

ADMINISTRACIÓN DE UN INMUNOTERÁPICO ORAL PARA INCREMENTAR LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON TETRACICLINAS EN POLLOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE CON MYCOPLASMA GALLISEPTICUM.

Stipkovits, L.¹, Marca, J.², Sisquella, L.², Navarrete, E.²

¹Institut of Hungarian Academy of Sciences. ²Laboratorios Calier, S.A. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad respiratoria crónica producida por la infección por Mycoplasmas, así como las infecciones secundarias por otros microorganismos como *E. coli*, causan graves pérdidas económicas en la industria avícola. La infección por mycoplasmas deprime el sistema inmune de las aves, disminuyendo su respuesta a las vacunas y aumentando la predisposición a otras infecciones concomitantes.

Las tetraciclinas constituyen un grupo de antibióticos de elección frente a Mycoplasmas, aunque algunos autores han descrito que afectan de algún modo al sistema inmune [1, 2].

Inmunair[®] 17.5 es un producto inmunoterápico constituido por LPS precedente de *E. coli* y células inactivadas de *Propionibacterium acnes*, con capacidad de activar la respuesta inmune inespecífica del animal, macrófagos y monocitos, con una consecuente estimulación de la proliferación y activación de linfocitos B y T.

El objetivo del ensayo fue valorar el efecto de la administración de Inmunair[®] 17.5 para aumentar la eficacia del tratamiento con tetraciclinas en pollos infectados experimentalmente con *M. gallisepticum*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo clínico se llevó a cabo con pollos Tetra SL libres de Mycoplasma, los cuales se obtuvieron a partir de un grupo libre de *M. gallisepticum* y *M. synoviae*. Para asegurar que las madres eran libres de Mycoplasmas, se realizaron exámenes serológicos cada 2 meses durante el período de puesta. Para detectar anticuerpos de *M. gallisepticum* se utilizó la técnica de aglutinación de suero en placa, utilizando antígeno nobilis de *M. gallisepticum* teñido (Intervet) y un test de ELISA de bloqueo basado en monoclonales (Czifra et al., 1993), utilizando el test MYGA (Diagnosticum Kft, Hungary). Todos los test fueron negativos. Para detectar anticuerpos frente a *M. synoviae*, se utilizó la técnica de aglutinación de suero en placa utilizando antígeno nobilis de *M. synoviae* (Intervet) y un kit ELISA de bloqueo MYSY (Svanova Uppsala, Sweeden). Todos los test dieron resultados negativos.

Al terminar el período de puesta, se sacrificaron y examinaron 10 aves, realizando cultivos para detectar la presencia de *M. gallisepticum* y *M. synoviae* en la cavidad nasal, tráquea y sacos aéreos, utilizando medio B (Erno and Stipkovits, 1973) y medio Frey (Frey et al. 1975). No se aislaron mycoplasmas.

Se confirmó que los pollos sometidos a ensayo estaban libres de mycoplasma mediante un examen serológico y el cultivo de 20 polluelos de un día de edad del mismo lote.

Para la infección experimental se utilizó la cepa 1226 de *M. gallisepticum*, la cual se clonó y filtró mediante un filtro de 450 nanómetros y se reprodujo en 100 ml de medio N. Se tomaron alícuotas de 10 ml las cuales se distribuyeron en viales y se almacenaron a 70°C antes de su uso. Antes del desafío, se descongeló una alícuota y se determinaron las unidades formadoras de colonias, obteniéndose 3×10^7 UFC/ml. Se utilizaron 0.3 ml de cultivo para administrar a los pollos sometidos a ensayo, los cuales fueron inoculados en el saco aéreo abdominal izquierdo.

Se llevaron al laboratorio 150 pollos de 1 día de edad, libres de mycoplasma. Los pollos se alimentaron con pienso corriente (materia seca: 86.0%, energía metabolizable: 12.82 MJ/kg, proteína bruta: 22.96%, lisina: 1.29%, metionina: 0.52%, metionina + cisteína: 0.91%, grasa bruta: 3.68%, fibra bruta: 3.11%, sodio: 0.09%, calcio: 0.84%, fósforo: 0.63%, vitamina A: 10125.000 IU/kg, vitamina D3: 3025.00 IU/kg, vitamina E: 15.85 mg/kg) conteniendo un nivel de 60 mg/kg de Salinomicina.

A los siete días, los pollos se marcaron individualmente y se pesaron. Se dividieron en 15 grupos de 10 pollos cada uno, analizando los pesos de manera que los grupos se formaron teniendo en cuenta que no hubiera diferencias entre ellos.

TABLA 1. TRAZADO DEL DISEÑO EXPERIMENTAL DEL ESTUDIO

Grupos	Tratamiento con Inmunair® 17.5 los días -4 a 0 antes de la infección por M. G.	Infección con M. G.	Tratamiento con Inmunair® 17.5 del día 0 al 5 tras la infección	Tratamiento con antibióticos del día 0 al 5 tras la infección
1	+	+	-	OTC
2	+	+	-	CTC
3	+	+	-	DOX
4 (K1)	+	+	-	-
5	-	+	+	OTC
6	-	+	+	CTC
7	-	+	+	DOX
8 (K2)	-	+	+	-
9	-	+	-	OTC
10	-	+	-	CTC
11	-	+	-	DOX
12 (K3)	-	+ K2	-	-
13 (K4)	-	-	+	-
14 (K5)	+	-	-	-
15 (K6)	-	-	-	-

Los grupos 1-4 se trataron con Inmunair® 17.5 durante 5 días (desde el día -4 hasta el día 0) a través del agua de bebida, a la dosis de 0.5 ml/10 kg p.v.. Posteriormente se infectaron los pollos con *M. gallisepticum*. Desde el día de la infección y durante 5 días consecutivos, los grupos 1-3 fueron tratados con Oxitetraciclina, Clortetraciclina y Doxiciclina respectivamente.

Los grupos 5-8 se infectaron con *M. gallisepticum* como los grupos anteriores y después se les administró, simultáneamente, Inmunair® 17.5 y los antibióticos descritos antes durante 5 días, con excepción del grupo 8 al que se le administró únicamente Inmunair® 17.5.

Los grupos 9–12 se infectaron con *M. gallisepticum* y se administró antibióticos a los grupos 9-11, sin Inmunair® 17.5, dejando el grupo 12 sin antibiótico.

Los grupos 13-15 no se infectaron, al grupo 13 se le administró Inmunair® 17.5 tras la infección, al grupo 14 antes de la infección. El grupo 15 no recibió ningún tratamiento.

OTC: oxitetraciclina; CTC: clortetraciclina; DOX: doxicilina; K1 y K2: infectados, tratados con Inmunair® 17.5 y no tratados con antibióticos; K3: infectados y no tratados con antibióticos ni con Inmunair® 17.5; k4 y k5: no infectados, tratados sólo con Inmunair® 17.5; k6: no infectados y no tratados con antibióticos ni Inmunair® 17.5.

Los animales se mantuvieron en observación durante 10 días, tras los que se sacrificaron los pollos y fueron examinados patológicamente y microbiológicamente.

Para evaluar la eficacia del tratamiento, se evaluaron los siguientes parámetros:

- Signos clínicos: los pollos se examinaron cada día por si aparecían síntomas respiratorios.
- Ganancia de peso: se pesó a los animales antes y al final del ensayo.
- Lesiones patológicas: a los pollos sacrificados al final del experimentos se les examinó los sacos aéreos y el peritoneo para detectar posibles lesiones patológicas características de la infección por *M. gallisepticum*. Las lesiones se puntuaron según la siguiente gradación: 0 (sin lesiones), 1 (pared del saco aéreo ligeramente inflamada), 2 (exudado ligeramente sero-fibrinoso en el saco aéreo), 3 (saco aéreo engrosado con fibrinas) y 4 (pared del saco aéreo engrosada con gran cantidad de masa fibrinosa).

También se tomaron muestras de pulmón, bazo, bolsa de Fabricio e hígado para examinarlas histológicamente. Las muestras se tiñieron con hematoxilina-eosina y el hígado con Fat Red para la detección de grasa infiltrada. Las lesiones se puntuaron según la siguiente gradación: 0 (sin lesiones), 1 (ligeras), 2 (medias) y 3 (reacción celular extensiva).

Se realizaron exámenes serológicos de los sueros mediante ELISA indirecto, utilizando anticuerpos monoclonales anti IgG e IgM para detectar anticuerpos específicos frente a *M. gallisepticum*. Los valores de densidad óptica obtenidos por ELISA se compararon mediante un test t-Student. También se examinó los sueros mediante un perfil Western blot con antígeno de *M. gallisepticum* utilizando el método descrito anteriormente.

RESULTADOS

En los pollos infectados por *M. gallisepticum* hubo una disminución del crecimiento. No se observó ningún efecto adverso tras la administración oral de Inmunair® 17.5. Los pesos al inicio del experimento eran homogéneos entre los grupos. La menor ganancia de peso se observó en el grupo 12, infectado y no tratado, siendo menor que en los grupos medicados con Inmunair® 17.5 o con antibióticos. La mayor ganancia de peso se dio en los grupos que fueron medicados simultáneamente con Inmunair® 17.5 y antibióticos después de la infección experimental, siendo mayor que en los grupos medicados sólo con antibióticos o tratados con Inmunair® 17.5 antes de la infección y medicados con antibióticos después de la misma.

Los mejores resultados en cuanto a lesiones patológicas se obtuvieron al administrar Inmunair® 17.5 y antibióticos. En el caso de la oxitetraciclina los mejores resultados se vieron al administrar Inmunair® 17.5 antes de la infección y el antibiótico después y en el caso de la clortetraciclina y la doxicilina los mejores resultados se obtuvieron al tratar simultáneamente con Inmunair® 17.5 y antibióticos.

Las lesiones en pulmón, caracterizadas por neumonía intersticial y bronquitis linfocítica, probablemente son debidas al papel patológico de la infección por *Mycoplasma*. La neumonía catarral probablemente está inducida por infecciones bacterianas asociadas. La infiltración linfocítica focal del hígado es una reacción inducida por la infección. La hiperplasia de las zonas “B” y “T” del bazo así como la actividad celular en la bolsa de Fabricio son reacciones fisiológicas a antígenos. La severidad de la reacción está relacionada con la antigenicidad de los agentes.

En el grupo 15, no infectado y no tratado, así como los grupos 13 y 14, medicados con Inmunair® 17.5, las gradaciones de lesiones fueron bajas, sin diferencias estadísticas entre ellos. Durante todo el experimento la tendencia fue la de obtener gradaciones de las lesiones más bajas en los grupos tratados con Inmunair® 17.5 y antibióticos simultáneamente.

En cuanto a la serología, los valores de densidad óptica para IgM fueron más elevados en los grupos tratados simultáneamente con Inmunair® 17.5 y antibióticos (5, 6 y 7) que en los que se administró Inmunair® 17.5 antes de la infección y antibióticos después de la misma (1, 2 y 3) o en los que se administró sólo antibióticos (9, 10 y 11). El tratamiento con Inmunair® 17.5 después de la infección da mejores resultados que la aplicación antes de la infección. Por otro lado, la administración de Inmunair® 17.5 solo después de la infección dio valores OD más elevados.

En los tests de nivel IgG, el tratamiento simultáneo con Inmunair® 17.5 y antibióticos generalmente daba mejores resultados que la aplicación de Inmunair® 17.5 antes de la infección y el tratamiento con antibióticos después de la infección, o que la medicación sólo con antibióticos.

DISCUSIÓN

La infección por *M. gallisepticum* provoca una disminución de la ganancia de peso al comparar con el grupo de animales control no infectado. Sin embargo, el tratamiento con Inmunair® 17.5 y antibióticos antes o después de la infección en los pollos infectados compensa las pérdidas de peso corporal provocadas por la infección. La mejor ganancia de peso se observó cuando los pollos infectados se trataron simultáneamente con Inmunair® 17.5 y tetraciclinas.

Por otro lado, también es interesante mencionar que las gradaciones de lesión más bajas así como los valores más elevados de OD para IgM y IgG se observaron después del tratamiento simultáneo de Inmunair® 17.5 y tetraciclinas, en comparación con la administración de antibióticos sólo o la administración de Inmunair® 17.5 antes de la infección. Podemos concluir que la administración simultánea de tetraciclinas e Inmunair® 17.5 tras una infección experimental por *M. gallisepticum* da lugar a una mejor ganancia de peso, menos lesiones patológicas y mejor respuesta serológica.

Por la composición de Inmunair® 17.5, que contiene lipopolisacáridos y células inactivadas de *Propionibacterium acnes*, nuestros resultados concuerdan con las observaciones de otros investigadores (Flo et al., 1996), indicando que la interacción de los lipopolisacáridos con el sistema inmune da como resultado una respuesta proliferativa y de diferenciación de los linfocitos B (Schultze and Goodman, 1979), como se ha manifestado en el estudio mediante la síntesis y secreción de inmunoglobulinas, intensificando la respuesta de anticuerpos.

Las células inactivadas de *Propionibacterium acnes* juegan un papel importante al intensificar el tráfico de linfocitos (Huedl et al., 1993). El efecto de Inmunair® 17.5 frente a la infección por *Mycoplasma* y el aumento de la respuesta de anticuerpos tras su aplicación oral, puede deberse al hecho de que este producto inmunoterápico activa las células B que se encuentran en “lámina propia”, que están en el último paso de maduración (Flo et al., 1996) e intensifican el tráfico de linfocitos de las Placas de Peyer al intestino para controlar el proceso infeccioso (Huedl et al., 1993).

TABLA 2. GANANCIA DE PESO

Tratamientos	Infecc. por M.G.	Inmunair® 17.5 antes de la infección y con antibióticos después de la infección	Inmunair® 17.5 después de la infección, simultáneamente con antibióticos	Antibióticos sin Inmunair® 17.5 después de la infección	Test t-Student
OTC	+	75,0 +/- 7,5 (1)	82,8 +/- 12,2 (5)	71,3 +/- 8,8 (9)	1-5 NS 1-9 NS 5-9 0.05
CTC	+	71,7 +/- 1,9 (2)	85,5 +/- 8,1 (6)	75,0 +/- 8,3 (10)	2-6 0.001 2-10 NS 6-10 0.01
DOX	+	8,0 +/- 9,0 (3)	86,7 +/- 1,0 (7)	75,6 +/- 11,6 (11)	3-7 0.05 3-11 NS 7-11 0.01
IM	+	76,7 +/- 13,7 (4) (k1)	81,1 +/- 11,1 (8) (k2)	-	4-8 NS
IM	-	78,9 +/- 9,9 (13) (k4)	-	75,0 +/- 7,1 (14) (k5)	13-14 NS
-	+	-	-	62,2 +/- 11,1 (12) (k3)	12-15 0.01
-	-	-	-	77,2 +/- 9,7 (15) (k6)	-

TABLA 3. LESIONES PATOLÓGICAS

Tratados (grupos)	Infectados con M.G.	Tratamiento con Inmunair® 17.5 antes de la infección y con antibióticos después de la infección	Tratamiento con Inmunair® 17.5 después de la infección, simultáneamente con antibióticos	Tratamiento con antibióticos sin Inmunair® 17.5 después de la infección	Test Chi - Cuadrado
OTC	+	18 (1)	10 (5)	32 (9)	1-5 0,05 1-9 0,001 5-9 0,001
CTC	+	22 (2)	24 (6)	28 (10)	2-6 NS 2-10 NS 6-10 0,05
DOX	+	12 (3)	14 (7)	30 (11)	3-7 NS 3-11 0,001 7-11 0,001
IM	+	29 (4)	22 (8)	-	4-8 0.05
IM	-	0 (13)	0 (14)	-	-
-	+	-	-	32 (12)	-
-	-	-	-	0 (15)	-

TABLA 4. ANTICUERPOS IGM

Grupos tratados	Infectados con M.G.	Inmunair® 17.5 antes de la infección y con antibióticos después de la infección	Inmunair® 17.5 después de la infección y simultáneamente con antibióticos	Antibióticos después de la infección	Test t-Student
OTC	+	0,343+/-0,12 (1)	0,46+/-0,09 (5)	0,38+/-0,14 (9)	1-5 0,05 1-9 NS 5-9 NS
CTC	+	0,386+/-0,08 (2)	0,483+/-0,09 (6)	0,308+/-0,07 (10)	2-6 0,05 2-10 0,05 6-10 0,01
DOX	+	0,396+/-0,1 (3)	0,470+/-0,11 (7)	0,335+/-0,12 (11)	3-7 0,05 3-11 NS 7-11 0,001
IM	+	0,449+/-0,1 (4) (k1)	0,522+/-0,1 (8) (k2)	-	4-8 NS
IM	-	0,219+/-0,04 (13) (k4)	-	0,187+/-0,04 (k5) (14)	-
-	+	-	-	0,339+/-0,06 (12) (k3)	-
-	-	-	-	0,191+/-0,04 (15) (k6)	-

TABLA 5. ANTICUERPOS IgG

Grupos tratados	Infectados con M.G.	Inmunair® 17.5 antes de la infección y con antibióticos después de la infección	Inmunair® 17.5 después de la infección y simultáneamente con antibióticos	Antibióticos después de la infección	Test t-Student
OTC	+	0,343+/-0,12 (1)	0,46+/-0,09 (5)	0,38+/-0,14 (9)	1-5 0,05 1-9 NS 5-9 NS
CTC	+	0,386+/-0,08 (2)	0,483+/-0,09 (6)	0,308+/-0,07 (10)	2-6 0,05 2-10 0,05 6-10 0,01
DOX	+	0,396+/-0,1 (3)	0,470+/-0,11 (7)	0,335+/-0,12 (11)	3-7 0,05 3-11 NS 7-11 0,001
IM	+	0,449+/-0,1 (4) (k1)	0,522+/-0,1 (8) (k2)	-	4-8 NS
IM	-	0,219+/-0,04 (13) (k4)	-	0,187+/-0,04 (k5) (14)	-
-	+	-	-	0,339+/-0,06 (12) (k3)	-
-	-	-	-	0,191+/-0,04 (15) (k6)	-

REFERENCIAS

1. Allakany, H. F. (1997). Thesis of PhD, Budapest.
2. Babb, J. L., Kyono, H., Michalek, S. M. and McGhee, J. R. (1981). *J. Immun.* 127. 1052-1057.
3. Czifra, Gy., B. Sundquist, T. Tuboly and L. Stipkovits (1993). *Avian Dis.* 37. 680-688.
4. Erno, H. and L. Stipkovits (1973). *Acta Vet. Scand.* 14. 436-449.
5. Flo, J., Goldman, H., Roux, M. I. and Massouh, E. (1996). *Vaccine*, 14. 1167-1173.
6. Frey, M. C., R. P. Hansons, and D. O. Anderson. *Am. J. Vet. Res.* 29: 2164-2171. 1968.
7. Hannan, P. C. T., P. J. O'Hanlon and N. H. Rogers (1989). *Res. Vet. Sci.*, 46. 203-210.
8. Hosein, H. I. and Salem, A. M. (1990). Fourth Sci. Congr., Fac. Vet. Med.. Assiut University, 958-961.
9. Huedl, C., Albini, B., Bock, G., Wick, G. and Wolf, H. (1993). *Inf. Immun.* 5. 29-36.
10. Jacobs, D. M. (1979). *J. Immun.*, 122. 1471-1476.
11. Jacobs, D. M. (1982). *Recent Advances in Mucosal Immunology* (Eds: Strober, W., Hanson, L. A. and Sell, K. W. Raven Pross. New York. Pp. 47-55.
12. Jordan, F. T. W., S. Gilbert, D. L. Knight and C. A. Ivary (1989). *Avian Pathol.*, 18. 659-673.
13. Jordan, F. T. W., B. K. Horrock. *Avian Dis.* 40:326-334. 1996.
14. Kempf, I., Ollivier, C., L'Hospitalier, R., Guittet, M. and Bennejean, G. (1989). *Le Point Vétérinaire*, 20, 935-940. (In French.)
15. Kleven, S.H. (1990). Summary of discussion of Avian Mycoplasma Team, IRPCM, IOM, *Avian Pathol.*, 19. 795-800.
16. Kleven, S. H. (1991). In: Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., Reid, W. M. and Yoder, H. W. Jr. (eds). *Diseases of Poultry*. (9th edn), Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 231-233.
17. Lakhotia, R. L. and Stephens, J. F. (1972). *Avian Dis.*, 16. 1029-1034.
18. Levisohn, S. (1981). *Israelian Journal of Medical Science*, 58, 1107-1111.
19. Marca, J., Caldentey, L., Torras, M., Irurre, P. (1996). 14 th IPVS Congr., Bologna.
20. McGhee, J. R., Michalek, S. M., Klyono, H. Babb, J. I., Clark, M. P. and Mosteller, L. M. (1982). *Recent Advances in Mucosal Immunology* (Eds: Strober, W., Hanson, L. A. and Sell, K. W. Raven Pross. New York. Pp. 57-72.
21. Mohamed, H.O., Carpenter, T.E. and Yamamoto, R. (1987). *Avian Diseases*, 30, 474-482.
22. Nagi, S. A., Sahin, N., Wagner, G. and Williams, J. (1984). *Am. J. Vet. Res.*, 45. 1425-1429.
23. Németh, I., L. Stipkovits, Z. Biaty, A. Varga and K. Forgách (1993). Xth Int. Congr. WVPA, Sydney, p.197.
24. Ortiz, J. M., Valesco, F., Dominguez, J., Alveraz, B., Marca, J., Irrure, P., Candentey, L. (1996). XVII Sympium Anaporc, Santiago de Compostela, p13-14.
25. Panigrahy, B., Grumbles, L.C., Millar, D. (1979). *Avian Dis.*, 23. 401-408.
26. Persson, U. (1977). *J. Immun.* 60. 119.789.
27. Porta, J. R., Solsona, M. J. and Ponsa, F. (1994). *Proc. 9th European Poultry Conf.*, Glasgow. Vol. 167-168.
28. Skelly, B. J., Andersen, D., Pruss, M. and Pellegrino, R. (1985). *Avian Dis.*, 30. 505-509.
29. Stipkovits, L. (1968). *Kand. értekezés (Ph.D. thesis)*, Budapest. Hungary.
30. Sulzer, B. M. and Goodman, G. W. (1976). *J. Exp. Med.*, 144. 821-827.
31. Uchlyama, T. and Jacobs, D. M. (1976). *J. Immun.*, 121. 2347.
32. Yamamoto, R. (1991). In: *Diseases of poultry*. 9th ed., Calnek, B. W., Beard, C. W., Barnes, H. J. and Yoder, H. W., Jr. (eds). Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 212-223.