. Y., U.S.A.) y se estimularon tres muestras de cada animal con fitohemaglutinina (*) (1 µg/pocillo - PHA-M, Gibco, Grand Island, N.Y., U.S.A.). durante 48 horas. Se realizaron cultivos análogos, sin mitógeno. La PHA estimula la división de los linfocitos T. Se agregó a todos los pocillos de la placa 0,5 µCi de 3 H-Metil Timidina (3 H-Metil Timidina; 6,7 Ci/mmol, New England Nuclear Corp. Boston, M.A., U.S.A.); - 18 hs. antes de finalizar la incubación, con el fin de marcar las células en división por la incorporación del material radiactivo al ADN celular. (5,19,20,27,29,46).

Cada muestra se filtró a través de una membrana de fibra de vidrio (Sartorius, tipo SM, Alemania) colocada en un porta-filtro, co-

(*) Fitohemaglutinina (PHA)

nectado a un Kitasato en el cual se aplicó vacío.

En experimentos de puesta a punto de la técnica se determinó me diante el uso de ^3H -Metil Timidina en solución, que utilizando 4 lavados de 5 ml cada uno se elimina del filtro 94%; 4,42%; 0,53% y 0,19% - de la radioactividad total de la muestra, efectuados con agua destilada.

Por lo tanto en este experimento se utilizaron cuatro lavados - de 5 ml cada uno, los cuales fueron suficientes para separar el material radioactivo no incorporado al ADN celular. Los filtros secos fueron colocados en frascos de vidrio conteniendo 5 ml de líquido de centelleo (4 g de Omnifluor, New Engalnd Nuclear Corp., Boston, Ma, U.S.A. por litro de Tolueno).

Las muestras se leyeron en un contador de centelleo líquido - - (Beckman, LS 100-C, INC, U.S.A.) en el instituto de Fisiología de la - Facultad de Agronomía, U.N.L.P. Los valores de las lecturas se expresan en cuentas por minuto (c.p.m.). Dividiendo las c.p.m. de las muestras de linfocitos estimuladas con PHA (PHA+) por las c.p.m. de las -- muestras no estimuladas (PHA-) se obtuvo el índice de estimulación (I. E.) de las mismas.(45,66).

$$\text{I.E.} = \frac{\text{c.p.m. PHA+}}{\text{c.p.m. PHA-}}$$

Se empleó esta técnica como una adaptación de aquellas en que - se utiliza un "HARVESTER" Mash II automático para el lavado de los filltros, por no disponer del mismo en nuestro medio.

3.6.2. Prueba cutánea de hipersensibilidad

Los animales pertenecientes a los tres grupos se depilaron en una zona del dorso, inyectándole en ese sitio, 0,1 ml intradérmica de PHA-M diluída 1/5 (23,24,57). A las 24 horas se efectuó la lectura, evaluándose la respuesta mediante la medición con calibre de la zona de induración.

3.6.3. Determinación de la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares (MA).

Los animales se sacrificaron y fueron sangrados a blanco para obtener el suero de cada uno de ellos.

Se abrió la cavidad torácica y se disecó el extremo anterior de la tráquea, obturándolo con una pinza hemostática para evitar la contaminación. El exterior del pulmón se lavó con PBS estéril a 37° C, secándolo con gasa estéril. Se inyectaron 30 a 40 ml de PBS estéril a 37° C por el extremo anterior de la tráquea, con una jeringa de plástico de 50 ml conectada con un tubo de plástico flexible de 4 mm de diámetro. Se cerró la abertura traqueal, se masajó suavemente y se recogió en un tubo de centrífuga, introduciendo una segunda alicuota que se unió a la anterior. Se centrifugó a 1.500 rpm a 4° C durante 20 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió con medio 199 (38, 70). Se efectuó el conteo de las células con cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad con colorante

azul tripán. Se cultivaron en tubos de Leighton con laminillas flotantes, con una concentración de 1×10^6 células por ml, agregando 20% de suero homólogo o heterólogo con el fin de determinar si los macrófagos variaban su actividad fagocítica frente a sueros provenientes de animales sometidos a diferentes tratamientos (T, V, VA) además de sus sueros homólogos.

Se utilizaron dos tubos por cada combinación, totalizando 6 tubos por animal.

Esa combinación se realizó según el siguiente esquema:

Macrófagos alveolares del grupo T (MA-T) más suero (S) de T

MA - T más S V

MA - T más S VA

MA - V más S V

MA - V más S T

MA - V más S VA

MA - VA más S VA

MA - VA más S V

MA - VA más S T

Luego de permanecer 30 minutos en contacto se agregó a cada tubo 0,1 ml de un cultivo de 18 hs. de *Pasteurella multocida* sin inactivar, teniendo como referencia de concentración la opacidad del tubo N 3 de la escala de Mac Farland correspondiente a 900 millones de bacterias/ml. Se mantuvieron durante 1 hora a 37° C. Al finalizar la incubación

ción, se extrajeron las laminillas, se secaron a temperatura ambiente y se colorearon con tinción de May - Grunwald Giemsa. Las laminillas teñidas, se montaron sobre un portaobjeto, con aceite de cedro, procediendo a su observación microscópica con un aumento de 100 x. Se contaron como mínimo 100 macrófagos en cada preparado, estableciendo posteriormente el porcentaje de fagocitosis o de adherencia.

3.6.4. Evaluación estadística de los datos

La ganancia semanal de peso fue evaluada mediante análisis de -varianza (Prueba de Fisher). El porcentaje de fagocitosis y adherencia de los macrófagos alveolares se comparó por la prueba de G y el índice de estimulación se expresó como cociente del Error Estandar.(33,62).

3.7. Evaluación de la ganancia semanal de peso

En ambos experimentos los animales de los 3 grupos se pesaron tres veces por semana para determinar la ganancia semanal de peso. Las dosis de AF L (al grupo VA) se suministró por kilo de peso vivo. Al grupo V se le administró aceite comestible mezcla de acuerdo a su peso.

4. RESULTADOS

Primer Experimento

Uno de los parámetros utilizados para considerar el efecto de las aflatoxinas en la intoxicación crónica de los conejos fue la ganancia de peso durante el experimento y con posterioridad al desafío con la cepa viva de *Pasteurella multocida*. A lo largo del período de administración de AFL no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos estudiados. Con posterioridad al desafío, únicamente el grupo T redujo significativamente la ganancia de peso. El grupo V arrojó una media de ganancia de peso significativamente mayor que el grupo T, no difiriendo del grupo VA que evidenció, sin embargo, desde el punto de vista numérico, una menor ganancia de peso. (Tabla N° 1, Gráfico N° 1).

Los valores de los títulos de anticuerpos expresados como Título Geométrico Medio (TGM), en los grupos V y VA, no difirieron significativamente entre sí, como se indica en la Tabla N° 2, Gráfico N° 2.

Los resultados con respecto a la extensión de las lesiones neumónicas observadas macroscópicamente se expresan en la Tabla N° 3, Gráfico N° 3. Como se observa hubo diferencia en la extensión de las lesiones entre los tres grupos, siendo la misma significativamente mayor en el grupo T (64,41%). Asimismo el porcentaje de la lesión hallado en el grupo VA (6,7%) fue significativamente mayor que en el grupo V (0,06%) en que prácticamente no se observaron lesiones macroscópicas.

Hubo diferencias significativas entre los tres grupos en relación con la distribución de la severidad de las lesiones microscópicas (clasificadas de 0 a 3), como se indica en la Tabla N^o 4, Gráfico N^o 4. Para el grado 3, el grupo V no presentó lesiones, mientras que los grupos VA y T no difirieron entre sí, presentando el mismo porcentaje de áreas de pulmón lesionadas. La ausencia de lesiones (grado 0) arrojó diferencias significativas entre los grupos T y V, - siendo éste último el que presentó un mayor porcentaje de animales no lesionados (41,7%).

Se observaron diferencias significativas en la distribución de las lesiones microscópicas en las distintas zonas del pulmón (Vías aéreas, Alvéolos, Tejido linfoideo peribronquial) siendo los alvéolos los que presentaron mayores porcentajes de lesiones, siguiendo en orden decreciente por el tejido linfoideo y las vías aéreas (Tabla N^o 5, Gráfico N^o 5).

En los alvéolos, el grupo V fue el que presentó un mayor porcentaje - -- (41,7%) de áreas no lesionadas (grado 0) difiriendo significativamente con los grupos VA y T, entre los cuales no se hallaron diferencias significativas. Asimismo el grupo V no presentó lesiones tipo 3 en alvéolos difiriendo por ello - de los dos grupos restantes. El grupo T para este último grado fue el que presentó el mayor porcentaje, no observándose en él animales sin lesiones en alvéolos. (Tabla N^o 6, Gráfico N^o 6)

En la Tabla N^o 7, Gráfico N^o 7, se expresan los grados de lesión para -- las vías aéreas, notándose que los porcentajes correspondientes a vías aéreas no lesionadas fueron mayores tanto en el grupo V como en el VA (75% en ambos) con respecto al grupo T.

Con respecto a la clasificación de las lesiones en el tejido linfoideo - peribronquial, se observa en la Tabla N^o 8, Gráfico N^o 8, que los dos grupos - vacunados fueron significativamente diferentes con respecto al grupo T, presentando un mayor desarrollo del tejido linfoideo que este último.

En la Tabla N^o 9, Gráfico N^o 9, se indican los resultados en cuanto a -- las lesiones microscópicas, clasificadas de 0 a 2, en el tejido linfoideo perivascular, no existiendo diferencias significativas entre los tres grupos.

Hubo diferencias significativas entre los tres grupos en lo referido al hallazgo de pleuritis, siendo el grupo T el más afectado (50%) siguiendo el -- grupo VA (16.7%), no hallándose este tipo de lesión en el grupo V (Tabla N^o 10 Gráfico N^o 10).

No hubo diferencia significativa entre los pesos de los órganos (hígado, bazo y pulmón) (Tabla N^o 11), no observándose lesiones microscópicas en los hígados de los tres grupos estudiados.

En la Tabla N^o 12 y Gráfico N^o 12, se indican las variaciones diarias de temperatura antes y después del desafío con *P. multocida*. Se observa que con - posterioridad al mismo, el grupo V arrojó una media significativamente menor -- que los grupos VA y T que no difirieron entre sí. Posteriormente al sacrificio de los animales se recuperó *Pasteurella multocida* de 4 animales testigos y de un animal del grupo VA, siendo los restantes negativos.

En las fotos 1, 2, 3 se observaron los hallazgos anatomopatológicos macroscópicos, de un animal perteneciente a cada grupo.

Segundo Experimento:

Los resultados obtenidos con referencia a la determinación de la inmunidad mediada por células, por la técnica de transformación blástica de los linfocitos T, expresados mediante un índice de estimulación(I.E), indican que éste último fue mayor en animales del grupo V. Los valores de I.E en los grupos T y VA fueron inferiores a 1.(Tabla N°13).

En la Tabla N°14 se expresa la respuesta inmune celular a la prueba cutánea con PHA, siendo el diámetro de induración cutánea en los grupos V y VA, variable entre 7 a 10 mm. En el grupo T no se observó induración.

La capacidad fagocítica de los MA en los tres grupos de animales en combinación con sus sueros homólogos(MA-T más sT; MA-V más sV; MA-VA más sVA) fue significativamente diferente. Como se observa en la Tabla N°15, el grupo T fue el que presentó el mayor porcentaje de fagocitosis y el grupo V el que manifestó el mayor porcentaje de adherencia(Fotos N° 13 y 14).

En la Tabla N°16 se indican los porcentajes de fagocitosis y adherencia de los macrófagos pertenecientes a cada grupo, con las distintas combinaciones de sueros. Se observa , en general, que de las mismas, aquellas en que se utilizaron sueros de los testigos (MA-T más sT; MA-VA más sT) fueron las que presentaron un mayor porcentaje de fagocitosis, mientras que aquellas en que se emplearon los sueros de los vacunados(MA-T más sV; MA-V más sV; MA-VA más sV), presentaron el mayor porcentaje de adherencia.

En el segundo experimento no se registraron diferencias en la ganancia semanal de peso entre los tres grupos de animales.

5. DISCUSIÓN

Durante el período de administración de AFL, no se comprobaron signos clínicos de intoxicación, tales como anorexia o pérdida de peso, resultados que difieren de aquellos obtenidos en estudios previos(68), en que se utilizó igual dosis de AFL. Sin embargo en este último, al igual que en los experimentos realizados en el presente, no se observaron lesiones microscópicas en el hígado, las cuales son indicativas de un cuadro tóxico por aflatoxinas, hallazgo éste que difiere de lo observado por Clark y col.(13). Estas diferencias podrían deberse al tipo de AFL utilizada y a la variabilidad de los pesos de los animales .

Los efectos inmunodepresores de las aflatoxinas se manifiestan, en condiciones de campo y experimentales, por fallas en la eficacia de las vacunaciones y por una menor resistencia o mayor susceptibilidad a la presentación de cuadros infecciosos.

En el estudio realizado, se comprobó una mayor extensión y severidad de las lesiones pulmonares macro y microscópicas respectivamente, en el grupo VA, lo que expresaría una menor resistencia adquirida en el mismo. Sin embargo, no hubo diferencias en los títulos de anticuerpos , medidos por la prueba de hemaglutinación pasiva, entre los grupos vacunados. Estos hallazgos, similares a los obtenidos por otros autores(36,47), indicarían que los anticuerpos aglutinantes dirigidos contra polisacáridos capsulares de la P.multocida, no estarían en relación con el grado de protección conferido por la vacuna y que el efecto de las AFL en las dosis utilizadas(0,05 mg/kg de AFL B1 equivalente), no se reflejaría en variaciones en los niveles de anticuerpos. En efecto, solo las dosis

altas de AFL (0,1 a 1 mg/Kg) causarían la disminución en los títulos de anticuerpos (57). Se obtuvieron resultados similares en estudios realizados con pavos, conejos y cerdos, en los cuales se comprobó la disminución de la resistencia adquirida, sin variación en los valores de anticuerpos, evaluados por diferentes métodos (16, 23, 44, 50, 68). Si bien no se ha precisado el mecanismo exacto por el cual las AFL producen inmunodepresión (56), se estima que el principal efecto de las mismas estaría en relación con la inmunidad mediada por células (55, 65). Se ha comprobado mediante pruebas "in vivo" e "in vitro" que los linfocitos T periféricos manifiestan una reducción en la blastogénesis inducida por mitógenos, debido a la acción de la AFL B1 (45, 52, 57).

Las dosis de 0,03 mg/Kg de peso en el cobayo, producen una significativa depresión de la respuesta inmuno celular (52). Esto último, también observado en el grupo VA, avalaría lo expresado anteriormente y permitiría inferir que los mecanismos de la inmunidad mediada por células, serían los responsables de las diferencias entre los grupos vacunados. Sin embargo son necesarios otros estudios experimentales para corroborar estos hallazgos, ya que se observó una gran variabilidad en las lecturas de las cuentas por minuto (cpm), en particular en el grupo V.

La otra prueba utilizada para evaluar la inmunidad mediada por células, fue la reacción cutánea a la inoculación intradérmica con PHA. Este mitógeno, que promueve la división de los linfocitos T, es un indicador "in vivo" de la actividad de las linfocininas y de la respuesta linfoblastogénica (57). Otros autores (22, 23, 52, 57) han utilizado esta prueba con esos fines, en forma paralela al uso de pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada, lo que no resultó posible en este estudio, pues hubiera significado agregar otra variable

en la evaluación de la respuesta inmune. Por ello, la falta de diferencias en la induración cutánea entre los grupos V y VA, coincide con aquellos, quienes, sin embargo, consideran a la prueba de hipersensibilidad retardada como un índice más adecuado para la evaluación "in vivo" del efecto de las AFL sobre la inmunidad celular.

En la evaluación general de la respuesta inmune producida, se hace necesario considerar el efecto del adjuvante utilizado con la vacuna. El mismo actúa por un lado, produciendo un aumento del número de linfocitos circulantes o fijos y por el otro, estimulando a los mismos a la producción de anticuerpos (10,42,67). Así, la hiperplasia del tejido linfoideo peribronquial, observada en los animales vacunados en el primer experimento, podría atribuirse a la acción del adjuvante.

Estudios "in vitro" han demostrado que las AFL disminuyen la acción de ciertas sustancias relacionadas con la resistencia inespecífica tales como el complemento y el interferón, así como también la capacidad fagocítica de los macrófagos alveolares (37, 56, 59, 64, 65). En relación con esto último se evaluó el efecto de las mismas sobre la capacidad fagocítica de los M.A, ya que estas células cumplen un rol importante en la producción de la respuesta inmune a través del procesamiento y presentación de los antígenos ante los linfocitos T y B (LT y LB) (28, 30, 61). En el experimento realizado no se comprobó un efecto negativo de la AFL B1 sobre dicha capacidad o sobre sustancias presentes en el suero. Cuando se utilizaron M.A y sueros de conejos a los que se les suministró AFL B1, en dosis de 0,03 a 0,09 mg/Kg durante 2 semanas, se comprobó una menor estimulación para la fagocitosis, cuando se compararon con testigos (59).

Las diferencias con el trabajo realizado, podrían asignarse al período de tiempo transcurrido entre la finalización de la administración de AFL y la obtención de los macrófagos. El aumento del índice de fagocitosis, observado con el suero de los animales del grupo T, en las diferentes combinaciones utilizadas, fue una constante. Este efecto, que podría deberse a un mecanismo de fagocitosis inespecífica, podría explicar en parte la mayor extensión y severidad de las lesiones pulmonares en los animales no vacunados. La rápida internalización de Pasteurella multocida dentro de los M.A en animales no inmunes, facilitaría la ruptura de los fagolisosomas y la liberación de hidrolasas lisosómicas al interior de la célula o bien su liberación al medio externo. Los mecanismos citados, como así también la presencia de toxinas bacterianas citotóxicas para los M.A (12, 32, 34, 61) y la liberación de las enzimas lisosomales, favorecerían por un lado, mediante un factor quimiotáctico (32, 61) la presencia de gran número de neutrófilos a nivel alveolar, principal célula inflamatoria observada en la pasteurelosis del conejo (21, 49).

Por otro lado, facilitaría el daño celular, mediante la eliminación de elastasas y colagenasas, enzimas que actuarían sobre las principales proteínas constituyentes de la pared alveolar (32, 61). Esta hipótesis se contrapone en parte con resultados obtenidos en bovinos inmunizados contra Pasteurella haemolytica, en los que se observó, luego de desafiarlos con la misma bacteria, una mayor extensión y severidad de las lesiones pulmonares con respecto a los testigos, postulándose en este caso que la fagocitosis específica, mediada por anticuerpos y complemento, favorecería la ingestión de gran número de bacterias con la consiguiente muerte celular y liberación de enzimas lisosomales al medio externo (34). Otro parámetro de la actividad fagocítica evaluado, fue la adhe-

rencia de la P. multocida a los M.A. Independientemente del grupo de origen del macrófago utilizado, la incubación con sueros de conejos vacunados, favoreció este proceso. Se infiere que la presencia de anticuerpos específicos así como fracciones de complemento conjuntamente con la de receptores para la porción Fc del anticuerpo, presentes en dichas células, facilitarían el fenómeno de adsorción de los inmunocomplejos a los M.A, proceso éste que permitiría una fagocitosis progresiva y coordinada que evitaría la agresión lisosómica, hipótesis ésta que requiere corroborarse experimentalmente. Los resultados obtenidos utilizando como modelo M.A de conejos inmunizados contra P. multocida, en contacto con ésta, fueron similares a aquellos observados con M.A de bovinos inmunizados contra P. haemolytica (69). En ambos casos, no hubo correlación entre la existencia de un estado de resistencia adquirida y un incremento de la fagocitosis evaluada por pruebas "in vitro".

6. CONCLUSIONES

De los datos aquí analizados podemos concluir que:

- 1- Se observó una menor resistencia adquirida en los animales tratados con aflatoxinas, la que no estaría relacionada con los títulos de anticuerpos conferidos por la vacunación.
- 2- Los valores del IE, como expresión de la inmunidad mediada por células, fueron mayores en el grupo vacunado, lo que permitiría inferir que los mecanismos de inmunidad celular serían los responsables de las diferencias entre los grupos vacunados.
- 3- Los MA de los animales testigos fueron los que presentaron los mayores porcentajes de fagocitosis en presencia de sus sueros y los de animales vacunados el mayor porcentaje de adherencia. Por ello se sugiere que la presencia de anticuerpos específicos, así como de fracciones de complemento conjuntamente con los receptores para la porción Fc del anticuerpo en el MA, facilitarían el fenómeno de adsorción de inmunocomplejos, permitiendo una fagocitosis progresiva y coordinada.
- 4- No se observaron signos clínicos ni lesiones en hígado con la dosis utilizada, la cual sin embargo aparenta ser suficiente para producir una alteración en la respuesta inmune.

TABLAS Y GRAFICOS

Tabla No 1: RUMENTO DE PESO, EXPRESADO EN GRAMOS

Media (+-Desvio standar)

Se.	T	V	VA	F
1	95.00 (69.21)	131.67 (68.24)	120.00 (90.33)	0.36 a
2	63.33 (45.90)	-6.67 (124.37)	36.67 (136.7)	1.19 a
3	61.67 (84.95)	113.33 (57.50)	123.33 (99.93)	0.96 a
4	90.00 (56.21)	90.00 (78.74)	86.67 (53.17)	0.01 a
5	100.00 (45.61)	46.67 (148.41)	113.33 (30.11)	0.90 a
6	53.33 (70.05)	63.33 (128.00)	83.33 (55.74)	0.17 a
D D			
7	-96.67 * (112.0)	86.67 * (92.66)	5.00 (195.90)	2.55
8	-136.67 * (196.54)	26.67 (69.19)	5.00 (125.50)	2.39

7 = * P < 0.05, F=5.10 GL=1/15 +

8 = * P < 0.05, F=4.72 GL=1/15 +

a = Diferencias no significativas

+ = Grados de Libertad Para Polinomios ortogonales (Lison,

1976)

Se= Semanas

D=..Desafio..

T=Testigos - V=Vacunados - VA=Vacunados+Aflatoxina

F=Test de análisis de varianza, Fisher

7 Posterior al Desafio, el grupo V arrojó la media significativamente mayor (86.67) en contraste con el grupo T. V y VA no difirieron entre sí (P< 0.05)

8 En esta último contraste el grupo T Presentó una media (-136.67), significativamente menor que V y VA que no difirieron significativamente entre sí(P< 0.05)

Gráfico N° 1: Aumento semanal de peso expresados en gramos

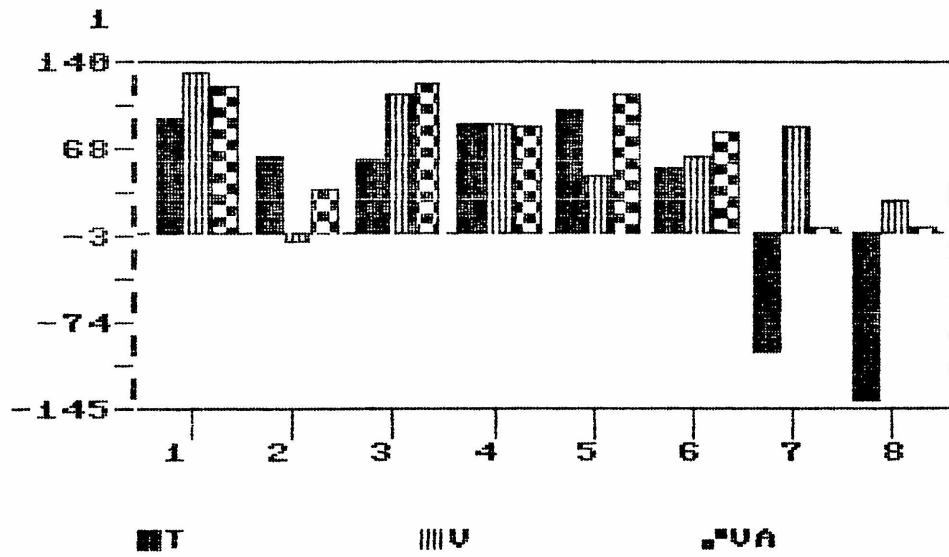


Tabla No 2 : TITULOS DE ANTICUERPOS AGLUTINANTES
 EXPRESADOS EN TITULO GEOMETRICO MEDIO

Tomados Semanalmente

Se.	V	VA	F.	P
0	5.635	5.019	0.012	NS
1	19.279	35.623	0.926	NS
2	17.167	24.288	0.158	NS
3	63.497	44.880	0.738	NS
4	40.005	24.288	0.483	NS
5	50.400	40.005	0.357	NS
6	50.400	44.880	0.059	NS

NS: Diferencias No Significativas

Se: Semanas

F :Test de análisis de varianza, Fisher

P :Nivel Significación

F de tabla 4.96 Para 1/10 Grs.de Libertad

Gráfico N° 2: Títulos de anticuerpos hemoaglutinantes expresados en Título Geométrico Medio (T.G.M.)

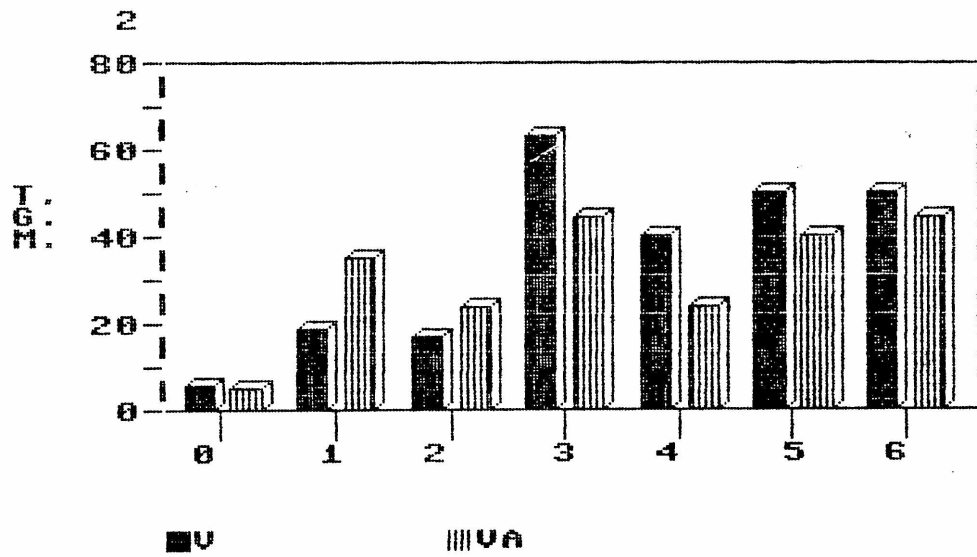


Tabla No 3 EXTENSION DE LAS LESIONES MACROSCOPICAS
 EN PULMON EXPRESADAS EN PORCENTAJES

Lesionados y No Lesionados

Grupo	S.Les.	S.No Les	Total	% Les.
T	10.742	5.935	16.677	64.41
V	10	16.876	16.886	0.06
VA	1.032	14.362	15.394	6.70

X29	T vs.V	V vs.VA	VA vs.T	X2t
Valor	15956	1036	11471	22697
P	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
GL	1	1	1	2

S.Les =Superficie Lesionada

S.No Les=Superficie No Lesionada

X29 =Contraste de grupos

X2t =Contraste total

P =Nivel de Significación

GL =Grados de Libertad del Contraste

La distribución de lesiones macroscópicas en Pulmón fue significativamente diferente en los tres grupos observados (P< 0.0005)

Gráfico N° 3: Extensión de las lesiones macroscópicas en pulmón expresadas en porcentajes.

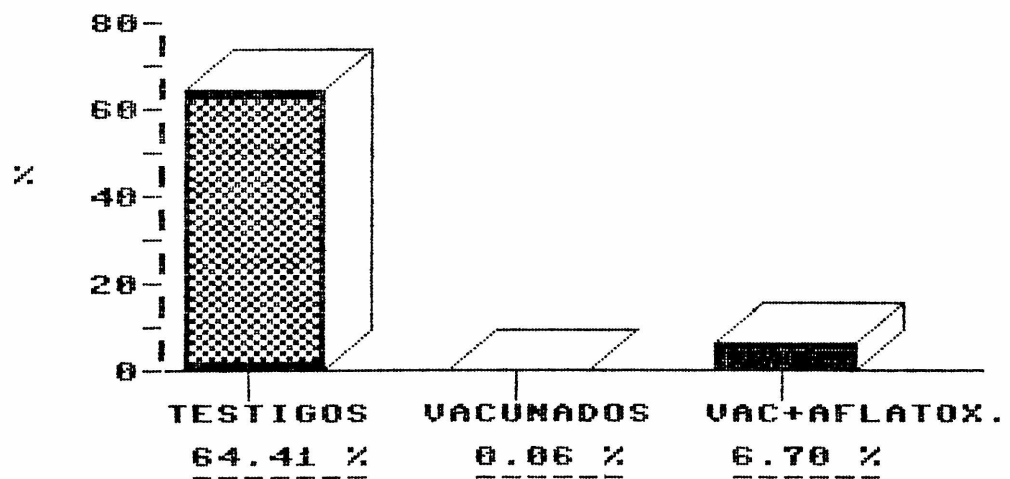


Tabla No 4 DISTRIBUCION DE LAS LESIONES MICROSCOPICAS
EN PULMON CLASIFICADAS DE 0 a 3 DE ACUERDO A SU GRAVEDAD

Expresadas en Porcentajes

Grado	T	V	VA	Total	%
0	20	30	22	72	33.3
%	(27.8)	(41.7)	(30.6)		
1	24	22	20	66	30.6
%	(33.3)	(30.6)	(27.8)		
2	18	20	20	58	26.9
%	(25.0)	(27.8)	(27.8)		
3	10	0	10	20	9.3
%	(13.9)	(0.00)	(13.9)		

CONTRASTES DE GRUPO

Grado	T vs V	V vs VA	VA vs T	X ² t
0	*	NS	NS	3.6
1	NS	NS	NS	NS
2	NS	NS	NS	NS
3	*	*	NS	11.0 *

Grado= Grado de lesión

X²t = Contraste Total

(+) = Contraste de Grupo

* = P <= 0.05

La distribución de lesiones microscópicas en Pulmón fue significativamente diferente en los tres grupos observados (X²=12.83, P<= 0.05), Grados Libertad= 5)

Gráfico N° 4: Distribución de las lesiones microscópicas en pulmón clasificadas de 0 a 3 por su gravedad, expresadas en porcentajes.

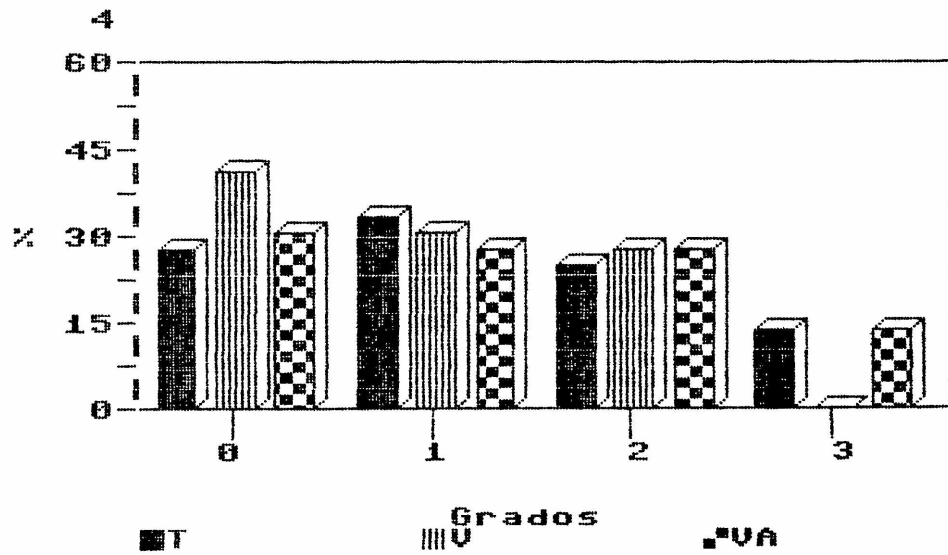


Tabla No 5 DISTRIBUCION DE LAS LESIONES MICROSCOPICAS
EN PULMON CLASIFICADAS DE 0 a 3 DE ACUERDO A SU GRAVEDAD

DISTRIBUCION EN ZONAS I

Grado	VA	AL	TL	Total	%
0	48	12	12	72	33.3
%	(66.7)	(16.7)	(16.7)		
1	12	26	28	66	30.6
%	(16.7)	(36.1)	(38.9)		
2	8	18	32	58	26.9
%	(11.1)	(25.0)	(44.4)		
3	4	16	0	20	9.3
%	(5.6)	(22.2)	(0.0)		

CONTRASTES DE GRUPO

Grado	VA vs AL	AL vs TL	TL vs VA	X ² t
0 (+)	**	NS	**	54.0**
1	*	NS	**	9.8*
2	*	*	**	20.5**
3	**	**	NS	11.0**

Grado= Grado de lesión

X²t = Contraste Total

(+) = Contraste de Grupo

* = P <= 0.05

** = P <= 0.01

VA: Vías aéreas

AL: Alvéolos

TL: Tejido linfoideo peribronquial

La distribución de lesiones microscópicas en zonas Pulmonares fue significativamente diferente en los tres grupos observados (X²=78.73, P <= 0.01), Grados Libertad= 6)

Gráfico N° 5: Distribución de los grados de lesiones microscópicas en tres zonas del pulmón (vías aéreas, alvéolos, tejido linfoideo).

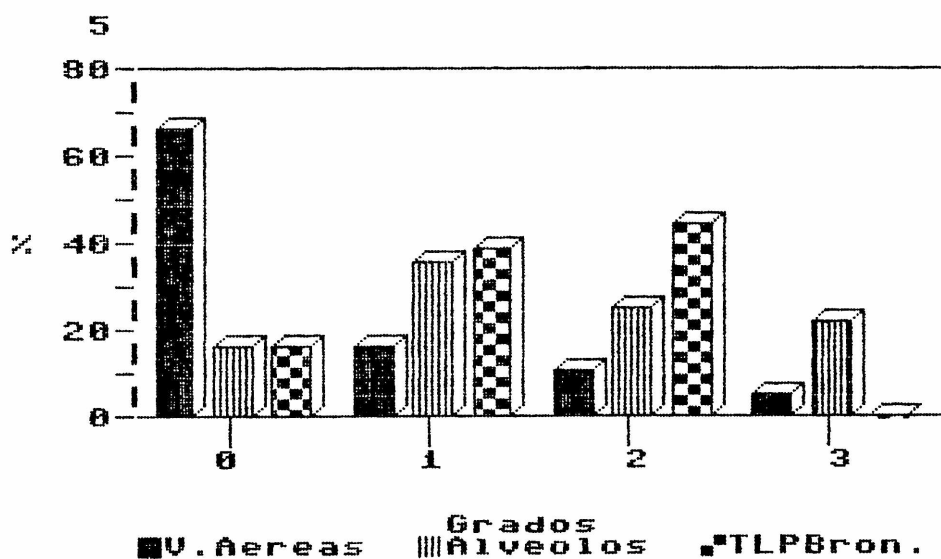


Tabla No 6 DISTRIBUCION DE LAS LESIONES MICROSCOPICAS
EN PULMON CLASIFICADAS DE 0 a 3 DE ACUERDO A SU GRAVEDAD

DISTRIBUCION EN ALVEOLOS I

Grado	T	V	VA	Total	%
0	0	10	2	12	16.7
%	(0.0)	(41.7)	(8.3)		
1	6	6	14	26	36.1
%	(25.0)	(25.0)	(58.3)		
2	8	8	2	18	25.0
%	(33.3)	(33.3)	(8.3)		
3	10	0	6	16	22.2
%	(41.7)	(0.0)	(25.0)		

CONTRASTES DE GRUPO

Grado	T vs V	V vs VA	Va vs T	X2t
0 (+)	**	*	NS	16.8**
1	NS	*	*	7.6*
2	NS	*	*	5.4*
3	**	*	NS	11.0**

Grado= Grado de lesión

X2t = Contraste Total

(+) = Contraste de Grupo

* = P<= 0.05

** = P<= 0.01

La distribución de lesiones microscópicas en Alvéolos fue significativamente diferente en los tres grupos observados (X2=32.42, P<= 0.01). Grados Libertad= 6)

Gráfico N° 6: Distribución de las lesiones (clasificadas de 0 a 3) en los alvéolos.

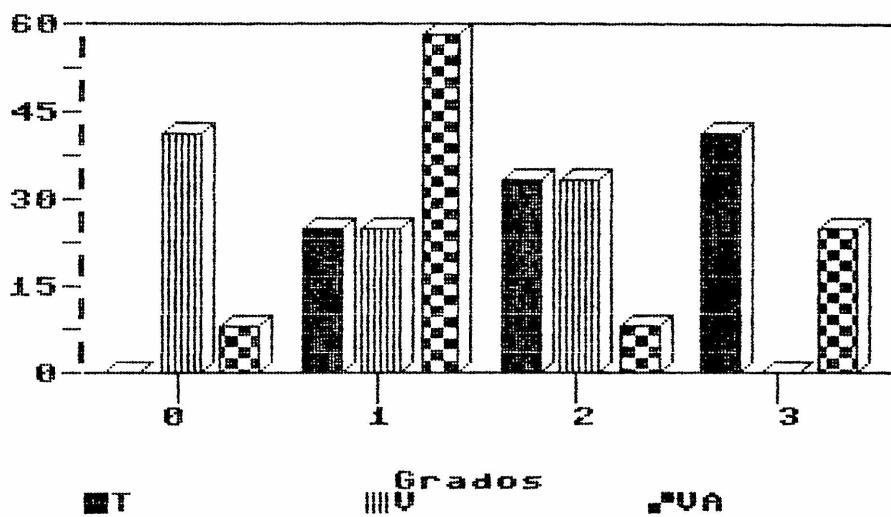


Tabla No 7 DISTRIBUCION DE LAS LESIONES MICROSCOPICAS
EN PULMON CLASIFICADAS DE 0 a 3 DE ACUERDO A SU GRAVEDAD

I DISTRIBUCION EN VIAS AEREAS I

Grado	T	V	VA	Total	%
0	12	18	18	48	66.7
%	(50.0)	(75.0)	(75.0)		
1	8	4	0	12	16.7
%	(33.3)	(16.7)	(0.0)		
2	4	2	2	8	11.1
%	(16.7)	(8.3)	(8.3)		
3	0	0	4	4	5.6
%	(0.0)	(0.0)	(16.7)		

CONTRASTES DE GRUPO

Grado	T vs V	V vs VA	VA vs T	X ² t
0 (+)	**	NS	**	4.6 *
1	NS	*	**	9.6 *
2	NS	NS	NS	NS
3	NS	*	*	8.7 *

Grado= Grado de lesión

X²t = Contraste Total

(+) = Contraste de Grupo

* = P<= 0.05

** = P<= 0.01

T = Testigos

V = Vacunados

VA = Vacunados más Aflatoxinas

La distribución de lesiones microscópicas en Vías aéreas fue significativamente diferente en los tres Grupos observados (X²=18.49, P<= 0.01), Grados Libertad= 6)

Gráfico N° 7: Distribución de las lesiones microscópicas en las vías aéreas.

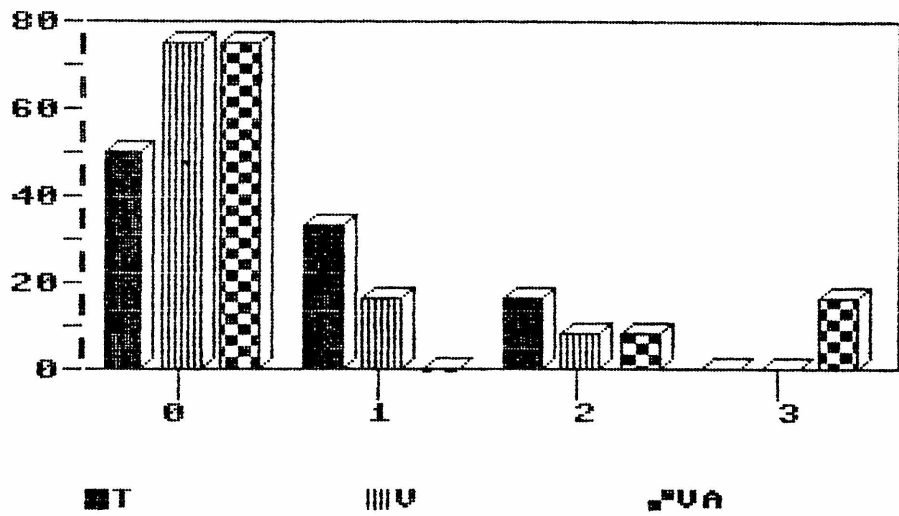


Tabla No 8 DISTRIBUCIÓN DE LAS LESIONES MICROSCÓPICAS
EN PULMON CLASIFICADAS DE 0 a 3 DE ACUERDO A SU GRAVEDAD

DISTRIBUCION EN EL TEJIDO LINFOIDEO PERIBRONQUIAL

Grado	T	V	VA	Total	%
0	8	2	2	12	16.7
%	(33.3)	(8.3)	(8.3)		
1	10	12	6	28	38.9
%	(41.7)	(50.0)	(25.0)		
2	6	10	16	32	44.4
%	(25.0)	(41.7)	(66.7)		
3	0	0	0	0	0.0
%	(0.0)	(0.0)	(0.0)		

CONTRASTES DE GRUPO

Grado	T vs V	V vs VA	VA vs T	X ² t
0 (+)	*	NS	*	7.2 *
1	NS	NS	NS	NS
2	NS	NS	**	8.5 *
3	NS	NS	NS	NS

Grado= Grado de lesión

X²t = Contraste Total

(+) = Contraste de Grupo

* = P<= 0.05

** = P<= 0.01

T = Testigos

V = Vacunados

VA = Vacunados más Aflatoxinas

La distribución de lesiones microscópicas en el Tejido Linfoideo PeribronQUIAL fue significativamente diferente en los tres grupos observados (X²=12.75, P<= 0.05), Grados Libertad= 6)

Gráfico N° 8: Distribución de las lesiones microscópicas en el tejido linfoide peribronquial.

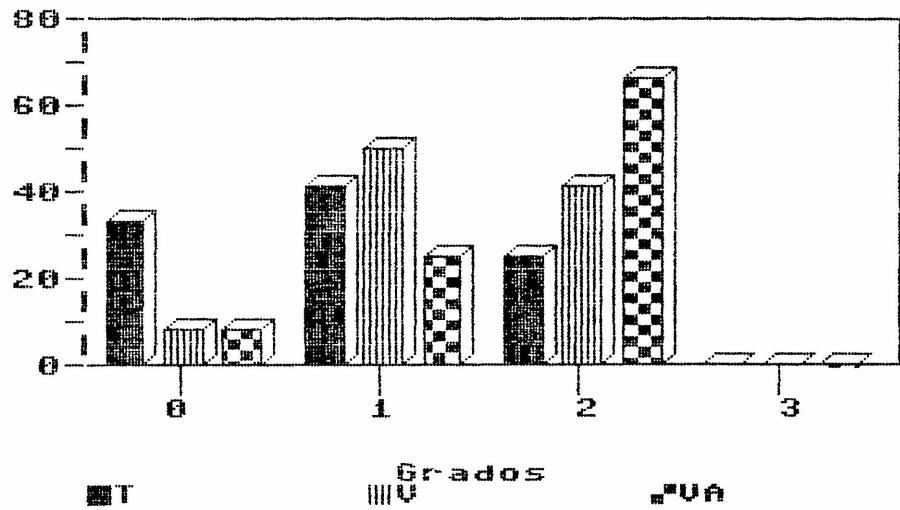


Tabla No 9 DISTRIBUCION DE LAS LESIONES MICROSCOPICAS EN PULMON CLASIFICADAS DE 0 a 3 DE ACUERDO A SU GRAVEDAD

 DISTRIBUCION EN EL TEJIDO LINFOIDEO PERIVASCULAR

<u>Grado</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	<u>VA</u>	<u>Total</u>	<u>%</u>
0	14	12	8	34	47.2
%	(58.3)	(50.0)	(33.3)		
1	10	8	10	28	38.9
%	(41.7)	(33.3)	(41.7)		
2	0	4	6	10	13.9
%	(0.0)	(16.7)	(25.0)		

 CONTRASTES DE GRUPO

<u>Grado</u>	<u>T vs V</u>	<u>V vs VA</u>	<u>VA vs T</u>	<u>X2t</u>
0 (+)	NS	NS	NS	NS
1	NS	NS	NS	NS
2	*	NS	*	6.5 *

Grado= Grado de lesión

X2t = Contraste Total

(+) = Contraste de Grupo

* = P<= 0.05

** = P<= 0.01

T = Testigos

V = Vacunados

VA = Vacunados más Aflatoxinas

La distribución de lesiones microscópicas en el Tejido Linfoides Perivascular no difirió significativamente entre los tres grupos observados (X2= 7.53, P> 0.05). Grados Libertad= 6).

Arrojaron diferencias significativas los contrastes individuales de grupo (P< 0.05)

Gráfico N° 9: Distribución de las lesiones microscópicas en el tejido linfoide perivascular del pulmón.

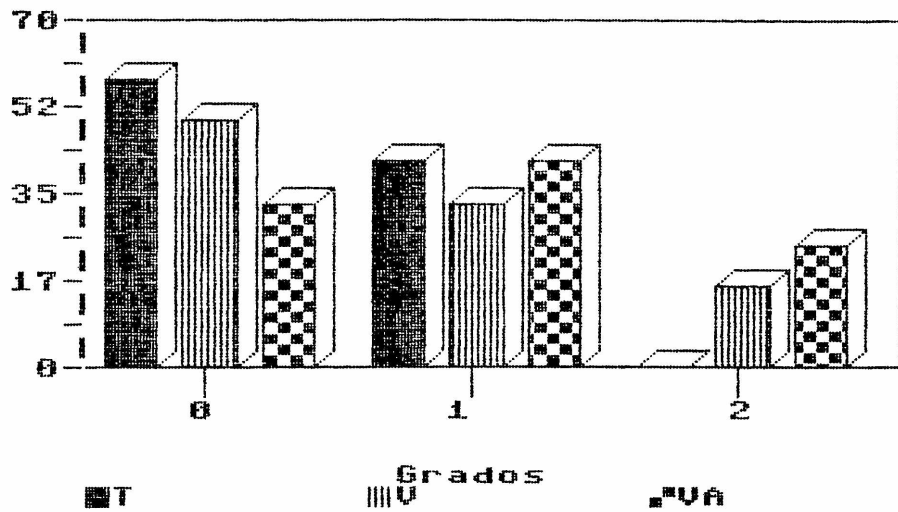


Tabla No 10 DISTRIBUCION DE LAS LESIONES MICROSCOPICAS
EN PULMON CLASIFICADAS COMO LESIONADOS Y NO LESIONADOS

DISTRIBUCION EN LA PLEURA

Grado	T	V	VA	Total	%
Les.	12	0	4	16	22.2
%	(50.0)	(0.0)	(16.7)		
No Les.	12	24	20	56	77.8
%	(50.0)	(100.)	(83.3)		
Total	24	24	24	72	100.0

CONTRASTES DE GRUPO

Grado	T vs V	V vs VA	VA vs T	X2t
Les (+)	**	*	*	17.99

Grado= Lesionados y No Lesionados

NS = Diferencias no Significativas

X2t = Contraste Total

(+) = Contraste de Grupo

* = P< 0.05

** = P< 0.01

T = Testigos

V = Vacunados

VA = Vacunados más Aflatoxinas

La distribución de lesiones microscópicas en la Pleura difirió significativamente entre los tres grupos observados (X2= 17.99, P< 0.01), Grados Libertad= 2).

Gráfico N° 10: Distribución de las lesiones microscópicas en pleuras (presencia o no de pleuritis).

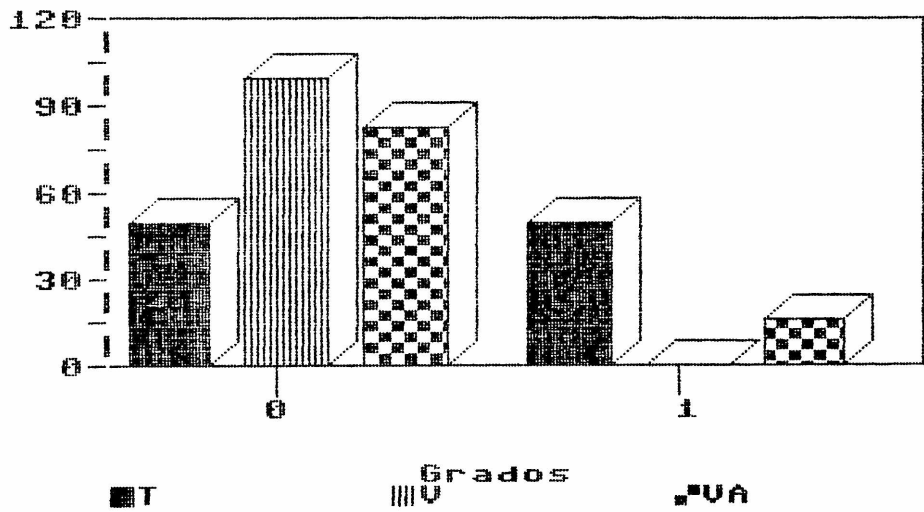


Tabla No 11 : PESO DE LOS ORGANOS
EXPRESADO EN GRAMOS

(Media +- Desvío Standar)

Organos	T	V	VA	F
<u>Hígado</u>	91.90 (30.00)	100.90 (28.30)	106.00 (16.00)	0.10 a
<u>Bazo</u>	2.20 (0.20)	2.60 (0.60)	2.60 (0.20)	0.20 a
<u>Pulmón</u>	19.80 (12.30)	14.70 (4.20)	15.30 (5.80)	0.90 a

a = Diferencias no significativas

T=Testigos - V=Vacunados - VA=Vacunados+Aflatoxina

F=Test de análisis de covarianza, Fisher

No se observaron diferencias significativas en los Pesos de los órganos estudiados

Tabla No 12: VARIACIONES DIARIAS DE TEMPERATURA

ANTES Y DESPUES DEL DESAFIO

Media(+Desvio Standar)

Ti.	T	V	VA	F
1	0.50 (0.50)	0.30 (0.30)	0.10 (0.20)	1.7 a
2	0.03 (0.10)	0.18 (0.24)	0.01 (0.77)	1.16 a
3	0.08 (0.28)	0.25 (0.37)	-0.15 (0.39)	1.42 a
D-----D				
4	0.33 (0.24)	-0.47 ** (0.61)	0.08 (0.37)	5.95 b
5	0.33 (0.66)	0.01 (0.28)	0.10 (0.50)	0.54 a
6	0.08 (0.57)	0.27 (0.30)	0.13 (0.51)	0.26 a
7	-0.77 (0.86)	-0.38 (0.20)	-0.38 (0.58)	0.68 a
8	-0.25 (0.76)	-0.25 (0.19)	-0.17 (0.21)	0.06

4 ** P < 0.01, F=10.72 GL=1/10 +

a Diferencias no significativas

b F Para 2 y 10 Grs de Libertad(P< 0.05)

+ Grs.de Libertad en Polinomios ortogonales (Lison, 1976)

D=..Desafio..

T=Testigos - V=Vacunados - VA=Vacunados+Aflatoxina

F=Test de análisis de varianza, Fisher

Ti=Intervalos de tiempo, 24 Horas

4. Posterior al Desafio, el grupo V arrojó la media significativamente menor (-0.47) en contraste con los grupos T y VA, que no difirieron entre sí (P< 0.01)

Gráfico N° 12: Variaciones diarias de temperatura antes y después del desafío.

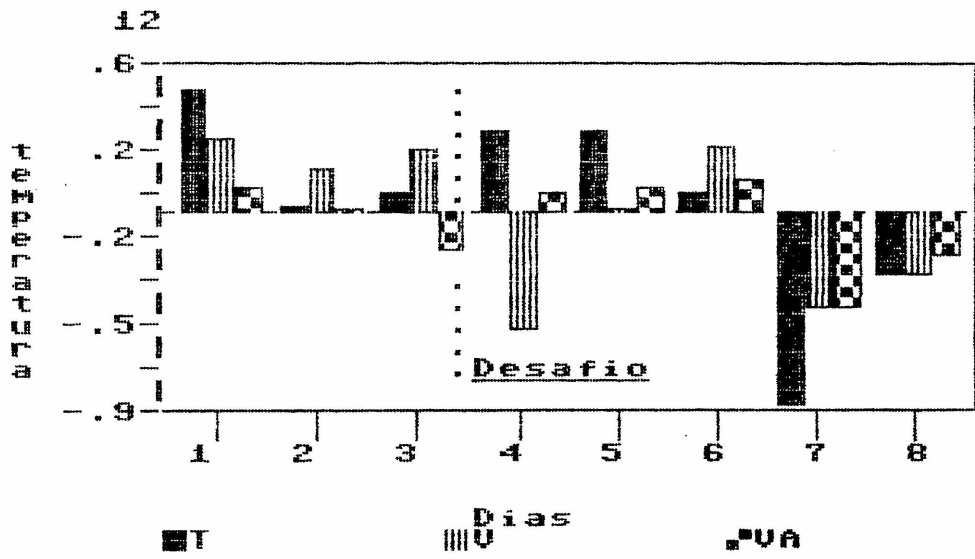


TABLA N^o 13: Índice de estimulación de los linfocitos T periféricos.

	C	PHA	I.E
	c.p.m.		
Grupo T	210.2	259.1	0.8
Grupo V	156.3	1004.0	6.4
Grupo VA	80.9	60.2	0.7

PHA : Muestras estimuladas con PHA

C : Muestras Control

c.p.m.: Cuentas por minuto

I.E. : Índice de estimulación expresado como cociente de Error Estandard de las c.p.m.

TABLA N°14: Prueba cutánea con PHA

	T	V	VA	
C/i	0	4(66%)	6(100%)	10(55%)
S/i	6 (100%)	2(34%)	0	8(45%)
TOTAL	6	6	6	18(100%)

C/i: con induración cutánea

S/i: sin induración cutánea

T fue significativamente diferente de V y VA, que no difirieron entre si($p < 0,01$)

Tabla No: 15 PORCENTAJE DE FAGOCITOSIS Y ADHERENCIA

DE LOS MACROFAGOS ALVEOLARES

Con sus sueros Homólogos

	MA-T s.T	MA-V s.V	MA-VA s.VA	Total
F	777.0 ***	624.0 **	661.0	2062
%	(+ 87.0)	(+ 62.2)	(+ 67.9)	
A	116.0 ***	379.0 **	313.0	808
%	(+ 13.0)	(+ 37.8)	(+ 32.1)	
Tot.	893.0	1003.0	974.0	2870

Test usado = G

*** = $P < 0.005$

** = $P < 0.01$

* = $P < 0.05$

-* = $P < 0.10$

F : Fagocitosis

A : Adherencia

MA: Macrófago alveolar

S : Suero

T : Grupo T; V: Grupo V; VA: Grupo VA

Tabla No:16 PORCENTAJE DE FAGOCITOSIS Y ADHERENCIA
DE LOS MACROFAGOS ALVEOLARES

Macrófagos de T con sueros T, V, VA				
	MA-T + s.T	MA-T + s.V	MA-T + s.VA	Total
F	***777.0	*** 470.0	*** 713.0	1960
%	(+- 87.0)	(+- 46.1)	(- 63.8)	
R	***116.0	*** 550.0	*** 405.0	1071
%	(+- 13.0)	(+- 53.9)	(+- 36.2)	
Tot.	893.0	1020.0	1118.0	3031
Macrófagos de V con sueros V, VA, T				
	MA-V + s.V	MA-V + s.VA	MA-V + s.T	Total
F	624.0 *	936.0 NS	472. NS	2032
%	(+- 62.2)	(+- 67.8)	(+- 65.3)	
R	379.0 *	445.0 NS	251. NS	1075
%	(+- 37.8)	(+- 32.2)	(+- 34.7)	
Tot.	1003.0	1381.0	723.0	3107
Macrófagos de VA con sueros VA, V, T				
	MA-VA + s.VA	MA-VA + s.V	MA-VA + s.T	Total
F	*** 661.0	*** 608.0	*** 622.0	1891
%	(+- 67.9)	(+- 47.0)	(+- 76.7)	
R	*** 313.0	*** 685.0	*** 189.0	1187
%	(+- 32.1)	(+- 53.0)	(+- 23.3)	
Tot.	974.0	1293.0	811.0	3078

Test usado = G, *** = PC 0.005, ** = PC 0.01, * = PC 0.05, NS = Diferencias no Significativas

Tabla No:17 AUMENTO DE PESO SEMANAL, EXPRESADO EN Grs.

Media (\pm Desvio standar)

Se.	T	V	VA	F
1	196.7 (\pm 124.8)	196.7 (\pm 46.3)	203.3 (\pm 79.4)	0.02a
2	133.3 (\pm 61.5)	86.7 (\pm 85.2)	88.3 (\pm 90.8)	0.9 a
3	148.3 (\pm 121.2)	140.0 (\pm 50.1)	175.0 (\pm 46.4)	0.1 a
4	145.0 (\pm 43.2)	166.7 (\pm 54.6)	151.7 (\pm 18.3)	0.3 a
5	55.0 (\pm 101.5)	76.7 (\pm 58.5)	50.0 (\pm 84.4)	0.07a
6	106.7 (\pm 70.9)	123.3 (\pm 68.6)	118.3 (\pm 62.1)	0.11a
7	78.3 (\pm 54.6)	56.7 (\pm 98.3)	63.3 (\pm 61.2)	0.12a
8	93.3 (\pm 103.2)	70.0 (\pm 77.7)	-13.3 # (\pm 104.2)	4.01
9	153.3 (\pm 90.4)	146.7 (\pm 54.6)	143.3 (\pm 100.5)	0.1 a

T = Testigos

V = Vacuandos

VA = Vacuanados + Aflatoxina

*** = $P < 0.005$

** = $P < 0.01$

* = $P < 0.05$

= $0.05 > P < 0.10$

a = Diferencias no significativas

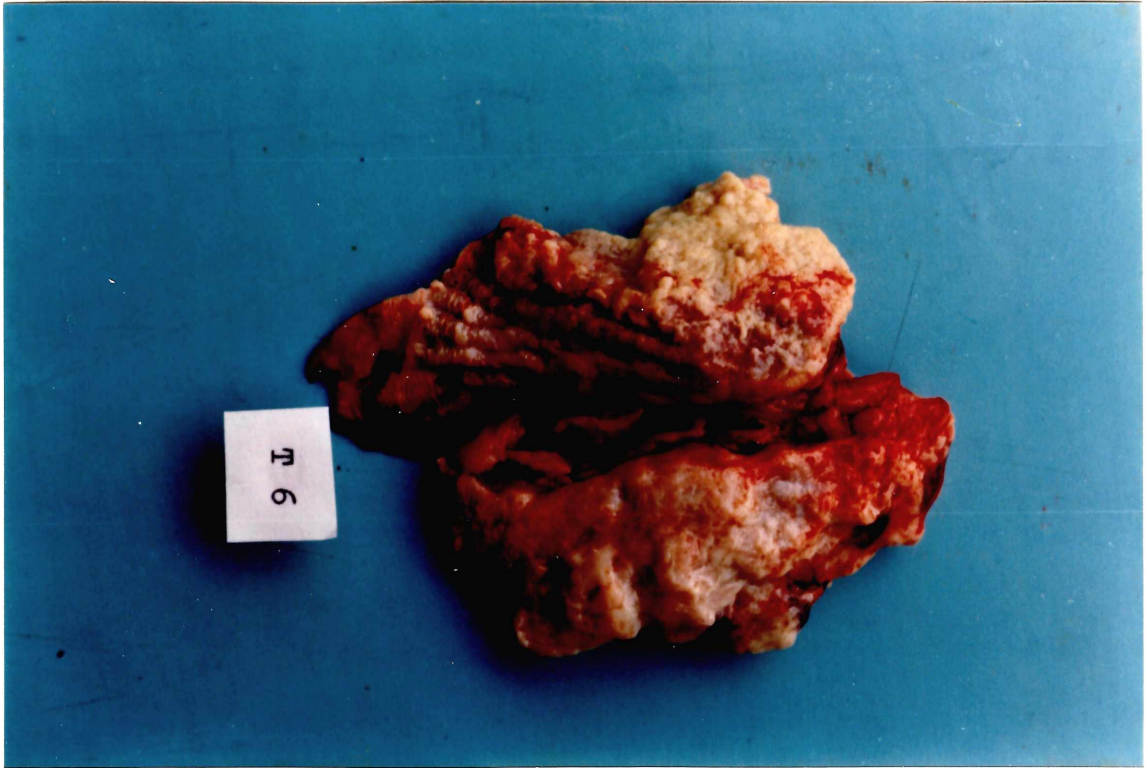


Foto N 1: Pulmón de un animal testigo: se observa una extensa área de pleuroneumonía fibrinopurulenta.

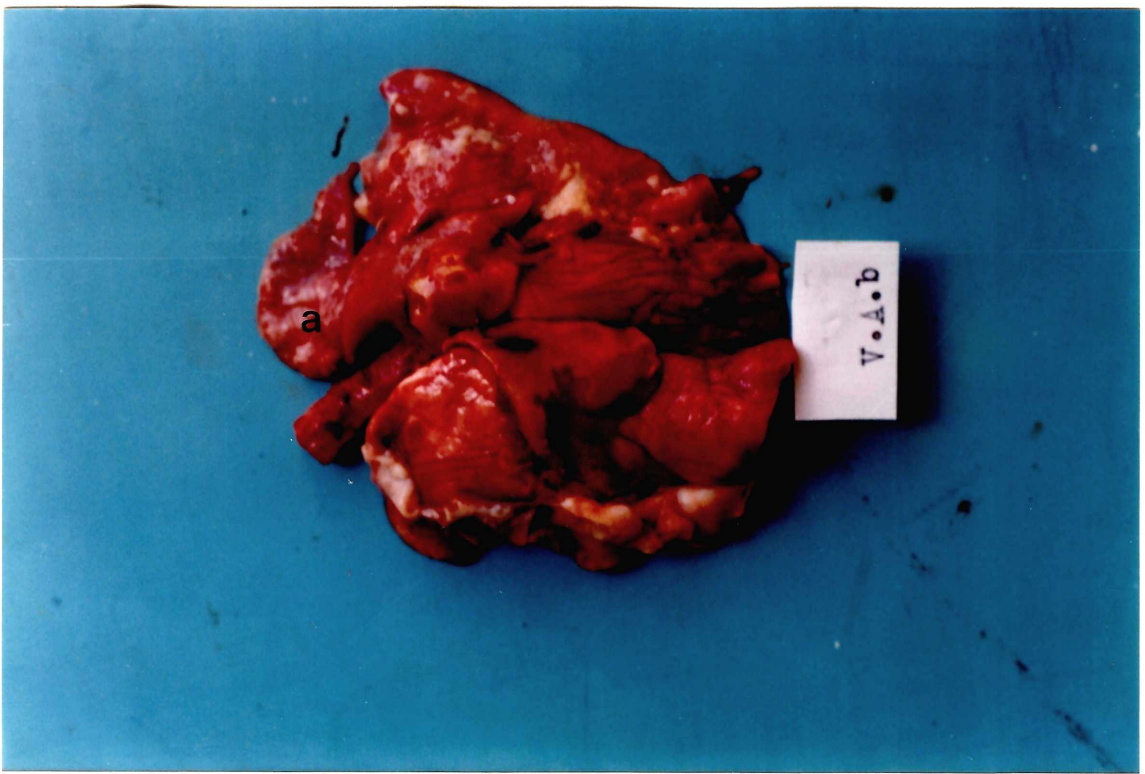


Foto N 2: Pulmón de un animal del grupo VA: se observan focos de consolidación.(a) con localización en lóbulo cranial.

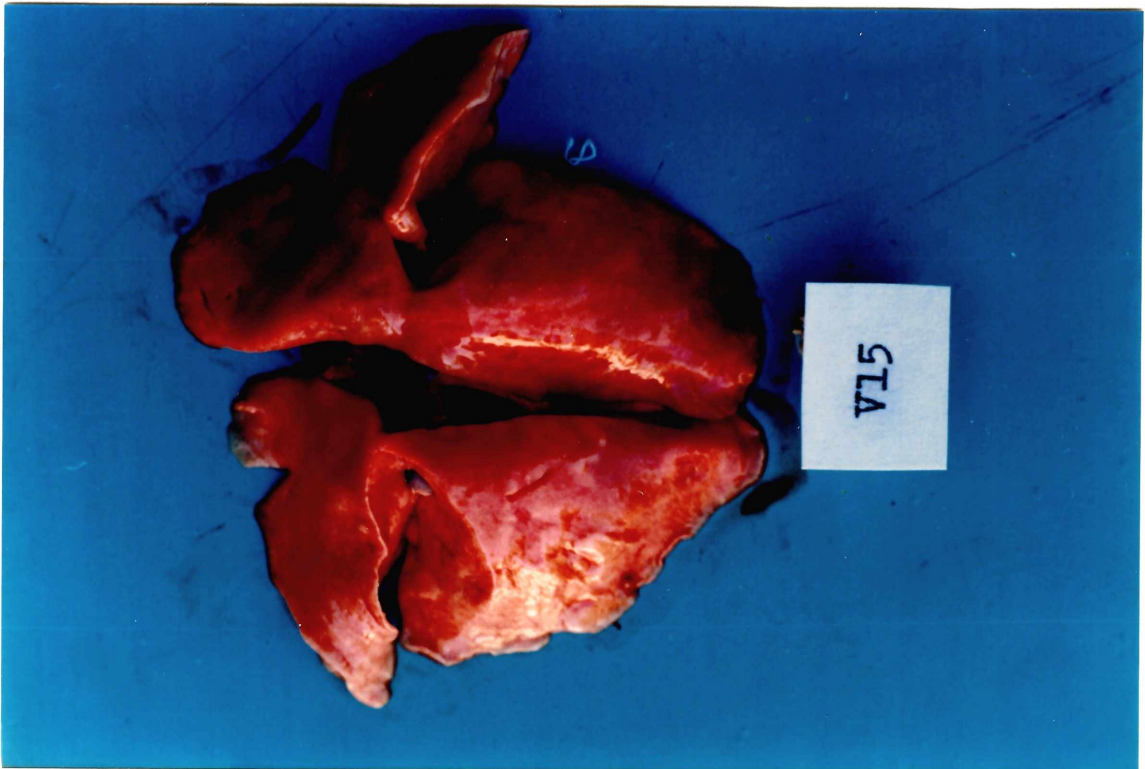


Foto N 3: Pulmón de un animal vacunado. No se observan lesiones macroscópicas.

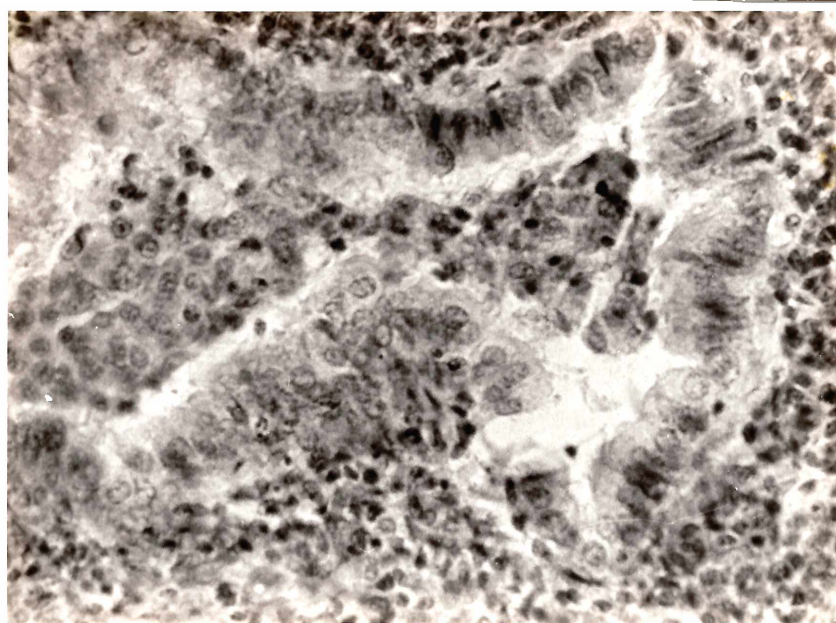


Foto N^o 4: Vías aéreas: Grado 1: presencia de escaso exudado en la luz, sin cambios en la pared del bronquíolo. H&E. 40 x.

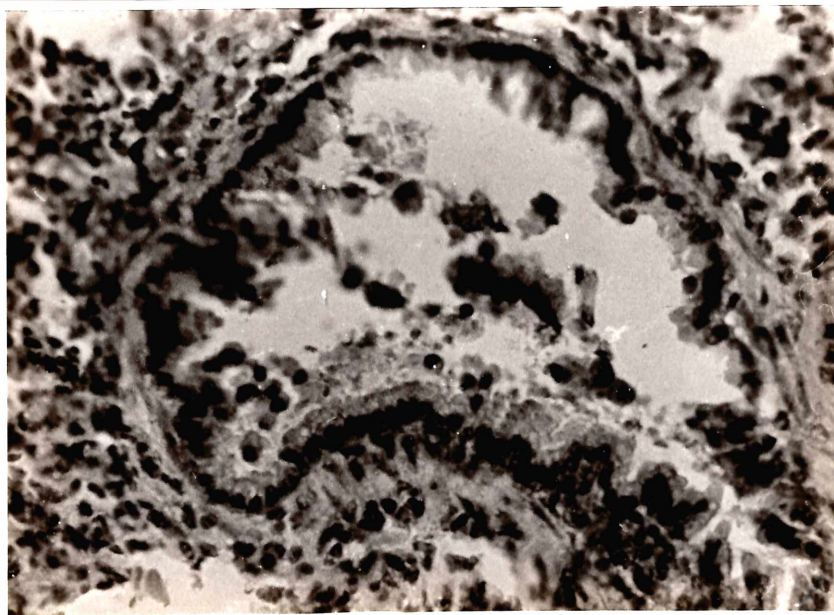


Foto N^o 5: Vías aéreas: Grado 2: Lo indicado en l más la descamación e infiltración en la pared de polimorfonucleares y mononucleares. H&E. 40 x.

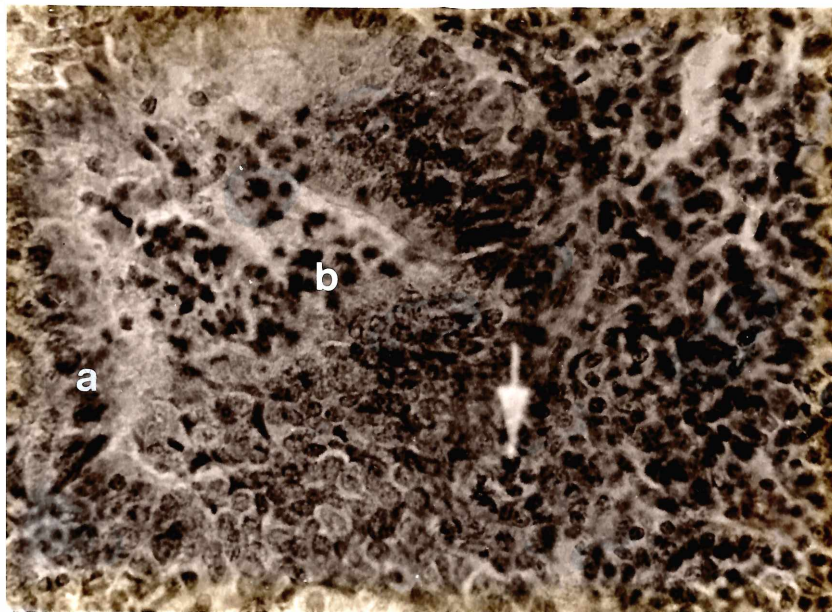


Foto N^o 6: Vías aéreas: Grado 3: bronquilitis obstructiva (a) epitelio relativamente normal. (b) detritus celular y exudado que obstruyen la luz del bronquíolo. H&E. 40 x.

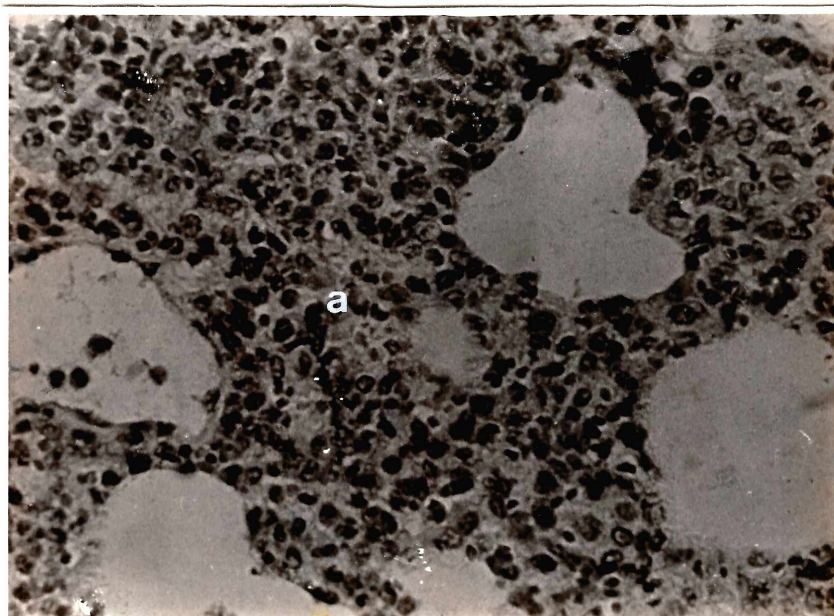


Foto N^o 7: Alvéolos: Grado 1: Liger o moderado engrosamiento de la pared alveolar por células inflamatorias. (a) H&E. 40 x.

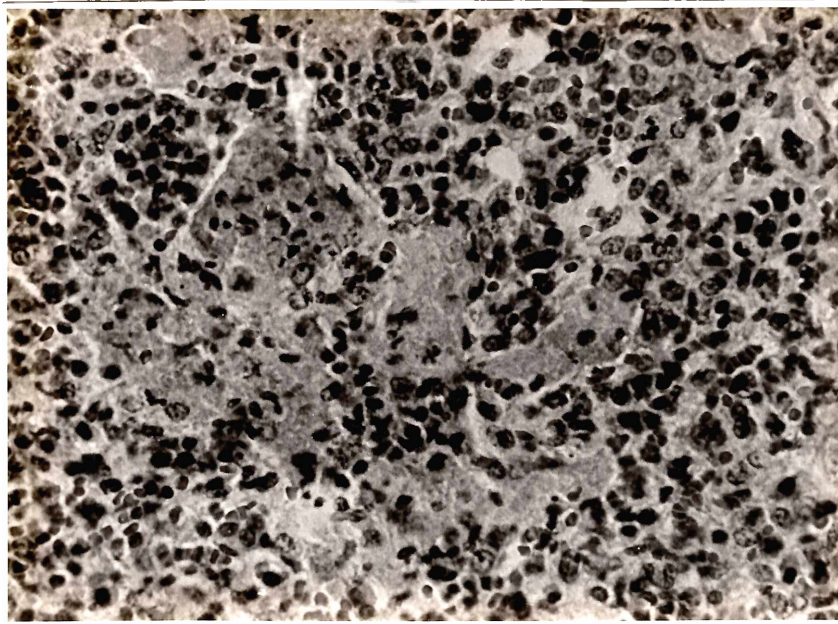


Foto N^o 8: Alvéolos: Grado 2: lo indicado en 1 más una marcada infiltración celular en la luz alveolar. H&E. 40 x.

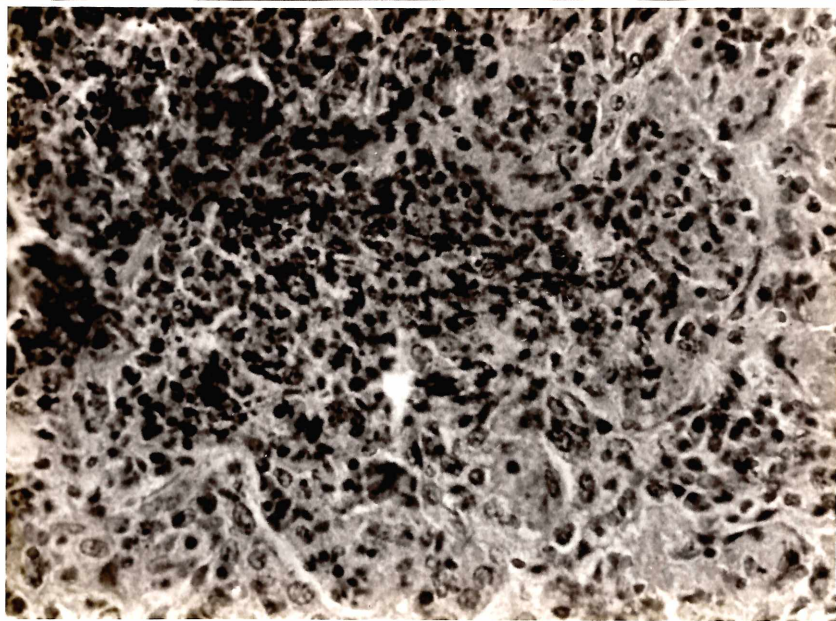


Foto N^o 9: Alvéolos: Grado 3: Lo indicado en 2 más consolidación o necrosis. H&E. 40 x.

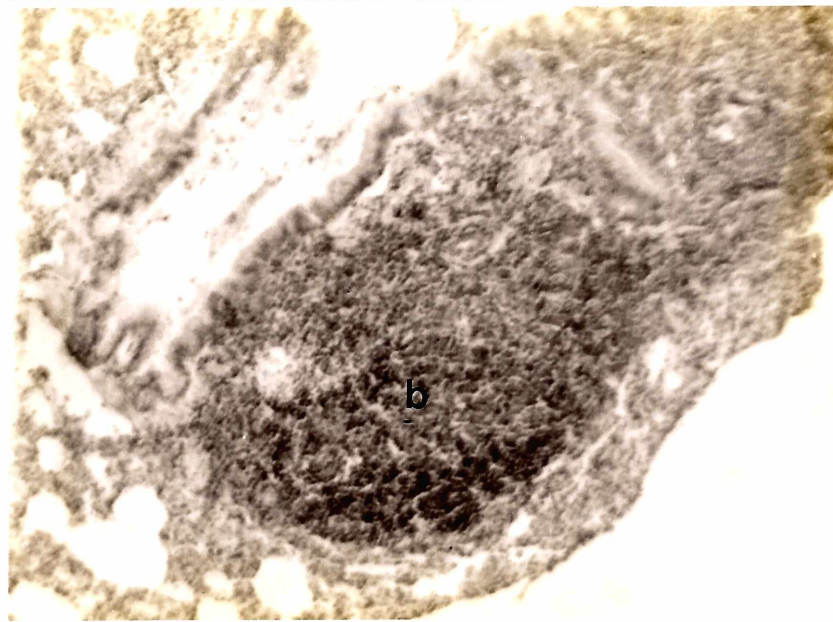


Foto N^o 10: Tejido linfoide peribronquial. Grado 2: Moderada hipertrofia (b) con deformación bronquiolar. H&E. 10 x.

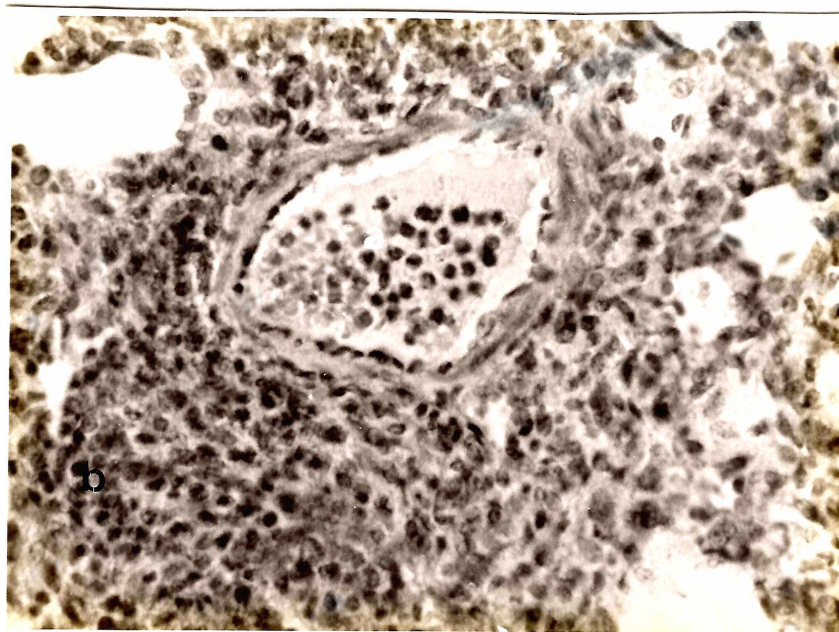


Foto N^o 11: Tejido linfoide perivascular. Grado 1: se visualiza. (a) vaso sanguíneo. (b) tejido linfoideo. H&E. 40 x.

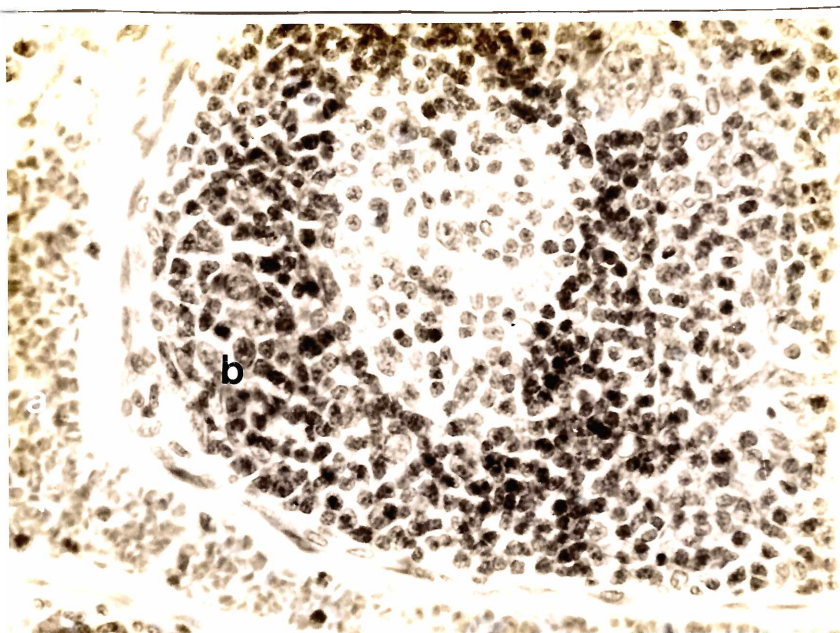


Foto N° 12: Tejido linfoideo perivascular. Grado 2: se visualiza muy marcada hipertrofia (B). vaso sanguíneo (a). H&E. 40 x.

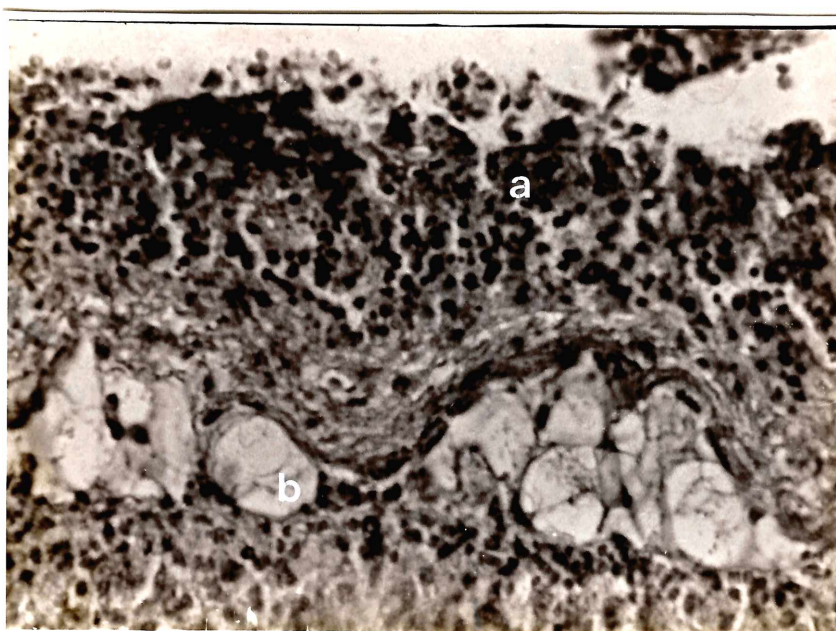


Foto N° 13: Pleuritis. (a) Exudado inflamatorio sobre la superficie pleural. (b) linfangiectasia. H&E. 40 x.

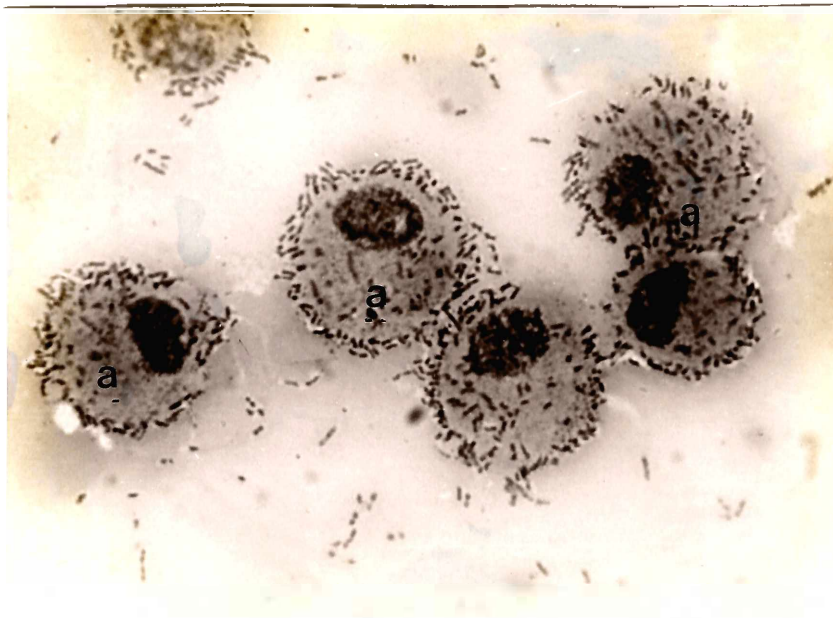


Foto N 14: a) Macrófago alveolar con bacterias adheridas a su superficie. Coloración de May Grunwald Giemsa. 100 x.

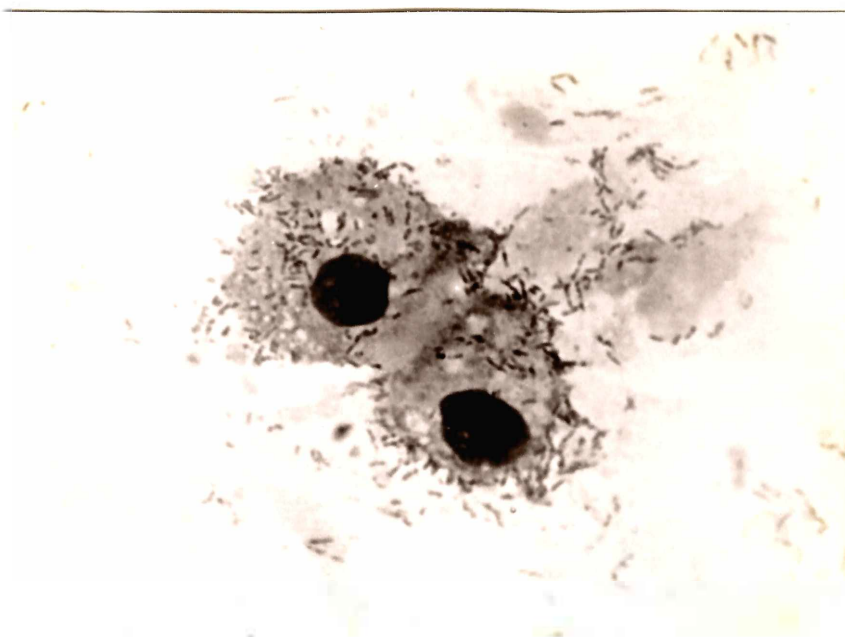


Foto N 15: Macrófago alveolar con bacterias fagocitadas en su interior. Se observan vacuolas fagocíticas. Coloración de May Grunwald Giemsa. 100 x.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1.- APPLEBAUM, R.S.; BRACKETT, R.E.; WISEMAN, D. and MARTH, E.H. Aflatoxin: Toxicity to Dairy Cattle and occurrence in milk and milk products. A review J. Food. Prot. 45: 752-777. 1982.
- 2.- BERTRAM, T.A.: Quantitative morphology of peracute pulmonary lesions induced by Haemophilus pleuropneumoniae. Vet. Pathol. 22: 598-609. 1985.
- 3.- BODINE, A.B.; FISHER, S.F. and GANGJEE, S.: Effect of Aflatoxin B₁ and Major Metabolites on Phytohemagglutinin stimulated Lymphoblastogenesis. J. Dairy Sci., 67: 110-114. 1984.
- 4.- BONACIC KRESIC, M.R. de: Micotoxinas. Panorama actual en el país y en el mundo. Misceláneas N° 9. INTA. E.E.R. Roque Saenz Peña (Chaco). 1983.
- 5.- BUSCAGLIA, C.; CALNEK, B.W. and SCHAT, K.A.: Effect of Immunocompetence on the establishment and maintenance of latency with Marek's disease herpesvirus. J. Gen. Virol. 69: 1067-1070. 1988.
- 6.- CARNAGHAN, R.B.A.: Hepatic tumours and other chronic liver changes in rats following a single oral administration of aflatoxin. The British Journal of Cancer. 21: 811-814. 1967.
- 7.- CARTER, G.R.: Studies on *Pasteurella multocida* I. A hemagglutination test for the identification of Serological types. Am. J. Vet. Res. 16: 481-484. 1955.
- 8.- CARTER, G.R.: Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica*. Adv. vet. Sci. 11: 321-379. 1967.

- 9.- CHARLEY, B.: Le macrophage alvéolaire chez le porc.: description et etude fonctionnelle. Ann. Rech. Vét. 13: 1-9. 1982.
- 10.- CHARLEY, B.: Effects of immunopotentiating agents on alveolar macrophage properties. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 9: 155-159. 1986.
- 11.- CHENGAPPA, M.M.; CARTER, G.R. and BAILIE, W.E.: Identification of type D *Pasteurella multocida* by counterimmune-electrophoresis. J. Clin. Microbiology 24: 721-723. 1986.
- 12.- CHEVILLE, N.F.: Cell Pathology. 2nd ed. The Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. 1983.
- 13.- CLARK, J.D.; JAIN, A.B.; HATCH, R.C. and MAHAFFEY, E.A.: Experimental induced chronic aflatoxicosis in rabbits. Am. J. Vet. Res. 11: 1041-1045. 1980.
- 14.- CLARK, J.D.; JAIN, A.V. and HATCH, R.C.: Effects of various treatment on induced chronic aflatoxicosis in rabbits. Am. J. Vet. Res. 43: 106-110. 1982.
- 15.- COULOMBE, R.A.; DENNIS, W.W.; HSIEH, D.P.H.; PLOPPER, Ch. G. and COSETTE, J.S.: Metabolism of Aflatoxin B₁ in the upper airways of the rabbit: role of the nonciliated tracheal epithelial cell. Cancer Research. 46: 4091-4096. 1986.
- 16.- CYSEWISKI, A.J.: Effects of aflatoxins on the development of acquired immunity to swine Erysipelas. Am. J. Vet. Res. 39: 445-448. 1978.
- 17.- DALVI, R.R.: An overview of Aflatoxicosis of poultry: its characteristics prevention and reduction. Veterinary Research Communications. 10: 429-443. 1986.

- 18.- EDDS, G.T.: Acute aflatoxicosis: A review. J.A.V.M.A., 4: 304-309. 1973.
- 19.- FANGER, M.W.; HART, D.A.; WELLS, J.V. and NISONOFF, A.: Requirement for cross-linkage in the stimulation of transformation of rabbit peripheral lymphocytes by antiglobulin reagents. J. Immunol., 105: 1484-1493. 1970.
- 20.- FANGER, M.W.; REESE, A.; SCHOENBERG, M.D.; STAVITSKY, A.B. and REESE, A. L.: Evidence for T lymphocyte subpopulations in the rabbits. J. Immunology, 112: 1971-1980. 1974.
- 21.- FLATT, R.E. and DUNGWORTH, D.L.: Enzootic Pneumonia in rabbits: microbiology and comparison with lesions experimentally produced by *Pasteurella multocida* anal Chlamydial organism. Am. J. Vet. Res. 4: 627-637. 1971.
- 22.- GIAMBRONE, J.J.; DIENER, V.L.; DAVIS, N.D.; PANANGALA, V.S. and HOERR, F. J.: Effect of purified aflatoxin on broiler chickens. Poultry Science 64: 852-858. 1985.
- 23.- GIAMBRONE, J.J.; DIENER, V.L.; DAVIS, N.D.; PANANGALA, V.S. and HOERR, F. J.: Effect of purified aflatoxin on turkeys. Poultry Science 64: 859-865. 1985.
- 24.- HEALEY, M.C. and GAAFAR, S.M.: Immunodeficiency in canine demodectic mange. II. Skin reactions to Phytohemagglutinin and Concavalin. A. Vet. Parasit. 3: 133-140. 1977.
- 25.- HEATHCOTE, J.G.: Aflatoxins and related toxins. en Betina, V. (Ed.): Mycotoxins. Production, Isolation, Separation and Purification. Elsevier Sc. Publishers B.V. Amsterdan. 1984. pp. 89-130.
- 26.- HOIDAL, J.R.; BEALL, G.D.; RASP, F.L.; HOLMES, B.; WHITE, J.G. and REPI-NE, J.E.: Comparison of the metabolism of alveolar macrophages from

- humans, rats and rabbits: response to heat-killed bacteria or phorbol myristate acetate. J. Lab. Clin. Med. 92: 787-794. 1978.
- 27.- JOHNSTONE, A. and THORPE, R.: Immunochemistry in practice. 2nd. Edition. Blackwell Scientific Publications. 1987.
- 28.- KENDE, M.: Role of macrophages in the expression of immune response. J.A.V.M.A., 181: 1015-1021. 1982.
- 29.- KISHIMA, M.; ROSS, R.F. and KUNIYASU, C.: Cell mediated and humoral immune response to *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs enhanced by dextran sulfate. Am. J. Vet. Res., 46: 456-462. 1985.
- 30.- KLESZIUS, P.: Intercellular communication: Role of soluble factors in cellular immune response. J.A.V.M.A., 181: 1015-1021. 1982.
- 31.- KROGH, P.: The role of mycotoxins in disease of animals and man. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement. 995-1045. 1989.
- 32.- LIGGITT, H.D.: Defense mechanisms in the bovine lung. en Breeze, R. (Ed.) The Veterinary Clinics of North América Food Animal Practice. Symposium on Bovine Respiratory disease. W.B. Saunders. Company Philadelphia. U.S.A. 1985. pp. 347-366.
- 33.- LISON, L.: Estadística aplicada a la biología experimental. Planificación de experiencias y análisis de resultados. Ed. Univ. Buenos Aires. 1976.
- 34.- MARKHAM, R.J.F. and WILKIE, B.N.: Influence of bronchoalveolar washing supernatants and stimulated lymphocyte supernatants on uptake of *Pasteurella haemolytica* by cultured bovine alveolar macrophages. Am. J. Vet. Res., 41: 443-446. 1980.

- 35.- MILLER, D.M.; STUART, B.P. and CROWELL, W.A.: Experimental aflatoxicosis in swine: morphological and clinical pathological results. *Can. J. Comp. Med.*, 45: 343-351. 1981.
- 36.- MORISSE, J.P.; BODOLEC, J.L. and ANDRIEUX, J.: Prophylaxe medicale de la Pasteurellose du lapin: essai de trois vaccins. *Rec. Med. Vet.*, 155 (9): 693-701. 1979.
- 37.- MUNEER, M.A.; FARAH, I.O.; NEWMAN, J.A. and GOYAL, S.M.: Immunosuppression in animals. *Br. Vet. J.*, 144: 288-301. 1988.
- 38.- MYRVIK, Q.; LEAKE, E. and FARISS, B.: Studies on pulmonary alveolar macrophages from the normal rabbit: A technique to procure them in a high state of purity. *J. Immunol.* 86: 128-132. 1961.
- 39.- NEWBERNE, P.M. and BUTLER, M.H.: Acute and Chronic Effects of Aflatoxins on the liver of Domestic and Laboratory Animals. A Review. *Cancer Res.* 29: 236-250. 1969.
- 40.- NEWBERNE, P.M.: Chronic Aflatoxicosis. *J.A.V.M.A.*, 11: 1262-1267. 1973.
- 41.- OGMUNSDOTTIR, H.M. and WEIR, D.M.: Mechanisms of macrophage activation. *Clin. Exp. Immunol.* 40: 223-234. 1980.
- 42.- OSEBOLD, J.W.: Mechanisms of action by immunologic adjuvants. *J.A.V.M.A.*, 181: 983-987. 1982.
- 43.- OSUNA, O.; EDDS, G.T. and SIMSON, Ch. F.: Toxicology of Aflatoxin B₁, warfarin and cadmium in young pigs: metal residues and pathology. *Am. J. Vet. Res.* 43: 1395-1400. 1982.
- 44.- PANANGALA, V.S.; GIAMBRONE, J.J.; DIENER, U.L.; DAVIES, N.D.; HOERR, F.J.,

- MITRA, A.; SCHULTZ, R.D. and WILT, G.R.: Effects of Aflatoxin on the growth performance and immune response of weanling swine. Am. J. Vet. Res. 47: 2062-2067, 1986.
- 45.- PAUL, P.S.; JOHNSON, D.W.; MICROCHA, C.J.; SOPER, F.F.; THOEN, C.O.; MUSCOPLAT, C.C. and WEBER, A.F.: In vitro stimulation of bovine peripheral blood lymphocytes. Supression of phytomitogen and specific antigen lymphocyte responses by aflatoxin. Am. J. Vet. Res. 38: 2033-2035. 1977.
- 46.- PEDEN, W.M.; RICHARD, J.L.; THURSTON, J.R. and SACKS, J.: Effect of pre-treatment with aflatoxin on a second aflatoxin treatment in guinea pigs. Mycopathologia. 99: 107-114. 1987.
- 47.- PERCY, D.H.; PRESCOTT, J.L. and BHASIN, J.L.: *Pasteurella multocida* infection in the domestic rabbits: Immunization with a streptomycin dependent mutant. Can. J. Comp. Med. 49: 227-230. 1985.
- 48.- PERFUMO, C.; BANCHERO, E.P. de; GONZALEZ, J.; GENTILETTI, R. y SALA de MIGUEL, M.: Aflatoxicosis en cerdos: descripción de un caso de campo. Rev. Med. Vet. (Bs.As.) 64: 308-316. 1983.
- 49.- PERFUMO, C.J.; BRANDETTI, E.; VENTURINI, M.C.; PETRUCELLI, M.A.; MENENDEZ N.A.; GARCIA VALENTE, H.; GARBI, A.; BUSCAGLIA, C.; COURREGES, M.: Pasteurellosis del conejo. I. Un estudio de campo y experimental. Rev. Med. Vet. 65: 180-192. 1984.
- 50.- PIER, A.C.: Effects of aflatoxins on immunity. J.A.M.V.A., 11: 1268-1269. 1973.
- 51.- PIER, A.C.; HEDDLESION, K.L.: The effect of aflatoxin in immunity in turkey. Impairment of actively acquired resistance to bacterial challenge. Avian. Dis. 14: 797-809. 1970.

- 52.- PIER, A.C.; FICHTNER, R.E. and CYSEWSKI, S.J.: Effects of aflatoxin on the immune system Ann. Nutr. Alim., 31: 781-788. 1977.
- 53.- PIER, A.C.; RICHARD, J.L.; THURSION, J.R.: The influence of mycotoxins on resistance and immunity.en: Proceedings of the 1978 Symposium on interaction of Mycotoxins in Animal Production. Nat. Academic Sciences. pp. 56-66. 1979.
- 54.- PIER, A.C.; RICHARD, J.L.; CYSEWISKI, S.J.: Implications of Mycotoxins in Animal Disease. J.A.V.M.A. 8: 719-724. 1980.
- 55.- PIER, A.C.; RICHARD, J.L.; THURSTON, J.R.: Effects of Aflatoxin on the mechanisms of Immunity and Native Resistance.en: Preusser (Eds.). Medical Mycology. Zbk. Bakt. Suppl. 8 Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. New York 1980, pp. 301-309.
- 56.- PIER, A.C. and Mc Loughlin, M.E.: Mycotoxic suppression of immunity en: Lacey J. (Ed.): Trichotecenes and other mycotoxins. John Wiley & Sons. Ltd. U.S.A. 1985. pp. 507-519.
- 57.- PIER, A.C.; VARMAN, R.R.; DAHLGREN, E.L. and MAKI, L.R.: Aflatoxin supression of cell mediated immune response and interaction with T-2 Toxin, en Steyn, P.S. and Vleggaar, R. (Eds.): Mycotoxins and Phycotoxins Elsevier Sc. Publishers B.V., Amsterdam. 1986. pp. 423-434.
- 58.- REID, M.I.: Morphometric Methods in Veterinary Pathology: A Review. Vet. Pathol. 17: 522-543. 1980.
- 59.- RICHARD, J.L.; THURSTON, J.R.: Effect of aflatoxin on phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* spores by rabbit alveolar macrophages. Appl. Microbiol. 1: 44-47. 1975.

- 60.- RIMLER, R.B.; BRODJEN, K.: Pasteurella multocida isolated from rabbits and swine: Serologic types and toxin production. Am. J. Vet. Res. 47: 730-737. 1986.
- 61.- ROITT, I.; BROSTOFF, J. and MALE, D.: Inmunología. Edición española. Gower Medical Publishing L.t.d., Sucursal en España, Barcelona, España. 1986.
- 62.- SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J.: Introducción a la Bioestadística. Editorial Reverté S.A., España. 1984.
- 63.- THAXTON, J.P.; TUNG, H.T.; HAMILTON, P.B.: Immunosuppression in chickens by aflatoxins. Poultry Science, 53: 721-725. 1974.
- 64.- THURSTON, J.R.; COOK, W.; DRIFTMIER, K. and SACKS, J.: Decreased complement and bacteriostatic activities in the sera of cattle given single or multiple doses of aflatoxin. Am. J. Vet. Res. 47: 846-849. 1986.
- 65.- THURSTON, J.R.; RICHARD, J.L. and PEDEN, W.M.: Importance of Micotoxins as suppressors of immunity. En: Proceedings of the VI International Conference on the Mycoses; Washington D.C., U.S.A. Panamerican Health Organization. 1986. pp. 53-58. (Scientific Pub. N^o 479).
- 66.- VALERO GIRADO, F. y SANCHES VIZCAINO, J.M.: Purificación de las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune del cerdo. Estudio comparativo de varias técnicas. An. INIA/Ser. Ganadera IN, 14: 69-81. 1982.
- 67.- VANSELOW, B.A.: The application of Adjuvants to Veterinary Medicine. Vet. Bull. 57: 881-896. 1987.
- 68.- VENTURINI, M.C.; PERFUMO, C.J.; RISSO, M.A.; GOMEZ, C.M.; PISCOPO, M.V.;

SALA de MIGUEL, M. and GODOY, H.: Effect of aflatoxin B₁ on resistance induced by *Bordetella bronchiseptica* vaccine in rabbits. (Comunicación personal).

69.- WALKER, R.D.; COUSTVET, R.E. and PANCIERA, R.J.: Study of bovine pulmonary response to *Pasteurella haemolytica*. Pulmonary Macrophage Response. Am. J. Vet. Res., 41: 1008-1014. 1980.

70.- WILLIAMS, P.P.: Collection and Cultivation of and phagocytosis by pulmonary macrophages obtained from hysterectomy derived pigs. Am.J.Vet.Res.39:485-489. 1978.

Art. 11: La Facultad no se hace solidaria de las opiniones vertidas en una tesis.