



UNIVERSIDAD DE LEÓN

**Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal**

TESIS DOCTORAL

**Infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae*
en un modelo murino**

Que presenta para optar al grado de Doctor en Veterinaria

**JOSÉ LUIS MONTER FLORES
León, España. Abril, 2010**



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal

**INFORME DEL LOS DIRECTORES DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

El Dr. D. ELÍAS FERNANDO RODRÍGUEZ FERRI y el Dr. D. CÉSAR BERNARDO GUTIÉRREZ MARTÍN como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un modelo murino”, realizada por D. JOSÉ LUIS MONTER FLORES en el Departamento SANIDAD ANIMAL de la Universidad de León, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, para dar cumplimiento al art Art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 4 de febrero de 2010.

Fdo.: Elías F. Rodríguez Ferri

Fdo.: César B. Gutiérrez Martín



UNIVERSIDAD DE LEÓN

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal

**ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)
Norma 7ª de las complementarias de la ULE**

El Departamento de SANIDAD ANIMAL en su reunión celebrada el día 12 de febrero de 2010 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* en un modelo murino” dirigida por el Dr. D. ELÍAS-FERNANDO RODRÍGUEZ FERRI Y el Dr. D. CÉSAR- BERNARDO GUTIÉRREZ MARTÍN y elaborada por D. JOSE LUIS MONTER FLORES. Cuyo título en ingles es el siguiente “*Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in a murine model”

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. Art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a 12 de febrero de 2010.

El Secretario,

Fdo.: Juan Miguel Fregeneda Grandes

Vº Bº

El Director del Departamento,

Fdo.: Elías F. Rodríguez Ferri

A Dios....

**Que me da la oportunidad de vivir un día más permitiéndome llegar a
una etapa más de mi vida.**

Quiero dedicar este trabajo a dos seres extraordinarios que Dios me ha dado y que me permite seguir disfrutando de ellos, José Luis y Guadalupe, mis padres, gracias por todo su amor, por su ejemplo, su constancia, su trabajo de todos los días, su alegría, su ejemplo de amor, por darme la vida. Los amo.

A mis hermanas, María Guadalupe, Romana María Teresa y María Esperanza, gracias por toda su confianza, su cariño y por el amor que siempre tendremos.

A mi pequeño José Luis, todo mi amor.

A Valente, mi amistad incondicional

Agradecimientos

No sé si seré capaz de expresar la enorme gratitud que siento por la cooperación de todas aquellas personas gracias a las cuales este trabajo es hoy una realidad. Sé que las frases se quedan siempre cortas, y que las palabras a veces no transmiten todo lo que uno quisiera manifestar con ellas, pero de todas maneras intentaré que el lenguaje no me limite, y en todo caso, puedo afirmar que lo que hoy escribo me sale directamente del corazón.

Quiero agradecer en primer lugar a las instituciones que han hecho posible la realización del trabajo presentado en esta memoria de tesis por la ayuda económica brindada, a el consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) y a la Universidad de León, gracias por la confianza en mi depositada.

Debo manifestar el más sincero agradecimiento a mis directores de Tesis, a los cuales admiro profundamente, al Dr. Elías F Rodríguez Ferri y al Dr. César B Gutiérrez Martín, por todo el apoyo que me han brindado, su dedicación, su amistad, sus consejos, sus enfados y sobre todo, la gran paciencia que han tenido conmigo durante estos largos años, estaré eternamente agradecido.

A todos y cada uno de mis compañeros que estuvieron conmigo en el laboratorio de microbiología, a los que están ahora, a todo el departamento de Sanidad Animal, a Rosa y Nides que en el animalario cuidaron y procuraron siempre de todos mis ratones, a profesores, a Javier (colega) y demás técnicos, al equipo de limpieza, de seguridad, que en su momento compartieron conmigo trabajo, alegrías, preocupaciones, tristezas, siempre los recordare con mucho cariño, por saber de lo suyo, y saber mucho, y haberlo compartido en algún momento conmigo, Gracias.

A todos mis amigos dentro y fuera de la Universidad, gracias por todo el cariño que han dado a este mexicano.

A mi compadre Rafa, por su gran amistad, gracias.

I. INDICE

I. INDICE.....	I
II. ABREVIATURAS.....	XI
III. TABLAS CUADROS Y FIGURAS.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Pleuroneumonía Porcina.....	1
1.2. <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	2
1.3. Factores de virulencia.....	5
1.3.1. Polisacárido capsular (CP).....	5
1.3.2. Fimbrias.....	6
1.3.3. Lipopolisacárido (LPS).....	6
1.3.4. Proteínas de membrana externa TbpA y TbpB.....	8
1.3.5. Proteasas.....	10
1.3.6. Exotoxinas.....	10
1.4. Importancia del hierro en la infección.....	13
1.4.1. Proteínas implicadas en el metabolismo del hierro.....	16
1.4.1.1. La proteína HFE. El gen <i>hfe</i> en el ratón.....	16
1.4.1.2. Ferritina (H y L).....	18
1.4.1.3. Hemosiderina.....	18
1.4.1.4. Transferrina (TF). El receptor <i>celular</i> de la transferrina.....	19
1.4.2. Mecanismo de captación de hierro en las bacterias.....	20
1.4.2.1. Proteínas receptoras de transportadores de hierro.....	21
1.4.2.1.2. Receptores de transferrina y lactoferrinas.....	21
1.4.2.1.3. Receptores de hemina y hmoglobina.....	22
1.4.2.1.4. Proteínas de unión a tranferrina porcina en <i>Actinobacillus pleurpneumoniae</i>	23
1.4.2.2. Sideróforos.....	26
1.4.3. Transporte de hierro al interior de la célula.....	30
1.4.3.1. Almacenamiento de hierro en el interior de las bacterias.....	33
1.4.3.2. Antigenicidad de las estructuras receptoras de hierro.....	33
1.4.4. Control de la expresión de los genes implicados en la captación del hierro	36
1.4.4.1. Mecanismos de acción.....	36

Índice

1.4.4.2. La caja Fur.....	38
1.4.4.3.Regulación y funciones	39
1.4.4.4. Mutantes Fur.....	40
1.4.4.5. Otros Reguladores.....	41
1.5. Mecanismos relacionados con la susceptibilidad o resistencia a la infección y las enfermedades.....	41
1.6. Respuesta inmune frente a <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	43
1.6.1. Respuesta innata. Fagocitosis y activación del complemento.....	45
1.6.2. Respuesta humoral.....	56
1.6.3. Respuesta Celular.....	56
1.7. Modelos de infección en pleuroneumonía porcina.....	58
1. 8. Vacunas y vacunación.....	60
1.8.1. Vacuna frente a la pleuroneumonía porcina	64
1.9. Línea NMRI de ratones albinos.....	66
2. PLANTEAMIENTOS Y OBJETIVOS.....	71
3. MATERIAL Y METODOS.....	77
3.1. Microorganismos utilizados.....	79
3.2. Tinciones.....	79
3.2.1. Tinción de GIEMSA.....	79
3.3. Medios de cultivo.....	79
3.3.1. Medios de Cultivos Bacterianos.....	79
3.3.1.1. Agar chocolate (BioMérieux).....	79
3.3.1.2. Agar Sangre (BioMérieux).....	80
3.3.1.3. Caldo y agar PPLO (Difco).....	80
3.3.1.4. Caldo de tioglicolato (FTM, “fluid thioglycollate medium”).....	80
3.3.2. Medios de Cultivos Celulares de células eucariotas.....	81
3.3.3. Medio de congelación.....	81
3.4. Soluciones de antibióticos y suplementos.....	81
3.4.1 Ampicilina.....	81
3.4.2. Isovitalex.....	81
3.4.3. Glucosa.....	82
3.4.4. NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleótido).....	82

3.5. Productos y reactivos.....	82
3.5.1. Inactivación bacteriana.....	82
3.5.1.1. Formol.....	82
3.5.1.2. Thimerosal.....	82
3.5.2. Extracción de sobrenadantes con proteínas de membrana externa enriquecidos en TbpB.....	82
3.5.2.1. Solución de 2,2 Dipiridilo.....	82
3.5.2.2. Deoxicolato Sódico.	82
3.5.2.3. Tris HCl 1M, pH 8.....	82
3.5.2.4. Cloruro sódico (5M).....	82
3.5.3. Anestésico.....	83
3.5.4. Transferrina sérica porcina.....	83
3.6. Determinación de la concentración de proteína total (Bradford, 1976).....	83
3.7. Electroforesis.....	83
3.7.1. SDS--PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico).....	83
3.7.1.1. Gel separador.....	84
3.7.1.2. Gel concentrador (5%).....	84
3.7.1.3. Tampón de electroforesis (5x).....	84
3.7.1.4. Tampón de carga de proteínas.....	84
3.7.2. Electroforesis en gel agarosa.....	85
3.7.2.1. Tampón de carga ADN (6x).....	85
3.7.2.2. Tampón de Tris-Borato-EDTA 5x (TBE).....	85
3.7.3. Tinción con azul de Comassie.....	85
3.7.3.1. Tinción de geles de poliacrilamida.....	85
3.7.3.2. Tinción de geles de agarosa al 1%.....	85
3.7.3.2.1. Solución de teñido.....	85
3.7.3.2.2. Solución de desteñido.....	86
3.8. Inmunoblotting.....	86
3.8.1. Tampón de transferencia.....	86
3.8.2. TBS.....	86
3.8.3. Tampón de bloqueo.....	86

Índice

3.8.4. Tampón TBS-Tween 20 (TTBS).....	87
3.9. ELISA.....	87
3.9.1. Tampón fosfato (PBS).....	87
3.9.2. Tampón carbonato.....	87
3.9.3. Tampón de lavado.....	87
3.9.4. Tampón de bloqueo.....	88
3.9.5. Tampón de dilución del conjugado.....	88
3.9.6. Sustrato TMB (3,3',5, 5'- tetrametilbenzidina).....	88
3.9.7. Isotiocianato de amonio 4M.....	88
3.10 Metodo ELISA indirecto.....	88
3.10.1. Tapizado de placa de ELISA [Tapizado con proteínas (TbpB crudo)]... 88	
3.10.2. tapizado con LPS.....	88
3.11. Citometría de flujo.....	89
3.11.1. Tampón FACS.....	89
3.11.2. Tampón FACS fijador.....	89
3.12. Laboratorios e instalaciones utilizadas.....	89
3.13. Animales, Ratones.....	91
3.13.1. Ratones NMRI.....	91
3.13.2. Ratones BALB/c, (SPF).....	91
3.13.3. Ratones “inbred” BALB/c nude.....	91
4.14. Método de infección de ratones.....	91
3.14.1. Anestesia y Eutanasia.....	91
3.14.2. Preparación de las suspensiones.....	92
3.14.2.1. Cultivo y crecimiento bacteriano.....	92
3.14.2.2. Recuento UFC (Unidades formadoras de colonias).....	92
3.14.3. Inoculaciones.....	92
3.14.4. Determinación de la DL50 (Dosis Letal 50%).....	93
3.14.5. Dosis subletal de trabajo.....	94
3.14.6. Pruebas de colonización y supervivencia bacteriana.....	94
3.15. Transferrina porcina.....	94
3.15.1. Saturación con hierro.....	94

3.15.2. Ajuste del volumen y concentración de transferrina cargada con hierro para la inoculación intranasal. Volumen del inóculo bacteriano.....	95
3.15.3. Vía de infección.....	97
3.15.4. Preparación del inóculo bacteriano.....	97
3.15.5. Infección.....	98
3.15.6. Evaluación de la infección.....	98
3.16. Diseño experimental.....	99
3.17. Estudios de supervivencia y/o multiplicación de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI utilizando diferentes dosis. Influencia de la administración de transferrina sérica porcina.....	99
3.17.1. Estudio de supervivencia y/o multiplicación solo con <i>A. pleuropneumoniae</i>	99
3.17.2. Estudio con transferrina. Influencia de la administración de transferrina sérica porcina en la supervivencia y multiplicación de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en el ratón.....	100
3.18. Estudio de la actividad anticomplementaria y su influencia en la infección murina por <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	102
3.18.1. Estudio de la implicación del complemento en la susceptibilidad o resistencia a <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en modelo murino.....	102
3.18.1.1. Anestesia y Eutanasia.....	102
3.18.1.2. Veneno de Cobra.....	102
3.18.1.3. Preparación del veneno de cobra.....	102
3.18.1.4. Dosis letal (DL50) y subletal (DSL) del veneno de cobra.....	103
3.18.1.5. Descomplementación del suero de los animales.....	103
3.18.1.6. Preparación e infección con <i>A. pleuropneumoniae</i>	104
3.18.2. Estudios de supervivencia y/o multiplicación de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones utilizando veneno de cobra.....	104
3.18.3. Recuento general de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> con inoculación de veneno de cobra en diferentes puntos horarios.....	106
3.19. La inmunidad innata celular en la resistencia a la infección por <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> . Influencia de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) en la supervivencia y/o multiplicación de <i>A. pleuropneumoniae</i> en el ratón.....	107
3.19.1. Animales de experimentación utilizados.....	107
3.19.2. Anticuerpo monoclonal frente a PMN de ratón.....	107
3.19.3. Diseño y Desarrollo del experimento.....	108

3.19.4. Recogida y obtención de muestras.....	109
3.19.4.1. Muestras de sangre.....	109
3.19.4.1.1. Estudio de neutrófilos. Recuento diferencial directo al microscopio de PMN.....	109
3.19.4.1.2. Estudio de poblaciones celulares.....	109
3.19.4.1.2.1. Recuento celular directo, al microscopio.....	109
3.19.4.1.2.2 Separación de células mononucleares (linfocitos y monocitos, PBMC- <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> -) de sangre periférica.....	110
3.19.4.1.2.3. Separación de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) de sangre periférica.....	110
3.19.4.1.2.4. Análisis por citometría de flujo.....	111
3.19.4.2. Sacrificio, toma y procesamiento de muestras de pulmón para el estudio de la supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i>	111
3.19.5. Experimentos, pruebas y determinaciones.....	112
3.19.5.1. Experimento principal.....	112
3.19.5.2. Experimentos y pruebas complementarias.....	113
3.20. Preparación de una bacterina de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y su aplicación en un modelo murino (ratones NMRI infectados con <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (serotipo 1).....	113
3.20.1 Cepa utilizada.....	113
3.20.2. Hemolisinas (Apx I y II).....	113
3.20.3. Sobrenadante enriquecido de proteínas unidas a transferrina (TbpB).....	115
3.20.4. Cuerpos celulares (Unidades formadoras de colonias totales).....	116
3.20.5. Inactivación.....	116
3.20.6. Formulación vacunal.....	116
3.20.7. Vacunación.....	116
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	119
4.1. Consideraciones Generales.....	121
4.2. Experimentos iniciales, ajustes previos a los estudios de infección y otras Observaciones clínicas.....	123
4.2.1. Anestesia. Tiempo óptimo de exposición.....	123

4.2.2 Volumen de los inóculos. Elección del volumen de trabajo para inoculación intranasal.....	123
4.2.3 Dosis Letal 50 (DL ₅₀).....	124
4.2.4 Dosis Subletal (DSL).....	125
4.2.5. Cuadro clínico. Síntomas y Lesiones.....	126
4.2.6. Vía de administración.....	127
4.3. Estudios de supervivencia/ multiplicación de <i>A. pleuropneumoniae</i>	128
4.3.1 Grupo de experimentos con ratones convencionales NMRI dirigidos al estudio de la supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> , sin modificaciones.....	128
4.3.2. Análisis y discusión de los resultados de supervivencia de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	134
4.4. Supervivencia / multiplicación de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones inoculados con transferrina sérica porcina.....	141
4.4.1 Supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> . Influencia de la administración de transferrina porcina cargada con hierro.....	148
4.4.2. Supervivencia en presencia de otras concentraciones de transferrina (100 y 400 µg).....	150
4.5. Influencia de la actividad del complemento en la supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en el ratón.....	154
4.5.1 Ajuste de la dosis subletal de veneno de cobra.....	155
4.5.2. Resultados de supervivencia y/o multiplicación de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI descomplementados por el tratamiento con una dosis subletal de veneno de cobra en diferentes modalidades de aplicación.....	155
4.5.3. Influencia de la actividad del complemento en la supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en el ratón.....	162
4.6. Influencia de la depleción de Neutrófilos (PMN) en la infección y supervivencia de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI, tratados con transferrina porcina.....	166
4.6.1. Elementos formes de sangre periférica y supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en diferentes grupos de ratones infectados y tratados con el anticuerpo monoclonal Ly-6G y 100 µg de transferrina sérica porcina.....	167
4.6.2. Estudio de la población de neutrofilos por citometría de flujo.....	171
4.6.2.1. Valores de la población de neutrófilos.	171
4.7. Vacunación de ratones frente a <i>A. pleuropneumoniae</i> serotipo 1, utilizando una bacteria elaborada con cuerpos celulares, toxinas inactivadas y proteínas receptoras de transferrina.....	174

Índice

4.7.1. Grupos de animales.....	174
4.7.2. Desafío.....	174
5. CONCLUSIONES.	181
6. RESUMEN.....	185
7. BIBLIOGRAFÍA.....	190

II. ABREVIATURAS

ABC. Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa

AcMc. Anticuerpo (s) Monoclonal (es)

App. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

CAMP. (factor de monofosfato de adenina cíclica)

CVF. Factor del veneno de cobra

DL₅₀. Dosis letal cincuenta

D_{SL}. Dosis subletal

EDTA. Acido etilendiaminotetracético

ELISA. Prueba de inmunosobrante ligado a enzima

Fur. Regulador de hierro

kDa. Kilodalton

Lbp. Proteínas de unión a lactoferrina.

LPS. Lipopolisacárido

MHC. Complejo Mayor de Histocompatibilidad

NAD. Dinucleótido de nicotinamida y adenina

NMRI. Naval Medical Research Institut

PAMPs. Patrones moleculares asociados a patógenos

PBT. Proteínas periplasmáticas de unión al sustrato

BS. Tampón Fosfato-Salino

PBS. Solución Salina Amortiguada por Fosfatos

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

PME. Proteínas de membrana externa

PMNs. Leucocitos polimorfonucleares neutrófilos

PRR. Receptores de patrones de reconocimiento

Abreviaturas

rpm. Revoluciones por minuto

SDS. Dodecilsulfato de sodio

SPF. Libres de patógenos específicos

Tbp. Proteínas de unión a transferrina

TbpA. Gen que codifica para la proteína TbpA

TbpB. Gen que codifica para la proteína TbpB

Tbps. Proteínas de unión a transferrina

tf. Transferrina porcina sérica

TNF. Factor de necrosis tumoral

ufc. Unidades formadoras de colonias

vc. Veneno de cobra

III. TABLAS, FIGURAS Y CUADROS

Tabla 1.	Distribución y referencia mundial de los principales serotipos actualmente descritos de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	4
Tabla 2:	Apx expresadas por los serotipos 1-12 de <i>A. pleuropneumoniae</i>	12
Tabla 3.	Distribución de volúmenes y concentración de transferrina para el ajuste de transferrina.....	96
Tabla 4.	Preparación de concentraciones de transferrina.....	96
Tabla 5.	Inóculo bacteriano. Determinación del volumen más idóneo.....	97
Tabla 6.	Pruebas de supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en pulmones de ratones....	99
Tabla 7.	Grupos de animales en estudios con transferrina porcina.....	100
Tabla 8.	Tres experimentos con distintas dosis de transferrina (50, 100 y 400 µg) para comprobar su influencia en la supervivencia y/o multiplicación <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	101
Tabla 9.	Preparación de las cinco dosis del veneno de cobra, inoculando 200 µl por cada ratón NMRI.....	103
Tabla 10.	Dosis de inicio y mantenimiento de Veneno de Cobra (VC).....	104
Tabla 11.	Calendario de infección con <i>A. pleuropneumoniae</i> e inoculación de veneno de cobra. VC : inoculaciones con veneno de cobra, primera dosis (0,0375mg/kg de peso). VCb : segunda inoculación de veneno de cobra (0,0187 mg/kg de peso).....	106
Tabla 12.	Recuento de tres experimentos en ratones NMRI (hembras 30 g) inoculados con dosis subletales de <i>A. pleuropneumoniae</i> y tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 a 172 h. Total por grupo n=24; por punto horario = 3 animales.....	107
Tabla 13:	Resumen de grupos experimentales en el estudio de PMN en la resistencia murina frente la infección por <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	112
Tabla 14.	Diferentes grupos de ratones que fueron vacunados, infectados y tratados. En cada caso, el desafío solo fue con 1 dosis letal o subletal respectivamente.....	117

Tabla 15.	Calendario de vacunación para 3 grupos de ratones infectados y no infectados con <i>A. pleuropneumoniae</i> , tratados con (tf) transferrina porcina y vacunados en un periodo de 40 días.....	117
Tabla 16.	Ajuste del tiempo de exposición al halotano con 30 ratones NMRI (hembras 30 g).....	123
Tabla 17.	Resultados de la inoculación de distintos volúmenes de suspensión bacteriana, 3 diferentes concentraciones de transferrina porcina saturada y PBS, por vía intranasal.....	123
Tabla 18.	Experimento para Determinar la DL_{50} utilizando 6 concentraciones diferentes en ratones NMRI (hembras de 30 g). M: animales muertos; Mt: muertos totales = número acumulado de muertos desde la menor concentración a la más alta; Vt:vivos totales= número de muertos desde la mayor concentración a la más baja.....	125
Tabla 19.	Tabla 19. Resumen del recuento pulmonar de 16 pruebas de supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> , en ratones NMRI (hembra 30 g) en un periodo de 0 a 120 días. Valores expresados en log 10 de ufc. /: No se llevó a cabo recuento en ese punto horario; 0: no se obtuvo crecimiento en el recuento.....	128
Tabla 20.	Resumen de los resultados de 3 pruebas de supervivencia de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en ratones BALB/c SPF (hembras 30g) en un periodo de 12 a 168h. Valores en log 10 de ufc, se hace constar, además que en la prueba 2, existe información de 6 h (5,3573 log 10).....	132
Tabla 21.	Tabla 21. Resumen de datos más relevantes de supervivencia de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en dos grupos de pruebas llevadas a cabo con ratones (primer grupo de 16 pruebas con ratones NMRI y segundo de 3 pruebas con ratones SPF). Datos expresados del recuento correspondiente a log decimal. Entre paréntesis, diferencia con el inóculo de infección.....	136
Tabla 22.	Resumen de los valores de supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en log 10 de ufc en 5 pruebas en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 50 µg de transferrina porcina en un periodo de 0 a 216 h. Conjunto de 64 ratones. 0 h: inóculo inicial; /: no se llevaron a cabo recuentos en ese punto horario.....	141

Tabla 23. Resumen de 4 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 100 µg de transferrina porcina en el periodo de 0 a 216 h. Total de 48 ratones utilizados (2 por punto horario; el resultado se refiere como una media). Valores en log 10 de ufc 0h: inóculo de prueba..... 143

Tabla 24. Resumen de 5 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumonie* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 400 µg de transferrina porcina en el periodo entre 0–216 h. Número total de ratones utilizados: 70 (2 por punto horario; el resultado representa una media). Valores en log 10 de ufc..... 144

Tabla 25. Resumen de 10 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones BALB/c nude SPF (hembras 30 g) tratados con 100 µg de transferrina en un periodo de 0 - 216 h. n= 160 ratones (2 animales por punto horario). El dato que aparece reflejado en la tabla es una media. Valores en log 10 de ufc..... 146

Tabla 26. Resumen de los datos más relevantes de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en dos grupos de pruebas llevadas a cabo en ratones (primer grupo de 16 pruebas con ratones NMRI y un segundo de 3 pruebas con ratones SPF) y su comparación con 5 pruebas en las que se administraron a los ratones NMRI 50 µg de transferrina sérica porcina. Datos expresados en log decimales. Entre paréntesis, diferencias con el inóculo de partida..... 150

Tabla 27. Resumen de datos más relevantes de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en dos grupos de pruebas llevadas a cabo con ratones (primer grupo de 16 pruebas con ratones NMRI y segundo de 3 pruebas con ratones SPF) y su comparación con 5 pruebas en los que se administraron a los ratones NMRI 50 µg de transferrina sérica porcina y con 4 pruebas en las que se administraron a los ratones 100 µg de transferrina. Expresados en log decimales. Entre paréntesis, diferencias con el inóculo de partida..... 151

Tabla 28. Resumen de los datos más relevantes de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en dos grupos de pruebas llevadas a cabo con ratones (primer grupo de 16 pruebas con ratones NMRI y segundo de 3 pruebas con ratones SPF) y su comparación con 5 pruebas en los que se administraron a los ratones NMRI 50 µg de transferrina sérica porcina, con 4 pruebas en las que se administraron a

los ratones 100 µg de transferrina y con 4 pruebas en las que se administraron 400 µg de transferrina. Datos expresados en log decimales. Entre paréntesis, diferencias con el inóculo de partida. (*): En este caso, media de 3 pruebas; (**): media de 2 pruebas; en ambos casos las medias están corregidas solo a las de los inóculos de origen correspondientes..... 152

- Tabla 29.** Resumen de datos más relevantes de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en dos grupos de pruebas llevadas a cabo con ratones (primer grupo de 16 pruebas con ratones NMRI y segundo de 3 pruebas con ratones SPF) y su comparación con 5 pruebas en los que administraron a ratones NMRI 50 µg de transferrina sérica porcina, con 4 pruebas en las que se administraron a los ratones 100 µg de transferrina, en 4 pruebas administrando 400 µg de transferrina y 10 pruebas adicionales en ratones SPF con 100 µg de transferrina. Datos expresados en log decimales. Entre paréntesis, diferencias con el inóculo de partida. (*): En este caso, con una media de 3 pruebas; (**): con una media de 2 pruebas; En ambos casos las diferencias medias están corregidas solo a los inóculos de origen correspondientes..... 153
- Tabla 30.** Tabla para la determinación de la DL₅₀ del veneno de cobra utilizando solo 5 concentraciones diferentes y 4 pruebas con lotes de 6 ratones NMRI por prueba (en total 24 ratones) por concentración de veneno de cobra..... 155
- Tabla 31.** Dosis subletal inicial y de mantenimiento de veneno de cobra utilizada en los experimentos de descomplementación de ratones NMRI..... 155
- Tabla 32.** Recuento de *A. pleuropneumoniae* en ratones (hembras 30 g) tratados con 1 dosis de 0,0375 mg/kg (inicial) y 0,0187 mg/kg (mantenimiento) de veneno de cobra por vía intraperitoneal. Dosis de *A. pleuropneumoniae* 5 x10⁵ ufc= 5,6989 log 10 ufc. En un periodo de 0–172 h. Se utilizaron 24 ratones por grupo. Total= 144 animales. Valores de supervivencia en log 10 de ufc
Leyenda (VC: veneno de cobra; DI: dosis infecciosa): **Grupo A:** En la hora 0, inoculación VC y la DI. **Grupo B:** 1ª dosis de VC -12 h. Mantenimiento de vc en horas +12,+28,+40 y +52. **Grupo C:** 1ª dosis de vc -40 h, mantenimiento de VC en -28 y -16 h. Después de la infección, en +12 y +52. **Grupo D:** 1ª dosis VC a las -24 h y 2 dosis de mantenimiento en -20 y -12 h. Después de la

infección, mantenimiento en +16,+28 y +52 h. **Grupo E:** control supervivencia de *A. pleuropneumoniae*. No hay administración de VC. **Grupo F:** Control VC: 1ª dosis a -40h y mantenimiento en -36, -28 y -16 h. Nuevas en 0 y +12 h....
 156

Tabla 33. Ratones sacrificados (n) y muertos (n) inoculados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con veneno de cobra en 4 grupos de prueba (A –D) y controles (E, F) inoculados con 5,6989 log 10 de ufc de *A. pleuropneumoniae* (Primer experimento) entre 0 – 172 h. **S:** sacrificados. **M:** muertos..... 157

Tabla 34. Recuento de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 – 172 h. 24 ratones por punto horario (4 ratones por grupo); Total=192 animales. Valores de supervivencia en log 10 de ufc 0 h corresponde al inóculo..... 158

Tabla 35. Sacrificio y muerte de ratones inoculados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 – 172 h. **S=** animales sacrificados. **M=** animales muertos..... 159

Tabla 36. Recuento de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 – 172 h. 24 ratones por punto horario (4 ratones por grupo); Total=192 animales. Valores de supervivencia en log 10 de ufc 0 h corresponde al inóculo. Dosis de *A. pleuropneumoniae* 4.5 x 10⁶ ufc (6,6532 log 10 de ufc)..... 160

Tabla 37. Ratones inoculados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con veneno de cobra, muertos en un periodo de 0 – 172 h. **S=** animales sacrificados. **M=** animales muertos..... 161

Tabla 38. Resumen de tres experimentos de supervivencia y mortalidad de ratones NMRI inoculados con *A. pleuropneumoniae* y descomplementados con diversas dosis y combinaciones de veneno de cobra..... 165

Tabla 39. Recuento (supervivencia) de *A. pleuropneumoniae* en ratones tratados con el anticuerpo monoclonal Ly-6G (clon RB6-8C5) y transferrina porcina saturada de Fe. Valores de los recuentos de ufc expresados en log 10. Inóculo de infección de 5 x 10⁵ ufc (5,698 log 10), día= día post-infección..... 167

Tabla 40	Porcentaje de ratones muertos en periodo de 15 días. S: Animales sacrificados, M: animales muertos; AcMc: anticuerpo monoclonal Ly-6G; tf: transferrina porcina; App: <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	169
Tabla 41.	Porcentaje neutrófilos sobre el total de elementos formes de la sangre periférica en grupos de ratones inoculados con distintas combinaciones de anticuerpo monoclonal Ly-6G, transferrina porcina cargada con hierro e infectados (ver texto), en un periodo de 15 días. La cifra se refiere a las medias animales supervivientes en cada periodo. AcMc: anticuerpo monoclonal Ly-6G; tf: transferrina porcina; App: <i>A. pleuropneumoniae</i>	170
Tabla 42.	Recuento (%) de neutrófilos por citometría de flujo en ratones infectados con <i>A. pleuropneumoniae</i> en presencia de 100 µg de transferrina en un periodo de 6 días; pre-trat-inf: tratamiento previo a la infección con el AcMc Ly-6G.....	172
Tabla 43.	Recuento de <i>A. pleuropneumoniae</i> en los grupos VI y NVI de ratones en el estudio. 1ª vacunación día 0, 2ª vacunados día 15, extracción de pulmones para análisis bacteriológico días 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40. Datos media de 2 animales.....	175
Tabla 44.	Valores ELISA en los grupos VI (vacunados e infectados), NVI (no vacunados e infectados) VNI (vacunados no infectados), de ratones en el estudio. Datos media de 2 animales.....	176
Tabla 45.	Recuento de <i>A. pleuropneumoniae</i> en los grupos VI y NVI de ratones en el estudio. 1ª vacunación día 0, 2ª vacunados día 15, extracción de pulmones para análisis bacteriológico días 31, 32,33,34,35,36,37,38,39 y 40. M= ratones muertos, d= día.....	177
Tabla 46.	Valores ELISA en los grupos VNI (vacunados no infectados), VI (vacunados e infectados), NVI (no vacunados e infectados) de ratones en el estudio.....	177

Figura 1:	Modelo captación de hierro en <i>A. pleuropneumoniae</i> a partir de la transferrina porcina mediante el sistema Tbp, Tbp: proteína de unión a transferrina; OM: membrana externa; IM: membrana interna; Tf: transferrina; Fbp: proteína periplasmática de unión a hierro; Fpc: permeasa de unión con hierro. Figura modificada de Jacques and Mikael (2002).....	25
Figura 2.	El operón tonB de <i>A. pleuropneumoniae</i> (Tonpitak <i>et al.</i> , 2000).....	26
Figura 3.	Esquema de la asimilación del hierro a través de los sideróforos en las bacterias Gram negativas (A) y Gram positivas (B) (Andrews <i>et .al</i> 2003).....	27
Figura 4.	Representación de los distintos mecanismos de captación de hierro (esquema modificado de Retldge y Dover, 2000 y Jacques y Mikael, 2002).....	33
Figura 5.	Mecanismo de acción de la proteína Fur. A altas concentraciones, el hierro se une a la proteína Fur y el complejo Fur-Fe a la caja Fur, reprimiendo así los genes que se encuentran bajo su control. Por lo contrario, teniendo a bajas concentraciones la forma apo-Fur no puede unirse al DNA y se transcriben los genes que están bajo su control (esquema modificado Andrews <i>et al.</i> , 2003)	37
Figura 6.	Animalario de la Universidad de León. Vista exterior (www.unileon.es).....	90
Figura 7.	Detalle de las instalaciones utilizadas en el Animalario de la ULE.....	91
Figura 8.	Separación y aislamiento de elementos formes de la sangre www.bio.us.es/Departamento/INMUNOLOGIA/nueva%20carpeta/sección.es.htm	110
Figura 9.	Promedio de 16 pruebas de supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI (hembras 30 g) en un periodo de 0 a 120 h.....	129
Figura 10.	Gráficas individuales de las 16 pruebas de supervivencia de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI, en la práctica de 120 h.....	131
Figura 11.	Representación gráfica de los resultados de supervivencia promedio de <i>A. pleuropneumoniae</i> en tres pruebas, utilizando un total de 24 ratones BALB/c SPF (hembras 30 g) e inóculos en punto 0 entre 5,4771 y 5,845 log 10 de ufc.....	132

Figura 12.	Conjunto de gráficas individuales de 3 pruebas de supervivencia en ratones infectados con <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones BALB/c SPF (en la práctica de 168 h).....	133
Figura 13.	Resumen de 5 pruebas de supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 50 µg de transferrina porcina en un periodo de 0 a 216 h.....	141
Figura 14.	Conjunto de gráficas individuales de cinco pruebas de supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI tratados con 50 µg de transferrina porcina (en la practica de 168 h).....	142
Figura 15.	Promedio de 4 pruebas de supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 100 µg de transferrina porcina en el periodo de 0 a 216 h. Número total de ratones que se utilizaron: 48 ratones (2 por punto horario; el resultado se refiere como una media de ambos).....	143
Figura 16.	Conjunto gráficas individuales correspondientes a 4 pruebas de supervivencia de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI tratados con 100 µg de transferrina porcina.....	144
Figura 17.	Promedio de 5 pruebas de supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 400 µg de transferrina porcina en el periodo de 0- 216h. n= 70 ratones (2 por punto horario).....	144
Figura 18.	Conjunto gráficas individuales de 5 pruebas, supervivencia de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en ratones (hembras de 30 g) NRMI tratados con 400 µg de transferrina porcina entre 0 – 216 h.....	145
Figura 19.	Promedio de 10 pruebas de supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones BALB/c nude SPF (hembras 30 g) tratados con 100 µg de transferrina en un periodo de 0 a 216 h.....	146
Figura 20.	Conjunto de gráficas individuales de supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones BALB/c nude SPF tratados con 100 µg transferrina porcina.....	147
Figura 21.	Supervivencia de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en ratones (hembras 30 g) tratados con veneno de cobra en 4 grupos de prueba (A–D) y controles (E, F)	

	inoculados con 6,6698 log 10 de ufc de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> (Primer experimento) entre 0 – 172h.....	157
Figura 22.	Representación gráfica de ratones muertos infectados con <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y tratados con veneno de cobra en un periodo de 0–172 h (primer experimento).....	158
Figura 23.	Promedio de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 - 172 h.....	159
Figura 24.	Ratones infectados con <i>A. pleuropneumoniae</i> y tratados con veneno de cobra, muertos en un periodo de 0 – 172 h.....	160
Figura 25.	Recuento de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 – 172 h.....	161
Figura 26.	Numero de ratones infectados con <i>A. pleuropneumoniae</i> y tratados con veneno de cobra, muertos en un periodo de 0 – 172 h.....	162
Figura 27.	Recuento y supervivencia de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones tratados con AcMc y transferrina porcina en un periodo de 15 días.....	168
Figura 28.	Recuento de sacrificio y muerte de ratones inoculados con <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y tratados con AcMc y transferrina porcina en un periodo de 15 días.	169
Figura 29.	Porcentaje de Neutrófilos en sangre periférica (sobre total de leucocitos) de ratones inoculados con <i>A. pleuropneumoniae</i> tratados con el AcMc Ly-6G y transferrina porcina (ver texto) en un periodo de 15 días.....	170
Figura 30.	PMN en sangre periférica de ratones tratados con AcMc, infectados con <i>A. pleuropneumoniae</i> y tratados con 100 µg de transferrina porcina en un periodo de 6 días.....	172
Figura 31.	Polimorfonucleares correspondiente al ratón No. 1. Representación por medio de histogramas y evolución de los neutrófilos (Ly 6G ⁺) en ratones infectados y tratados con 100 µg de transferrina porcina, en los diferentes momentos del estudio. (1) Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de los polimorfonucleares obtenidos mediante el gradiente de densidad. 2-8: Representación de los porcentajes de expresión del	

	AcMo Ly6G en la población total de polimorfonucleares en los diferentes días del experimento (pre y post infección) y 9 Control negativo de la tinción.....	173
Figura 32.	Recuento de <i>A. pleuropneumoniae</i> en ratones tratado con transferrina porcina y vacunados en un periodo de 40 días. Datos media de 2 animales.....	175
Figura 33.	Valores de ELISA en ratones infectados (dosis subletal) con <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> y vacunados en un periodo de 10 días.....	176
Figura 34.	Recuento de <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> en ratones vacunados y tratados transferrina porcina en un periodo de 40 días.....	177
Figura 35.	Valores de la prueba de ELISA en suero de ratones infectados y vacunados contra <i>A. pleuropneumoniae</i> en un periodo de 40 días.....	178
Cuadro 1:	Ejemplo de diversos factores de virulencia regulados por el hierro (Litwin y Calderwoo, 1993).....	27
Cuadro 2:	Reacción de Haber-Weiss, en la cual el Fe ⁺⁺ cataliza la producción del radical OH· a partir de los radicales generados en el metabolismo oxidativo.....	28
Cuadro 3.	Esquema de las distintas interpretaciones descritas acerca de la caja Fur.....	39
Cuadro 4.	Diferentes especies de serpientes y su DL50 (dosis letal 50) en ratones.....	52
Cuadro 5.	Proteínas de fase aguda en diferentes especies.....	54
Cuadro 6.	Valores normales de población celular de sangre periférica del ratón blanco NMRI.....	66
Cuadro 7.	Porcentajes aproximados de los distintos tipos celulares sanguíneos en el ratón.	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Pleuroneumonía Porcina

La pleuroneumonía porcina es una de las enfermedades respiratorias más importantes en la industria porcina (Williams *et al.*, 2000, Huerta *et al.*, 2004), presentando un cuadro agudo en cerdos, que suelen morir debido a una neumonía hemorrágica necrótica; sin embargo, el impacto económico de la enfermedad se centra más en la disminución de la tasa de crecimiento de los cerdos enfermos crónicos. Enfermedad la cual ha sido estimada en ratones logrando hasta un 33,6% (Taylor 2002; Assavacheep *et al.*, 2003).

La pleuroneumonía porcina es un proceso respiratorio de carácter infeccioso, agudo o crónico, caracterizado por bronconeumonía necrótico hemorrágica y pleuritis fibrinosa, producida por *Actinobacillus pleuropneumoniae*. La pleuroneumonía porcina puede presentarse en animales de todas las edades aunque son más susceptibles entre las seis y las quince semanas (Nicolet, 1992). La incidencia se incrementa cuando se asocian factores ambientales de carácter estresante, como sucede en el caso del transporte, hacinamiento, la falta de ventilación en las naves y las condiciones climatológicas adversas (Rosendal y Mitchell, 1983). Estos hechos sugieren que habitualmente la infección se mantiene subclínicamente hasta que la aparición de ciertos factores estresantes facilita la multiplicación del microorganismo en el aparato respiratorio y a consecuencia de ello, hace su aparición la enfermedad. Un brote típico de pleuroneumonía porcina origina aproximadamente un 50% de morbilidad y un 10% de mortalidad (Fenwick y Henry, 1994), siempre que los animales no hayan tenido contacto antes con el agente, lo que produce importantes pérdidas económicas derivadas de las bajas y los tratamientos medicamentosos.

El curso de la enfermedad puede ser hiperagudo, agudo o crónico. En la mayoría de las ocasiones, la circulación del agente, los tratamientos antibióticos y el uso de programas de control basados en el uso de vacunas (generalmente bacterinas, o vacunas de subunidades o conjugadas) ha derivado hacia formas crónicas más frecuentes, que apenas producen síntomas. En estas condiciones, las pérdidas económicas se relacionan con la disminución de los índices de conversión del alimento, que retrasa el crecimiento de los animales y aumenta su permanencia en los cebaderos una media de 5 a 6 días, hasta alcanzar el peso de mercado de 100 kg. (Rohrbach *et al.*, 1993). Otros costes adicionales

Introducción

incluyen los tratamientos y vacunas, la atención veterinaria y la mano de obra, al prolongarse la permanencia de los animales en la explotación (Pijoan, 1984).

En general, los animales que sobreviven al proceso agudo evolucionan a la forma crónica y se convierten en portadores asintomáticos, con el microorganismo localizado en las lesiones necróticas del pulmón, en las tonsilas y en la cavidad nasal (Nicolet, 1985; Sidibe *et al.*, 1993).

La transmisión del agente es principalmente de tipo directo, desde el animal infectado al sano susceptible, por vía aérea (Letchtenberg *et al.*, 1994). En algunos brotes, sin embargo, se ha observado la difusión entre granjas sin intercambio de animales, lo que sugiere un tipo de contagio a través de aerosoles, o del personal de la granja en contacto con exudados procedentes de animales enfermos (Nicolet, 1992). Como se ha señalado antes, *A. pleuropneumoniae* puede estar presente en un animal sin causar enfermedad, por lo que es introducido en las explotaciones con la llegada de nuevos cerdos infectados, frecuentemente portadores asintomáticos (Kume *et al.*, 1986), siendo esta la forma más habitual de contagio en granjas que se abastecen con individuos de diferentes procedencias.

1.2. *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Actinobacillus pleuropneumoniae es un tipo de microorganismo Gram negativo, perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*, clasificada en el Manual Bergey (Garrity, G.M., 2001-2003), dentro del subgrupo 3, del grupo 5: “Bacilos Gram negativos anaerobios facultativos”. Es un cocobacilo pleomórfico, capsulado y no esporulado, que puede manifestar formas filamentosas cuando las condiciones de crecimiento no son las óptimas. Tradicionalmente ha sido considerado inmóvil, aunque recientemente se ha demostrado la existencia de flagelos y la movilidad consiguiente (Negrete-Abascal *et al.*, 2003.). En aislamientos iniciales requiere una atmósfera con un 5% de CO₂.

Con carácter general, su crecimiento es dependiente del factor V de coagulación de la sangre (NAD, dinucleótido, de nicotinamida y adenina). Esta circunstancia se resuelve en el laboratorio, bien adicionando este compuesto a los medios de cultivo, en una proporción del 0,025%, o utilizando variantes de agar sangre inoculadas con una estría de

Staphylococcus aureus (o *S. intermedius*); de este modo, *A. pleuropneumoniae* obtiene el NAD que necesita de este último, formando colonias satélites alrededor o en la vecindad del estafilococo. Algunas cepas, antaño incluidas en el denominado biotipo II, son independientes de NAD. En la actualidad se han integrado ambos biotipos, diferenciándose un total de 15 serotipos (Blackall, 2002) sobre la base del antígeno capsular (K). En los serotipos 2, 4, 7 y 9 coexisten cepas dependientes e independientes de NAD, el 13 y 14 son independientes y el resto son dependientes de NAD.

Actinobacillus pleuropneumoniae es hemolítico, con distintos matices en función del serotipo. Además, debidamente inoculado frente a *S. aureus*, produce una zona de hemólisis completa, mucho más intensa que la que se observa en el resto de zonas de crecimiento (fenómeno CAMP). *A. pleuropneumoniae* posee una potente ureasa, característica que le distingue de otros agentes próximos, patógenos y no patógenos; Una descripción de sus características bioquímicas y su diferenciación de otros patógenos del tracto respiratorio porcino puede encontrarse en revisiones recientes (Christensen y Bisgaard, 2004).

Como quiera que el antígeno O, es decir, las cadenas laterales del LPS, son inmunodominantes y poseen cierta proximidad que origina reacciones cruzadas entre varios serotipos (1, 9 y 11; 3, 6, 8; 4 y 7), se ha propuesto su consideración en forma de la clásica fórmula antigénica del esquema de Kauffmann-White, considerando en primer lugar el antígeno K y después el antígeno O (Rodríguez Barbosa *et al.*, 1995).

La determinación del serotipo tiene interés desde el punto de vista diagnóstico y epidemiológico. En cada región, país o territorio pueden circular uno o varios serotipos como causa de la pleuroneumonía; sin embargo suele ser habitual que uno o unos pocos predominen de forma sustancial. De igual modo resulta necesario como parte de los programas de lucha que utilizan la vacunación con bacterinas, en las que la protección que generan es homologa, específica de serotipo.

En España, los serotipos más prevalentes son el 2, 4 y 7 (Rodríguez Ferri *et al.*, 2006, datos sin publicar). En la tabla 1 que sigue, se resume la distribución mundial de serotipos principales.

Serotipo	País
2, 9	Alemania
8	Bélgica
1, 2, 5, 7, 12	Canadá
2, 3, 5, 7	Corea
2, 3, 5, 6, 7, 12	Dinamarca
1, 2, 4, 7, 9, 11	España
1, 5, 7,	Estados Unidos
2, 5, 9	Francia
3	Gran Bretaña
2, 5, 9, 11	Holanda
2	Japón
1, 3, 5, 7	México
2, 6	Noruega
1, 5, 7	Venezuela

Continente o Región	Serotipos Dominantes	Referencia
América	1, 5 y 7	M. Gottschalk, 1998
Australia	12, 1 y 7	Blackall PJ, 1999
Islas Británicas	2 y 8	McDowell SW, 1994
Europa continental	2 y 9	M. Gottschalk,
Extremo oriente	1, 2 y 5	M. Gottschalk,

Tabla 1. Distribución y referencia mundial de los principales serotipos actualmente descritos

Actinobacillus pleuropneumoniae

1.3. Factores de virulencia

A pesar de que durante los últimos años se ha realizado un esfuerzo considerable por esclarecer los mecanismos de virulencia de *A. pleuropneumoniae*, aún son muchos los aspectos que permanecen sin resolver. Los factores de virulencia descritos son numerosos, pero la importancia relativa y el papel que cada uno de ellos desempeña en la patogenia del proceso solo se conoce parcialmente en algunos y en otros se desconoce casi totalmente. Lo que parece fuera de toda duda es que la patogenia de esta enfermedad es multifactorial, con implicaciones de diversos productos y estructuras de la bacteria, a los que hay que añadir los factores propios del hospedador, así como la presencia concurrente de otros agentes respiratorios. Entre los factores de virulencia bacterianos puede incluirse la cápsula, el LPS, las toxinas Apx, las fimbrias y pelos, la enzima super óxido dismutasa, la ureasa, las proteasas y diversas proteínas de la membrana externa (Tascón *et al.*, 1996).

1.3.1. Polisacárido capsular (CP)

El cultivo de *A. pleuropneumoniae* en un medio sólido claro, proporciona colonias iridiscentes después de 24 horas de incubación a 37°C. Esta característica se debe a la producción de cápsula (Inzana, 1990), la principal responsable de la especificidad de serotipo, cuya composición y estructura ha sido determinada en todos ellos. Las cápsulas están cargadas negativamente y se componen de unidades repetidas de oligosacáridos, polímeros de ácido teicoico unidos por enlaces fosfodiéster o polímeros de oligosacáridos unidos por enlaces fosfato (Perry *et al.*, 1990).

La relación de la cápsula con la virulencia se ha demostrado a partir de la obtención de mutantes acapsulares atenuados, bien por mutagénesis química (Inzana, 1988), por intercambio alélico (Ward, 1998) o mediante mutagénesis por transposón (Rioux, 2000). Por otra parte, la variación en el contenido de CP también contribuye a diferencias de virulencia entre distintos aislamientos (Bandara *et al.*, 2003). En general, las cepas con cápsulas gruesas son más virulentas (Jensen y Bertram, 1986; Rosendal y MacInnes, 1990; Jacques *et al.*, 1998; Steffens *et al.*, 1990) que las de cápsula fina. Además, la cápsula es inmunogénica y los anticuerpos generados frente a ella reducen o eliminan la mortalidad en infecciones experimentales, aunque no se resuelve ni la producción de lesiones pulmonares ni la cronificación del proceso (Inzana *et al.*, 1988; Rosendal *et al.*, 1986).

1.3.2. Fimbrias

Se ha descrito la presencia de fimbrias de 0,5 a 2 nm de diámetro y de 60 a 450 nm de longitud, identificadas por microscopía electrónica (Utrera y Pijoan, 1991). Estos apéndices desaparecen con los primeros pases *in vitro*, estimándose que su función es fundamental para la adherencia de la bacteria al epitelio respiratorio, permitiendo la colonización posterior.

1.3.3. Lipopolisacárido (LPS)

Es el componente más abundante de la membrana externa de las bacterias Gram negativas y en relación con *A. pleuropneumoniae* desempeña un papel básico en la adherencia al tracto respiratorio (Paradis *et al.*, 1994), como ha sido confirmado por la pérdida de adherencia en mutantes defectivos (Jacques, 2002).

El LPS incluye una fracción polisacárida (núcleo y cadenas laterales) y una lipídica (lípidio A), siendo esta última la portadora del carácter de endotoxina. El polisacárido (antígeno O ó somático) está integrado por un núcleo formado por ácido 3-desoxi-D-manoctulosónico, glucosa y heptosa y por las cadenas laterales (que incluyen repeticiones de oligosacáridos ramificados o lineales, según el serotipo). La porción lipídica del LPS está compuesta por ácidos grasos, grupos fosfato y glucosa. Se han descrito cepas menos virulentas, caracterizadas por menor contenido de LPS por gramo de peso seco (Jensen, 1986).

En función del tipo de LPS (basado en la región del núcleo) se pueden clasificar los serotipos en dos grupos distintos: el primero comprende los serotipos 1, 6, 9, 11 y el segundo engloba al resto (Jacques *et al.*, 1996). En relación con la composición de las cadenas laterales, pueden diferenciarse también los que las presentan completas, como sucede en los serotipos 2, 4, y 7 (lisos); parciales, en los serotipos 1 y 5 (semirrugosos) o ausentes como sucede en el caso de los serotipos 3 y 6 (rugosos) (Rodríguez, E.F. 2002). Los determinantes antigénicos del LPS de esta bacteria son también específicos de serotipo, aunque existen suficientes similitudes entre los epítomos como para provocar la existencia de reacciones cruzadas dentro de la especie e incluso con otras (Fenwick y Osburn, 1986; Rodríguez Barbosa *et al.*, 1995).

La actividad biológica de la endotoxina de *A. pleuropneumoniae* es similar a la de otras bacterias Gram negativas. El LPS purificado es capaz de inducir una reacción dérmica de tipo Schwartzman y una respuesta blastogénica de linfocitos sanguíneos periféricos; además, coagula el lisado de amebocitos del cangrejo *Limulus polyphemus*, es pirogénico y letal para los embriones de pollo (Fenwick y Osburn, 1986; Fenwick *et al.*, 1986) y activa la vía alternativa del complemento (Inzana, 1991). Tras la inoculación en ratones y cerdos, el LPS induce una neumonía intersticial, multifocal o consolidada, con infiltración de células inflamatorias, en la que la gravedad de las lesiones se relaciona con la dosis utilizada. Sin embargo, este factor endotóxico es incapaz de reproducir por sí solo el cuadro de lesión característico de la pleuroneumonía, ya que no origina hemorragias y la necrosis está menos difundida (Udeze *et al.*, 1987; Jewen, 1994). Tampoco se consigue una protección adecuada frente a la enfermedad mediante la inmunización con LPS puro (Fenwick *et al.*, 1986; Inzana *et al.*, 1988).

El LPS también resulta importante en la adherencia (Belanger *et al.*, 1990), aunque no está claro en forma concreta, ya que se han publicado resultados contradictorios. Se demostró, por ejemplo, que la adherencia podía ser inhibida por anticuerpos monoclonales frente a la fracción de alto peso molecular del polisacárido (Paradis *et al.*, 1994; 1999). Sin embargo, un estudio realizado con mutantes defectivos en la misma fracción se adhieren en igual proporción que la cepa salvaje, sugiriendo que la proporción polisacárida del LPS no intervenía en este proceso. (Rioux *et al.*, 1999). En el mismo trabajo, otro mutante defectivo en la biosíntesis del núcleo del LPS redujo su adherencia en un 38% comparado con la cepa salvaje, pero no quedó aclarado el fundamento genético de tal suceso (Rioux *et al.*, 2000). Para añadir más confusión en este punto, estudios más recientes sobre células epiteliales de pulmón porcino parecen demostrar que el antígeno O del LPS no es esencial en la adherencia (Boekema, B.K. *et al.*, 2003). Además, se han identificado glicoesfingolípidos y fosfolípidos de células epiteliales como posibles receptores para el LPS de *A. pleuropneumoniae* (Abul-Milh *et al.*, 1999, Jeannotte *et al.*, 2003).

Por tanto, el LPS parece que contribuye a la patogenicidad de *A. pleuropneumoniae*, interviniendo de alguna forma en la colonización bacteriana y actuando sinérgicamente con otras toxinas para acentuar las lesiones. Sin embargo, es imprescindible la participación de

otros factores, tanto para reproducir el cuadro completo de la enfermedad, como para conseguir una protección eficaz.

1.3.4. Proteínas de membrana externa. TbpA y TbpB.

Los determinantes antigénicos de las proteínas de membrana externa, junto con los del LPS y proteínas citoplasmáticas, son los responsables de la reactividad cruzada entre los serotipos de *A. pleuropneumoniae* y otras especies, lo que da lugar a problemas de inespecificidad en las pruebas diagnósticas (Rapp y Ross, 1986; Inzana y Mathison, 1987). La inmunización de cerdos con estas proteínas confiere cierta protección frente a la infección (Chiang *et al.*, 1991; Rossi-Campos *et al.*, 1992; Gerlach *et al.*, 1993; Bunka *et al.*, 1995).

Dentro de las proteínas de membrana externa ocupan un lugar destacado las proteínas de unión a transferrina, que intervienen como receptores en el proceso de captación de hierro por la bacteria. El receptor de transferrina está formado por dos proteínas denominadas Tbps (*transferring binding proteins*). La mayor de ellas se denomina TbpA y presenta un tamaño aproximado de 100 kDa, mientras que la menor tiene un peso de entre 60 a 85 kDa y se denomina, TbpB. Se unen de forma específica a la transferrina porcina, lo que satisface completamente las necesidades de hierro de las bacterias, hecho que determina al menos en parte, la especificidad de hospedador de este microorganismo (Schryvers y Lee, 1989; Gerlach *et al.*, 1992; González *et al.*, 1995). La proteína TbpA es una proteína integral de membrana dispuesta en forma de canal, a través de la cual pasa la transferrina al espacio periplásmico (Postle, 1993). Contiene una secuencia de aminoácidos muy conservada, lo que podría facilitar el paso de hierro a su través (González *et al.*, 1995). La proteína TbpB es una lipoproteína que se encuentra expuesta en la superficie de la bacteria, siendo posible la existencia de dominios transmembrana que le permitirían extenderse hacia la membrana interna (Gerlach *et al.*, 1992), mientras que el resto se proyectaría hacia el exterior. Los anticuerpos obtenidos a partir de animales convalecientes de la infección no reconocen el extremo N-terminal de la proteína (necesaria para que se una de forma estable a la transferrina), lo que pone de manifiesto una cierta variabilidad entre sus isoformas (Strutzberg, 1995); sin embargo, la región C-terminal está muy conservada (Gerlach *et al.*, 1992).

Mediante estudios de hibridación se han determinado tres variantes del gen *tbpB*, la primera en los serotipos 1, 6 y 12, otra en los serotipos 2, 3, 4, 8, 9, 10 y 11 y la última únicamente presente en el serotipo 5. En el primer serotipo codifica una proteína de 65 kDa y de 60 kDa en el segundo. El gen del serotipo 5 presenta una homología muy baja con los dos anteriores.

Se cree que ambas proteínas (TbpA y TbpB) intervienen juntas en la unión a transferrina, ya que es necesario que se expresen las dos para que la bacteria pueda sobrevivir con transferrina como fuente única de hierro (Litt *et al.*, 2000). Según se ha demostrado con mutantes defectivos, ambas proteínas son factores de virulencia, ya que las cepas mutadas no produjeron signos clínicos ni tampoco se detectó respuesta inmune 21 días después de la infección (Baltes *et al.*, 2002).

Las Tbps de *A. pleuropneumoniae* inducen respuesta inmune (Rossi-Campos *et al.*, 1992) y además son críticas en la supervivencia del microorganismo, por lo que su utilidad vacunal es de gran interés. Los anticuerpos obtenidos contra estas dos proteínas, bien en forma conjunta o individualmente, podrían tener capacidad de bloquear la captación de hierro y con ello impedir su crecimiento y multiplicación, actuando como inmunoprolácticos.

La proteína TbpA posee escasa variabilidad antigénica, restringida además a lugares muy determinados. Por el contrario, la proteína TbpB presenta mayor variabilidad, debido a la heterogeneidad existente dentro de la misma especie y, además, debido a su localización en la superficie bacteriana, lo que la hace más accesible al sistema inmunológico (del Río, 2004).

La inmunización con las proteínas TbpB de un serotipo no induce protección cruzada (Rossi-Campos, 1992), lo que supone una limitación desde el punto de vista de su uso como antígeno, ya que requeriría incorporar sobre todo TbpBs de varios aislamientos para asegurarla (Gerlach *et al.*, 1992); No obstante, existen determinados epítomos conservados dentro de la TbpB que convierten a esta proteína en un buen candidato para desarrollar una vacuna (Stevenson *et al.*, 1992). Además, la inmunización con una proteína TbpB recombinante indujo inmunidad protectora en cerdos contra la cepa parental en *A. pleuropneumoniae* (Rossi-Campos, 1992).

1.3.5. Proteasas

A. pleuropneumoniae secreta proteasas capaces de degradar la gelatina porcina, las IgA y la hemoglobina (Negrete-Abascal *et al.*, 1994), acción esta última que podría dirigirse a facilitar la colonización de las mucosas y la obtención del hierro combinado en esta proteína plasmática. Se ha observado, al menos *in vivo*, que estas proteasas se secretan al medio en vesículas que contienen también exotoxinas (Negrete – Abascal *et al.*, 2000).

1.3.6. Exotoxinas

Los resultados obtenidos tras la inoculación intratraqueal en cerdos de sobrenadantes de cultivo de *A. pleuropneumoniae* indujeron a sospechar que las exotoxinas de esta especie constituían factores de virulencia esenciales (Rosendal *et al.*, 1980). Las lesiones se han atribuido a tres proteínas citotóxicas denominadas Apx-I, Apx-II y Apx-III (Frey *et al.*, 1993) y a una cuarta denominada Apx-IV que sólo se produce *in vivo* (Schaller *et al.*, 1999). Se ha confirmado el papel que tienen estas toxinas en el desarrollo clínico y de lesiones mediante la inoculación endobronquial de cerdos con proteínas Apx recombinantes (Kamp *et al.*, 1997). En conjunto, pueden definirse como proteínas con actividad tóxica que se secretan durante el proceso infeccioso. Son fuertemente inmunógenas y poseen actividad hemolítica y/o citotóxica.

Hemolisina I o Apx-I: Es una proteína de 105 kDa, con actividad hemolítica (Frey y Nicolet, 1988) y citotóxica (Kamp *et al.*, 1991) fuertes. Está codificada en un operón formado por cuatro genes dispuestos en tándem en el orden *apxIC*, *apxIA*, *apxIB* y *apxID*. Es producida y secretada por cepas de los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11, mientras que el genoma del resto de serotipos (excepto el 3) es incompleto y por lo tanto insuficiente para la producción de la toxina. Se ha detectado que la toxina se excreta dentro de vesículas, lo que podría favorecer la virulencia (Negrete-Abascal *et al.*, 2000). El calcio es un elemento esencial para su secreción y actividad biológica (Devenish y Rosendal, 1991). Las cepas capaces de producir esta toxina tienden a ser las más virulentas de la especie (Frey y Nicolet, 1990; Kamp *et al.*, 1991).

Hemolisina II o Apx-II: Es una proteína de 103 kDa, que presenta actividad hemolítica débil y citotóxica moderada. Es producida por todos los serotipos excepto por el 10 (Kamp *et al.*, 1991). Su operón no contiene ningún gen para el transporte y la secreción, por lo que utiliza los genes correspondientes del operón de la Apx-I, presentes en todos los serotipos, excepto en el 3 (Frey *et al.*, 1993).

Citotoxina III ó Apx-III: Es una proteína de 120 kDa, que posee actividad citotóxica fuerte, pero que carece de actividad hemolítica (Kamp, *et al.*, 1991). Está producida y secretada por los serotipos 2, 3, 4, 6 y 8, en los que se encuentra presente el operón *apxIIICABD* completo (Chang *et al.*, 1994).

Apx-IV: Se trata de una proteína de 202 kDa, con actividad hemolítica débil, responsable del efecto CAMP. Su identificación, más tardía, se debe principalmente a que no se expresa en cultivos *in vitro* de *A. pleuropneumoniae* (Schaller *et al.*, 1999). Está presente en todos los serotipos y, como se ha señalado, solamente se expresa *in vivo*.

Estas cuatro toxinas pertenecen a la familia de toxinas RTX (*repeat in toxins*) formadoras de poros, que contienen nonapéptidos ricos en glicina, ampliamente distribuidos entre las bacterias patógenas Gram negativas. Su toxicidad se dirige contra macrófagos alveolares y neutrófilos (Bendixen *et al.*, 1981; Udeze y Kadis, 1992; Cullen y Rycroft, 1994; Tarigan *et al.*, 1994 Jensen *et al.*, 1995b), cuya membrana perforan, provocando un choque osmótico que conduce a la muerte celular (Lalonde *et al.*, 1989; Welch, 1991). La importancia de estas exotoxinas como factores de virulencia se demuestra no sólo por su acción tóxica directa sino también por la atenuación conseguida en cepas mutantes o defectivas para estas proteínas mediante distintos procedimientos (Tascón *et al.*, 1994; Jensen *et al.*, 1995b; Reimer *et al.*, 1995; Stokhofe – Zurweiden *et al.*, 1996).

La distribución de las toxinas Apx en los distintos serotipos del biotipo I queda reflejada en la Tabla 2. Es posible encontrar, sin embargo, algunas cepas de campo que no cumplen el patrón de Apx característico de su serotipo.

Combinación de Apx	Serotipos
Apx-I y IV	10
Apx-I, II y IV	1, 5a, 5b, 9 y 11
Apx-II y IV	12
Apx-II, III y IV	2, 3, 4, 6, 7 y 8

Tabla 2: Apx expresadas por los serotipos 1-12 de *A. pleuropneumoniae*.

Los serotipos del biotipo II, ahora unificados con los del biotipo I, normalmente expresan tan sólo la Apx-II, lo cual podría ser parte de la explicación de su menor virulencia (Dom *et al.*, 1994), aunque igual que los primeros producen pleuroneumonía.

Existen elementos en común entre estas proteínas y las exotoxinas RTX de otros microorganismos, como sucede por ejemplo, entre la α -hemolisina de *E. coli* y la Apx-I, o las leucotoxinas de *Manheimia hemolytica*, y la Apx-II y, en menor grado, la Apx-I (Koronakis *et al.*, 1987; Chang *et al.*, 1989; Strathdee y Lo, 1989). Este tipo de proteínas se caracteriza por la presencia de tres dominios hidrofóbicos en la región N-terminal, como todas, un dominio formado por nonapéptidos repetidos ricos en glicina (Negrete-Abascal *et al.*, 1994), que se localiza en la segunda mitad de la proteína y finalmente, una región hidrofílica en el extremo C-terminal (Coote, 1992). Todas las toxinas Apx requieren Ca^{2+} para su actividad, ión que se une a los dominios ricos en glicina del extremo C-terminal (Van Leengoed *et al.*, 1992).

La actividad hemolítica de estas exotoxinas podría ser la responsable de las hemorragias y las lesiones necróticas que se observan en los casos de pleuroneumonía, por lo que se contemplan como los principales factores de virulencia del patógeno (Smits *et al.*, 1992; Crujisen *et al.*, 1996) aunque por si mismas no producen la enfermedad. La función biológica de las exotoxinas es diversa: permiten la liberación de NADH y grupos hemo a partir de los eritrocitos y ayudan a neutralizar la acción de los macrófagos (Udeze y Kadis, 1992; Cullen y Rycroft, 1994; Jensen, 1995a).

La actividad hemolítica más fuerte es la debida a la proteína Apx-I (Frey y Nicolet, 1988; Devenís *et al.*, 1990; Kamp *et al.*, 1991). Por su gran inmunogenicidad (Frey y Nicolet 1991), se ha considerado una proteína interesante tanto para formulación de vacunas como en el diseño de métodos para el diagnóstico de la enfermedad. Diversos mutantes deficientes en la producción de toxinas, bien obtenidos por mutagénesis (Tascón *et al.*, 1994) o espontáneos (Inzana, 1991) han demostrado ser avirulentos, lo que demuestra la importancia fundamental de las toxinas en la patogénesis de la enfermedad.

Se ha obtenido protección parcial mediante inmunización de cerdos con RTX, en combinación con otros componentes bacterianos (Beaudet *et al.*, 1994). La presencia de anticuerpos neutralizantes frente a las exotoxinas determina una menor susceptibilidad a la infección (Devenish *et al.*, 1990; Crujisen *et al.*, 1995a). Además, se ha visto que todos los animales que sobreviven a la infección presentan títulos elevados de anticuerpos frente a las hemolisinas (Stine *et al.*, 1994). No obstante, como ya hemos comentado anteriormente, resulta evidente que estas toxinas no son los únicos factores necesarios para generar una respuesta protectora.

1.4. Importancia del hierro en la infección

El hierro constituye un componente esencial para los organismos vivos debido a que su presencia resulta necesaria para la actividad de muchas proteínas celulares. En los vertebrados, por ejemplo, numerosos procesos fisiológicos, incluidos el transporte de oxígeno, la respiración, la síntesis de DNA, la formación de neurotransmisores y hormonas y ciertos aspectos de la defensa contra microorganismos, requieren proteínas que contienen hierro.

El uso de hierro en los sistemas biológicos presenta, sin embargo, dos inconvenientes importantes: por un lado su baja solubilidad y, por otro, su toxicidad potencial, ya que puede promover la formación de intermediarios de oxígeno altamente reactivos, como el radical hidroxilo, y promover así la oxidación de los lípidos (lipoperoxidación), de las proteínas o de otros componentes celulares. Los seres vivos han desarrollado, en consecuencia, una serie de mecanismos y estrategias que les permiten adquirir y hacer uso del hierro, reduciendo los efectos adversos de este micronutriente sobre

Introducción

la viabilidad celular. Uno de estos mecanismos consiste en la unión específica del hierro a proteínas que incrementan su solubilidad y reducen su toxicidad, además de ejercer un control sobre su metabolismo.

En el hombre y animales, los principales órganos que acumulan hierro son el hígado (aproximadamente una tercera parte), el bazo y la médula ósea. El músculo es cuantitativamente importante debido a que constituye una gran masa, aunque la concentración total de hierro almacenado es baja (40 mg/Kg). En individuos sanos solo se absorbe 1 mg de hierro al día, cifra que representa únicamente un 10% del contenido de hierro en la ingesta, cantidad que se regula dependiendo de la necesidad corporal. Por ejemplo, ante situaciones deficitarias en hierro y cuando existe un incremento de la eritropoyesis, simplemente se absorbe más hierro de lo habitual.

Como sucede en el caso de los seres vivos superiores, en las bacterias el hierro es también un factor de crecimiento esencial al formar parte de algunas proteínas, como catalasa, peroxidasa, oxidasas y citocromos; además participa en la síntesis de pirimidinas y aminoácidos, en el ciclo del ácido tricarbóxico, en la cadena de transporte de electrones y es un cofactor importante debido a su potencial redox (Crosa, 1997; Braun y Killmann, 1999; Ratledge y Dover, 2000).

Las bacterias necesitan para su crecimiento una concentración de hierro de entre 10^{-6} y 10^{-8} M (Pradel *et al.*, 2000), lo que significa que una sola bacteria requiere alrededor de 10^5 - 10^6 iones de hierro por generación (Wandersman y Stojiljkovic, 2000). En condiciones anaeróbicas, el hierro se encuentra en forma reducida, que es lo suficientemente soluble como para que pueda ser capturado por las bacterias sin necesidad de mecanismos especializados (Braun & Killmann, 1999). De la misma forma, en condiciones de acidez (pH 3) la concentración de hierro reducido soluble es únicamente de 10^{-8} M (Braun y Killmann, 1999), suficiente para cubrir las necesidades de la mayoría de las bacterias acidófilas. Sin embargo, en las mucosas y tejidos la concentración de hierro libre en solución es de 10^{-8} M (Ratledge & Dover, 2000). Esta baja concentración de hierro libre constituye una de las primeras líneas de defensa del hospedador frente a las infecciones bacterianas.

Los organismos superiores disponen de mecanismos constitutivos para mantener un bajo nivel extracelular de hierro basados en la función de algunas proteínas que secuestran los iones de hierro, como la transferrina, hemoglobina, hemopexina, ferritina y albúmina. El hierro, que se asimila de la dieta a través de las células de la mucosa del yeyuno, pasa al torrente sanguíneo donde es transportado hacia el hígado unido a la transferrina (Ratledge y Dover, 2000).

La transferrina es un tipo de glicoproteína extracelular de entre 75 y 80 kDa de peso molecular, capaz de unir hierro (Otto *et al.*, 1992). Existen tres tipos de transferrina: la serotransferrina, que se encuentra en la sangre y linfa; la lactoferrina, que se localiza en el interior de los neutrófilos y en la mayoría de fluidos extracelulares (saliva, lágrimas, secreciones nasales, fluidos seminales e intestinales, moco cervical, leche, etc.) y la ovotransferrina, que se halla en la albúmina de los huevos (Ratledge y Dover, 2000).

La ferritina es la principal proteína de almacenamiento de hierro. Se localiza en la mayoría de órganos animales, pero principalmente en el hígado. Es una proteína soluble en agua y está presente en los espacios extramitocondriales. Su peso molecular es de alrededor de 500 kDa y está compuesta por 24 subunidades que forman una esfera que puede almacenar unos 4.500 átomos de hierro. Cuando existe un exceso de hierro, se sintetiza en el hígado hemosiderina, una proteína que posee características parecidas a la ferritina (Otto *et al.*, 1992; Ratledge y Dover, 2000).

La hemoglobina es la proteína encargada del transporte de oxígeno en los glóbulos rojos y está compuesta por dos cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene un grupo hemo que se localiza en un dominio hidrofóbico. Su peso molecular es de unos 64,5 kDa (Otto *et al.*, 1992). Si se produce la rotura de los glóbulos rojos (hemólisis) se oxida la hemoglobulina libre en el plasma, disociándose en globina y el grupo hemo, el cual se une específicamente a una proteína de unión a hemo llamada hemopexina y el hierro de la hemoglobina se une a haptoglobina, saturándola. Ambos complejos, hemoglobina-haptoglobina y hemopexina-hemo, son conducidos al hígado donde el grupo hemo se degrada a bilirrubina o se incorpora a los citocromos. Una pequeña parte de las moléculas de hemo se degrada en protoporfirina y hierro, que se une a la transferrina, que lo transporta hasta la ferritina (Otto *et al.*, 1992).

Introducción

La albúmina es una proteína globular de alrededor de 68 kDa que constituye casi el 60% de las proteínas totales del plasma. Una molécula de albúmina puede unir hasta 10 átomos de hierro (Genco y Dixon, 2001).

Además de todos estos mecanismos, el hospedador es capaz de reducir aún más la cantidad del hierro extracelular en el curso de un proceso infeccioso, fenómeno conocido como hipoferremia de la infección, que se produce incrementando la síntesis de ferritina en el hígado y la liberación de lactoferrina por parte de los neutrófilos (Otto *et al.*, 1992).

Las células del hospedador también responden directamente a la invasión de un patógeno alterando el estatus del hierro intracelular. Se han descrito unas proteínas de resistencia natural asociadas a macrófagos, llamadas Nramp1 y Nramp2, que intervienen en este proceso. Nramp1 es una proteína transmembrana, que actúa incrementando la captación de hierro desde la transferrina al macrófago, cuando los macrófagos y otros fagocitos profesionales han sido activados por la invasión microbiana. Este aporte adicional de hierro estimula la formación de formas reactivas de oxígeno, OH y O²⁺, que contribuyen a la destrucción de las bacterias fagocitadas (Ratledge y Dover, 2000).

Los seres vivos superiores también responden a la infección suprimiendo la asimilación del hierro de la dieta, aumentando la secreción de haptoglobina y hemopexina desde el hígado, inhibiendo el crecimiento de las bacterias dentro de los fagosomas de los macrófagos o mediante el secuestro por los macrófagos de las formas de lactoferrina cargadas de hierro (Weinberg, 1995).

1.4.1. Proteínas implicadas en el metabolismo del hierro

1.4.1.1. La proteína HFE. El gen *hfe* en ratón

Está codificada por el gen *hfe* y consta de 343 aminoácidos en tres dominios extracelulares, un dominio transmembrana y una cola citoplasmática corta. Es homóloga a moléculas no clásicas del MHC-I pero, a diferencia de ellas, es incapaz de presentar antígenos.

Función y localización de la proteína HFE

Estudios funcionales y cristalográficos han demostrado que la proteína HFE interacciona con el receptor de transferrina clásico (TFR) en la superficie celular y compite con la transferrina (TF) en la unión al receptor (Parkkila *et al.*, 1997a; Feder *et al.*, 1998; Lebrón *et al.*, 1998; Lebrón y Bjorkman 1999; Lebrón *et al.* 1999). Del mismo modo, estudios de sobreexpresión del gen *hfe* demuestran que la proteína interfiere con el proceso de transporte de hierro del endosoma al citoplasma, bien a nivel de la acidificación de los endosomas, de la reducción del Fe⁺⁺⁺ o en el transporte a través de la membrana del endosoma del Fe⁺⁺ (Arredondo *et al.*, 2001). Se concluye, por ello, que la función de la proteína HFE permite disminuir la entrada de hierro al citoplasma celular, actuando a nivel de la membrana plasmática, inhibiendo la captación de este metal a través de la vía transferrina-receptor de transferrina (TFR-TF) y a nivel endosómico, bloqueando el transporte de hierro al citoplasma.

A pesar de que la relación entre el TFR y la HFE es la primera evidencia de implicación del gen *hfe* en el metabolismo del hierro, la disminución de la afinidad del TFR por la TF no explica el incremento de la absorción intestinal de hierro que se encuentra en los pacientes de hemocromatosis hereditaria, ya que el TFR solo se expresa en la región basal de los enterocitos (Arredondo *et al.*, 2001). Se han propuesto varias hipótesis sobre el papel de la proteína HFE en la absorción intestinal del hierro.

Estudios inmunohistoquímicos han revelado que la proteína HFE se expresa solo en ciertas células del tracto alimentario humano (las células de la cripta del duodeno) con una localización única intracelular y perinuclear, totalmente diferente a la localización de membrana que tendría en los demás tejidos (Parkkila *et al.*, 1997b). Mediante *Northern blot* y RT-PCR se ha detectado que el mRNA de HFE se expresa constitutivamente y a unos niveles muy bajos en todos los órganos investigados, siendo mayoritaria su expresión en hígado (Feder *et al.*, 1996; Rhodes *et al.*, 1999).

Un año antes de que Feder y colaboradores descubrieran el gen *hfe*, en 1995, Hashimoto *et al.*, identificaron sin saberlo el gen homólogo del *hfe* en el ratón, al que denominaron *mr2* (Hashimoto *et al.* 1995). El gen presenta una similitud de aproximadamente un 66% en secuencia y se expresa en todos los órganos estudiados

Introducción

(corazón, cerebro, bazo, pulmón, hígado, músculo, riñón y testículo) (Hashimoto *et al.* 1997).

1.4.1.2. Ferritina (H y L)

La ferritina es una proteína compuesta por 24 cadenas polipeptídicas de subunidades pesadas (H) y ligeras (L), capaz de almacenar hasta 4.500 átomos de Fe^{++} . La ferritina está presente en todas las especies animales y su estructura tridimensional está muy conservada. Su habilidad para secuestrar hierro le confiere una función dual de proteína detoxificadora y de reserva de hierro (Harrison Arosio, 1996).

Existen ferritinas formadas por heteropolímeros o por homopolímeros. Las dos subunidades que componen la ferritina representan papeles diferentes en el metabolismo del hierro. La H-ferritina es una ferroxidasa y su actividad promueve una rápida incorporación del hierro en ferritinas ricas en esta subunidad. La forma rica en subunidades L capta hierro más lentamente, acumulando hierro a largo plazo. Por lo tanto, en general, los tejidos que almacenan hierro, como el hígado y el bazo, presentan ferritinas ricas en formas L y éstas presentan un contenido relativamente alto de hierro (Harrison y Arosio, 1996).

La producción de ferritina está directamente ligada al estatus celular de hierro, a través de cambios en la traducción de los mRNAs de las formas H y L, que permiten una rápida respuesta en las situaciones de exceso o deficiencia de hierro celular. Aunque en los vertebrados la ferritina se localiza principalmente en el citoplasma, también pueden descubrirse concentraciones bajas en el plasma.

1.4.1.3. Hemosiderina

Aunque en condiciones normales, la ferritina es la principal proteína que almacena hierro, en enfermedades por sobrecarga de hierro la proteína predominante es la hemosiderina. La hemosiderina es un producto de degradación de la ferritina y, a diferencia de aquella, que es soluble, ésta es insoluble. Al microscopio electrónico, la hemosiderina se observa como agrupaciones masivas e irregulares de partículas densas a los electrones incluidas dentro de membranas, posiblemente lisosomas secundarios, que reciben el nombre de siderosomas.

1. 4.1.4. Transferrina (TF).

La transferrina (TF) es una glicoproteína con una masa molecular aproximada de 76,5 kDa. La transferrina se originó como consecuencia de una duplicación intragénica de un gen ancestral, que condujo a la presencia de dominios N y C terminales homólogos, cada uno de los cuales une un ión de hierro férrico (Fe^{+++}). Por lo tanto, la TF puede unir dos átomos de hierro, como máximo. Normalmente en el suero un tercio de los sitios de unión de hierro están saturados evitando la acumulación de hierro libre.

La TF es el principal medio de transporte de hierro (en forma no hemo) entre los distintos órganos corporales. Transporta hierro desde el intestino, el sistema reticuloendotelial y las células parenquimatosas del hígado, a todas las células proliferativas del organismo. Acepta hierro procedente de las células reticuloendoteliales, de tejidos parenquimatosos y de las células de la mucosa intestinal, entregándolo a los eritroides de la médula y otros tejidos, para la síntesis de proteínas que contienen hierro y para su almacenamiento (Harrison Arosio, 1996). La captación celular de hierro unido a TF se realiza a través de endocitosis mediada por receptor. La expresión de la TF está influida por múltiples factores y su abundancia en el está inversamente relacionada con el nivel corporal de hierro. En situaciones de deficiencia del mismo, la transcripción del gen de la TF se incrementa de 2 a 3 veces en el hígado, que es el principal órgano de síntesis de TF; contrariamente cuando los niveles de hierro son altos, se reduce la traducción del mRNA de la TF y consecuentemente su expresión hepática.

El receptor celular de transferrina (TFR)

El TFR es una proteína de aproximadamente 95 kDa que forma homodímeros y es capaz de unir dos moléculas de transferrina (TF). En las condiciones del pH extracelular la TF diférrica se une al TFR; entonces, el complejo TF-TFR es captado por endocitosis mediada por receptor, y en el compartimento endosomal, donde el pH es ácido, el hierro se libera de la TF y es bombeado al citoplasma, posiblemente por intervención de la proteína DMT1 (Fleming *et al.*, 1998). El complejo apo-TF-TFR se recicla a la membrana, donde la apo-TF se disocia del TFR y puede captar de nuevo hierro del plasma. El TFR se encuentra en la mayoría de los tipos celulares del organismo, pero no en todos.

El número de TFR presentes en la superficie de las células eucariotas está relacionado con las necesidades de captación de hierro; La deficiencia de hierro induce la expresión del TFR, lo que debe entenderse como la respuesta orgánica de la célula para solucionar el abastecimiento. El hierro modula la síntesis del TFR mediante distintas vías de regulación que incluyen alteraciones en la estabilidad del mRNA o mediante la modulación transcripcional del gen *tfr*.

1.4.2. Mecanismos de captación de hierro en las bacterias

Igual que en el caso de las células y, como ya ha sido comentado, el hierro es un elemento esencial para la vida y el crecimiento de las bacterias y su disponibilidad dentro del hospedador es insuficiente para cubrir las necesidades (Ratledge y Dover, 2000).

Por este motivo, los microorganismos patógenos se han visto obligados a desarrollar estrategias para captar hierro de las diferentes fuentes disponibles *in vivo*. Los sistemas de captación de hierro por parte de las bacterias, pueden agruparse en dos modelos clásicos: los que implican una interacción directa con las proteínas que acomplejan y transportan el hierro (transferrina, lactoferrina, hemoglobina, etc.) y los sistemas que implican la síntesis y liberación de moléculas de bajo peso molecular, llamadas sideróforos, con gran afinidad por el hierro, que lo capturan y separan de las moléculas del hospedador (Ratledge y Dover, 2000). Además de estos mecanismos, algunos patógenos producen enzimas que incrementan la eficacia de estos sistemas, como sucede con los microorganismos que sintetizan proteasas, que son secretadas al medio y allí degradan las proteínas transportadoras de hierro del hospedador (Genco y Dixon, 2001).

Por otro lado, un exceso en la concentración de hierro intracelular puede ser tóxico para las bacterias, ya que estimula la formación de formas reactivas de oxígeno, generándose radicales hidroxilo mediante la reacción de Haber-Weiss (Ratledge y Dover, 2000); por este motivo, las bacterias han desarrollado mecanismos para controlar los niveles de hierro intracelular.

La permeabilidad de la membrana externa de las bacterias Gram negativas viene determinada por la presencia de proteínas denominadas porinas de clase I, que forman poros en la membrana que permiten el paso de compuestos hidrofílicos de hasta 600

daltons; estas porinas no muestran especificidad de sustrato (Braun, 1995). Existe un segundo tipo de porinas, las denominadas de clase II, que permiten la difusión inespecífica de compuestos de bajo peso molecular, aunque también reconocen algunos sustratos de forma específica (Braun, 1995). Tal especificidad permite una difusión más eficaz de los sustratos y también la de compuestos de mayor tamaño, que no podrían pasar a través de las porinas de clase I. Por último, existe un tercer tipo de canales, los receptores específicos de alta afinidad, que permiten el paso de moléculas de mayor tamaño y que se encuentran en concentraciones muy bajas (Braun, 1995).

El tamaño de las moléculas de hierro en solución impide que pasen por la membrana externa a través de las porinas inespecíficas, por lo que resulta necesaria la presencia de receptores de membrana. Estos receptores reconocen las moléculas de hemo o de proteínas transportadoras de hierro del hospedador. Después de la unión de dichas moléculas, se libera el hierro, que es transportado hacia el citoplasma (Genco y Dixon, 2001). Este proceso de entrada del hierro requiere energía, que es proporcionada por el sistema TonB (Moeck y Coulton, 1998), que incluye acopladores que proporcionan ATP. Por ello, los receptores específicos de membrana contienen una región, conocida como caja *Fur*, que es la que interacciona con la proteína TonB. Así pues, se puede considerar que aquellas proteínas de membrana que contengan la caja *FurB* probablemente estarán implicadas en la captación de alguna clase de nutrientes esenciales para la célula, como sucede con el hierro. Todos estos receptores están regulados negativamente por el complejo *Fur-Fe⁺⁺* y, por tanto, se expresan en condiciones de privación de hierro.

1.4.2.1. Proteínas receptoras de transporte de hierro

1.4.2.1.2 Receptores de transferrina y lactoferrinas

En muchas bacterias patógenas pertenecientes a las familias *Neisseriaceae* y *Pasteurellaceae* se han descrito dos proteínas muy conservadas y específicas que reconocen únicamente las transferrinas o lactoferrinas de su hospedador habitual. Dichas proteínas se denominan TbpA y TbpB si reconocen la transferrina y LpbA y LpbB si reconocen la lactoferrina (Morton y Williams, 1989; Fuller *et al.*, 1998). Así, por ejemplo, se han descrito receptores de transferrina en *N. gonorrhoeae* (Cornelissen *et al.*, 2000), *N. meningitidis* (Schryvers and Morris, 1988; Ferrón *et al.*, 1993) y en *P. multocida* (Veken *et*

Introducción

al., 1994; Ogunnariwo y Schryvers, 2001), entre otros (ver después), y receptores de lactoferrina en *N. meningitidis* (Schryvers y Morris, 1988b). También se han identificado receptores de este tipo en microorganismos que no pertenecen a estas familias, como en *Moraxella catarrhalis* (Du *et al.*, 1998). La proteína TbpA es un receptor de membrana externa dependiente de TonB. Presenta la misma afinidad por las transferrinas cargadas con moléculas de hierro como por las apotransferrinas. La proteína TbpB es una lipoproteína que produce un aumento de la eficacia de captación de hierro, si bien no es imprescindible para que ésta se lleve a cabo. Se ha propuesto un mecanismo de acción que consiste en que inicialmente la proteína TbpB reconocería las transferrinas cargadas con moléculas de hierro, se uniría a ellas y las presentaría a un dímero formado por dos proteínas, la TbpA, integral y anclada en la membrana, externa y la TbpB, unida a la membrana, pero proyectada hacia el exterior. La unión de la transferrina a estas dos proteínas podría inducir un cambio conformacional en la TbpB y en las propias transferrinas, liberándose así las moléculas de hierro que pasarían hacia el periplasma a través de los poros formados por las proteínas de membrana (Schryverrs y Stojiljkovi, 1999).

1.4.2.1.3. Receptores de hemina y hemoglobina

Se ha descrito una gran variedad de proteínas de membrana implicadas en la captación de hierro procedente de hemina y hemoglobina. Por ejemplo, se han caracterizado receptores de hemina en *Porphyromonas gingivalis* (Dashper *et al.*, 2000) o receptores de hemoglobina en *Haemophilus ducrey* (Elkins, 1995; Elkins *et al.*, 1995b), *P. gingivalis* (Fujimura *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 2000) y en distintas especies de *Neisseria* (Stojiljkovic *et al.*, 1995; Stojiljkovic *et al.*, 1996).

Todas ellas presentan una escasa similitud (entre un 17 y un 23%) con los receptores de membrana para sideróforos y los de transferrina y lactoferrinas, siendo el extremo N-terminal el más conservado entre los distintos tipos de proteínas. En particular, los receptores de hemina contienen un dominio muy conservado, que presenta la secuencia FRAP/NPNL (Wandersman y Stojiljkovic, 2000).

1.4.2.1.4. Proteínas de unión a transferrina porcina en *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Dentro de las proteínas de la membrana externa se encuentran los receptores específicos de la transferrina porcina, responsables (al menos probablemente) de la especificidad estricta de hospedador a *A. pleuropneumoniae*, ya que está suficientemente contrastado que esta bacteria depende de este mecanismo para la adquisición del hierro *in vivo*, lo que determinaría que sólo pueda originar enfermedad en la especie porcina, cuya transferrina es reconocida de forma selectiva por los receptores de superficie de la membrana externa de *A. pleuropneumoniae* (Yu *et al.*, 1992). Además, los sistemas de captación de hierro representan un mecanismo de virulencia relevante, al posibilitar la satisfacción de los requerimientos nutricionales de esta especie bacteriana en un ambiente en que el hierro libre se encuentra en concentraciones ínfimas (Finkelstein *et al.*, 1983).

La primera descripción de la captación de transferrina en *A. pleuropneumoniae* es más reciente que en otras especies bacterianas, como *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella catarrhalis* o *Haemophilus influenzae*, pero anterior a la de otros integrantes de la familia *Pasteurellaceae*, como *Haemophilus agni*, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus parasuis*, *Haemophilus avium*, *Avivacterium paragallinarum*, *Pasteurella multocida* o *Mannheimia haemolytica* (de la Puente, 2001). Schryvers y González (1990) demostraron que *A. pleuropneumoniae* era capaz de captar únicamente transferrina porcina, para lo que se valía de dos proteínas de la membrana externa (designadas inicialmente Tbp1 y Tbp 2 y más tarde, TbpA y TbpB), que fueron identificadas y purificadas por Ricard *et al.*, en 1991. Estas proteínas han sido identificadas en cepas de todos los serotipos y presentan unión específica para la región C terminal de la transferrina porcina (González *et al.*, 1995), hecho que podría constituir una de las claves de su limitación a la especie porcina (Litt *et al.*, 2000). Las TbpA y TbpB son proteínas de membrana externa con especial interés vacunal. Su importancia como factores de virulencia ha sido demostrada por la atenuación que se obtiene en cepas defectivas (Baltes *et al.*, 2002). Además, la inmunización de cerdos con proteínas de unión a transferrina confiere cierta protección frente al desafío con el agente patógeno (Rossi Campos *et al.*, 1992; Gerlach *et al.*, 1993).

Introducción

Las proteínas TbpA y TbpB se expresan en *A. pleuropneumoniae* en condiciones de carencia de hierro. La proteína TbpA es una proteína transmembrana de 110 Kda que funciona como canal de transporte de hierro a través de la membrana externa. La Tbp es una lipoproteína de 60 a 70 kDa que se encuentra anclada a la membrana externa mediante una cola lipídica N-terminal (Yu y Schryvers, 1994). Esta proteína se modifica y procesa secuencialmente por la gliceril y O-aciltransferasa, la peptidasa señal II y la N-aciltransferasa, dando lugar a una proteína madura que presenta una cadena triple-acil unida a su residuo de cisteína N-terminal. El péptido señal, eliminado en este proceso, consta de 19 aminoácidos. La variabilidad de la TbpB entre los diferentes serotipos es mucho mayor que la de TbpA, lo cual podría ser debido a una mayor accesibilidad de la primera (Vonder Haar *et al.*, 1994). Se definen 3 variantes de TbpB según el serotipo: la primera, una TbpB de 70 kDa, se presenta en los serotipos 1, 6, 8 y 12; mientras que el segundo tipo corresponde a los serotipos 2, 3, 4, 7, 9, 10 y 11, que expresan una TbpB de 60 kDa. Finalmente, en el serotipo 5 se expresa una variante de 65 kDa (Gerlach *et al.*, 1992; Bog *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2002).

Ambas proteínas, se encuentran asociadas merced a su disposición que implica un contacto íntimo. Esta disposición parece facilitar su funcionalidad y reforzar la unión de la transferrina. Existe alguna hipótesis sobre qué regiones de cada proteína están implicadas en dicha interacción (Bog *et al.*, 2001) y se ha logrado demostrar, comparando proteínas Tbp de diferentes especies relacionadas, que se trata de dominios conservados (Fuller *et al.*, 1998). En la Figura 1 se presenta un modelo de este sistema.

El proceso de captación del hierro unido a la transferrina por parte del sistema Tbp interesa también a otros componentes, además de las proteínas TbpA y TbpB, puesto que se trata de un proceso dependiente de energía, aportada por un sistema proteico, *TonB-ExbBD*, localizado en la membrana interna (ver después). Cuando un protón atraviesa el complejo en dirección al espacio periplasmático, provoca un cambio conformacional en una proteína TonB (necesaria para la transducción de energía desde la membrana citoplasmática en procesos que ocurren en la membrana externa), encargada de proporcionar la energía necesaria al par TbpA/TbpB (Higgs *et al.*, 1998). La interacción de la transferrina con el complejo TbpA/B y la transducción de energía por parte de la proteína de tipo TonB

conducen a un cambio conformacional en la molécula de transferrina y a la liberación de cationes férricos. Estos iones son transportados a través de la TbpA y se asocian con la proteína periplasmática Fbp, la cual transporta un catión férrico desde el espacio periplasmático hacia un complejo de permeasas de la membrana interna (Fpc1 y Fpc2) que transloca el ión Fe^{+++} hacia el citoplasma. La transferencia de hierro a través de la membrana interna conlleva la reducción del ión férrico a ferroso, aumentando así su biodisponibilidad, como se ha señalado en apartados anteriores.

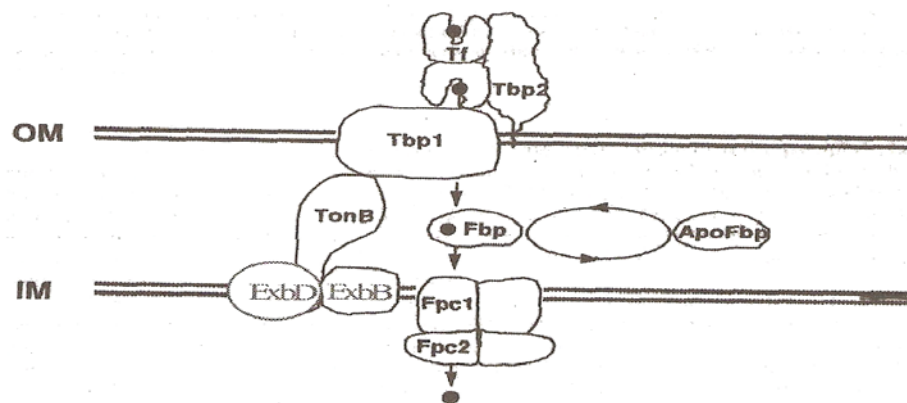


Figura 1: Modelo de captación de hierro en *A. pleuropneumoniae* a partir de la transferrina porcina mediante el sistema Tbp. Tbp: proteína de unión a transferrina; OM: membrana externa; IM: membrana interna; Tf: transferrina; Fbp: proteína periplasmática de unión a hierro; Fpc: permeasa de unión a hierro. Figura modificada de Jacques and Mikael (2002).

La interacción entre las Tbp y el sistema dependiente de TonB no se limita a aspectos funcionales, puesto que también la genética de ambos sistemas está íntimamente coordinada; se ha demostrado que los genes *tonB*, *exbB* y *exbD* se localizan adyacentes en posición 5' a los genes *tbp*, pudiéndose transcribir conjuntamente *exbB*, *exbD*, *tbpB* y *tbp2* (Tonpitak *et al.*, 2000) (Figura 2).

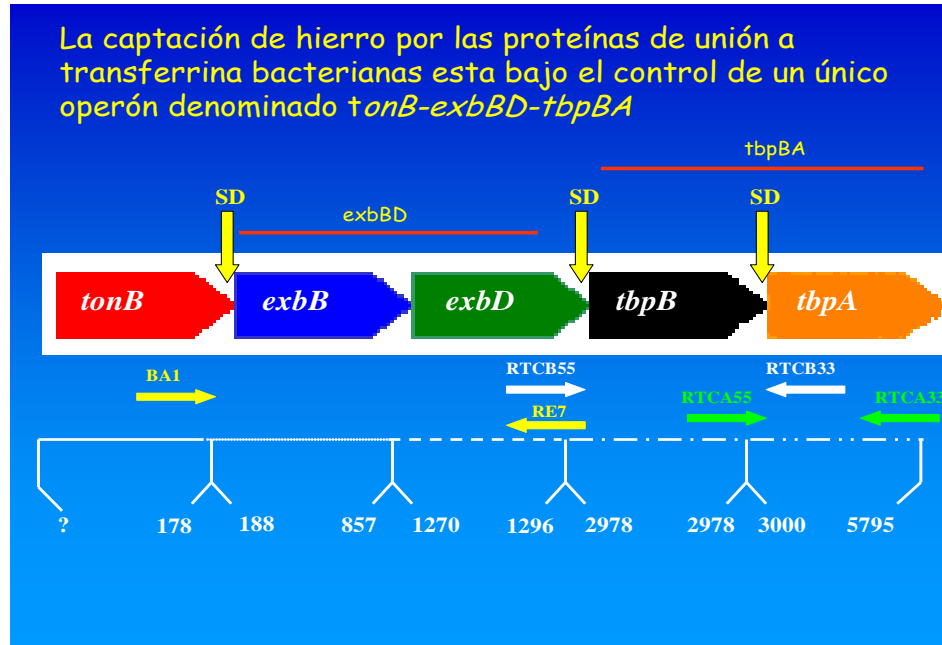


Figura 2. El operón *tonB* de *A. pleuropneumoniae* (Tonpitak *et al.*, 2000)

Además, se ha observado la incapacidad de ciertos mutantes $\Delta exbB$ de provocar la infección (Baltes *et al.*, 2001), lo cual pone a la vez de manifiesto la importancia capital del sistema Tbp de obtención de hierro para la virulencia de este microorganismo.

1.4.2.2. Sideróforos

Como se ha comentado antes, la síntesis de sideróforos es uno de los mecanismos de que disponen los patógenos para capturar hierro de su entorno.

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular con una elevada afinidad por hierro Fe^{+++} , que son secretadas al medio y son capaces de extraer las moléculas de este elemento presentes en las proteínas transportadoras del hospedador o en el medio ambiente. Una vez que han captado el hierro, son reconocidos por unos receptores específicos de la membrana bacteriana y, en la mayoría de los casos, penetran hacia el interior de la célula donde liberan la molécula de hierro. El sideróforo, tras este proceso, puede ser secretado otra vez al medio para la captura una nueva molécula de hierro. De este modo, los sideróforos actúan como agente quelantes de hierro (Ratledge y Dover, 2000). En la figura 3, se esquematiza el proceso de captación de hierro por parte de los sideróforos.

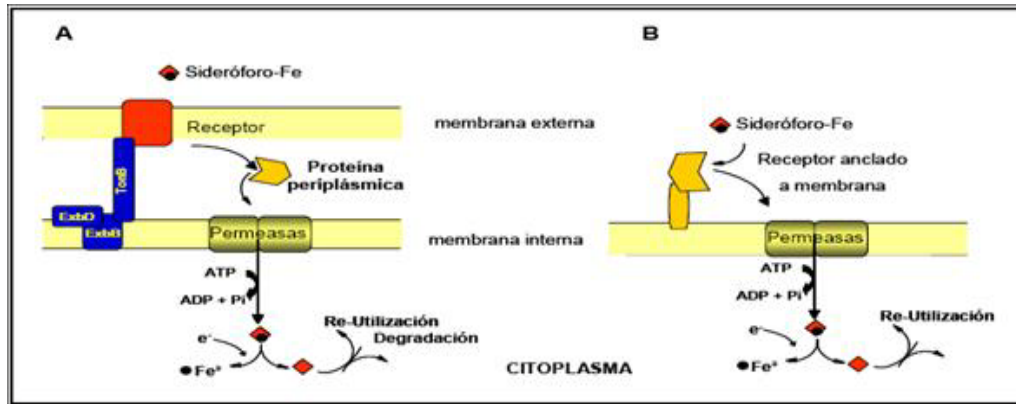


Figura 3. Esquema de la asimilación del hierro a través de los sideróforos en las bacterias Gram negativas (A) y Gram positivas (B) (Andrews *et al.*, 2003)

Aunque el empleo de sideróforos es la forma más extendida de captación de hierro, algunas bacterias patógenas recurren a las proteínas del hospedador (lactoferrina o transferrina), para las cuales poseen receptores inducibles (Cornelissen y Sparling, 1994).

Todos estos sistemas de captación y asimilación de hierro actúan frecuentemente como factores de virulencia en las bacterias patógenas, pues permiten superar o disminuir la deficiencia de hierro libre presente en el hospedador. La reducida disponibilidad de hierro constituye una señal para la expresión de determinantes de virulencia relacionados con su captación a partir de complejos de este elemento (cuadro 1) (Litwin y Calderwoo, 1993).

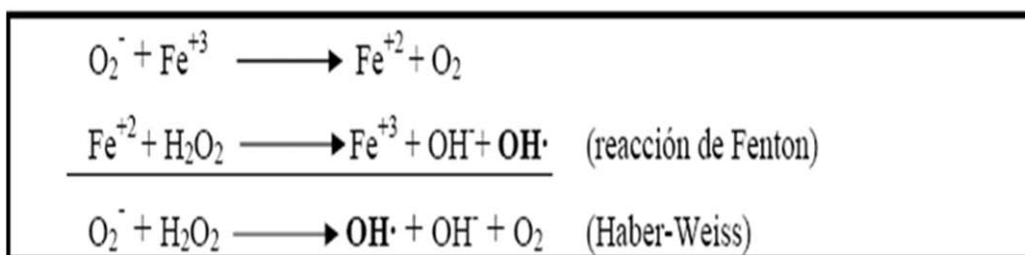
Organismo	Determinante de virulencia	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	aerobactina, toxina tipo Shiga, α -hemolisina	(DeBoy <i>et al.</i> , 1980; Opal <i>et al.</i> , 1990)
<i>Shigella dysenteriae</i> tipo 1	toxina Shiga	(Van Heyningen, 1953)
<i>Vibrio cholerae</i>	Proteínas de membrana externa (IrgA)	(Goldberg <i>et al.</i> , 1990a; Goldberg <i>et al.</i> , 1990b)
<i>Vibrio anguillarum</i>	Anguibactina	(Crosa, 1980)
<i>Yersinia</i> spp.	proteínas de membrana externa	(Carniel <i>et al.</i> , 1987)
<i>Neiseria gonorrhoeae</i>	proteína de unión a transferrina	(Genco <i>et al.</i> , 1991; Payne and Finkelstein, 1975)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	exotoxina A, elastasa, proteasa alcalina	(Bjorn <i>et al.</i> , 1978)
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	toxina diftérica	(Tai <i>et al.</i> , 1990)

Cuadro 1: Ejemplo diversos factores de virulencia regulados por el hierro en todos los casos por disponibilidad no reducida (Litwin y Calderwoo, 1993).

Introducción

El Fe^{+++} , una vez asimilado, es reducido a Fe^{++} en el citoplasma, de la bacteria, incorporándose a nuevas proteínas, como el grupo hemo o bajo la forma de especies mono o binucleares o asociaciones hierro-azufre. Alternativamente, se almacena en bacterioferritinas y ferritinas desde las que es liberado cuando se reduce la concentración intracelular del mismo. El almacenamiento evita además, su participación en reacciones de estrés oxidativo. En efecto, el oxígeno o las especies oxigenadas, producidas por el metabolismo oxidativo, reaccionan con el Fe^{++} generando radicales $\text{OH}\cdot$ responsables del daño a las proteínas, los lípidos y el ADN durante el estrés oxidativo (Touati, 2000).

En el caso de los sideróforos, una vez en el citoplasma, se produce la liberación del hierro por una reducción de Fe^{+++} a Fe^{++} catalizada por una ferri-sideróforo ferri-reductasa (Ratledge y Dover, 2000). La reacción global de este proceso sería:



Cuadro 2: Reacción de Haber-Weiss, en la cual el Fe^{++} cataliza la producción del radical $\text{OH}\cdot$ a partir de los radicales generados en el metabolismo oxidativo.

La molécula de Fe^{++} es soluble, se libera del sideróforo, pasa al citoplasma y se incorpora a las porfirinas o a las apoproteínas. Este proceso parece ser general, excepto en el caso de la enteroquelina de *E. coli*, que presenta un potencial redox demasiado bajo para utilizar el poder reductor del par NAD(P)H/NAD(P)^+ . En este caso, la liberación del ión de hierro implica la hidrólisis del sideróforo por la acción de una esterasa, produciéndose después la reducción de Fe^{+++} a Fe^{++} (Ratledge y Dover, 2000).

Los sideróforos no presentan especificidad de fuente de hierro, sino que un mismo sideróforo puede secuestrar el hierro de diferentes proteínas del hospedador como la transferrina, hemoglobina, hemopexina, etc. Se han descrito más de 500 sideróforos diferentes producidos tanto por bacterias como por levaduras y hongos filamentosos,

poniendo de manifiesto que esta estrategia para captar hierro del medio se encuentra ampliamente distribuida en los seres vivos a lo largo de la evolución (Ratledge y Dover, 2000).

Los genes implicados, tanto en la biosíntesis de sideróforos como en la de sus receptores, están regulados negativamente por el complejo formado por la proteína Fur y el Fe^{++} , de forma que en presencia de hierro, las regiones promotoras de dichos genes se encuentran bloqueadas y sólo se expresan en condiciones de privación de hierro. Así pues, debido a que la disponibilidad de hierro *in vivo* es escasa, la producción de sideróforos se inicia cuando el patógeno infecta un hospedador, permitiéndose la captura de hierro y el reciclaje de éstos, con lo que la necesidad de sintetizar nuevas moléculas desaparece y se inhibe la transcripción de los genes de biosíntesis.

Además de este control negativo, en algunos casos también parece tener lugar una regulación positiva que induce la síntesis de sideróforos, como sucede en *Vibrio anguillarum*, que, además de la proteína Fur, presenta dos activadores que controlan la síntesis del sideróforo anguibactina: AngR (*anguibactin system regulator*) y TAF (*transacting factor*); en cualquier caso, esta bacteria también posee un regulador negativo (un RNA antisentido) que interviene en esta regulación (Tolmasky *et al.*, 1994).

Aunque lo normal es que cada tipo de bacteria sintetice un tipo de sideróforo, algunas especies, como las del género *Pseudomonas*, pueden sintetizar más de un tipo (Ratledge y Dover, 2000). En *V. anguillarum*, los genes implicados en la síntesis y transporte de sideróforos están codificados en el plásmido pJM1 (Stork *et al.*, 2002). En los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia*, las células sintetizan también sideróforos intracelulares, además de extracelulares (de Voss *et al.*, 1999). Este fenómeno se debe probablemente a la gruesa capa lipofílica de sus membranas celulares, que dificulta el abastecimiento con rapidez, pues estas bacterias necesitan un almacenamiento de hierro intracelular que asegure la disponibilidad de hierro a corto plazo, ya que el paso de los sideróforos extracelulares y la consiguiente incorporación de hierro a través de la membrana celular resulta un proceso lento. Existen también casos, como en algunas de las especies de la familia *Enterobacteriaceae*, que pueden reconocer no solo los sideróforos

Introducción

propios, sino también los que sintetizan otros microorganismos, incluidos los de los hongos (Nelson *et al.*, 1992).

La estructura de los sideróforos, como ocurre con las rutas de biosíntesis, varía entre las distintas especies de bacterias, aún cuando se pueden establecer dos tipos generales según su estructura: los fenolatos, como la enterobactina de algunas especies de la familia *Enterobacteriaceae*, y los hidroxamatos, como la aerobactina de *E. coli* (Otto *et al.*, 1992).

Finalmente, la consideración de factor de virulencia de los sideróforos es variable según el tipo de bacterias. En algunos casos, los mutantes no atenúan su patogenicidad pero en otros, como *Y. pestis*, los mutantes deficientes en la síntesis de sideróforos presentan una reducción en su virulencia (Haag *et al.*, 1993).

1.4.3. Transporte de hierro al interior de la célula

Acoplados a los mecanismos de captación del hierro se encuentran los sistemas encargados de transportar el hierro al interior de la célula, teniendo lugar los siguientes procesos, para el caso de las bacterias Gram negativas.

Paso del hierro a través de la membrana externa

Una vez que las proteínas que transportan el hierro (sideróforos, transferrinas o hemoproteínas) se encuentran asociadas a los receptores de membrana externa, deben atravesarla para llegar al periplasma.

La translocación de estas moléculas es un proceso activo que necesita una fuerza motriz de protones aportada por el **sistema Ton** (Elkins *et al.*, 1998; Guerry *et al.*, 1997; Koebnik *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1996; Larsen *et al.*, 1999; Nicholson y Beall, 1999; Occhino *et al.*, 1998; Stojiljkovic y Srinivasan, 1997).

El sistema Ton está formado por tres proteínas: TonB, ExbB y ExbD, que interactúan con la membrana citoplasmática. La proteína TonB es periplasmática y se encuentra anclada en la membrana citoplasmática por su dominio hidrofóbico N-terminal, mientras contacta con los receptores de la membrana externa a través de su dominio C-terminal. Por el contrario, las proteínas ExbB y ExbD son integrales de la membrana

citoplasmática. La proteína ExbB presenta tres dominios transmembrana, mientras que su dominio N-terminal y un pequeño giro se encuentran en el periplasma. En referencia a ExbD, ésta se encuentra anclada a la membrana citoplasmática por su dominio N-terminal y el resto de la proteína se localiza en el periplasma (Braun y Kilmann, 1999).

Estudios *in vivo* demuestran que la relación de estas tres proteínas es de 1:7:2 para formar el complejo TonB-ExbB-ExbD (Higgs *et al.*, 2002). Se cree que **ExbB y ExbD** aprovechan el gradiente electroquímico de la membrana para producir un TonB “energético” que provoca un cambio conformacional en el receptor de la membrana externa, al que se encuentra unido mediante un fragmento de 7 aminoácidos hidrofóbicos denominado *TonB box* (Andrews *et al.*, 2003). Dicha energía es también aprovechada para el transporte de la vitamina B₁₂ al periplasma.

Transporte de hierro a través de la membrana citoplasmática

Sea cual sea el mecanismo de captación de hierro, su transporte a través de la membrana citoplasmática en bacterias Gram negativas, se realiza mediante un mecanismo de tipo ABC (ATP Binding Cassette) (Kóster, 2001).

El sistema ABC está formado por:

Proteínas periplasmáticas de unión al sustrato (PBT). Estas proteínas pueden ser solubles o encontrarse ancladas a la membrana citoplasmática en forma de lipoproteínas (como sucede en los Gram negativos).

Complejos de **Permeasas** transmembrana, formados por cuatro módulos, dos de ellos idénticos u homólogos a los de permeasas integrales de membrana y los otros dos son generalmente idénticos ente sí y se localizan en la cara interna de la membrana citoplasmática.

Las **ATP hidrolasa** o **ATPasas** que se sitúan en la cara interna de la membrana citoplasmática y se encargan de aportar la energía necesaria al sistema de transporte (Kóster, 2001).

Se pueden definir tres tipos de transportadores de hierro ABC:

A) Transportadores de sideróforos, grupo hemo y vitamina B12

Están muy conservados a lo largo de la evolución, ya que se encuentran en todas las bacterias y arqueobacterias, excepto en aquellos patógenos intracelulares cuyo metabolismo está muy ligado al metabolismo de su hospedador, como en el caso de los micoplasmas, y en aquellas bacterias que no necesitan hierro, como las bacterias del ácido láctico. El paso a través de la membrana citoplasmática es menos específico que la translocación a través de la membrana externa. El mejor transportador caracterizado es el sistema fhuBCD de *E. coli* que sirve de modelo para la familia que utiliza sideróforos (Köster, 2001).

El transporte de sideróforos y hierro a través de la membrana citoplasmática es mucho menos específico que su translocación a través de la membrana externa, ya que un mismo sistema es capaz de transportar a diferentes sustratos relacionados estructuralmente (Köster, 2001). Aunque no existen evidencias, es posible que en las bacterias Gram negativas, las proteínas de unión al sustrato interaccionen directamente con los receptores de membrana externa, facilitando así la liberación del ligando (Köster, 2001).

B) Transporte del ión férrico

El primer transportador de este tipo caracterizado, independiente de sideróforos, fue el sistema Sfu de *S. marcescens* (Angerer *et al.* 1990). Posteriormente, se han definido sistemas similares en *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* habiéndose identificado las proteínas FbpA, FbpB y FpC (Mietzner, *et al.* 1998). Estos transportadores median el paso de ión férrico adquirido de las transferrinas y lactoferrinas, que han sido transportadas hasta el periplasma, gracias a un receptor que depende del sistema TonB (Schryvers y Stojiljkovic, 1999; Vasil y Ochsner, 1999).

C) Transportadores de metales. Es el grupo de transportadores del tipo ABC que se ha descubierto más recientemente. Las proteínas de unión de este tipo de transportador fueron originalmente descritas como adhesinas y no requieren necesariamente receptores de la membrana externa o sideróforos. No todos los transportadores de este tipo están vinculados al transporte de hierro, sino que algunos de ellos presentan especificidad para otros iones metálicos como el zinc o el manganeso, que difunden libremente a través de la membrana externa (Köster, 2001).

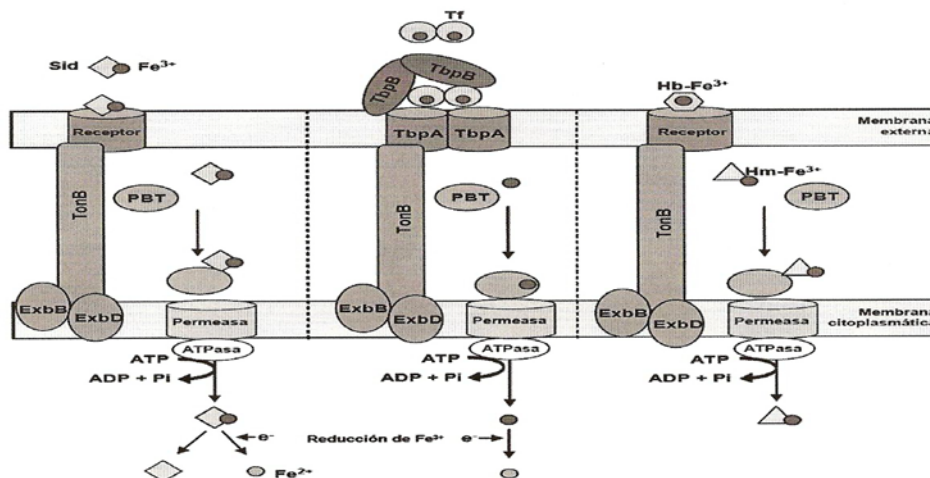


Figura 4. Representación de los distintos mecanismos de captación de hierro (esquema modificado de Retlidge y Dover, 2000 y Jacques y Mikael, 2002).

1.4.3.1. Almacenamiento de hierro en el interior de las bacterias

Una vez dentro del citoplasma, el hierro tiene distintos destinos. Un 5% forma parte de los citocromos, un 10% se encuentra en las proteínas de hierro y azufre, un 10% está secuestrado por las bacterioferritinas y hasta un 40% está unido a carbohidratos ácidos en forma de Fe^{++} (Clarke *et al.*, 2001).

La homeostasis del hierro en las bacterias se mantiene gracias a un flujo de este elemento desde las proteínas de almacenamiento al citoplasma y viceversa. Las principales proteínas de almacenamiento son las ferritinas (Raltledge y Dover, 2000), que cumplen una doble función, ya que por un lado son un almacén de hierro y por otro previenen de la toxicidad que puede acarrear niveles altos de éste y del daño por estrés oxidativo.

La síntesis de ferritina en *E. coli* está activada por la proteína Fur (Bereswill *et al.*, 2000), que de este modo controla no sólo la incorporación del hierro del medio, sino también su almacenamiento dentro de las células (Bereswill *et al.*, 2000).

1.4.3.2. Antigenicidad de las estructuras receptoras de hierro

Los antígenos que se expresan *in vivo* desempeñan un papel esencial en la protección heteróloga. Algunos autores consideran que la expresión de estos antígenos está inducida por la baja concentración de hierro en el hospedador; de este modo, las proteínas

Introducción

de membrana externa inducidas por la falta de hierro conferirían protección (Choi-Kim *et al.*, 1991).

Por otra parte, las proteínas receptoras de transferrina, lactoferrina, hemoglobina y hemina presentan una serie de características que las hacen buenas candidatas en la producción de vacunas. Entre ellas, se pueden citar su exposición en la membrana externa, un aumento de su síntesis durante el proceso infeccioso y que su neutralización por parte de los anticuerpos puede bloquear la captación de hierro, inhibiendo así el crecimiento de la bacteria dentro del hospedador.

Se ha descrito, el efecto protector de las proteínas receptoras de hierro frente a enfermedades que cursan con lesiones hemorrágicas como la pleuroneumonía porcina (Rossi Campos *et al.*, 1992; Danve *et al.*, 1993; Lissolo *et al.*, 1995), lo que ha incentivado su incorporación a bacterinas obtenidas a partir de microorganismos cultivados en condiciones de privación de hierro y por otro su purificación de vacunas conjugadas.

Bacterias inactivadas

Los diferentes estudios se basan en la inoculación de bacterias cultivadas en condiciones de privación de hierro o bien en la administración de extractos de cultivos obtenidos en condiciones de privación de hierro. Se ha descrito que los extractos de *M. haemolytica*, obtenidos por sonicación o por tratamiento con agentes químicos como el formol, cultivada en presencia del quelante de iones 2,2'-dipiridil (DP), inducen una buena protección frente a la infección producida por este microorganismo (Gilmour *et al.*, 1991).

Sin embargo, también se han publicado resultados, por ejemplo en el caso de bacterinas de *P. multocida* cultivadas en condiciones de privación de hierro, que no inducen inmunidad en pollos y pavos ni aún después de la inoculación de dos dosis (Wilson *et al.*, 1993) y contrariamente, los extractos de membrana externa de *P. multocida* cultivadas en presencia de DP si que inducen protección heteróloga frente a esta especie bacteriana (Ruffolo *et al.*, 1998).

A pesar de los buenos resultados obtenidos, estas aproximaciones presentan algunas limitaciones, como el elevado coste económico, las complicaciones que supone optimizar cultivos masivos en presencia de agentes quelantes (adaptación, menor rendimiento del

tanque de fermentación, etc.) y las alteraciones que se pueden producir en la estructura de los antígenos durante el proceso de obtención de los extractos.

Proteínas purificadas

Se han llevado a cabo numerosos estudios basados en la purificación de receptores de hierro, ya sea directamente a partir de cultivos del patógeno, o mediante la clonación del gen correspondiente y su posterior purificación tras su expresión de *E. coli*.

Así, se ha publicado que la inoculación en cerdos con dos dosis, de 25 µg cada una, de un receptor de transferrina de *A. pleuropneumoniae*, induce una buena respuesta humoral y confiere protección frente a un enfrentamiento homólogo (Rossi-Campos *et al.*, 1992). Además, los trabajos realizados con los receptores de transferrina (Tbps) de *N. meningitidis* han demostrado que el antisuero específico obtenido contra las Tbps de este microorganismo confiere protección pasiva en ratones. Este antisuero presenta actividad protectora no sólo frente a su cepa parental sino también frente a otras cepas. De la misma forma, la inoculación de Tbps purificadas en ratones incrementa su supervivencia frente a una infección con dicha bacteria (Danve *et al.*, 1993).

En la misma línea, los anticuerpos contra la proteína Tbp2 de *N. meningitidis* inhiben la captación de transferrina, disminuyendo el crecimiento de la cepa cuando crece con transferrina como única fuente de hierro, además de presentar capacidad protectora frente a su cepa parental (Lissolo *et al.*, 1995). Se ha determinado también que el extremo N-terminal de la proteína TbpB de *N. meningitidis* es suficiente para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes que reconocen el receptor TbpB de distintos serotipos (Rokbi *et al.*, 1997).

Aunque las dos proteínas que forman el receptor de transferrina son capaces, por separado, de inducir cierto grado de protección, parece que la TbpB es la más eficaz. A pesar de que la proteína TbpA de *N. meningitidis* induce una mejor protección heteróloga que la TbpB, los anticuerpos generados contra la TbpB presentan una mayor actividad protectora que los obtenidos contra la TbpA (West *et al.*, 2001). De la misma manera, el antisuero anti-TbpA de *M. catarrhalis* no muestra actividad bacteriana, mientras que sí que la presenta el antisuero anti-TbpB (Myers *et al.*, 1998).

Se han publicado también investigaciones con otros tipos de receptores de hierro. Así, en *M. catarrhalis*, las proteínas TbpB y LbpB son inmunógenas, mientras que no lo son la TbpA ni la LbpA (Yu *et al.*, 1999). Además, la proteína Fbp de *N. meningitidis* induce la producción de anticuerpos que reaccionan con distintas cepas de esta especie, aunque éstos no bloquean la incorporación de hierro ni activan el sistema del complemento frente a meningococos (Gómez *et al.*, 1996).

Los datos sobre la posible utilización de receptores de hemoglobina como inmunógenos son escasos. Solo está descrito que la inhibición de la captación de hemoglobina por anticuerpos contra la proteína Kgp de *P. gingivalis* induce protección en ratones (Kiboniwa *et al.*, 2001).

Esta segunda estrategia no presenta las limitaciones descritas en el apartado anterior y, por otro lado, el uso de sistemas de expresión permite que se puedan obtener cantidades suficientes de proteínas con fines vacunales. Sin embargo, también existen algunos inconvenientes, como los posibles cambios estructurales que pueden producirse en las proteínas seleccionadas, debido a la expresión de estos antígenos en un microorganismo distinto, lo que podría alterar sus propiedades inmunógenas.

1.4.4. Control de la expresión de los genes implicados en la captación de hierro

Típicamente, las bacterias regulan su metabolismo del hierro en respuesta a la disponibilidad del recurso. En *E. coli* y en otras bacterias esta regulación es a nivel transcripcional y se encuentra controlada por la proteína **Fur** (**F**erric **U**ptake **R**egulator) que es capaz de regular a gran cantidad de genes (Hantke, 2001; Hantke y Braun, 2000).

1.4.4.1. Mecanismo de acción

La proteína Fur es un homodímero formado por dos subunidades de 17 kDa. En presencia de hierro, la proteína Fur unida a él, actúa como represor de la transcripción, uniéndose a los promotores de los genes que regula. Por el contrario, en ausencia del hierro, la forma apo-Fur no puede unirse a los promotores y se producen altos niveles de expresión de los genes que se encuentran bajo su control (figura 5). los resultados *in vitro* indican que la proteína Fur puede ser activada por Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ y Cd²⁺ pero *in vivo* sólo por Mn²⁺, Fe²⁺ y Co²⁺ (Bagg y Neilands, 1987; Ochsner *et al.*, 1995).

Probablemente estos cationes divalentes se unirán en el mismo lugar que el cofactor Fe^{2+} . Las constantes de afinidad varían de 10 a $100\mu M$, dependiendo de la bibliografía.

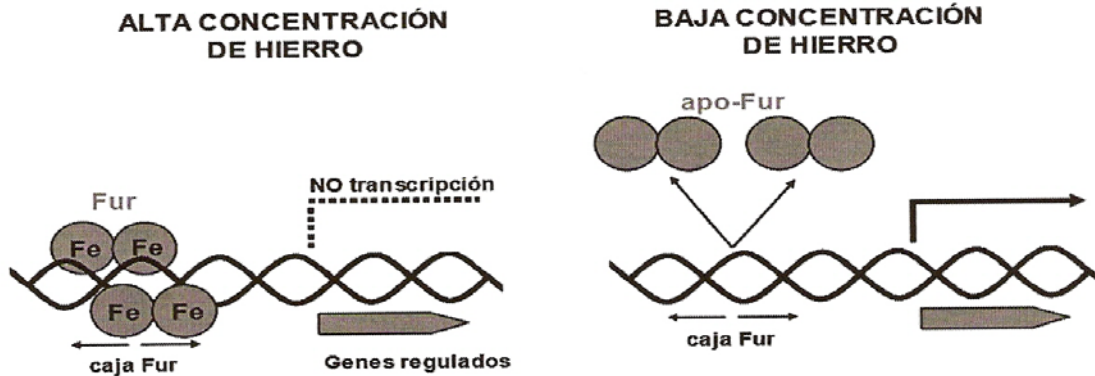


Figura 5. Mecanismo de acción de la proteína Fur. A altas concentraciones, el hierro se une a la proteína Fur y el complejo Fur-Fe a la caja Fur, reprimiendo así los genes que se encuentran bajo su control. Por lo contrario, a bajas concentraciones, la forma apo-Fur no puede unirse al DNA y se transcriben los genes que están bajo su control (esquema modificado de Andrews *et al.*, 2003).

Cada subunidad de la proteína Fur está formada por un dominio N-terminal, que se unirá al DNA entre los lugares -35 y -10 de los promotores de los genes regulados por Fur, y el dominio C-terminal, rico en histidinas, relacionado con la unión al cofactor (ión ferroso) y con la dimerización (Coy y Neilands, 1991; Stojiljkovic y Hantke, 1995). Cuando se une el metal a la proteína Fur, ésta sufre un cambio conformacional que permitirá la unión de su dominio N-terminal al DNA. Además, se ha descrito que la proteína Fur es una metaloproteína de zinc, ya que contiene un lugar de zinc esencial para su actividad (Jacquamet *et al.*, 1998).

Asimismo, se han estudiado los lugares específicos de unión a metales usando diferentes métodos espectroscópicos (Adrait *et al.*, 1999; Althaus *et al.*, 1999; Jacquamet *et al.*, 1998). La región relacionada con el reconocimiento del DNA se ha determinado mediante espectrometría de masa MALDI_TOF (Tiss *et al.*, 2005). Es la primera identificación de un residuo aminoacídico involucrado directamente en la interacción DNA-Fur. La secuencia aminoacídica que podría ser la responsable del reconocimiento del DNA es TXY (donde X es V o I) y ha sido identificada en la proteína Fur de *E. coli*, *P.*

Introducción

aeruginosa y *B. subtilis*, en la proteína Zur de *B. subtilis* y *E. coli* y en PerR de *B. subtilis*. Esta información sugiere un modelo conformacional de unión de la proteína Fur al DNA que podría ser semejante a la unión de otras proteínas tipo Fur como son Zur y PerR.

Se han descrito proteínas *Fur-like* en muchas bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, lo que sugiere que este mecanismo de regulación está muy generalizado en el mundo bacteriano. Además, la proteína Fur de *E. coli* reconoce las cajas Fur de otros microorganismos, incluso de Gram positivos, por lo que esta secuencia parece estar muy conservada en la escala evolutiva de las bacterias (Escolar *et al.*, 1999).

La proteína Fur está compuesta por dos dominios. El dominio amino terminal contiene sitios de unión de DNA *helix-turn-helix*, mientras que el dominio carboxi-terminal posee dos lugares de unión de metales, uno para el Fe^{++} y otro para el Zn^{++} ; y resulta importante para la dimerización (Hantke, 2001).

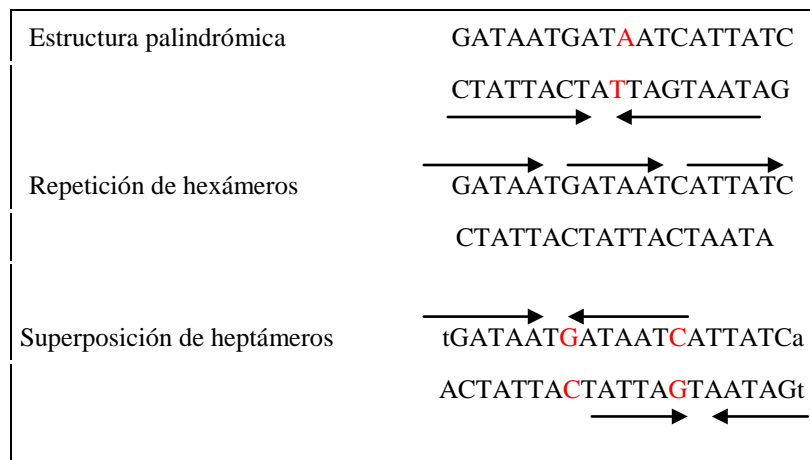
La regulación de la expresión del gen *fur* es muy compleja. Por un lado, la proteína Fur es autorregulable, pero además presenta un lugar de unión para la proteína CAP (receptor por catabolito), con lo que se liga su expresión al metabolismo general de la bacteria y además se encuentra regulado también por la respuesta al estrés oxidativo (Hantke, 2001). Sorprendentemente, en *Campylobacter jejuni*, el gen *fur* se expresa a partir de dos promotores, cuya expresión no está regulada por hierro (Van Vliet *et al.*, 2000).

1.4.4.2. La caja Fur

Se ha descrito que la unión del complejo Fur- Fe^{2+} al DNA tiene lugar en una secuencia palindrómica denominada **caja Fur**, presente en los promotores de los genes regulado por esta proteína entre los lugares -35 y -10 cuya secuencia era GATAATGATAATCATTATC (Lorenzo *et al.*, 1988).

Diferentes estudios, en los que se clonó esta secuencia frente a los genes no pertenecientes al regulón Fur, demostraron que su presencia daba lugar a que dichos genes pasaran a estar regulados por la proteína Fur (Stojiljkovic *et al.*, 1994). Así que, basándose en el patrón de interacción entre Fur y DNA, se ha establecido la caja Fur como una repetición de cómo mínimo tres copias del hexámero NATA/TAT en una u otra orientación (Escolar *et al.*, 1999). Posteriormente, se ha vuelto a revisar este concepto y, basándose en

estudios comparativos de las distintas regiones de DNA a las que se une la proteína Fur de *Bacillus subtilis*, se ha propuesto que la caja Fur está formada por dos secuencias superpuestas de heptámeros repetidos e invertidos (Baichoo y Helmann, 2002). En el cuadro 3, se comparan las distintas interpretaciones de la caja Fur.



Cuadro 3. Esquema de las distintas interpretaciones descritas acerca de la caja Fur.

1.4.4.3. Regulación y funciones

Inicialmente se creía que la proteína Fur únicamente regulaba genes implicados en la captación de hierro, pero posteriormente se ha observado que también regula la expresión de otros genes, por lo cual hoy en día se acepta que es un regulador general, pleiotrópico, que está implicado en la regulación de las siguientes funciones:

- Captación de hierro.
- Almacenaje del hierro en *E. coli* (Andrews, 1998).
- Producción de algunas toxinas y factores de patogenicidad; Colicinas, α -hemolisinas, y pectato liasas (Calderwood y Mekalanos, 1987; Poole y Braun, 1988; Ochsner *et al.*, 1995; Hirono *et al.*, 1997).
- Metabolismo general; Regulación de las biosíntesis de purinas (Stojiljkovic *et al.*, 1994), Reemplazamiento de la ferrodixina por la flavoroxina (Ghassemian and Straus, 1996).
- Motilidad bacteriana (Stojiljkovic *et al.*, 1994).
- Protección contra el estrés mediante la regulación de las defensas contra el estrés oxidativo y la respuesta al estrés ácido (Foster y Hall, 1992).

Aparte del mecanismo de regulación anteriormente mencionado, se sabe que el gen *pfr* que codifica la ferritina de *Helicobacter pylori*, puede ser regulado a través de una interacción directa con la proteína Fur (Delany *et al.*, 2001). Su expresión es reprimida por la forma no activa de la proteína Fur (apo-Fur) que se une al DNA bloqueando la expresión.

Además, se ha observado que, en algunos casos, la proteína Fur actúa como un regulador positivo (Niederhoffer *et al.*, 1990; Tsolis *et al.*, 1995; Gruer y Guest, 1994). Los genes regulados de este modo no contienen la caja Fur en sus regiones 5' y no está muy claro cuál es el mecanismo de dicha regulación. En *E. coli*, el gen más estudiado que también se induce de este modo es *sodB*, habiéndose demostrado que su inducción necesita un elemento en *cis* consistente en un palíndromo en la región +1 y una región adyacente rica en AT. Parece ser que este tipo de regulación se produce a nivel post-transcripcional, al menos parcialmente (Dubrac y Touati, 2000).

1.4.4.4. Mutantes *Fur*

La gran variedad de genes controlados por la proteína Fur sugiere que un defecto de esta proteína podría tener consecuencias graves para las células bacterianas. Además, se ha demostrado que la proteína Fur está implicada en la virulencia, regulando factores asociados a ella (Cooksley *et al.*, 2003; Litwin y Calderwood, 1993).

Un ejemplo bien conocido, son los mutantes Fur de *Actinobacillus pleuropneumoniae*, los cuales presentan una expresión constitutiva de las proteínas de unión a transferrina, deficiencias de crecimiento *in vitro*, y reducción de su virulencia en un modelo animal (Jacobsen *et al.*, 2005). Asimismo, mutantes Fur de *E. coli* (Touati *et al.*, 1995) son variables pero tienen deficiencias en su crecimiento en aerobiosis y presentan evidencias de daño en el DNA. Se sabe que aumenta la tasa de mutagénesis espontánea en presencia de oxígeno y que no pueden sobrevivir si se han eliminado los sistemas de recombinación (*recA* o *recB*), además de presentar un aumento de su sensibilidad al peróxido de hidrógeno. También se ha obtenido mutantes Fur de *S. enterica* serovariedad Typhimurium (Foster y Hall, 1992) y de *Pasteurella multocida* (Bosch *et al.*, 2001).

Por el contrario, los intentos para obtener mutantes fur no han dado fruto en *P. aeruginosa* ni en *Vibrio anguillarum* y tampoco se ha podido eliminar copias salvajes del gen *fur* en *Rhizobium leguminosarum* y en *Synechococcus* 7942, por lo cual parece que este

gen tendría un papel esencial en estas bacterias (Ghassemian y Stratus, 1996; de Luca *et al.*, 1998).

Los mutantes Fur presentan una expresión constitutiva de los genes implicados en la captación de hierro, no pueden crecer usando glicerol, succinato o fumarato como fuentes de carbono, y resultan más sensibles al estrés ácido que las cepas salvajes (Escolar *et al.*, 1999).

1.4.4.5. Otros reguladores

El tipo de regulación llevado a cabo por la proteína Fur puede ser aplicado a otros represores dependientes de metales. En esta línea, cabe destacar a la proteína **PerR** de *B. subtilis* (Bsat *et al.*, 1998) y a la proteína **Irr** de *Bradyrhizobium japonicum* (Hamza *et al.*, 1998).

La proteína PerR regula la expresión de las proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo en combinación con manganeso y hierro. Por otro lado, la proteína Irr controla la biosíntesis de hemo, cuyo producto participa en la ruta de biosíntesis de hemina, y coordina este mecanismo con la homeostasis del hierro. A diferencia de la proteína Fur, la proteína Irr es activa en carencia del hierro (Hamza *et al.*, 1998).

1.5. Mecanismos relacionados con la susceptibilidad o resistencia a la infección y a las enfermedades

Se ha definido la resistencia natural a la infección como la resultante de los efectos protectores combinados de barreras anatómicas y celulares, de mecanismos químicos efectores y de otros sistemas de distinta naturaleza, modificados y modulados por las condiciones particulares del individuo, desde el punto de vista nutricional, hormonal y genético; indirectamente, la resistencia natural supone la falta de susceptibilidad, es decir, que cuando no existe resistencia natural, se habla de susceptibilidad.

En la práctica, es preciso diferenciar, sin embargo, entre la susceptibilidad de un hospedador a una infección y la susceptibilidad a la enfermedad, y ambas varían de forma independiente. En relación con ello, y desde el punto de vista de los microorganismos, infecciosidad (infectividad) o transmisibilidad no son lo mismo que patogenicidad.

Introducción

La transmisibilidad depende de numerosos factores, como la extensión y difusión de los microorganismos a partir de los individuos infectados y/o enfermos, de su estabilidad (supervivencia y capacidad de multiplicación) en el medio ambiente y de la capacidad y facilidad para establecer la infección en nuevos hospedadores, etc., con la particularidad de que cada uno de estos aspectos son enormemente variables y dependen, a su vez, de la virulencia del microorganismo, de la vía de infección, de la dosis y de otros factores.

La patogenicidad de un microorganismo se identifica con su virulencia, aunque ésta es en términos estrictos una medida de la primera.

La virulencia se suele utilizar como sinónimo de infectividad o transmisibilidad, aunque, virulencia y patogenicidad refieren de forma conjunta la capacidad de causar daño y enfermedad, representando la primera una condición específica de cepa, dependiente de una serie de atributos, denominados factores de virulencia, relacionados con el hospedador al que producen daño, o del que le permiten “escapar” a sus defensas.

Factores genéticos de la susceptibilidad, dependientes del hospedador

Es sabido que diferentes especies animales reaccionan de distinto modo frente a un microorganismo patógeno y que, dentro de cada una, sus razas lo hacen también y aún dentro de ellas, cada individuo lo hace de forma diferente. En algunas enfermedades se ha definido ya un cierto mecanismo genético que se asocia a la susceptibilidad (Rodríguez Ferri, 2002).

El MHC (Complejo principal de histocompatibilidad) es, probablemente la agrupación de genes más polimórfica del genoma de los animales. Aunque el MHC desempeña un papel central en la defensa, otros muchos factores son también importantes y pueden ser genéticamente polimórficos, como sucede con el TNF (factor de necrosis tumoral).

La susceptibilidad a muchas infecciones víricas depende de la presencia de receptores específicos para virus en la superficie de las células hospedadoras, los cuales están determinados genéticamente. Las reacciones inmunes mediados por sus receptores son críticas en la patogénesis y control de una amplia variedad de infecciones causadas por bacterias, hongos, virus y protozoos.

Una alimentación insuficiente y desequilibrada, aumenta la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas y parasitarias, interfiriendo en los mecanismos que actúan como barreras defensivas frente a los patógenos. En teoría, están afectados todos los procesos corporales y las barreras físicas que protegen de la invasión microbiana.

Otros factores relacionados con la susceptibilidad a las infecciones son los factores químicos inespecíficos, que constituyen poderosos instrumentos de prevención de la infección y, por tanto, condicionantes de la susceptibilidad o resistencia a ella (Rodríguez Ferri, 2002). Se cuentan distintos compuestos como enzimas, proteínas, péptidos, ácidos grasos libres, el complemento sérico, etc., todos los cuales actúan tanto local como sistémicamente y complementan la acción de otros sistemas. Las moléculas fijadoras de hierro (receptores) representan también un importante condicionante de la susceptibilidad o resistencia, como hemos señalado anteriormente, pues el nivel de hierro en tejidos y líquidos es un factor limitante para la supervivencia y crecimiento microbiano.

La fagocitosis supone la ingestión y destrucción de los microorganismos, llevada a cabo por células especializadas denominadas fagocitos, principalmente PMN (neutrófilos) y macrófagos. Unos y otros reconocen a los microorganismos mediante distintos receptores que estimulan su migración al sitio de infección y promueven la fagocitosis. A través de los receptores reconocen péptidos cortos que contienen residuos de N-formilmetionil, lo que supone en la práctica, la capacidad para reconocer cualquier tipo de proteína bacteriana y la actividad microbicida mediada por el proceso denominado estallido respiratorio, que consiste en la capacidad de convertir el oxígeno molecular en una serie de compuestos o metabolitos de oxígeno, entre ellos el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), potentes microbicidas capaces de dañar moléculas orgánicas.

1.6. Respuesta inmune frente a *A. pleuropneumoniae*

El sistema inmune defiende al hospedador frente a la infección, y se compone de diversas células, órganos y tejidos. Las células del sistema inmune se originan en la médula ósea y luego migran a los tejidos circulando por la sangre y el sistema linfático.

La respuesta inmune, puede dividirse en dos tipos: La inmunidad **innata**, un mecanismo de defensa inespecífico que se activa de forma inmediata o en el plazo de unas

Introducción

pocas horas, tras la exposición al agente patógeno, que se considera la primera línea de defensa y utiliza principalmente macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos (fagocitos). Otra de las barreras importantes en la inmunidad innata son las proteínas de fase aguda, que son sintetizadas rápidamente en el hígado. La respuesta inmune **específica o adaptativa** es inducible y requiere la presencia de una serie de células que reaccionan específicamente con el antígeno inductor (los linfocitos), adecuadamente presentados por monocitos o células dendríticas. La memoria es una de las características principales de la respuesta, inmune específica. Los linfocitos reconocen y eliminan microorganismos patógenos o las células infectadas por estos por medio de proteínas denominadas anticuerpos, producidos y liberados por linfocitos B (respuesta humoral) o mediante mediadores de acción citocida producidos por los linfocitos T (respuesta celular); unos y otros se basan en la existencia de receptores específicos frente al antígeno. La inmunidad adquirida posee dos componentes principales: uno pasivo, que consiste en la transferencia de inmunoglobulinas de la madre al feto y al recién nacido, a través del calostro, y otro activo en el que participan las células B y T.

En *A. pleuropneumoniae* la respuesta humoral resulta fundamental, habiéndose demostrado correlación entre ella y el grado de protección frente a la infección. El perfil de la respuesta inmune humoral de los animales infectados por *A. pleuropneumoniae* presenta respuestas de inmunoglobulinas claramente definidas frente a la cápsula, el LPS (sobre todo el antígeno O), diversas OMPs y frente a las toxinas Apx. Se ha comprobado, además, la existencia de inmunidad pasiva mediante antisueros de convalecientes y por vía maternal (Bossé *et al.*, 1992; Oishi *et al.*, 1993; Chiers *et al.*, 2002). Los anticuerpos transferidos a través del calostro llegan a persistir hasta 9 semanas, aunque a partir de las 3 semanas de vida sus niveles disminuyen por debajo del umbral mínimo de protección (Nicolet, 1992), hecho que concordaría con la detección, por PCR, del antígeno de *A. pleuropneumoniae* a partir de las 4 semanas de vida, cuando esta técnica se aplica en explotaciones con infecciones endémicas (Chiers *et al.*, 2002).

El microorganismo penetra por las vías respiratorias superiores, pudiendo colonizar en primer lugar las tonsilas. Debido a que las mucosas son la primera vía de contacto con el microorganismo, el papel de las IgA en esta etapa inicial es importante. La presencia de

estas inmunoglobulinas en los fluidos nasales y broncoalveolares resulta básica para la opsonización y neutralización de la bacteria, antes de que ésta pueda alcanzar las vías respiratorias inferiores (Loftager y Eriksen, 1993). A las IgA les suceden las IgG, detectables en suero en estados más avanzados de la infección. Tras haber penetrado en las vías respiratorias, las bacterias se adhieren a la mucosa por acción combinada de las fimbrias, cápsula y LPS. Una vez en el pulmón, se adhieren a los macrófagos y producen las exotoxinas, que son tóxicas para los macrófagos, células endoteliales y epiteliales. La acción combinada de las exotoxinas y la protección conferida por la cápsula permite a *A. pleuropneumoniae* eludir la barrera leucocitaria.

Además del papel desempeñado por los anticuerpos, la infección provoca la secreción de numerosas citoquinas pro-inflamatorias, especialmente IL-1 e IL-8, que podrían ser importantes en la respuesta local en los alvéolos pulmonares. Aparecen al cabo de 2 horas después de iniciarse la infección y provocan la infiltración de neutrófilos y macrófagos, lo que puede contribuir a la formación de lesiones en el pulmón (Baarsch *et al.*, 1995). Como respuesta al estímulo de las endotoxinas se secretan también IL-1 y TNF- α , factores que generan hipertensión, fiebre y eventualmente contribuyen al shock séptico.

1.6.1. Respuesta innata. Fagocitosis, complemento y proteínas de la fase aguda

Dentro de los mecanismos de defensa innata, se incluyen la fagocitosis, mediada por macrófagos y neutrófilos; además, muestran también los receptores de patrones de reconocimiento (PRR), que se unen a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), como el receptor *Toll-like* 4 de reconocimiento de LPS y el sistema del complemento (activación por las vías clásica, alternativa y la vía de las lectinas). También, las citoquinas (TNF- α), los mediadores humorales (anticuerpos naturales) y las proteínas de fase aguda (proteína C reactiva), contribuyen igualmente a la respuesta temprana innata a la infección.

En el aparato respiratorio, en particular, una primera barrera física frente a la infección está representada por el propio epitelio, recubierto de cilios y mucus, capaces de retener y expulsar al exterior aerosoles que contengan microorganismos potencialmente patógenos.

Introducción

Una segunda barrera está representada por los macrófagos alveolares y otras células fagocíticas de la sangre, como monocitos y neutrófilos. Los fagocitos del sistema retículo-endotelial se activan rápidamente a través de sus receptores de patrones de reconocimiento, después de interactuar con los patrones moleculares asociados a patógenos, que sirven de puente de comunicación entre el sistema inmune innato y adaptativo.

La exposición natural del hospedador a los microorganismos comensales con los que convive, desencadena respuestas de tipo humoral representadas por los anticuerpos naturales, los cuales pueden reconocer epítomos compartidos con otros microorganismos patógenos, actuando como una barrera complementaria de la primera línea de defensa frente a la infección.

Macrófagos. Constituyen el sistema fagocítico mononuclear (SFM) y todos ellos poseen una morfología similar y función y origen comunes. Poseen un único núcleo redondo y fagocitan con rapidez y repetidamente. Además, procesan y presentan antígenos, liberan mediadores solubles que amplifican la respuesta inmune, controlan la inflamación, contribuyen a la reparación del daño tisular y asisten en el proceso de restauración. Están distribuidos por todo el organismo, en la sangre (inmaduros) reciben el nombre de monocitos y constituyen cerca de 5% de la población leucocitaria sanguínea total. En el tejido conectivo constituyen los histiocitos, células de Kupffer en el hígado, microglía en el cerebro o macrófagos alveolares en el pulmón, etc. Todos forman parte del SFM.

En el foco de infección los macrófagos son atraídos por los productos bacterianos y por los productos de reacciones inmunes, como el C5a y algunas citoquinas, así como por otros factores liberados por las células en las que se ha producido daño (fragmentos de colágeno, elastina y fibrinógeno). Algunos productos liberados por los neutrófilos, como la elastasa y colagenasa, son factores quimiotácticos para monocitos. Los macrófagos destruyen el antígeno a través de mecanismos oxidativos y no oxidativos. El estallido respiratorio es menos intenso que en el caso de los neutrófilos y en lugar de mieloperoxidasa contiene catalasa. También pueden producir óxido nítrico y otros metabolitos reactivos del nitrógeno.

Neutrófilos

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs), se caracterizan morfológicamente por un núcleo excéntrico multilobulado (dos o tres lóbulos), con la cromatina densa y agrupada, y por la presencia de un gran citoplasma pálido en el que se distinguen gránulos que varían desde el gris al rosa pálido. Los gránulos son de forma redonda u ovalada, y variables de tamaño.

Entre las principales funciones de los neutrófilos se encuentran la fagocitosis y la actividad microbiciada mediada por el estallido respiratorio, que consiste en la capacidad de convertir el oxígeno molecular en una serie de compuestos o metabolitos de oxígeno (ROS), entre los que más figuran el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), potentes microbicidas capaces de dañar moléculas orgánicas.

Otra de las funciones de los PMNs estriba en la mediación de la respuesta inflamatoria aguda. A partir del pronefros, los neutrófilos atraviesan los vasos y migran a los lugares de inflamación, en respuesta a estímulos quimioquinéticos, lo que provoca una depleción que se utiliza como marcador de infección.

El sistema del complemento

El sistema del complemento es uno de los sistemas efectores más eficaces de la defensa inmune frente a los microorganismos. Su activación, en cascada, se produce a través de la generación de enzimas complejas. Tal y como es de esperar en sistemas de activación de este tipo, la regulación de estos procesos es muy estricta, lo que restringe dicha activación a los focos donde se inició e impide el daño tisular que se podría generar. De las más de 30 proteínas distintas del complemento reconocidas hasta la fecha, el tercer componente del complemento, C3, es probablemente la más versátil con múltiples funciones.

En la activación del complemento se ponen en marcha una serie de reacciones consecutivas en cascada, de tal forma que a partir de cada una de ellas se genera un producto activo que además de permitir que la reacción consecutiva prosiga, puede desempeñar diferentes acciones biológicas importantes en la defensa del organismo. Esta activación tiene lugar a través de dos vías tradicionales: la clásica y la alternativa estando

Introducción

ambas interconectadas, de tal modo que confluyen en la generación de las enzimas multimoleculares responsables de la activación del tercer componente, el C3, denominadas convertasas del C3. La composición molecular de las convertasas del C3 de las dos vías es distinta, pero las proteínas que las integran son, homólogas. Esta confluencia lleva a la etapa final de activación de los componentes del sistema del complemento, la fase de ataque y a la generación de las lesiones de membrana (complejo C5 y C9) que producen poros en la membrana celular que causan una lisis celular o bacteriana.

Los mecanismos de activación incluyen 3 posibles comienzos. El primero de ellos, a través de una enzima activa, responde al hecho de que algunas enzimas que normalmente requieren ser activadas proteolíticamente, pueden adquirir actividad enzimática aún como precursores. A este tipo corresponde *la vía clásica*.

El segundo, mecanismo, denominado de relanti, responde a una activación, sin efectos visibles, pero que puede dispararse en determinadas circunstancias; aquí es donde se encuadra *la vía alternativa*. En el 3º, la presencia de enzimas exógenas al sistema del complemento, que pueden emular su acción, inician la activación; tal sucede cuando el sistema del complemento se activa, al activarse la cascada de coagulación.

Vía clásica: A su actuación se deben las primeras actividades descritas del sistema del complemento. Salvo excepciones, su activación requiere la presencia de anticuerpos, formando parte de los complejos inmunes formados por IgG o IgM, cuyo ejemplo más característico es el de los eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos específicos, así como por algunos virus, lipopolisacáridos y porinas de algunas bacterias Gram negativas, polianiones o la proteína C-reactiva.

El primer paso de la activación consiste en la unión de la proteína C1 al activador, haciéndolo a través de las cabezas del subcomponente C1q. Éstas se unen al dominio CH2 de la IgG o al CH4 de IgM, ambos en la región Fc. Para que la actividad tenga lugar, se requiere que estén involucradas al menos dos de las cabezas globulares. Tras la unión, C1r se activa, generando C1r, que hidroliza un enlace en C1s, dando como resultado final C1.

Los componentes: C1 es el primer componente del complemento. Es un complejo multimolecular formado por la asociación, dependiente de Ca^{++} , de los subcomponentes C1q, C1r y C1s, en la proporción 1:2:2. Estos subcomponentes constituyen dos entidades

diferenciales: C1q es responsable de la interacción con inmunocomplejos y activadores y C1r2-C1s2 es el portador de la actividad enzimática. C1q es una proteína con una estructura muy peculiar, tomando el aspecto de un ramo de seis tulipanes, cada uno formado por tres cadenas, A, B y C que tienen estructura colágena en los tallos. C1r2-C1s2 constituyen la subunidad catalítica de C1: ambos tienen actividad enzimática del tipo de las serín proteasas, y están presentes como zimógenos. C1r es capaz de activarse y activar C1s, siendo éste el que activa C4 y C2.

El **C4** es una glicoproteína sérica que consta de tres cadenas polipeptídicas, α , β y γ , unidas por enlaces disulfuro. Codificada dentro del sistema principal de histocompatibilidad (MHC), en el ser humano presenta dos isotipos C4A y C4B, codificados por dos genes próximos. Es el primer sustrato de C1 tras su activación. Aunque carece de actividad enzimática, presenta en su cadena α un enlace tioéster interno que tras la activación genera un carbonilo altamente reactivo, capaz de formar enlaces covalentes con superficiesceptoras, inmunocomplejos, membranas celulares, etc. Esta capacidad de unión covalente tiene una duración muy corta.

El **C2** es una glicoproteína que consta de una única cadena de unos 100 kDa de peso molecular. Es sustrato de C1, posterior a la activación de C4. Es una serín proteasa, homóloga al factor B de la vía alternativa, estando ambos genes fuertemente ligados dentro del MHC, y próximos al de C4. Igual que ocurre con el factor B, constituye un tipo de serín proteasa distinto y más complejo que la mayoría de los conocidos.

El **C3** es el tercer componente del sistema del complemento y está formado por dos cadenas polipeptídicas α y β , unidas por un puente disulfuro. Presenta homologías estructurales con C4, lo que incluye la presencia de un tioéster interno.

La vía alternativa se activa por una gran diversidad de estímulos, incluyendo inmunocomplejos, paredes de bacterias Gram-negativas o de levadura, algunos virus y los eritrocitos del conejo.

Los componentes: El **Factor D**, es una serín proteasa, presente en plasma como enzima activa y exhibe una alta especificidad por el sustrato (factor B). Tiene un peso molecular de 24 kDa y en su secuencia están incluidas las posiciones características de las serín proteasas.

Introducción

El **C3** es el elemento en el que confluyen las dos vías. En la alternativa desempeña un papel relevante, ya que es parte integrante de la convertasa de C3. El papel del enlace tioéster es doble en el proceso de activación.

El **Factor B** es el segundo integrante de la convertasa de C3. La molécula es estructuralmente semejante a C2, formando un nuevo tipo de serín proteasa y constituye el sustrato del factor D una vez que se ha unido, de forma no covalente, a C3b.

Igual que en la vía clásica, existen además proteínas reguladoras. Muchas de ellas son comunes en ambas vías, como es el caso del factor I, CRI, DAF y MCP. Existen, además, otras que son exclusivas de esta vía. La properdina es un potenciador de la vía alternativa (vía alternativa o de la properdina) constituyendo en ocasiones un requisito imprescindible para una activación eficaz. En el plasma está constituida por una mezcla heterogénea de oligómeros de monómero de 53 kDa. Estabiliza las convertasas del C3 y la C5 aumentando su vida media. Está presente en dos formas, nativa y activada, ésta última formada por complejos C3-P. El factor H es un cofactor del factor I en la inactivación de C3b, además de acelerar la degradación de las convertasas de C3 y C5 y competir con el factor B por su unión a C3b. Su unión a C3b se ve afectada por las estructuras presentes en la superficie a la que ésta se ha unido.

Esta vía también puede iniciarse con el aporte, producto de la vía clásica, de moléculas de C3b unidas a la superficie, lo que supone un incremento en la velocidad y eficacia de la vía alternativa. Por otra parte, el C4b puede servir de aceptor para la unión covalente de C3b, lo que, además de generar la convertasa del C5 de la vía clásica, produce un entorno protector a C3b frente a la acción del factor H, actuando así como superficie activadora. El efecto opuesto lo ejerce el C1q, del que se ha comprobado que actúa como inhibidor de la actividad de la vía alternativa.

La fase de ataque. Es la fase final de la activación del sistema del complemento, teniendo sentido cuando la activación es sobre células. La activación del C5, constituye el último paso enzimático de la cascada. A partir de su iniciación, solo habrá interacciones proteína-proteína y cambios conformacionales, que se caracterizan por ser transiciones hidrofílicas-anfifílicas, esto es, cambios que generan, a partir de proteínas solubles, formas

con capacidad de insertarse en las membranas lipídicas, produciendo finalmente lesiones en la membrana, denominadas MAC (complejo de ataque a la membrana).

Los componentes. El C5 es una glicoproteína sérica, similar a C4 y C3 y, como esta última, consta de dos cadenas unidas por puentes disulfuro. Tras su activación presenta un sitio de unión metaestable específico de C6 de una vida media de 2,3 minutos, aunque en este caso la interacción no es covalente, dado que C5 carece del enlace tioéster de C3 y C4. C6 y C7 son proteínas semejantes, y sus genes están fuertemente ligados. Presentan, además, cierto grado de homología con C8 y C9. El C8 está formado por tres cadenas polipeptídicas, de las que α y γ están unidas por puentes disulfuro y β por fuerzas no covalentes, estando esta última codificada por un gen diferente. Por último, C9 es la proteína que forma la estructura cilíndrica que atraviesa la membrana lipídica y que constituye las lesiones propias del MAC. Estructuralmente es homóloga a la perforina, la proteína de células T citotóxicas implicada en la lisis de las células diana.

Factores anticomplementarios: El veneno de cobra

Cada especie de serpiente, produce un veneno único, con diversos componentes y cantidades de compuestos tóxicos y no tóxicos. Es probable que a lo largo del tiempo los venenos y los mecanismos de activación se hayan desarrollado varias veces, aumentando así su la diversidad química.

Los venenos se pueden dividir en varias categorías: La primera de ellas comprende las cardiotoxinas, que son los venenos generalizados de la membrana celular, que producen despolarización irreversible de la célula. Y que son causa de arritmia, hipotensión y muerte. El segundo grupo incluye las toxinas que activan el complemento por la vía alternativa (secuencia C3-C9). Por último se incluyen, toxinas de carácter enzimático como la fosfolipasa A₂ (de toxicidad variable), la hialuronidasa (que facilita la dispersión tisular de otras toxinas), la L - oxidasa y la acetilhidrolasa (que actúa sobre la acetilcolina, de toxicidad desconocida). En la cobra Rey, se encuentran otras enzimas proteolíticas.

Introducción

El ratón es tradicionalmente, el modelo al que se refieren desde el punto de vista tóxico la potencia y eficacia de los venenos de serpientes. Como además a esta especie se refieren también la capacidad patógena de las toxinas bacterianas y las toxinas químicas, se considera la especie animal de mayor utilidad como elemento de referencia. En el caso particular del veneno de cobra, dependiendo de la especie de origen, la capacidad letal en ratones, se recoge en el cuadro 3.

Veneno de Cobra	Dosis Letal (DL 50)
Cobra Naja de Filipinas (<i>philippinensis</i>)	0,29 mg/kg.
Cobra Naja de la India	0,14 mg/kg.
Cobra haje de Naja (egipcia)	1,75 mg/kg.,
Cobra del Rey	1,73 mg/kg.,
Cobra <i>los nigricollis de Naja</i> (cuello negro)	3,05 mg/kg.

Cuadro 4. Diferentes especies de serpientes y su DL50 (dosis letal 50) en ratones.

La química de los venenos de la serpiente es complicada. Están constituidos por lo menos en un 90% por proteína (del peso seco), la mayoría de las cuales son enzimas. A partir de los venenos de serpientes se han identificado cerca de veinticinco enzimas de las que al menos diez, se encuentran en la mayoría de los venenos de cobra. Los tipos mas comunes incluyen fosfolipasas y hialuronidasas proteolíticas. Las fosfolipasas, varían desde las débilmente tóxicas hasta otras altamente destructivas del tejido muscular y nervioso. La hialuronidasa disuelven la materia intercelular y facilita la difusión del veneno a través de los tejidos de la presa. La colagenasa provoca la degradacion del colágeno, un componente estructural dominante del tejido conectivo. La ribonucleasa, desoxirribonucleasa, nucleasas, aminoácido-oxidasas, lactato deshidrogenasa y las fosfatasas ácidas y alcalinas, interrumpen la función celular normal, causando el bloqueo del metabolismo de la célula, shock y la muerte.

Además de enzimas tóxicas, en el veneno de serpiente también se encuentran polipéptidos, glicoproteínas, y compuestos de bajo peso molecular, aunque su función es en gran parte desconocido.

Capacidad anticomplementaria del veneno de cobra

La presencia de un tercer componente del complemento fue postulada en 1912 por H. Ritz, quien observó que la adición de veneno de cobra destruía la actividad bactericida del suero, que se recobraba cuando se le añadía suero fresco. Como quiera que los componentes C'1 y C'2 habían sido inactivados por el calor, **Ritz** concluyó que en el suero debía existir un tercer componente, estable al calor pero sensible al veneno de cobra, al que, finalmente denominó C3. Posteriormente se demostraría que el C'3 también podía ser eliminado del suero mediante el tratamiento con levaduras. Especialmente potente resulta el factor anticomplementario (CVF) aislado del veneno de la cobra Kaouthia de Naja, purificado mediante cromatografía en columna.

Una sola dosis de 0.1 mg/kg de CVF inoculado por vía intravenosa a la rata, produce la caída total de la actividad del complemento durante casi 5 días. Dosis de 0.02 mg/kg de CVF, reducen la actividad del complemento de ratas en más del 96.5% en un tiempo de 6 horas.

Proteínas de fase aguda

Constituyen un conjunto de proteínas sintetizadas en el hígado y secretadas, como respuesta de la infección, en particular bajo la influencia de citoquinas como IL-1, TNF- α y especialmente de IL-6. La respuesta de fase aguda comienza entre 6 y 8 horas después de iniciarse la reacción inflamatoria y después de la infección y se mantiene llegando a un pico en sus niveles tras 3 - 6 días (ordinariamente hasta las 48 horas post-infección) (Jain. N.C., 1989)

En el Cuadro 5, recogen algunos tipos principales de proteínas de fase aguda producidas por las diferentes especies, de las que la proteína C-reactiva (CRP) es la más importante en la mayoría, de ellas.

Introducción

Especie	PFA Principales (Aumentos > de 1000)	PFA Moderadas (Aumentos de 2–3 veces)
Hombre	CRP, SAA	AGP, Haptoglobina
Bovino	Haptoglobina, SAA	AGP, α 1- antitipsina
Porcino	CRP, pig – MAP	Haptoglobina
Équidos	SAA	CRP, Fibrinógeno
Perro	CRP	Haptoglobina

Cuadro 5. Proteínas de fase aguda en diferentes especies.

Estas, se unen a linfocitos activados invadiendo microorganismos y produciendo daño tisular, lo que origina la activación del complemento; además tienen carácter de opsonina y se une a los neutrófilos a través de los receptores para el fragmento Fc induciendo la fagocitosis y eliminación de los tejidos dañados y de los microorganismos. También posee carácter antiinflamatorio, ya que inhibe la producción de superóxido y la degradación de los neutrófilos.

La proteína amiloide del suero A (SSA) es especialmente importante en el ganado bovino, perros, caballos y en el hombre. Es una proteína inmunosupresora y parece que posee carácter inmunoregulator, además ataca neutrófilos, monocitos y células T. En los roedores, la principal proteína amiloide es la proteína P (SAP), relacionada con la proteína C-reactiva y que, igual que ella, puede unir constituyentes nucleares tales como DNA, cromatina e histonas. También puede unirse al componente C1q del complemento y activarlo.

En el cerdo, se ha estudiado *in vitro* el efecto de las citocinas IL-6, IL-1 y TNF - ∞ sobre la producción de HPT, pig MAP y albúmina por los hepatocitos. Por lo que se refiere a las dos primeras proteínas, solo se observó el efecto de la IL-6, que actúa como inductora, especialmente a dosis elevadas. Así, la expresión del mRNA de la pig MAP en los hepatocitos se detecta a las 6 horas post-inducción, con niveles máximos a las 24 horas, momento en el que se pone de manifiesto su presencia en el medio de cultivo, con una concentración que va incrementándose y a las 48 horas es el doble de la inicial. Con respecto a la HPT, a las 24 horas se observa un notable incremento de su expresión en los

hepatocitos, y su concentración en el medio es casi dos veces superior, alcanzando valores todavía más altos a las 48 horas. En el caso de la albúmina, las tres citocinas inducen un descenso en su secreción, más notable y duradero en el caso de la IL-1 y el TNF- α (González-Ramón *et al.*, 2000). El LPS ejerce una acción inductora sobre la pig MAP, similar a la observada con la IL-6 (González-Ramón., 2000).

En general, el desarrollo de la respuesta de la fase aguda está relacionada con la gravedad del proceso inflamatorio y la extensión de la enfermedad. La cinética de inducción es variable entre las distintas proteínas aunque la rapidez y la magnitud del cambio suelen ir parejas. La pig MAP presente el incremento relativo más acusado: aumenta entre 20 y 30 veces para volver a alcanzar valores basales 10 ó 15 días después de iniciarse el proceso. La HPT aumenta entre 5 y 10 veces y 8 -15 días después, vuelve a presentar valores normales. La CRP se incrementa hasta 12 veces y sus valores se normalizan más rápidamente que en el caso de las anteriores. Finalmente, el amiloide sérico presenta un aumento menos notable en los primeros días y a partir del 5^o, comienza a normalizarse (Heegaard *et al.*, 1998). Respecto de las proteínas de fase aguda negativa, la apoA-I disminuye de 2 a 3 veces en infecciones bacterianas, los valores mínimos se alcanzan a los 2 o 3 días y su respuesta puede persistir hasta 13 y 15 días (Carpintero *et al.*, 2005).

Las funciones de estas proteínas no están muy claras pero se ha descrito el aumento de la presión osmótica de la sangre, la defensa inmunológica del organismo frente a sustancias extrañas, el transporte de sustancias liposolubles y la homeostasis. En el caso de la CRP, se ha señalado que participa en la activación del complemento y en la inducción de la acumulación de neutrófilos y macrófagos en las zonas dañadas. La pig MAP se podría considerar que pertenece a la familia del inhibidor de proteasas plasmático. Su actividad podría estar relacionada con la regulación y modulación de la migración y proliferación celular (González-Ramón *et al.*, 1997; Piñeiro, 1999); también se ha considerado una proteína antiinflamatoria porque inhibe la polimerización de la actina y fagocitosis de PMN. Existe una asociación estadística entre el aumento de pig MAP y de HPT, con el aumento de células rojas en sangre, de la IL-10 en el timo y con la disminución del hierro libre en sangre (Segalés *et al.*, 2004).

1.6.2. Respuesta humoral

La respuesta humoral se caracteriza por la interacción entre los antígenos que se encuentran en el espacio extracelular y los anticuerpos, proceso que se lleva a cabo después de la cooperación entre los linfocitos Th y linfocitos B para la activación y diferenciación de éstos últimos. Sin embargo, la respuesta de tipo humoral puede ser independiente de los linfocitos Th interaccionando directamente la células B con los antígenos. Una vez activadas, las células B se convertirán en células productoras de anticuerpos o bien en células de memoria que permanecerán en el organismo durante un largo período de tiempo. En este tipo de respuesta, se produce un predominio de la respuesta Th2 y la activación y proliferación de diversas células.

En la inmunidad frente a patógenos, los anticuerpos pueden actuar por tres vías. Se puede producir la unión de estos anticuerpos a los patógenos para prevenir la infección de las células, realizándose así la neutralización del agente. Por otra parte, este recubrimiento de los microorganismos por parte de los anticuerpos produce su opsonización para ser así reconocidos por los receptores Fc específicos de las células fagocíticas, incrementándose considerablemente el proceso de la fagocitosis. Alternativamente, los anticuerpos unidos a los patógenos pueden activar las proteínas del sistema de complemento, para incrementar la opsonización y la lisis de algunas bacterias.

1.6.3. Respuesta Celular.

La respuesta inmune de tipo celular cubre una importante función como mecanismo inmunológico de defensa, actuando principalmente frente a bacterias y virus, así como evitando la aparición y desarrollo de células tumorales.

La respuesta inmune de tipo celular es compleja en sus efectos y acciones finales, así como en su iniciación y desarrollo. En ella participan esencialmente los linfocitos T colaboradores y citotóxicos. Tal como se ha dicho anteriormente, los linfocitos reconocen el antígeno mediante el receptor T (TcR) y lo hacen solo cuando el antígeno es degradado y procesado en el interior de las células presentadoras de antígeno (APC) y sus determinantes antigénicos son expuestos en la superficie de estas células en el seno de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad.

Las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) son una serie de glicoproteínas presentes en las membranas de todas las células nucleadas, entre las que se encuentran las células inmunocompetentes. Estas moléculas son esencialmente de dos tipos o clases, clase I y clase II y tienen entre otras funciones las de presentar el antígeno a los linfocitos así como participar en el proceso de maduración de los linfocitos en el timo.

Las células presentadoras de antígeno tienen como misión captar, procesar y presentar el antígeno a los linfocitos T. El reconocimiento del antígeno por las células T exige que previamente sea procesado proteolíticamente en el interior de las células presentadoras de antígeno. Aunque existen excepciones, la separación de las funciones de los linfocitos T colaboradores CD4+ y CD8+ viene dada por el origen de los antígenos que reconocen y, en último término, por donde han sido procesados por vía exógena en el sistema endosomal de las células presentadoras de antígeno y expresados en superficie por el producto de los genes MHC de clase II. Los linfocitos citotóxicos CD8+ reconocen a los antígenos que han sido procesados endógenamente en el citotóxicos de la célula infectada y presentados en superficie por moléculas MHC de clase I, mientras que los linfocitos CD4+ interactúan con el antígeno en el contexto de moléculas de clase II.

Este fenómeno se conoce como restricción por el MHC, es decir, que el TcR que reconoce específicamente el antígeno ha de encontrarlo presentado en el contacto de moléculas MHC propias. En el proceso de reconocimiento e interacción de una célula con otra intervienen, además, toda una serie de moléculas llamadas moléculas accesorias que se encuentran bien en la superficie de los linfocitos T o en las células presentadoras de antígeno. Estas moléculas interactúan entre sí o con otros ligandos reforzando la unión entre el receptor de las células T y el complejo MHC-péptido e incrementando así la adherencia intercelular y su afinidad.

Cuando tiene lugar el reconocimiento antigénico entre el TcR y la molécula MHC que porta el antígeno, se desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en el citoplasma de la célula T, dando así lugar al proceso de activación, proliferación y diferenciación celular. Estos mecanismos implican la participación de una serie de sustancias intracitoplasmáticas, conocidas como segundos mensajeros, que son ciertas sustancias de carácter lipídico y proteínas que adquieren su carácter funcional al

Introducción

fosforilizarse esencialmente en los aminoácidos serina y treonina. Como consecuencia de estos eventos se predecirá finalmente la activación de la transcripción de los genes implicados en la síntesis de la proteína y factor implicado en una determinada función, tal como la síntesis de interleucina 2 u otros factores.

La consecuencia final de este tipo de respuesta es la formación de células Th activas productoras de interleucinas y células citotóxicas (CTL) que poseen capacidad de lisar a las células que portan el antígeno que indujo su activación. Este tipo de respuesta requiere varios días para su desarrollo. Ante, por ejemplo, un contagio viral, la acción del interferón y de las células NK antecede al de las células CTL.

1.7. Modelos de infección en pleuroneumonía porcina.

Desde los primeros tiempos de la Microbiología, el uso de animales de laboratorio ha representado una alternativa muy importante para el estudio experimental de las enfermedades producidas por microorganismos, con el fin de abordar el conocimiento de cuestiones relativas a la virulencia, inmunidad, diagnóstico o mantenimiento del agente etiológico, cualquiera que sea su naturaleza (bacterias o virus, por ejemplo). Proporcionándonos datos muy importantes, cabe aclarar que el avance en el conocimiento de las enfermedades, el desarrollo de revolucionarias técnicas quirúrgicas y la puesta en el mercado de nuevos medicamentos, son hechos que han estado vinculados íntimamente al servicio que prestan este tipo de animales, debido a que sus constantes fisiológicas resultan similares a las del hombre.

Pese a la necesaria restricción en el uso de animales con fines experimentales, a fecha de hoy éstos son todavía imprescindibles en los estudios de patogenicidad microbiana. En cualquier caso, su utilización debe llevarse a cabo manteniendo las condiciones que eviten sufrimientos innecesarios. La utilidad de estos modelos se justifica en razones como el bajo coste de adquisición y mantenimiento, los ciclos de vida cortos, la posibilidad de disponer de líneas homogéneas, la susceptibilidad a un gran número de agentes y en último término, la posible extrapolación de los resultados obtenidos (con las debidas correcciones) al hospedador natural (Smith, 1987).

Como consecuencia de los inconvenientes que presenta la investigación con el hospedador natural (necesidad de instalaciones costosas, mantenimiento, personal, etc.) el modelo murino se ha utilizado frecuentemente como una alternativa experimental de primer nivel, en particular en los estudios de inmunidad y virulencia de *A. pleuropneumoniae*. La mayoría de los investigadores ha concluido, sin embargo que la susceptibilidad de este animal a la infección por *A. pleuropneumoniae* depende de la cepa o línea de ratón utilizadas y que este animal representa un modelo adecuado para el estudio de la fase aguda de la enfermedad, aunque no para la evaluación del proceso en su conjunto (Sebunya y Sanders, 1982, Fenwik *et al.*, 1986; Udeze *et al.*, 1987; Inzana *et al.*, 1988; Gomal, y Mittal, 1990; Rosendal y Macinnes, 1990 y Tascón., 1995). Como ejemplo de cuanto señalamos, en algunas líneas murinas, como con los ratones ddY, que ha resultado imposible ejecutar la infección experimental con *A. pleuropneumoniae* (Nakai *et al.*, 1984).

Después de la infección con una cepa virulenta de *A. pleuropneumoniae*, las muertes suelen producirse en las primeras horas después de la inoculación (generalmente, hasta las 24 horas), por lo que parece que éstas tienen lugar como consecuencia de la acción de las toxinas de la bacteria, pero sin la persistencia duradera del microorganismo ni su multiplicación, circunstancias ambas que inducen la enfermedad en el hospedador natural (Finlay y Falkow, 1989; Tascón., 1995). A este respecto, se ha demostrado que la toxina Apx-I de *A. pleuropneumoniae* representa el factor fundamental sobre el que descansa la patogenicidad de esta bacteria en el ratón, toda vez que las cepas pertenecientes a los serotipos productores de esta toxina (serotipos 1, 5, 9, 10 y 11) resultan mucho más virulentas que las que carecen de ella (Tascón *et al.* 1994; Tascón 1995).

En diferentes estudios se ha intentado mejorar la sensibilidad del modelo murino, en relación con la captación de hierro, recurriendo a diversas estrategias, entre ellas, la inoculación de mesilato de desferoxamina B (Desferin[®]). Este producto, un sideróforo microbiano de la familia de los hidroxamatos, se emplea con fines terapéuticos en pacientes con sobrecarga de hierro, a consecuencia de transfusiones masivas o debido a envenenamientos. Su efecto varía en función de la capacidad de la bacteria por utilizar la forma férrica (desferoxamina) como factor de crecimiento. Si la especie en cuestión carece de receptores para la desferoxamina, esta sustancia ejerce un efecto terapéutico al

Introducción

secuestrar el hierro, como sucede en *N. meningitidis* (Calver *et al.*, 1979) o en *N. gonorrhoeae* (Finkelstein y Yancey, 1981); en caso contrario, sin embargo, se producirá una estimulación de la multiplicación bacteriana, como ocurre con *Salmonella Typhimurium* (Jones *et al.*, 1977) o con *Y. enterocolitica* (Robins-Browne y Prpic, 1985). También se ha utilizado el hierro-dextrano, que, inoculado por vía parenteral, puede ejercer un efecto favorecedor de la infección, puesto que representa un suministro directo de hierro en aquellos microorganismos que pueden utilizarlo en esta forma, al determinar el mantenimiento del nivel orgánico de transferrina o al provocar una inmunosupresión en el hospedador tratado.

Ambos productos han sido probados sobre el ratón, en relación con la infección por *A. pleuropneumoniae*, pero con ninguno de ellos se obtuvieron mejoras sustanciales en el progreso de la infección, de modo que las muertes seguían sucediendo durante las primeras 24 horas siguientes a la inoculación. Únicamente, la administración de hierro dextrano consiguió rebajar ligeramente la DL₅₀ de las cepas estudiadas y, en algún caso, *A. pleuropneumoniae* fue capaz de sobrevivir durante 48 horas (Tascón *et al.*, 1994; Tascón 1995).

1.8. Vacunas y vacunación.

A partir de la demostración de la importancia que reviste la respuesta humoral en la protección frente a la infección, se han sucedido numerosos intentos de formular un compuesto vacunal capaz de inducir una respuesta protectora eficaz frente a la pleuroneumonía porcina; no obstante, no se han logrado desarrollar hasta el momento métodos eficaces que induzcan una protección total. Las vacunas diseñadas hasta la fecha sólo proporcionan una protección limitada, disminuyendo o eliminando la mortalidad y reduciendo la aparición de lesiones. Sin embargo, no impiden la infección y su utilidad se ve reducida frente a serotipos heterólogos.

Se han utilizado diferentes estrategias en los numerosos intentos de formular compuestos vacunales. Pudiendo diferenciarse tres tipos de vacunas: las bacterinas, las vacunas de subunidades y vacunas que utilizan cepas atenuadas.

Las bacterinas se preparan a partir del microorganismo completo, inactivados por calor (a 60°C, 2 h) o formol (formaldehído, 0,2%). La vacunación mediante bacterinas reduce y, en ocasiones, elimina completamente la mortalidad provocada por la infección con serotipos homólogos, pero generalmente no confiere protección heteróloga (Bossé *et al.*, 1992). Además, no impiden el desarrollo de lesiones pulmonares ni la colonización microbiana (Loftager y Eriksen 1993). Una posible explicación de esta protección limitada sería la ausencia de los factores de virulencia secretados, como las citolisinas y hemolisinas, así como de ciertas proteínas de membrana externa, que no se expresarían *in vivo* (Fedorka-Cray *et al.*, 1990). La reducida protección puede también ser el resultado de la desaparición de epítomos, desnaturalizados como consecuencia del tratamiento previo con formalina, hipótesis que parece confirmarse por la obtención de una mejor protección utilizando bacterinas mejoradas, consistentes en estructuras externas de *A. pleuropneumoniae* obtenidas por lisis de la bacteria que no requieren ningún tratamiento que pueda desnaturalizar los antígenos (Hensel *et al.*, 2000) e incluso sustituyendo el formol por otro inactivante menos agresivo, como el timerosal (Turrado *et al.*, 2006, datos sin publicar). Debe considerarse también la posibilidad de que la protección escasa pueda deberse a la presencia de ciertos antígenos que disminuyen la eficacia de otros en la vacunación, en una especie de efecto antagónico (Van den Bosch y Frey, 2003).

La alternativa a la vacunación con bacterinas puede ser el uso de toxinas Apx y de ciertas proteínas de membrana externa, especialmente las proteínas de unión a transferrina, bien como vacunas de subunidades o como complementos en la formulación de las bacterinas.

Este tipo de vacunas confiere una mejor protección cruzada y es capaz de disminuir los síntomas clínicos y mejorar la condición de los animales (Haesebrouck *et al.*, 1997; Haag *et al.*, 1997). También se ha conseguido una protección cruzada mediante la inactivación del operón de la toxina Apx-II por mutagénesis (Prideaux *et al.*, 1999). Aunque estas proteínas son esenciales como componentes de una vacuna, no son las únicas responsables de conferir inmunidad. Las vacunas basadas en las Apx solo confieren una protección clínica parcial, siempre que la dosis de desafío no sea muy elevada (Chiers *et al.*, 1998). Uno de los factores que podría responder a este problema sería el papel que

Introducción

desempeña la adhesión de la bacteria a las células epiteliales de los bronquiolos terminales y los alvéolos. Esta estrecha unión permitiría liberar las toxinas directamente sobre la superficie de la membrana celular, lo que originaría su destrucción aunque hubiera anticuerpos circulantes inducidos por la vacunación (Haesebrouck *et al.*, 2004). En un estudio reciente, se ha puesto de manifiesto que *A. pleuropneumoniae* cultivado bajo circunstancias que favorezcan una gran adhesión *in vitro* protege mejor que otra bacteria que no haya crecido en estas condiciones (Van Overbeke *et al.*, 2003).

Por esta razón, las adhesinas deberían ser incluidas en vacunas frente a la pleuroneumonía aunque desafortunadamente estos factores de virulencia no están todavía bien caracterizados y además es probable que en este fenómeno se encuentren implicados muchos antígenos. Se ha propuesto un modelo de adhesión en dos etapas: en un primer momento tendría lugar una unión de baja afinidad entre el antígeno O del LPS y los fosfolípidos o glucolípidos de las células del hospedador y después entraría en acción el núcleo oligosacárido del LPS y las proteínas de unión a superficie, que interactuarían con otros receptores del hospedador de forma más intensa (Jeannotte *et al.*, 2003).

En definitiva, parece razonable pensar que teniendo en cuenta la compleja patogénesis de la pleuroneumonía porcina sería interesante incluir diferentes factores de virulencia en las vacunas. En el año 2001 Van Overbeke *et al.* Desarrollaron una vacuna que contenía proteínas de unión a transferrina y toxinas Apx, que en un desafío con dosis elevadas de *A. pleuropneumoniae* confirió mejor protección que otra vacunada formulada con Apx exclusivamente.

Se ha comprobado que los anticuerpos inducidos frente a la proteína de membrana externa PalA, la más inmunodominante de todas ellas, agrava las consecuencias de una infección experimental y contrarresta el efecto protector de los anticuerpos anti-Apx (Van den Bosch y Frey, 2003), por lo que parece necesario extremar el cuidado en la selección de los antígenos que se van a incluir en las vacunas de subunidades. En las bacterinas preparadas a partir de bacterias completas el contenido en PalA varía dependiendo del modo en que se cultiven o se prepare la vacuna. Esto podría explicar las variaciones en la eficacia de la protección de diferentes productos de este tipo.

En relación con el interés sobradamente justificado de las toxinas Apx como antígenos vacunales, en diversos experimentos se ha comprobado que la vacunación con una preparación de Apx-I + Apx-II obtenida a partir del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*, evitaba la mortalidad en cerdos infectados con el propio serotipo 1, a pesar de que se detectaban lesiones pulmonares en los cerdos inmunizados (Devenís *et al.*, 1990). Posteriormente, se ensayaron conjugados de Apx con polisacáridos capsulares. Aunque se consiguió un efecto combinado de neutralización de la toxina y opsonización de la bacteria, no se pudo demostrar protección frente a la infección (Byrd y Kadis, 1992). En cambio, la combinación de una preparación cruda de Apx-I y Apx-II del serotipo 1 con un extracto celular, ofrecía una buena protección contra la infección por los serotipos 1 y 5 (Beaudet *et al.*, 1994). Se obtuvieron resultados utilizando estas proteínas producidas de manera recombinante (Ike *et al.*, 1996). Tras la vacunación con Apx-II y una OMP de 60 kDa (posiblemente la Tbp2), ambas del serotipo 7 y obtenidas de forma recombinante, se obtuvo también una protección específica de serotipo (Rossi Campos *et al.*, 1992).

Dado que el patrón de expresión de las hemolisinas varía entre serotipos, es necesario contar tanto con la Apx-I como con la Apx-III si se desea obtener una respuesta cruzada (Kamp *et al.*, 1992). La protección inducida por una vacuna que contiene Apx-I y Apx-II, Apx-III y una OMP de 42 kDa presente en todos los serotipos (combinación en la que se basa un preparado comercial) ha resultado ser la más eficaz de todas las mencionadas (Van den Bossch *et al.*, 1992). También se han llevado a cabo pruebas de vacunación con bacterinas junto a hemolisinas obtenidas a partir de cultivo, aunque los datos de protección publicados no son concluyentes (Tarasiuk *et al.*, 1996).

Debido a la importancia de su función y a su accesibilidad, por su situación en la superficie bacteriana, las proteínas de unión a transferrina (Tbp) se han considerado también antígenos con un gran potencial vacunal. Al igual que ocurre con otros antígenos de superficie (Byrd *et al.*, 1992, Thwaites y Kadis, 1993), los anticuerpos frente a ellas actúan como buenas opsoninas, promoviendo la acción de los fagocitos porcinos (Thwaites y Solomon, 1991). Su eficacia para inducir protección ha sido demostrada con Tbp nativas y con una TbpB recombinante (Rossi-Campos *et al.*, 1992). Parece ser que la variabilidad entre las TbpB de los diferentes serotipos representa un gran obstáculo para una protección

Introducción

cruzada, ya que la región de la proteína principalmente reconocida por anticuerpos es la C-terminal, que también es la más conservada entre los diferentes serotipos (Strutzberg *et al.*, 1995). Se ha descrito un preparado inmunógeno basado en el sobrenadante de un cultivo obtenido en condiciones de restricción de hierro, compuesto básicamente por hemolisinas y proteínas no integrales de membrana externa, entre ellas la TbpB. Según los autores, este preparado proporciona protección completa frente a serotipo homólogo (Goethe *et al.*, 2001).

Además de las inmunizaciones basadas en bacterinas o en vacunas de subunidades, también se han ensayado vacunas basadas en cepas atenuadas. Para obtener estas variantes se han seguido múltiples estrategias: aislamiento de cepas de campo (Jensen y Bertram, 1986), inactivación por pases *in vivo* (Inzana *et al.*, 1993a) mutagénesis química (Inzana *et al.*, 1993b) y mutagénesis dirigida (Prideaux *et al.*, 1999; Fuller *et al.*, 2000; Ingham *et al.*, 2002). Un ejemplo de cepa atenuada procedente de un aislamiento de campo es la CM5 (Jensen y Bertram, 1986; Rosendal y McInnes, 1990), caracterizada por tener una cápsula reducida y un menor contenido de LPS. La inmunización con esta cepa protegía frente a la mortalidad pero no contra la aparición de lesiones tras la exposición a una cepa virulenta. Por lo que respecta al uso de cepas atenuadas por mutagénesis química, la bibliografía recoge una cepa mutante sensible a la temperatura que crecía a 30°C pero no a 40°C (Inzana *et al.*, 1993b). Por último, han sido numerosos los ensayos utilizando cepas atenuadas por mutagénesis dirigida, de las cuales aquí citaremos tan solo algunos ejemplos. En este sentido, la inactivación del gen *apxIIC*, necesario para la activación de la hemolisina Apx-II, ha dado como resultado una cepa atenuada que proporciona protección cruzada entre serotipos en condiciones experimentales (Prideaux *et al.*, 1999). Otro ejemplo es el de una cepa auxótrofa para la riboflavina, construida por reemplazamiento de parte del operón que codifica para las enzimas implicadas en la biosíntesis de la riboflavina por una resistencia antibiótica, cepa que también proporciona protección cruzada entre los diferentes serotipos en condiciones experimentales (Fuller *et al.*, 2000).

1.8.1. Vacunas frente a la pleuroneumonía porcina

Las bacterinas de cuerpos celulares reducen la mortalidad tras la infección con el serotipo homólogo pero no confieren protección en desafíos con serotipos heterólogos. Esto

se puede deber a la ausencia de toxinas Apx y de ciertos factores de virulencia o también a la presencia de ciertos antígenos que disminuyen la eficacia de otros en la vacunación (Van den Bosch y Frey, 2003). Se han conseguido avances utilizando vacunas que contienen toxinas Apx. Estas vacunas de subunidades confieren una mejor protección cruzada y son capaces de disminuir los síntomas clínicos e incrementar la condición de los animales (Haesebrouck *et al.*, 1997; Haga *et al.*, 1997). También se ha conseguido una protección cruzada mediante la inactivación del operón de la toxina ApxII por mutagénesis (Prideaux *et al.*, 1999). Aunque estas proteínas son esenciales como componentes de una vacuna, no son las únicas responsables de conferir inmunidad. Vacunas basadas en Apx, solo confieren una protección clínica parcial siempre que la dosis de desafío no sea muy elevada. (Chiers *et al.*, 1998). Uno de los factores que podrían responder a ese problema sería el papel que juega la adhesión de la bacteria a las células epiteliales de los bronquiolos terminales y los alveolos. Esta unión estrecha permitiría liberar las toxinas directamente sobre la superficie de la membrana celular lo que originaría su destrucción aunque hubiera anticuerpos circulantes inducidos por la vacunación (Haesebrouck *et al.*, 2004). En un estudio reciente se ha puesto de manifiesto que bacterias de *A. pleuropneumoniae* crecidas bajo circunstancias que favorecen una alta adhesión *in vitro* protegen mejor que otra bacteria que no haya crecido bajo esas condiciones (Van Overbeke *et al.*, 2003). Las adhesinas deberían ser incluidas en vacunas frente a la pleuroneumonía pero desafortunadamente estos factores de virulencia no están todavía bien caracterizados y además es probable que en este fenómeno estén implicados muchos antígenos. Recientemente se ha propuesto un modelo de adhesión en dos pasos. En un primer lugar ocurriría una unión de baja afinidad entre el antígeno O del LPS y fosfolípidos o glucolípidos de las células del hospedador. Después entraría en acción el núcleo oligosacárido del LPS y proteínas de unión a superficie que interactuarían con otros receptores del hospedador de forma más intensa (Jeannotte *et al.*, 2003). Teniendo en cuenta la compleja patogénesis de la pleuroneumonía porcina sería interesante incluir diferentes factores de virulencia en las vacunas. En el año 2001 Van Overbeke *et al.*, desarrollaron una vacuna que contenía proteínas de unión a transferrina y toxinas Apx. En un desafío con dosis elevadas confirió mejor protección la vacuna combinada que una con Apx exclusivamente.

Introducción

Otro dato a tener en cuenta es el hallazgo reciente de que los anticuerpos inducidos frente a la proteína de membrana externa PalA, la más inmunodominante de todas ellas, agrava las consecuencias de una infección experimental y contrarresta el efecto protector de los anticuerpos anti-Apx. (Van den Bosch y Frey, 2003). Por lo tanto es necesario tener cuidado con los antígenos que se van a incluir en las vacunas de subunidades. En las bacterinas preparadas a partir de cuerpos celulares el contenido en PalA varía dependiendo del modo en que se cultiven o se prepare la vacuna. Esto podría explicar las variaciones en la eficacia de protección de diferentes bacterinas.

1.9. Línea NMRI de ratones albinos

Los ratones blancos de la cepa NMRI presentan varias ventajas como son su fácil manejo y manutención, además de su bajo costo y su rápida maduración y ciclo reproductivo. Los valores de las diferentes poblaciones celulares de la sangre periférica de ratones blancos NMRI que actualmente se manejan como animales normales, aparecen en el cuadro 6.

<i>Población celular de sangre periférica</i>	<i>Valor</i>
Eritrocitos (millones/mm ³)	6 – 12
Reticulocitos (%)	2 – 5
Hemoglobina (g/100 ml)	10 – 90
Hematocrito (%)	37 – 48
Concentración media de hemoglobina corpuscular	30 – 35
Leucocitos / mm ³	7000 – 15000
Neutrófilos (%)	10 – 60
Eosinófilos (%)	0 – 7
Basófilos (%)	0 – 1
Linfocitos (%)	35 – 90
Monocitos (%)	0 – 3

Cuadro 6. Valores normales de población celular de sangre periférica del ratón blanco NMRI.

Los **eritrocitos** poseen un diámetro de 5,7 μm y un grosor de 2,7 μm aproximadamente. Normalmente, estos animales cursan con anisocitosis y policromatosis, alteraciones que pueden presentarse hasta en el 20% del total de los eritrocitos.

Los **reticulocitos** son células acidófilas, que se observan con gránulos o filamentos, material basófilo que se tiñe de color azul oscuro.

En cuanto a las células de la serie blanca, los **linfocitos** se encuentran en mayor cantidad que los otros tipos celulares, presentando 2 tamaños: los pequeños, que son redondos, ligeramente dentados, con un núcleo grande, redondo, que se tiñe de azul intenso y algunas veces presenta ligeras vesículas. El citoplasma es azul pálido con una zona intermedia brillante, que rodea el núcleo, rara vez presenta gránulos azurófilos, a veces se observa a un lado del núcleo como un semicírculo, y otras no se observa, aparentando así, un núcleo desnudo. Los linfocitos grandes también tienen un núcleo grande, menos picnótico, y con una zona de citoplasma más amplia y brillante.

Los **monocitos** son los tipos celulares más grandes de la serie blanca, llegando incluso a rebasar los 17 μm de diámetro. Presentan un núcleo grande, ligeramente excéntrico, con grandes muescas o incluso dividido en 2 ó 3 fracciones redondas, menos picnótico que el del linfocito. Su citoplasma es abundante, de color azul grisáceo pálido, y puede presentar vacuolas y contener gran número de gránulos finos. En ocasiones pueden confundirse con linfocitos grandes.

En los **neutrófilos**, el núcleo ocupa la mayor parte de la célula, puede presentarse en forma de anillo con bordes irregulares o segmentados en varios lóbulos, unidos por pequeños puentes de cromatina. Su citoplasma es de color azul grisáceo pálido y puede presentar o no granulaciones de color rojo violeta, gránulos que se encuentran juntos o separados, que son tan escasos que pueden aparentar ser simples sombras. En las formas juveniles se observan núcleos poco picnóticos, con bandas de indentación, y el citoplasma presenta pocos gránulos.

Los **eosinófilos** son de difícil identificación, ya que pueden ser confundidos con neutrófilos, por lo que se requiere de gran cuidado en el estudio y una buena tinción. Tienen un núcleo en forma de anillo formando una banda ancha que es menos picnótica que la de

Introducción

los neutrófilos. El citoplasma contiene gránulos de color café rojizo, densos, borrosos, que parecen sombras.

Otro tipo celular son los **basófilos**. Según algunos autores, éstos no se observan en la sangre de ratón, pero hay quienes consideran que, debido a una posible infiltración de basófilos, pueden encontrarse en un valor máximo del 1% en sangre periférica. Otros opinan que sí existen verdaderos basófilos, pero que son raros y difíciles de reconocer, ya que sus gránulos son solubles (Schermer, 1967; Wintrobe, 1979)

En cuanto a la formación de células hemáticas en la médula ósea de esta especie animal prevalecen las de la serie blanca (granulopoyesis) sobre las de serie roja (eritropoyesis). Los mieloblastos presentan grandes núcleos redondos y un citoplasma basófilo, que con la maduración toma un aspecto brillante. Los mielocitos eosinófilos muestran gránulos voluminosos, de color rojo amarillento, de los que carecen los neutrófilos. Una característica muy importante es la formación de un pequeño pero creciente orificio en el centro del núcleo, que causa las formas típicas anulares que también se presentan en las células jóvenes. Algunos autores sostienen que las formas anulares surgen por la fusión de 2 núcleos en forma de herradura, pero que esto puede ocurrir muy raramente. Otros, en cambio, consideran que los núcleos en forma de herradura surgen probablemente por la rotura de los anillos. Se dice que los núcleos en forma de herradura son muy anchos y débilmente pícnoticos, hasta llegar a formar las células maduras segmentadas que se encuentran en sangre periférica. Se observa una evolución similar en el caso de los eosinófilos. Los gránulos de los mielocitos inicialmente son pequeños, escasos, y se encuentran distribuidos por todo el citoplasma. Klieneberger, y otros encontraron células con granulaciones basófilas en la médula ósea, pero aseguran que son muy raras y que no resulta posible observarlas en todos los animales; sin embargo, se encuentran regularmente en bazo. Las células plasmáticas son muy frecuentes, de forma irregular, con un núcleo azul oscuro no muy definido y una aparente granulación citoplasmática de color rojizo. Dado que los valores descritos por diferentes autores difieren mucho en la nomenclatura y clasificación utilizadas para los diferentes tipos celulares, estos porcentajes resultan aproximados para las principales formas celulares encontradas (Schermer, 1967; Wintrobe, 1994).

Tipos celulares	%
Mieloblastos	10%
Mielocitos	20%
Juveniles anulares	40%
Leucocitos maduros	10%
Eritroblastos	20%
Granulocitos	87,3%
Eritrocitos	12,7%.

Cuadro 7. Porcentajes aproximados de los distintos tipos celulares sanguíneos en el ratón.

Los gránulos son de forma redonda u ovalada, variables de tamaño y electrónicamente densos (Slierendrecht y *et al.*, 1995). Su tamaño es mayor que el de los linfocitos y el de los eritrocitos (Blaxhall y Daisley, 1997. Entre las principales funciones de los neutrófilos se encuentra la fagocitosis. Los neutrófilos pasan al torrente circulatorio y migran a los lugares de inflamación, en respuesta a estímulos quimiocinéticos. Esto provoca una depleción en los neutrófilos (Campbell y Murru, 1990; Bly *et al.*, 1990; Hine, 1992). Los neutrófilos son las primeras células en migrar a la zona afectada, donde son detectables a las pocas horas de haberse producido la lesión y alcanzan el valor de máxima infiltración antes de las primeras 24 horas (Carlson *et al.*, 1998). Una vez en la zona lesionada, los neutrófilos se activan e inician la fagocitosis de los restos celulares, pero también generan radicales libres de oxígeno como consecuencia de un aumento de la respiración celular, que al ser liberados al espacio extracelular causan la peroxidación lipídica de la membrana de las células vecinas. Por otra parte, los neutrófilos infiltrados también secretan citocinas promotoras de la reactivación de los astrocitos y de la microglía, generando un ambiente inflamatorio. La segunda oleada de células infiltrantes son los monocitos que, una vez dentro del parénquima medular, se transforman en macrófagos-microglía, ayudando así a la fagocitosis de los restos celulares. De nuevo, como resultado del aumento de catabolismo celular liberan radicales reactivos de oxígeno, nocivos para la viabilidad de las células vecinas (Merrill y Jonakait, 1995).

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Si la especificidad de la infección del cerdo por *A. pleuropneumoniae* se debe en todo o en parte a la disponibilidad en la bacteria de receptores de superficie específicos para la transferrina, la administración de transferrina porcina cargada con Fe^{+++} en ratones permitirá que *A. pleuropneumoniae* se multiplique en esta especie, al menos durante algunas generaciones. Ello facilitará la expresión *in vivo* de los factores de virulencia y, como consecuencia, el desarrollo de un proceso clínico de pleuroneumonía en una especie que naturalmente no sufre la enfermedad. El objetivo final es sustituir al cerdo, el hospedador natural, por este animal de laboratorio. La propuesta debe contribuir a esclarecer la razón de la especificidad de la infección por *A. pleuropneumoniae* en el cerdo.

Como ha quedado expuesto en el capítulo anterior, el empleo de cerdos en los estudios experimentales de la pleuroneumonía porcina no siempre resulta posible, como consecuencia de factores diversos, que incluyen la necesidad de costosas instalaciones, en relación con el bienestar animal, por problemas de bioseguridad derivados de las limitaciones que impone el trabajo con cepas que pueden haber estado sometidas a manipulación genética, o por razones de índole económica, justificadas tanto por el precio de adquisición y mantenimiento de los animales como de su alojamiento físico y manutención, ya comentados. Aunque está suficientemente contrastado que el uso del hospedador natural resulta insustituible en determinadas fases de la enfermedad, la alternativa representada por un animal de laboratorio, de pequeño tamaño y otras ventajas, supondría no solo avanzar más rápido en el estudio de los factores de virulencia, críticos en el desarrollo del proceso clínico, sino también facilitar una alternativa de gran interés en la valoración de vacunas u otros productos potencialmente útiles en el control de la enfermedad, tanto desde un punto de vista experimental como industrial.

Sentadas estas premisas, el objetivo de este trabajo consiste en la propuesta y evaluación de la utilidad de un modelo experimental murino, para el estudio posterior de diversos aspectos de la infección producida por *A. pleuropneumoniae*; entre ellos, la valoración de la eficacia de diversos productos vacunales, cada vez más numerosos en el mercado. Con este propósito, se plantea como hipótesis de trabajo (a la vista de los fracasos obtenidos con otras estrategias de modificación del equilibrio del hierro en el ratón, tal y como se ha señalado) trasladar a *A. pleuropneumoniae* el modelo ensayado con éxito en *N. meningitidis* (Holbein, 1981), consistente en la administración de hierro

Planteamiento y objetivos

ligado a la transferrina específica del hospedador natural, porcina en nuestro caso. Este método debería permitir (al menos, en teoría) superar la ausencia de este oligoelemento en el hospedador experimental, lo que debería hacer posible la multiplicación de *A. pleuropneumoniae* durante un cierto número de generaciones, suficientes para que los acontecimientos que ocurren en el cerdo puedan también reproducirse en este modelo de infección experimental. Adicionalmente, el éxito en esta empresa demuestra el papel representado por los sistemas de abastecimiento de hierro en relación con la susceptibilidad restringida del cerdo a la infección y la resistencia natural del ratón.

A. pleuropneumoniae causa en el cerdo una pleuroneumonía con frecuencia grave, necrótica, fibrinosa y mortal. En la forma aguda de la enfermedad, los cerdos desarrollan un problema de dificultad respiratoria grave, cianosis, vómitos y fiebre. En la infección crónica el microorganismo se encuentra residiendo en las tonsilas y en las lesiones pulmonares focales. Estos animales desarrollan inmunidad frente a *A. pleuropneumoniae* y se protegen sólidamente contra desafío adicional pudiendo infectar a otros animales, afectando así la economía de la explotación, debido a la caída del índice de conversión del alimento y a la pérdida del valor comercial. Las vacunas comerciales actuales pueden reducir la mortalidad pero no previenen la morbilidad o el desarrollo del estado del portador. Estas bacterinas comerciales ofrecen solamente la protección parcial, mientras que los animales que sobreviven a una infección natural se protegen totalmente.

OBJETIVOS

➤ Adaptación del ratón para el desarrollo un modelo de infección crónica por *A. pleuropneumoniae* evaluando la eficacia de la transferrina porcina saturada con hierro para prolongar el tiempo de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en este animal. Dicho modelo servirá para estudiar *in vivo*, sin recurrir al hospedador natural, la contribución de diversos factores bacterianos en el desarrollo de la enfermedad.

➤ Estudio de factores inespecíficos (inmunidad innata) como responsables de la resistencia del ratón a la infección por *A. pleuropneumoniae*. Participación de neutrófilos y capacidad bactericida del suero (activación del sistema del complemento) en el evento.

- Estudio de la actividad anticomplementaria con veneno de cobra y su influencia en la infección murina por *A. pleuropneumoniae*.
- Desarrollo de una bacterina experimental frente a la pleuroneumonía porcina y evaluación de la protección inducida por la misma en el modelo murino adaptado a la pleuroneumonía porcina.

Planteamiento y objetivos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Microorganismos utilizados

En todos los ensayos de susceptibilidad y resistencia, así como de infección experimental, se utilizó la cepa CM5 del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*. Este microorganismo ha sido utilizado en diversas investigaciones sobre virulencia e inmunogenicidad de *A. pleuropneumoniae* (Rosendal *et al.* 1981). La cepa fue amablemente cedida por la Dra. Rosendal.

3.2 Tinciones

3.2.1 Tinción de GIEMSA

Se utilizó en la observación microscópica de la morfología celular de los componentes sanguíneos.

Desarrollo de la técnica	Tiempo
Añadir reactivo 1 (May-Grumwald) cubriendo los discos	2 min
Diluir 1:2 el reactivo con agua	2 min
Lavar con agua	30 seg
Añadir reactivo 2 (Giemsa) hasta cubrir los discos durante	10 min
Lavar con agua con frasco lavador y dejar secar	1 min
Observar al microscopio a 100 X, con aceite de inmersión	

3.3. Medios de cultivo

3.3.1. Medios de cultivo bacterianos

3.3.1.1. Agar chocolate (BioMérieux)

Se utilizaron placas de ágar chocolate enriquecidas con Polyvitex®, cuya fórmula, por litro de agua, además del enriquecimiento mencionado, contiene:

Fórmula	Cantidad (g)
Biopeptona	15 g
Almidón de maíz	1 g
Fosfato dipotásico	4 g
Fosfato monopotásico	1 g
Cloruro sódico	5 g
Hemoglobina	10 g
Agar	10 g

3.3.1.2. Agar Sangre (BioMérieux)

Contiene agar Columbia suplementado con un 5% de sangre de cordero.

Fórmula	Cantidad (g)
Bio-polytone	10 g
Hidrolizado de proteínas (animal y vegetal)	10 g
Bio-myotone	3 g
Almidón de maíz	1 g
Cloruro sódico	5 g
Sangre de cordero	50 ml
Agar	13,5 g

3.3.1.3. Caldo y agar PPLO (Difco)

Su composición por litro incluye los siguientes ingredientes:

Fórmula	Cantidad (g)
Extracto de corazón de ternera	5 g
Triptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
NaCl	5 g

En el caso del medio sólido, se añadieron 15 g de agar. El pH final se ajustó a 7,6. Se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante y se esterilizó en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

3.3.1.4. Caldo tioglicolato (FTM, “fluid thioglycollate medium”)

La composición por litro incluye:

Fórmula	Cantidad (g)
Triptona	15 g
Extracto de levadura	5 g
Tioglicolato sódico	0,5 g
L-Cisteína clorhidrato	0,5 g
Glucosa	5,5 g
Cloruro sódico	2,5 g
Resazurina	0,001g

Se mezcló la L-Cisteína con el cloruro sódico, el extracto de levadura, la glucosa y la triptona y se añadió un litro de agua. La mezcla se disolvió por agitación en calor y se ajustó a pH 7,1. Finalmente, se añadió la resazurina y se autoclavó 15 minutos a 121° C.

3.3.2. Celulares. Medio de cultivo

Contiene por litro los reactivos que se detallan a continuación.

<i>Fórmula</i>	<i>Cantidad (g)</i>
RPMI 1640 (Invitrogen)	500 ml
Tampón HEPES 200mM (Merck)	10 ml
Penicilina, 220 UI/ml (Sigma)	5 ml
L-glutamina 2mM (Sigma)	5 ml
Suero bovino fetal sin complemento	50 ml
2-mercaptoetanol, (5 x 10 ⁻⁵ M)	250 µl

El medio se preparó en cabina de flujo laminar, mezclando los cuatro primeros componentes y se conservó hasta su uso a 4° C, momento en el cual se añadieron el suero bovino fetal y el 2-mercaptoetanol.

3.3.3. Medio de congelación

Contiene por litro los reactivos que se detallan a continuación:

<i>Fórmula</i>	<i>Cantidad (g)</i>
Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma)	100 ml
Suero bovino fetal sin complemento	900 ml

3.4. Soluciones de antibióticos y suplementos

3.4.1. Ampicilina

Se preparó una solución stock a una concentración de 100 mg/ml de ampicilina (Sigma) en agua. Se esterilizó por filtración y se conservó a -20°C.

3.4.2. Isovitalax

Contiene por litro los reactivos que se detallan a continuación:

<i>Fórmula</i>	<i>Cantidad (g)</i>
L-Glutamina (Sigma)	1 g
L-Cisteína dihidroclorada (Sigma)	26 g
L-Cistina dihidroclorada (Sigma)	1 g
NAD en 10% de Glucosa monohidrato	1 g

Se esterilizó por filtración y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20° C.

3.4.3 Glucosa

La solución stock se preparó a una concentración del 50% (p/v) de glucosa (Sigma) en agua bidestilada. Se esterilizó por filtración y se conservó a 4° C.

3.4.4 NAD (Nicotinamida Adenina Dinucleótido)

Se preparó a una concentración de 20 mg/ml. Se esterilizó con filtros de 0,22 µm y se conservó en viales de 1 ml a -20° C.

3.5 Productos y reactivos

3.5.1. Inactivación bacteriana

3.5.1.1 Formol

Se utilizó formaldehído comercial (Sigma) con una pureza del 90%

3.5.1.2 Thimerosal

Se preparó una solución stock de thimerosal (Sigma) al 1% (p/v), se filtró y se almacenó a 4° C hasta su uso.

3.5.2 Extracción de sobrenadantes con proteínas de la membrana externa enriquecidos en TbpB

3.5.2.1. Solución de 2,2 Dipiridilo (Sigma)

Se preparó una solución stock a una concentración de 0,1 M en etanol (Panreac) y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -20° C.

3.5.2.2. Deoxicolato Sódico (Sigma)

Se preparó una solución stock de deoxicolato sódico (Sigma) a una concentración del 1% en agua bidestilada y se esterilizó por filtración.

3.5.2.3. Tris HCl 1M, pH 8

Se disolvieron 121,1 g de Trizma[®] base (Sigma) en 800 ml de agua bidestilada. Se ajustó el pH a 8 y se añadió agua hasta alcanzar un volumen final de 1 l.

3.5.2.4. Cloruro sódico (5 M)

Se preparó disolviendo 29,22 g de cloruro sódico (Sigma) en 100 ml de agua bidestilada.

3.5.3. Anestésico

En las inoculaciones de los ratones se utilizó como anestésico Fluotane[®] (Zeneca Farma S.A.) de la siguiente composición por ml:

Fórmula	Cantidad (g)
Halotano (D.C.I.)	1,874 g
Timol	csp 1 ml

3.5.4 Transferrina sérica porcina

La transferrina sérica porcina se obtuvo de Frist Link-UK-Ld y fue saturada con hierro mediante el procedimiento descrito por Herrington & Sparling (1985) (ver apartado 3.15.1).

3.6. Determinación de la concentración de proteína total (Bradford, 1976).

El reactivo contiene azul de Coomassie, metanol y ácido fosfórico (*Dye reagent concentrate*, Biorad). La determinación está basada en el principio de que el colorante se une de forma específica a las proteínas, de tal forma que en presencia de la solución ácida, hace que su absorbancia vare de 465 a 595 nm. Para realizar los estándares, con concentraciones conocidas de proteína, se empleó albúmina sérica bovina (Sigma).

3.7 Electroforesis

3.7.1 SDS-PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico)

Se utilizaron geles de poliacrilamida (solución al 29% de acrilamida + 1% de bisacrilamida -Sigma-), a una concentración del 5% en el gel concentrador, y del 12% en el gel separador. A continuación se detallan los productos empleados en la preparación de los geles y tampones necesarios para la electroforesis:

3.7.1.1 Gel separador

Fórmula	Cantidad (g)
Agua bidestilada	3 ml
Trizma [®] base, pH 8,8, 1,5 M (Sigma)	2,5 ml
SDS al 10% (Panreac)	100 µl
Solución Acrilamida/Bisacrilamida (Sigma)	4 ml
Persulfato amónico 10% (Sigma)	100 µl
TEMED (Sigma)	4 µl

3.7.1.2 Gel concentrador (5%)

Fórmula	Cantidad (g)
Agua bidestilada	1,4 ml
Trizma [®] base, pH 6,8 0,5 M (Sigma)	0,3 ml
SDS al 10% (Panreac)	20 µl
Solución acrilamida/bisacrilamida (Sigma)	0,6 ml
Persulfato amónico al 10% (Sigma)	20 µl
TEMED (Sigma)	2 µl

3.7.1.3 Tampón de electroforesis (5x)

Fórmula	Cantidad (g)
Trizma [®] base, 25 mM (Sigma)	15 g
Glicina, pH 8,3, 192 mM (Sigma)	72 g
SDS, pH 8,3 al 0,1% (Panreac)	5 g
Agua destilada	1 l

Para la realización de la electroforesis se diluyeron 300 ml del tampón de carga 5x en 1,2 l de agua destilada. Se conservó a 4° C.

3.7.1.4 Tampón de carga de proteínas

Fórmula	Cantidad (g)
Trizma [®] base (Sigma)	0,6 g
SDS (Panreac)	1 g
Azul de bromofenol (Sigma)	5 g
Agua destilada	100 ml

3.7.2 Electroforesis en gel de agarosa

3.7.2.1 Tampón de carga DNA (6x)

Se compone de:

Fórmula	Cantidad (g)
Azul de bromofenol al 0,25% (Sigma)	0,25 g
Xilencianol al 0,25% (Sigma)	0,25 g
Sacarosa al 40% (Sigma)	40 g
Agua libre de DNAsa (Sigma)	hasta 100 ml

3.7.2.2 Tampón Tris-Borato-EDTA 5x (TBE)

Contiene los siguientes reactivos:

Fórmula	Cantidad (g)
Trizma [®] base (Sigma)	54 g
Ácido bórico (Sigma)	27,5 g
EDTA 0,5M (pH 8)	2 ml
Agua destilada	hasta 1 l

Se utilizó a una concentración del 1x, por lo que se diluyó cinco veces en el momento de su uso.

3.7.3 Tinción con azul de Coomassie

3.7.3.1 Tinción de geles de poliacrilamida

Se empleó un método comercial (*Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution kit*, Biorad) que contenía la solución de teñido y desteñido, ya preparadas para su uso.

3.7.3.2 Tinción de geles de agarosa al 1%

3.7.3.2.1 Solución de teñido

Para preparar 1 litro de la solución se necesitaron:

Fórmula	Cantidad (g)
Azul de Coomasie (Sigma)	0,5 g
45% de metanol (Sigma)	45 ml
6% de ácido acético glacial (Sigma)	60 ml
Agua destilada	hasta 1 l

3.7.3.2.2 Solución de desteñido:

Se preparó 1 litro de la solución que contenía:

Fórmula	Cantidad (g)
25% de metanol (Sigma)	250 ml
10% de ácido acético glacial (Sigma)	100 ml
2% de glicerol (Sigma)	20 ml
Agua destilada	hasta 1 l

3.8 Inmunoblotting

3.8.1 Tampón de transferencia

Estaba compuesto por los siguientes productos:

Fórmula	Cantidad (g)
Tris HCl, pH 9,2 (Sigma)	48 mM
SDS (Panreac)	1,3 mM
Glicina (Sigma)	39 mM
Metanol (Sigma)	20%

3.8.2 Tampón TBS

Se preparó un litro de solución a una concentración 25 mM, con los siguientes reactivos:

Fórmula	Cantidad (g)
NaCl (Sigma)	8 g
KCl (Sigma)	0,2 g
Trizma [®] base (Sigma)	3 g
Agua destilada	800 ml

El pH se ajustó a 8 con una solución de HCl 2M y se enrasó con agua destilada hasta 1 l. Para su esterilización, se autoclavó durante 15 minutos a 121°C.

3.8.3 Tampón de bloqueo

Se preparó una disolución al 10% (p/v) de leche descremada en agua destilada.

3.8.4 Tampón TBS-Tween 20 (TTBS)

Al tampón TBS se le añadió un 0,05% de Tween 20 (Sigma).

3.9 ELISA

3.9.1 Tampón fosfato (PBS)

Su composición por litro es la siguiente:

Fórmula	Cantidad (g)
Na ₂ HPO ₄ (Sigma)	1,15 g
NaH ₂ PO ₄	40,20 g
NaCl	8,18 g
KClO ₃	20 g

Se disolvieron las cuatro sales en 800 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 7,2-7,4 y se enrasó hasta un volumen final de 1 l.

3.9.2 Tampón carbonato

Se preparó mezclando los siguientes productos

Fórmula	Cantidad (g)
Na ₂ CO ₃ (Sigma)	3,18 g
NaHCO ₃ (Sigma)	5,86 g
NaN ₃ (Sigma)	0,4 g

Se añadieron 100 ml de agua destilada, se ajustó el pH a 9,6 con HCl 1M y se añadió agua hasta que el volumen final fuera de 200 ml.

3.9.3 Tampón de lavado

Se preparó añadiendo al tampón fosfato Tween-20 (Sigma), a una concentración del 0,05%.

3.9.4 Tampón de bloqueo

Está compuesto por tampón de lavado y suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen) a una concentración del 5%.

3.9.5 Tampón de dilución del conjugado

Se preparó añadiendo al tampón de lavado un 0,1% de albúmina bovina (Sigma).

3.9.6 Sustrato TMB (3,3',5, 5'- tetrametilbenzidina)

Se disolvieron 100 mg de TMB (Sigma) en 10 ml de DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma), hasta una concentración final de 42 mM. Se conservó a temperatura ambiente, protegido de la luz.

3.9.7 Isotiocianato de amonio 4M

Se pesaron 30,5 g de isotiocianato de amonio (Sigma) y se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada.

3.10. Método ELISA INDIRECTO

3.10.1. Tapizado de placas de ELISA [Tapizado con proteínas (TbpB crudo)]

Se ajustó la concentración de proteína a una dilución de 1:200 en tampón fosfato, tapizando cada pocillo (placas Polysorp, Nunc) con un volumen de 50 µl.

3.10.2. Tapizado con LPS

El tapizado con un extracto crudo de LPS de *A. pleuropneumonia* obtenido previamente mediante extracción fenol-agua, se lleva a cabo en 2 pasos. En primer lugar se dispone el antígeno sobre la superficie de la placa, para lo cual con anterioridad, éste se prepara a una concentración determinada en tampón de PBS de pH 7,2 – 7,4. Se incuba a 37° 2 horas o bien toda la noche a 4° C. Las placas se vacían con un golpe. Finalmente, al día siguiente, se procede al bloqueo con una solución de PBS pH 7,2 – 7,4 a la que se añade una solución de BSA (albúmina bovina al 1 - 2%) a razón de 300 µl por pocillo, durante 2h a 37° C ó 1 noche a 4°C. En la reacción se añaden 100 µl del suero de prueba (igual en los controles negativo y positivo) diluido al 1:200 en PBS con 5 % de leche descremada (skim milk powder).

Se agita suavemente la placa y se incuba 20 minutos a temperatura ambiente. Se

realizan 3-4 lavados con la solución de lavado procurando que no rebose, evitando mezclar el contenido de los pocillos. Después se añade el conjugado diluido que contiene 100 μ l de una mezcla de 10 ml de PBS y 2 μ l de anti-pig IgG + peroxidasa (Sigma-Aldrich) por cada placa, incubando 20 minutos a temperatura ambiente. Se vuelve a lavar 4-5 veces y se seca la placa.

Para el revelado se añaden a cada pocillo 100 μ l de una mezcla de 10 ml de sustrato, 100 μ l de TMB y 2 μ l de H₂O₂ y se incuba la placa en un lugar oscuro a temperatura ambiente durante 8 ó 10 minutos. Se frena la reacción con HCl 2M añadiendo 50 μ l en cada uno de los pocillos y se procede a la lectura de las placas a una densidad óptica de 450 nm en un lector de ELISA (mod. Dynex Technologies).

Se consideraron positivos todos los pocillos cuya densidad óptica superara 3 veces la del control negativo (Hamblin, *et al.*, 1986).

3.11. Citometría de flujo

3.11.1 Tampón FACS

Está compuesto por PBS sin Ca⁺² ni Mg⁺² (Gibco, Invitrogen), con un 0,01% de BSA (Sigma) y un 0,01% de azida sódica (Sigma).

3.11.2 Tampón FACS fijador

La composición es similar a la del tampón FACS, con la adición de paraformaldehído (Sigma) hasta una concentración final del 0,1%.

3.12. Laboratorios e instalaciones utilizadas

Los trabajos experimentales, estudios bacteriológicos, inmunológicos y de resistencia innata a *A. pleuropneumoniae* se llevaron a cabo en las dependencias de la Unidad de Microbiología e Inmunología, del Departamento Sanidad Animal (Facultad de Veterinaria. Universidad de León). Los ensayos con ratones se realizaron en el Animalario de la Universidad de León, utilizando jaulas de plástico con tapas de rejilla y biberones con agua. La cama, a base de serrín, se cambiaba dos veces por semana. Las condiciones de temperatura (22°C), humedad (60%) y ciclos de luz/oscuridad (12h/12h) fueron constantes. Los animales tuvieron acceso libre a pienso comercial de mantenimiento (Panlab) de composición equilibrada, igual que al agua higienizada, y solo se utilizaron después de un periodo de cuarentena de cinco días de permanencia en el Animalario, permitiendo su aclimatación.

Material y Métodos

Los análisis por citometría de flujo se llevaron a cabo en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León.



Figura 6. Animalario de la Universidad de León.

Vista exterior (www.unileon.es)

Se utilizó un armario de protección microambiental suministrado por Biosis, S.L. (Biologic Systems) con sistema de filtrado de agentes patógenos, formado por 36 unidades independientes, instalado en un área aislada del Animalario en la que se acondicionó también una cabina de flujo laminar vertical tipo A-2, donde se llevaban a cabo las necropsias de los animales muertos en el curso de la experiencia.

El **protocolo experimental** fue aprobado por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de León, y estuvo diseñado conforme a las normas de la Unión Europea sobre el uso y cuidado de animales de experimentación, para el desarrollo de modelos animales de infección.





Figura 7. Detalle de las instalaciones utilizadas en el Animalario de la ULE

3.13. Animales. Ratones.

Se utilizaron distintas líneas o cepas de ratones (*Mus musculus*) en función del tipo de experimento.

3.13.1. Ratones N.M.R.I. (Naval Medical Research Institut) **SPF (libres de patógenos específicos)**, (Charles River, Wilmington, Barcelona, España), en lo sucesivo NMRI, de un peso aproximado de 30 g y entre 6 y 8 semanas de edad. Los animales (hembras albinas) fueron adquiridos a través del Animalario y mantenidos en esas instalaciones en condiciones controladas de temperatura, humedad, fotoperiodo, atmósfera, alimentación, jaulas y cama.

3.13.2. Ratones Balb/c (SPF). Cepas de ratón Balb/c, consanguíneos, hembras, de peso entre 25 y 30 g, libres de bacterias y virus patógenos comunes, de acuerdo a los controles rutinarios efectuados por la empresa proveedora.

3.13.3. Ratones “inbred” BALB/c nude, SPF, (Charles River, Wilmington), hembras, atímicos, de pesos entre 25 y 30 g,.

3.14. Método de infección de ratones

La infección se realizó por vía intranasal, todas las pruebas se realizaron por duplicado.

3.14.1. Anestesia y eutanasia.

Se llevaron a cabo ensayos preliminares para ajustar el procedimiento de anestesia que se ejecutó con Fluothane® (Zeneca Farma, S.A.), de la siguiente composición por ml: halotano (D.C.I.), 1,874 g; timol, c.s.p.. El procedimiento consistía

en la deposición de entre 1 y 2 ml del producto sobre una torunda de algodón, que se depositaba en la jarra de desecación y su vaporización lograba los efectos anestésicos por inhalación. El tiempo de duración de la exposición al anestésico fue establecido con anterioridad al comienzo de los experimentos de infección. A tal efecto se llevo a cabo un experimento sencillo en el que se fue variando el tiempo de espiración desde 15 a 30 segundos.

El método seguido en la eutanasia fue la dislocación cervical, aunque alternativamente se utilizaron también la anoxia y la sobrealnestesia con halotano.

Para la inoculación intranasal se siguió el procedimiento descrito por Rushton (1978). Los animales se situaban en posición vertical y se les instilaba en las fosas nasales la dosis de 5×10^5 ufc, con ayuda de una micropipeta de 200 μ l de volumen máximo. Este instante fue considerado el tiempo 0 de infección.

3.14.2. Preparación de las suspensiones

3.14.2.1. Cultivo y crecimiento bacteriano

Se utilizó el serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* cepa de referencia (CM5). A partir de un vial congelado a -80° C, se inocularon 50 μ l de la suspensión bacteriana en placas en agar chocolate y se incubaron a 37° C, durante 24-48 horas. Los cultivos se resuspendieron en RPMI sin glutamina (GIBCO, Invitrogen) hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO-600) superior o igual a 2, manteniéndose a 4° C.

3.14.2.2 Recuento de ufc (unidades formadoras de colonias)

A partir de la suspensión bacteriana anterior, se realizaron diluciones decimales en medio RPMI. Con cada una de ellas se realizaron medidas de la DO-600 y se sembraron 100 μ l de las mismas en placas de agar chocolate, incubando durante 48 horas a 37° C. Una vez finalizado el proceso de incubación, se llevó a cabo el recuento en cada una de las diluciones decimales (sólo se consideraron representativas las placas con un número de colonias entre 30 y 300) para calcular las ufc/ ml de la suspensión inicial.

3.14.3 Inoculaciones

Se utilizaron dos vías para las inoculaciones: intranasal e intraperitoneal. En ambos casos se establecieron grupos de ratones inoculados con distintas dosis de la bacteria, manteniendo siempre un grupo control que fue inoculado con RPMI estéril. Las concentraciones bacterianas que se utilizaron para las inoculaciones fueron según el caso, desde 2×10^3 a 2×10^9 ufc. Antes de la inoculación, los ratones se anestesiaron con Fluoatane® mediante el procedimiento descrito.

Por vía intranasal se administraron 50 μ l de la suspensión bacteriana en forma de pequeñas gotas depositadas en las fosas nasales, aprovechando el movimiento de inspiración, procediendo con micropipetas de 200 μ l con puntas estériles adecuadas. Para la inoculación en la cavidad peritoneal, se dispuso al ratón en posición vertical, con la cabeza inclinada hacia abajo, y se inocularon 200 μ l con jeringuilla estéril de tipo insulina.

Los animales fueron observados durante una semana, anotándose los cambios en su comportamiento y conducta alimentaria, así como cualquier otro síntoma indicativo de enfermedad. Tanto a los animales que murieron en el transcurso de la prueba, como a los que se sacrificaron al finalizar la misma, se les realizó la necropsia y se les extrajo el pulmón para su análisis microbiológico.

3.14.4. Determinación de la DL₅₀ (Dosis Letal 50%).

La dosis letal 50 (DL₅₀) fue calculada por el método de Reed y Muench (1938) e indica la mínima cantidad de bacterias que después de la administración de una única dosis provoca la muerte de la mitad de la población animal del estudio, teniendo como base 6 experimentos con 8 grupos de 6 ratones, que fueron inoculados por vía intranasal con un volumen de 50 μ l conteniendo suspensiones de *A. pleuropneumoniae* en RPMI, desde 5×10^3 a 5×10^8 ufc. Durante el tiempo de observación, se realizó un recuento del número de muertos y supervivientes y posteriormente se estableció el porcentaje de muertes para cada dosis y concentraciones con cada una de las dosis bacterianas empleadas. La DL₅₀ se calculó aplicando las siguientes fórmulas:

$\text{Log } (1/\text{DL}_{50}) = \text{log } (1/\% \text{ mortalidad superior al } 50\%) + \text{Df log (diferencia de log).}$
$\text{Df log} = [(\% \text{ mortalidad superior al } 50\% - 50\%) / (\% \text{ mortalidad superior al } 50\% - \% \text{ mortalidad inferior al } 50\%)] \times \text{log del factor de dilución.}$

3.14.5. Dosis subletal de trabajo.

Conociendo la DL_{50} , se prepararon 5 dosis inferiores y diferentes, llevando a cabo un experimento preliminar. Durante cinco días después de la inoculación se llevó a cabo el recuento de animales vivos, animales con síntomas y muertos, con cada una de las dosis bacterianas empleadas. Se seleccionó como dosis subletal (DSL) la dosis que no provocó ningún síntoma en los diferentes grupos de animales.

3.14.6. Pruebas de colonización y supervivencia bacteriana.

Se inocularon los ratones por vía intranasal con 50 μ l de una suspensión bacteriana que contenía 5×10^5 ufc. A las 4, 6, 8, 12 y 24 horas post-infección, se sacrificaron por duplicado grupos de tres ratones, y se recogió el bazo y pulmón de cada uno de ellos. Estas vísceras se maceraron en RPMI, se centrifugaron durante 5 minutos a $200 \times g$ y se tomaron 100 μ l del sobrenadante; con este volumen se sembraron placas de agar chocolate, que se incubaron durante 36-48 horas a 37°C . Transcurrido ese tiempo, se subcultivaron todas las colonias sospechosas en agar sangre con una estría de estafilococo productor de NAD.

3.15. Transferrina porcina.

3.15.1. Saturación con hierro.

La transferrina es el principal transportador de hierro extracelular en los fluidos orgánicos sistémicos. En este estudio se utilizó transferrina porcina comercial (*First Link, UK, Ltd*), que se saturó con hierro. Su preparación se basó en los protocolos descritos previamente por Herrington y Sparling (1985); Niven *et al.* (1989); Irwin *et al.*, (1993) y Gray-Owen *et al.* (1995).

Brevemente, primero se preparó una solución de transferrina 68,5 mM, mediante la disolución en un tampón de pH 5,5, compuesto por acetato sódico 0,1 M, fosfato sódico monobásico 0,1 M y EDTA 25 mM. La solución resultante se dializó contra el mismo tampón, en una proporción 1:100, 3 veces durante 12 horas cada una, a 4°C , en agitación. Para ello, se empleó una membrana “*Visking Dialysis Tubing 20/32*”, de 16 mm de diámetro de poro (*Boehringer Ingelheim Bioproducts*). Esta primera diálisis tenía como finalidad eliminar cualquier complejo de hierro insoluble asociado con esta glicoproteína.

A continuación, se preparó un segundo tampón, de pH 8,6, constituido por citrato sódico 100 mM y bicarbonato sódico 100 mM, en el que se disolvió cloruro férrico a una concentración 30 veces en exceso molar respecto de la transferrina, con el que se dializó la glicoproteína por cuarta vez, en las mismas condiciones anteriores. Este segundo tampón tenía por misión producir la fijación del hierro a las moléculas de transferrina porcina.

Para eliminar el hierro libre residual, se utilizaron columnas “*HiTrap Desalting*” (Amersham Pharmacia Biotech), rellenas con el gel “*Sephadex[®] G-25 5 x 5ml superfino*”, que fueron manejadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La filtración de la muestra se efectuó por duplicado con el fin de eliminar los complejos de hierro insolubles y/o no fijados a la transferrina, que podrían interferir en sus aplicaciones posteriores, filtrando en la columna los 2 ml de transferrina dializada con 5 ml de solución salina, obteniendo en los primeros 2 ml la transferrina cargada con hierro y en los 5 restantes sales con exceso de hierro libre, que podría interferir en aplicaciones posteriores de la transferrina. La filtración de la muestra se efectuó por duplicado.

El cálculo de la concentración de transferrina en la muestra obtenida se determinó mediante un sistema de medición de proteínas basado en la densidad óptica (*Bio-Rad Protein Assay*). La muestra finalmente fue alicuotada y conservada de forma indefinida, mediante congelación a -20°C.

3.15.2. Ajuste del volumen y concentración de transferrina cargada con hierro para la inoculación intranasal. Inóculo bacteriano.

Con anterioridad al comienzo de los estudios con suspensiones bacterianas y con transferrina porcina cargada, se llevó a cabo un ajuste del volumen óptimo de inoculación intranasal, desde el punto de vista físico. Se comprobaron los inconvenientes y dificultades derivadas del uso de 3 volúmenes representativos (20, 50 y 100 µl) de una suspensión microbiana y de una solución estándar de transferrina. Del mismo modo se comprobaron también 3 concentraciones de transferrina.

Inóculo de transferrina. El volumen del inóculo de transferrina fue determinado previo ensayo en la vía intranasal. Se determinó como óptimo el volumen de 50 µl de transferrina disuelta en PBS. El dato fue resultado de un ensayo en el que se probaron simultáneamente 2 volúmenes (50 y 100 µl) y 3 concentraciones de

Material y Métodos

transferrina (50, 100 y 400 $\mu\text{g/ml}$). En la Tabla 4 se muestra la distribución de volúmenes y concentraciones de transferrina por lotes de ratones.

Concentración de transferrina	Grupo 1	Nº ratones	Grupo 2	Nº ratones	Control
	(50 μl)		(100 μl)		(sin inocular)
50 $\mu\text{g/ml}$	50	10	100	10	10
100 $\mu\text{g/ml}$	50	10	100	10	10
400 $\mu\text{g/ml}$	50	10	100	10	10

Tabla 3. Distribución de volúmenes y concentración de transferrina para el ajuste de transferrina.

Se utilizaron un total de 90 ratones de las condiciones descritas de peso y sexo que fueron distribuidos en dos grupos, según volumen, más un tercero, no inoculado, que actuó como control. Los animales fueron mantenidos en observación 1 semana. En los diferentes lotes fueron recogidos los signos clínicos aparecidos.

La dosis con un volumen de 50 μl y con una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ fue con la que se obtuvieron los mejores resultados, decidiéndose su utilización en los experimentos siguientes. Las concentraciones menores fueron definidas como insuficientes, mientras que las concentraciones mayores provocaban un espesamiento del inóculo de consecuencias graves o letales para los animales. A la dosis elegida, los animales no sufrían alteraciones evidentes. La preparación de la transferrina lo fue, inicialmente, de una solución madre a una concentración de 1,15 mg/ml y de un volumen de 4 ml. A partir de esta solución madre se prepararon las concentraciones de prueba. Las concentraciones manejadas fueron las siguientes:

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen solución inicial de transferrina (μl)	Volumen de PBS (ml)	Final (ml)
50	171,9	3,826	4
100	347,8	3,652	4
400	1400	2,600	4

Tabla 4. Preparación de concentraciones de transferrina

Inóculo bacteriano. Como en el caso anterior, la determinación del volumen óptimo para incluir la dosis subletal de *A. pleuropneumoniae* fue objeto de un ensayo inicial de ajuste, en el que se probaron 3 volúmenes diferentes por vía intranasal: 25, 50 y 100 μ l. Para la determinación se utilizaron lotes de 10 ratones más los correspondientes controles, que fueron inoculados con PBS, según se señala en la tabla siguiente, decidiéndose (como en el caso de la transferrina) la utilización de un volumen de 50 μ l en los ensayos posteriores:

Volumen Inóculo (μ l)	Ratones	Controles inoculados PBS	Observaciones
25	10	5	Escaso volumen.
50	10	5	Respiración normal. Acceso y recuento fácil.
100	10	5	Respiración poco normal.

Tabla 5. Inóculo bacteriano. Determinación del volumen más idóneo

3.15.3. Vía de infección.

Se utilizó la vía intranasal, que es la vía habitual de infección en el cerdo, el hospedador natural de *A. pleuropneumoniae*. Esta vía fue practicada con ayuda de una micropipeta de 200 μ l.

Para la aplicación de anticuerpos monoclonales, en los estudios de depleción de neutrófilos, se utilizó la vía intraperitoneal. Esta vía fue practicada con ayuda de jeringuillas de insulina de 1 ml de volumen, realizando la punción en la parte izquierda de la línea media del abdomen del animal.

3.15.4 Preparación del inóculo bacteriano

Se utilizó la cepa CM5, del serotipo 1. La cepa fue sembrada en ágar chocolate comercial (Biomérieux) a 37°C durante 24 horas, resuspendiendo el crecimiento en medio RPMI 1640 (Gibco) e incubando durante 8 horas, preparando después una serie de diluciones utilizando el mismo medio, para poder así obtener la dosis de inoculación: 5×10^6 ufc. A partir de los viales alicuotados mantenidos en congelación, se procedía primero a descongelar y después a sembrar en PPLO enriquecido con extracto de levadura mas NAD incubando a 37° C durante 18 horas. Se realizó una resiembra en el mismo medio de cultivo recogiendo al cabo de 8 horas y resuspendiéndola en RPMI

(suspensión inicial). En este medio los microorganismos se mantuvieron el tiempo suficiente (18 horas) para que, una vez disponibles los datos del recuento, mediante diluciones decimales en el mismo diluyente (RPMI), pudiera ajustarse la dosis de infección a la dosis subletal en un volumen de 50 µl. Como se ha señalado antes, el medio de cultivo utilizado para el recuento fue PPLO enriquecido con extracto de levadura, glucosa y NAD.

3.15.5 Infección

El volumen de inoculación vía intranasal en la aplicación de la suspensión bacteriana de *A. pleuropneumoniae* fue de 50 µl por ratón. Para facilitar la infección natural, se utilizó el acceso directo al aparato respiratorio mediante la instilación nasal del microorganismo, dispensada con la punta fina para la micropipeta de 200 µl procediendo a introducir el inóculo directamente en la fosa nasal del animal, aprovechando el momento de la inspiración para hacerla penetrar, introduciendo además 5 µl de solución salina en la fosa nasal, con el fin de arrastrar la parte del inóculo que pudiera quedar depositada en las fosas nasales.

3.15.6. Evaluación de la infección

El primer paso fue determinar las condiciones óptimas en las que se pueda prolongar, hasta el máximo posible, la infección del ratón NMRI por *A. pleuropneumoniae*.

En este sentido, para facilitar la infección natural, se manejó el acceso directo al aparato respiratorio mediante la instilación nasal del microorganismo. En cada experimento se ajustó siempre la dosis inicial de ufc/ml realizando un recuento en placa de la suspensión inoculada, con el fin de comprobar exactamente la cantidad de bacterias inoculadas en el "tiempo 0" de cada experimento, e inoculando también las diferentes dosis de transferrina una hora antes (-1) de la hora 0.

Los ratones fueron observados diariamente para detectar la presencia de signos de infección, el porcentaje de mortalidad y las lesiones en pulmones. La aparición de recuentos superiores a 5,6989 unidades logarítmicas de unidades formadoras de colonia (ufc) 5×10^5 ufc) fue consideraba indicador de multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en el pulmón.

3.16. Diseño experimental

Aunque el ratón ha sido utilizado como modelo animal para el estudio de la infección por *A. pleuropneumoniae* (más o menos idóneo para el estudio de la infección aguda) parece que resulta poco representativo para la reproducción de la infección crónica, sin embargo es muy válido para la infección aguda, lo que por otra parte parece coherente, si se considera la probada especificidad de este agente por su hospedador natural, el ganado porcino.

En esta parte del trabajo se llevaron a cabo distintos experimentos de prueba consistentes en la inoculación de animales con dosis diferentes de *A. pleuropneumoniae* y de transferrina cargada con hierro con el propósito final de comprobar si la adición de este elemento se traduciría en la prolongación del aclaramiento de la bacteria o en su multiplicación en el modelo animal.

Resumidamente, el estudio incluyó diferentes formas de infección, únicamente la infección, inoculaciones con transferrina e infecciones y finalmente inoculaciones intranasales solo con transferrina. En todos los casos, los grupos testigo fueron administrados con volúmenes idénticos al de prueba, de PBS.

Se llevaron a cabo varios experimentos. En cada uno de ellos se manejaron diferentes grupos de ratones según el propósito y, según éste, se llevaron a cabo muestreos por sacrificio en distintas horas y hasta distintos límites.

3.17. Estudios de supervivencia y/o multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI utilizando diferentes dosis. Influencia de la administración de transferrina sérica porcina.

3.17.1. Estudios de supervivencia y/o multiplicación utilizando únicamente *A. pleuropneumoniae*.

Con carácter general, se pesaron los pulmones de los animales y los recuentos se llevaron a cabo a partir de un triturado de los pulmones en bolsas de plástico estériles para Stomacher, cada una con 2 ml de medio RPMI – 1640. Una vez homogenizado con ayuda de una maza de mortero, se hizo una medición del volumen final (pulmón + RPMI) en tubos estériles, que se centrifugaron a 1000 rpm durante 30 segundos. A partir del sobrenadante se realizaron diluciones decimales sembrando 100 µl de muestra por duplicado en placas de medio agar PPLO + 5% de extracto de levadura + 0,1% de

Material y Métodos

ureasa y 0,025 % de NAD (Sigma), incubando de 18 a 24 h a 37°C, realizando el recuento de ufc/ml por placa.

Experimento	Pruebas	Animales	Infección	
			<i>A. pleuropneumoniae</i>	Punto Horario
1 Ratones NMRI	16	258	Supervivencia <i>A. pleuropneumoniae</i>	0h a 120h
2 Ratones Balb/c	3	48	Supervivencia <i>A. pleuropneumoniae</i>	0h a 168h

Tabla 6. Pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en pulmones de ratones.

En cada tiempo de sacrificio de los ratones, los pulmones fueron previamente analizados anotando las lesiones macroscópicas, y posteriormente para su estudio anatomopatológico se tomaron muestras que se conservaron en formol al 10%.

3.17.2. Estudios con transferrina. Influencia de la administración de transferrina sérica porcina en la supervivencia y multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en el ratón.

Con carácter general, los estudios incluyeron 4 lotes de ratones que se describen a continuación (tabla7) sometiendo a todos a las mismas condiciones experimentales y a la inoculación por vía intranasal.

Grupos Animales	Volumen
Infectados (control de infección)	(Dosis subletal) 50 µl (5 x 10 ⁵ ufc de <i>App</i>)
Infectados y transferrina	50 µl (5 x 10 ⁵ ufc de <i>App</i>) 50 µl (100 µg/ml)
Solo transferrina	50 µl (100 µg/ml)
Control	50 µl (Solo PBS)

Tabla 7. Grupos de animales en estudios con transferrina porcina.

El tiempo total estimado de cada experimento fue de 216 horas (9 días) con intervalos de 24 horas en cada muestreo (por sacrificio), a diferencia de los 2 primeros días en que el intervalo de muestreo fue de 3, 6, 12, 24 y 36 horas y desde aquí, a los 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días. Como pauta general siempre se aplicó la transferrina 2 horas antes de la infección, aunque se incluyeron también otras variaciones, manejando el tiempo de inicio como el tiempo 0, justo en el momento de la infección de los ratones

con la suspensión bacteriana.

Los diferentes lotes fueron observados diariamente, recogiendo signos clínicos y anotando la mortalidad correspondiente. La eutanasia se llevó a cabo mediante dislocación cervical y seguidamente fue practicada la necropsia. A los animales muertos se les procesó del mismo modo.

Brevemente, los ratones se sacaron de las jaulas del armario de flujo, estériles, y se llevaron directamente a la campana de flujo laminar, donde fueron eutanasiados. Se procedió a su disección, por planos, extrayendo los pulmones en condiciones asépticas. Se anotó la presencia, extensión y carácter de las lesiones macroscópicas y se procedió al pesaje individual.

Experimento	# de Pruebas	Animales	A. pleuropneumoniae	transferrina	Punto Horario
1	5	64 ratones NMRI	App	50 µg/ml	0 h a 216 h
2	4	48 ratones NMRI	App	100 µg/ml	0 h a 216 h
3	4	70 ratones NMRI	App	400 µg/ml	0 h a 216 h
4 control (App)	10	160 ratones BALB/c	App	-	0 h a 216 h
5 control (PBS)	1	14 ratones NMRI	PBS	-	0 h a 216 h

Tabla 8. Tres experimentos con distintas dosis de transferrina (50, 100 y 400 µg) para comprobar su influencia en la supervivencia y/o multiplicación de *A. pleuropneumoniae*.

En esta parte de los ensayos de supervivencia los experimentos se manejaron con la aplicación de 3 concentraciones diferentes de transferrina porcina, la suspensión bacteriana de *A. pleuropneumoniae* y su correspondiente grupo control.

En las primeras pruebas de ajuste de la concentración de transferrina se organizaron cinco grupos de ratones: el primero fue infectado con la cepa CM5 de *A. pleuropneumoniae* solamente (control de infección); el segundo recibió por la misma vía 50 µl de transferrina porcina saturada con hierro 50 µg/ml; el tercero fue inoculado con 100 µg/ml de transferrina (en el mismo volumen de 50 µl) y el cuarto con 400 µg/ml en un volumen idéntico (50 µl). En los tres casos, la transferrina fue suministrada en una dosis única 2 h antes de la infección. El quinto grupo fue inoculado únicamente

con PBS (control ni infectado ni tratado con transferrina).

Los ratones infectados que no recibieron transferrina fueron sacrificados en diferentes intervalos de tiempo tras la inoculación, normalmente cada dos o cuatro horas. El seguimiento de este lote se prolongó durante cuatro días. Los animales pertenecientes al grupo infectado e inoculado con transferrina fueron sacrificados en intervalos mayores. En este experimento, la observación se mantuvo cuatro días y medio y, a partir de los resultados obtenidos, las observaciones se ampliaron más tiempo, con el fin de conocer durante cuánto tiempo más sobrevivían las bacterias inoculadas.

Después de conocer los resultados de estos cinco grupos de prueba se incorporó un nuevo experimento administrando, en las mismas condiciones descritas, 100 µg de transferrina a ratones BALB/c nude SPF, que posteriormente fueron infectados con una dosis subletal de *A. pleuropneumoniae*.

3.18. Estudio de la actividad anticomplementaria y su influencia en la infección murina por *A. pleuropneumoniae*

3.18.1 Estudio de la implicación del complemento en la susceptibilidad o resistencia frente a *A. pleuropneumoniae* en el modelo murino

3.18.1.1 Anestesia y eutanasia

Se realizó como en el estudio de supervivencia (ver apartado 4.13.1)

3.18.1.2 Veneno de Cobra

Para la descomplementación del suero de los ratones se utilizó veneno de cobra *Naja* (Sigma, St. Louis MO, USA) administrado por vía intraperitoneal.

3.18.1.3. Preparación del veneno de cobra

Para la preparación de la solución madre de veneno de cobra, se utilizó 1 mg de veneno de cobra (*Naja haje*, Egyptian cobra) suspendido en 5 ml de PBS de pH 7,4, centrifugando a 5000 rpm durante 20 minutos, a fin de eliminar impurezas, distribuyéndose en alícuotas de 0,2 ml en tubos eppendorf y mantenidos a -20°C. En el momento de ser utilizadas fueron descongeladas y reconstituidas con 1,8 ml de PBS para preparar las diluciones del veneno.

Como dosis de referencia del veneno de cobra se utilizó la DL₅₀ que asciende a 1,75 mg/kg de peso ratón (Norris, 1989), preparándose con ésta las diluciones utilizadas en las diferentes pruebas.

3.18.1.4. Dosis letal (DL₅₀) y subletal (DSL) del veneno de cobra.

Con el mismo protocolo descrito en el apartado 4.13.4., y a partir de la DL₅₀ de referencia y confirmada, se determinó la dosis subletal (DSL) definida como una dosis óptima final en la que logrando la descomplementación del animal, se conseguía mantener con vida a todos los animales a las 48 h post-inoculación.

La prueba se realizó con un total de 24 ratones como se ha indicado, el propósito fue confirmar la DL₅₀ de referencia utilizada por Norris (1999), mediante el método de Reed y Muench (1938), definiendo, además, una dosis subletal (entre la mínima efectiva y la máxima de tolerancia aparente) y una dosis de mantenimiento, para el tratamiento de los animales en los diferentes puntos horarios.

Se prepararon 5 concentraciones de veneno de cobra (Tabla 8), ensayando cada una en lotes de 6 ratones, inoculando cada ratón NMRI (hembras de 30 g) con 200 µl por vía intraperitoneal. La toxicidad del veneno fue corroborada en términos de DL₅₀ según Reed y Muench. Se utilizaron controles inoculados con PBS.

	Concentración	Dosis y Volumen final
1	0,01875 mg/kg	13,39 µl + 86,61 µl PBS
2	0,0375 mg/kg	26,78 µl + 173,22 µl PBS
3	0,0525 mg/kg	37,5 µl + 162,5 µl PBS
4	0,0750 mg/kg	53,5 µl + 146, 5 µl PBS
5	0,0900 mg/kg	64,2 ml + 135,8 ml PBS

Tabla 9. Preparación de las cinco dosis del veneno de cobra, inoculando 200 µl por cada ratón NMRI.

Los animales fueron mantenidos en observación durante un periodo de 48 horas registrándose diferentes síntomas y el número de muertes por cada dosis. Los animales del grupo control se inyectaron con 0,200 µl de PBS utilizando la vía intraperitoneal.

3.18.1.5. Descomplementación del suero de los animales.

Para la descomplementación del suero de los animales, la inoculación del veneno de cobra se llevó a cabo siempre antes de la infección con *A. pleuropneumoniae*

Material y Métodos

en diferentes tiempos, dependiendo del grupo de estudio.

Las dosis de veneno cobra utilizadas, para la dosis inicial de tratamiento y en su caso, dosis de mantenimiento (hasta 3 dosis de mantenimiento en algunos grupos), se recogen en la tabla 10.

<i>Concentración</i>	<i>Aplicación</i>
0,0375 mg/kg = 26,78µl + 73,22µl PBS	Dosis inicial (sub-letal)
0,0187 mg/kg = 13,39µl + 86,61µl PBS	Segunda aplicación (1er mantenimiento)
0,0187 mg/kg = 13,39µl + 73,22µl PBS	Tercera aplicación (2º mantenimiento)
0,0187 mg/kg = 13,39µl + 86,61µl PBS	Cuarta aplicación (3er mantenimiento)

Tabla 10. Dosis de inicio y mantenimiento de Veneno de Cobra (VC).

3.18.1.6. Preparación e infección con *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

El modo de preparación de la suspensión bacteriana se describe en el capítulo anterior. Se utilizó siempre una dosis infecciosa de 5×10^5 ufc de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 en un volumen por dosis de 50 µl.

La inoculación de *A. pleuropneumoniae* fue por vía intranasal, anestesiando con halotano durante 18 segundos, esperando a que el animal aspirara los 50 µl y esperando después a que se reincorporase el ratón.

Los pulmones de muestra se tomaran por medio de la técnica de disección de planos, piel, músculo y cavidad torácica, con instrumental estéril.

3.18.2. Estudios de supervivencia y/o multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en ratones, utilizando veneno de cobra.

La metodología para producir la infección en los animales de laboratorio se adaptó al modelo experimental descrito en apartados anteriores.

Utilizando la misma cepa de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, una vez descongelada y controlado su crecimiento, quedó lista para la inoculación de los respectivos grupos de animales.

En todos los lotes, se anotaron todos los signos clínicos observados. La eutanasia

se llevó a cabo mediante dislocación cervical y seguidamente fue practicada la necropsia. Una vez efectuada la extracción de los pulmones en condiciones asépticas, en una cabina de flujo laminar, se anotó la extensión y distribución de las lesiones visibles macroscópicamente y se pesó este órgano, antes de proceder a su macerado. A los animales muertos se les procesó de igual modo.

A continuación, los pulmones fueron introducidos en una bolsa de “Stomacher” estéril, junto con 2 ml de medio RPMI 1640, y triturados con la ayuda de una maza de mortero. Posteriormente, este material fue transferido a un tubo de centrifuga y, una vez calculado el volumen final correspondiente al pulmón y al medio de cultivo, se realizó una centrifugación para recoger el sobrenadante, a partir del cual se efectuaron las diluciones decimales correspondientes. Por último, se sembraron 100 µl de cada dilución y animal muerto o sacrificado, por duplicado. El recuento bacteriano se llevó a cabo a las 24 horas de la incubación. Se utilizó medio RPMI 1640 para las diluciones y, como medio de siembra, ágar PPLO (Difco) suplementado con un 5 % de extracto de levadura, un 0,025 % de NAD y un 0,1 % de glucosa.

La administración de dosis de veneno de cobra con la que fueron descomplementados los diversos grupos de ratones lo fue por vía intramuscular en un volumen de 100 µl. Durante el tiempo de observación, se llevó a cabo un recuento del número de muertos y supervivientes. Los síntomas que se recogieron a lo largo del experimento fueron síndrome febril, caracterizado por apatía, pelo erizado y temblores, comenzando estos síntomas a partir del primer día post-infección.

Se manejaron 6 grupos de ratones por experimento, que podían agruparse en 3 niveles que incluyeron 2 grupos controles (E y F) y 4 de prueba (A, B, C, D) con un total de 24 animales por tiempo (a razón de una media de 3 animales por punto horario).

- 1) Grupo inoculado con *A. pleuropneumoniae* y veneno de cobra.

De este grupo (grupo de prueba) se plantearon 4 versiones, modificadas en función de la pauta de administración del veneno de cobra y mas repeticiones de mantenimiento, según el caso (ver después). (A, B, C, D).

- 2) Grupo inoculado solo con *A. pleuropneumoniae* (E).
- 3) Grupo inoculado solo con veneno de cobra (F).

El tiempo estimado de cada experimento fue de 7 días, con intervalos de 24

Material y Métodos

horas entre cada muestreo. Se consideró tiempo 0 horas el momento de la inoculación de los ratones con *A. pleuropneumoniae*.

Se llevaron a cabo un total de 3 experimentos con los siguientes inóculos de *A. pleuropneumoniae*: **Grupo A:** En la hora 0, exclusivamente, inoculación de veneno de cobra y la dosis infecciosa de *A. pleuropneumoniae*. **Grupo B:** 12 horas antes de la infección, inoculación de la primera dosis de veneno de cobra. Dosis de mantenimiento del veneno de cobra en las horas +12, +28,+40 y +52. **Grupo C:** Previo a la infección, se administró una primera dosis de veneno de cobra pre-infección 40 horas antes (-40) y dosis de mantenimiento de veneno de cobra en las siguientes horas antes de la infección: -28 y -16 h. Después de la infección, volvieron a administrarse nuevas dosis de mantenimiento en las horas +12 y +52 post-infección. **Grupo D:** Previo a la infección, primera dosis con veneno de cobra a las -24h y 2 dosis de mantenimiento en las horas -20 y -12. Después de la infección nuevas dosis de mantenimiento en las horas +16, +28 y +52 post-infección. **Grupo E:** control supervivencia de *A. pleuropneumoniae*, infección con *A. pleuropneumoniae* en la hora cero. No hay administración de veneno de cobra. **Grupo F:** Control veneno de cobra: primera dosis a -40h y dosis de mantenimiento en las horas -36, -28 y -16. Nuevas dosis de mantenimiento en las horas 0 y +12.

Grupo/Horas	infección							Tratamiento							
	40 h	36 h	28 h	24 h	20 h	16 h	12 h	App	Veneno	hora 0	12 h	16 h	28 h	40 h	52 h
A								App	vcb						
B							vcb	App		vcb		vcb	vcb	vcb	vcb
C	vc		vcb			vcb		App		vcb					vcb
D				vc	vcb		vcb	App			vcb	vcb			vcb
E								App							
F	vc	vcb	vcb			vcb			vcb	vcb					

Tabla 11. Calendario de infección con *A. pleuropneumoniae* e inoculación de veneno de cobra. **VC:** inoculaciones con veneno de cobra, primera dosis (0,0375 mg/kg de peso). **Vcb:** segunda inoculación de veneno de cobra (0,0187 mg/kg de peso).

3.18.3. Recuento general de *Actinobacillus pleuropneumoniae* con inoculaciones de veneno de cobra en diferentes puntos horarios.

Se llevaron a cabo 3 experimentos con 6 grupos de 24 ratones cada uno (hembras de 30 gr) NMRI. La inoculación de *A. pleuropneumoniae* fue por vía

intranasal, con una concentración de $(5 \times 10^5 \text{ ufc})$, dejando 10 segundos de respiración, esperando a que se reincorporara el ratón. Los animales inoculados se mantuvieron separados por lotes en diferentes jaulas marcadas por grupos.

Experimento / Horas	UFC/ml	4h	28h	52h	76h	100	124h	148h	172h
1) A,B,C,D,E									
2) A,B,C,D,E									
3) A,B,C,D,E									

Tabla 12. Recuento de tres experimentos en ratones NMRI (hembras 30 g) inoculados con dosis subletales de *A. pleuropneumoniae* y tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 a 172 h. Total por grupo n=24; por punto horario=3 animales.

3.19. La inmunidad innata celular en la resistencia a la infección por *A. pleuropneumoniae*. Influencia de los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) en la supervivencia y/o multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en el ratón

El estudio pretende analizar la respuesta celular innata frente a la infección por *A. pleuropneumoniae* determinando los cambios acaecidos en las células periféricas de la serie blanca en particular en relación con los PMN y monocitos.

3.19.1 Animales de experimentación utilizados

En los ensayos de producción de anticuerpos monoclonales, se utilizaron ratones atímicos “*inbred*” BALB/c, nude SPF (Charles River, Wilmington, Barcelona, España)

3.19.2 Anticuerpo monoclonal frente a neutrófilos (PMN) de ratón

Se utilizó el anticuerpo monoclonal Ly-6G (clon RB6-8C5) previamente descrito por Hestdal *et al.*, 1991. El hibridoma productor fue amablemente proporcionado por el Dr. Ignacio Rodríguez Barbosa; con su ayuda se pudo llevar a cabo el estudio de caracterización de las poblaciones de neutrófilos y eosinófilos presentes en la fracción de células polimorfonucleares de sangre periférica de ratón (Tepper *et al.*, 1992). Para su obtención, los hibridomas se inocularon en 10 ratones atímicos desnudos (“*inbred*” BALB/c, nude) de 8 semanas de edad.

Inicialmente, el criotubo conteniendo el hibridoma se extrajo del nitrógeno líquido y se sumergió inmediatamente en un baño maría a 37°C, manteniéndole en agitación suave hasta su descongelación. Posteriormente las células fueron diluidas añadiendo 50 ml de medio de cultivo RPMI 1640, centrifugando a 1000 rpm durante 10 minutos, repitiendo el lavado dos veces. Se estimó la viabilidad celular (mediante un control por tinción vital con azul tripán) y se propagaron en frascos de 75 ml (TPP) conteniendo 25 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 200 mM de L-Glutamina, antibióticos y fungistáticos (penicilina 1.000 UI/ml, estreptomycin 0,2 mg/ml y anfotericina B 0,25 mg/ml) (Invitrogen). Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera con 5 % de CO₂.

Con anterioridad a la inoculación del hibridoma, los animales fueron inoculados con 500 µl de pristano por vía intraperitoneal, bloqueando de esta manera el drenaje linfático peritoneal, manteniéndoles en reposo durante 10 días. Al cabo de este tiempo, se inoculó a todos por la misma vía, una suspensión que contenía un total de 10⁶ células en un volumen de 300 µl de PBS estéril.

Entre 20 y 30 días después de la inoculación del hibridoma, y dependiendo del volumen abdominal de los animales, se procedió a la extracción del líquido ascítico. Se llevaron a cabo dos extracciones por drenaje, separadas entre 3 y 4 días, dependiendo de las condiciones de recuperación del animal. Se utilizaron agujas de 25 x 1,1 mm y jeringuillas de 1 ml. Después de la extracción los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical.

El líquido ascítico recogido, se mantuvo en reposo 18 h a 4° C y posteriormente fue centrifugado durante 7 minutos a 1.000 rpm, con el fin de sedimentar restos celulares, coágulos de fibrina y el pristano, que posteriormente fueron eliminados por decantación. El líquido sobrenadante fue filtrado por lana de vidrio estéril, adicionando 0,02 % de azida sódica como conservante, distribuyéndolo en alícuotas de 100 µl, que fueron almacenadas a -80° C.

3.19.3. Diseño y desarrollo de los experimentos

Todos los grupos de ratones, tanto en el experimento principal como en los experimentos complementarios, fueron observados hasta un total de 15 días a partir de la fecha de infección. En los días 1, 2, 3, 6, 10 y 15 se procedió al sacrificio (eutanasia)

de animales y toma de muestras de pulmón para el recuento bacteriano y, en su caso, de sangre para la determinación del porcentaje relativo de neutrófilos sobre el total de elementos formes sanguíneos.

3.19.4. Recogida y obtención de muestras

3.19.4.1 Muestras de sangre

3.19.4.1.1. Estudio de neutrófilos. Recuento diferencial directo al microscopio de PMN.

Inmediatamente después de proceder al corte transversal de la vena caudal, se tomaron de 2 a 3 gotas de sangre y se dispusieron en el borde de un portaobjetos, procediéndose a su extensión y tinción por el método de Giemsa (apartado 4.2). Se llevó a cabo un recuento directo y diferencial de las poblaciones celulares en los siguientes días: 4° antes de la infección; el día de la infección (día 0) y, como se ha señalado antes, coincidiendo con el sacrificio para la recogida de los pulmones, los días 1, 2, 3 4, 6 y 15 post infección, refiriendo los datos de un total de 20 campos y expresando el valor final como una media de PMN por campo.

3.19.4.1.2. Estudio de poblaciones celulares.

La sangre total de los ratones fue recogida del plexo venoso orbital, para lo cual los ratones eran anestesiados previamente con isoflourano. Para la extracción se utilizó un microcapilar con EDTA y, la sangre era depositada en un tubo eppendorf conteniendo 15 μ l de EDTA 2,5 mM. Por cada extracción se recogió un volumen de 500 μ l.

3.19.4.1.2.1. Recuento celular directo, al microscopio

Para conocer el número total de neutrófilos viables (PMN) se empleó en colorante azul de tripán al 0,4 % (Sigma). Se tomó una alícuota (10 μ l) de la suspensión celular y se realizó una dilución 1:10 en azul tripán (90 μ l). La mezcla se introdujo en la cámara de Neubauer y se observó al microscopio, contando los neutrófilos presentes en los cuatro cuadros grandes. Se obtuvo la media que, multiplicada por el factor de dilución (10), por 10^4 y por el volumen final de la suspensión celular, proporciona el número de neutrófilos totales por ml.

3.19.4.1.2.2 Separación de células mononucleares (linfocitos y monocitos, PBMC -*Peripheral Blood Mononuclear Cell*-) de sangre periférica

Los PBMC fueron separados de la sangre total mediante un gradiente de Ficoll (Amherstan). La sangre se diluía 1:4 en Dulbecco's PBS (D-PBS; Invitrogen) y después se añadía sobre el gradiente de Ficoll (1 ml), centrifugando a 1800 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente. La interfase (donde se encontraban los mononucleares) se recogió con la ayuda de una pipeta y se lavó 3 veces con D-PBS conteniendo 2 % SFB (suero bovino fetal), centrifugando a 1200 rpm durante 10 minutos. Los PBMC eran, finalmente, resuspendidos en 2 ml de D-PBS 2 % SFB y mantenidos a 4 °C hasta el recuento celular, por citometría de flujo.

3.19.4.1.2.3. Separación de polimorfonucleares neutrófilos (PMN) de sangre periférica

Después de obtener los PBMC, con la ayuda de una pipeta Pasteur se eliminó el plasma diluido y el Ficoll, manteniendo el pellet de eritrocitos y granulocitos en el tubo. Los glóbulos rojos fueron sometidos a una lisis osmótica mediante la adición de 9 ml de agua destilada fría (estéril) durante 30 segundos a temperatura ambiente. El choque osmótico fue frenado mediante la adición de 3 ml de CINA al 3,5 %. Se completó el volumen del tubo con D-PBS 2% SFB y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Tras finalizar la centrifugación, los PMN fueron resuspendidos en 2 ml de D-PBS 2% SFB y mantenidos a 4 °C hasta el recuento celular, por citometría de flujo

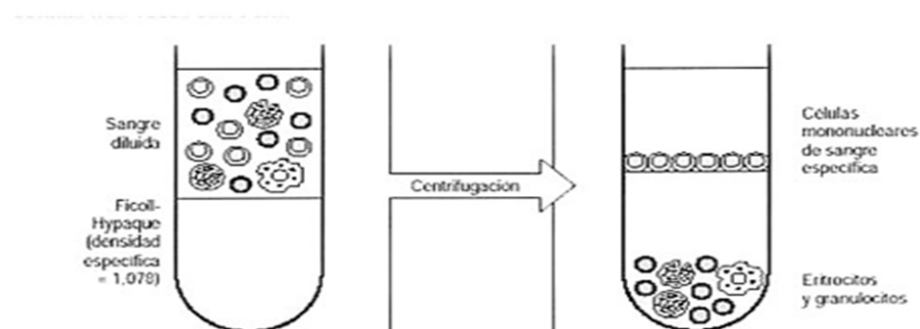


Figura 8. Separación y aislamiento de elementos formes de la sangre (<http://www.bio.us.es/Departamentos/INMUNOLOGIA/Nueva%20carpeta/Secciones.htm>)

3.19.4.1.2.4. Análisis por citometría de flujo.

Marcaje directo con los anticuerpos monoclonales Ly-6G (neutrófilos)

El marcaje se realizó en placas de 96 pocillos con fondo en V (Nunc), añadiendo 5×10^5 células por pocillo. Se centrifugaron a 1200 rpm durante 2 minutos y se eliminaron los sobrenadantes. Las células se dispersaron con ayuda de un homogenizador (MS2 Minishaker IKA) y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C con 50 µl del anticuerpo monoclonal Ly-6G (clon RB6-8C5) marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD-Pharmingen) previamente diluido en tampón FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) (D-PBS, 1% BSA y 0,01% de azida sódica) a razón de 0,2 µg de anticuerpo por 5×10^5 células. Una vez finalizada la incubación, las células se lavaron 3 veces con 200 µl de FACS y después se transfirieron a los tubos de citometría que contenían 400 µl de FACS. A todos los tubos se añadieron 2 µg de yoduro de propídio, para determinar y excluir del análisis las células muertas. Todo el proceso se llevó a cabo de modo independiente, tanto en el caso de monolitos (sobrenadante) como en el caso de granulocitos (pellet) a partir de la sangre obtenida y procesada por gradiente de Ficoll.

Análisis. Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Se empleó el programa CELL Quest® para ajustar los parámetros de adquisición de las muestras. Los datos obtenidos del citómetro fueron analizados en el programa CXP Analysis (Beckman Coulter). Los resultados obtenidos se analizaron con el programa informático GraphPad Prism (versión 5.0) se utilizó la prueba de One-way analysis of variance (ANOVA) y el post test de Tukey's Multiple Comparison Test, para determinar se existían diferencias significativas entre los distintos días pre y post infección. Se consideró que había diferencias significativas cuando el valor de P era inferior 0,05. Se comparó el día pre infección con los días post infección.

3.19.4.2. Sacrificio, toma y procesamiento de muestras de pulmón para el estudio de la supervivencia de *A. pleuropneumoniae*.

A partir de los pulmones de los animales sacrificados mediante eutanasia, de todos los grupos (los días 1, 2, 3, 6, 10 y 15), se procedió al sacrificio (eutanasia) y toma de muestras de pulmón en condiciones asépticas, para llevar a cabo recuentos de *A. pleuropneumoniae*, expresando el resultado en ufc/ml.

3.19.5. Experimentos, pruebas y determinaciones.

Para el estudio de las poblaciones celulares y la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en las poblaciones de ratones después del tratamiento con el anticuerpo monoclonal Ly-6G (anti-neutrófilos), se llevó a cabo un experimento principal y varias pruebas complementarias, según se detalla a continuación.

3.19.5.1. Experimento principal.

Tuvo por objeto el estudio comparado, en 5 grupos (1-5) de 30 ratones NMRI, infectados y tratados (incluyendo controles) en los términos que se señala en la Tabla 13, de la supervivencia de una DSL de *A. pleuropneumoniae* de 5×10^5 ufc (equivalente a 5,6989 log 10 de ufc, en un volumen de 50 μ l, por vía intranasal, mediante el mismo procedimiento descrito en el apartado 4.14. Siempre el momento de infección se consideró el punto de partida del experimento (día 0). El anticuerpo monoclonal Ly-6G se administró por vía intravenosa en un volumen de 300 μ l en los tres días antes de la infección (72, 48 y 24 horas). Después de la infección se administraron 100 μ l los días 2, 6 y 15 (48, 144 y 360 horas). La transferrina porcina cargada con hierro (100 μ g/ml), se administró por vía intranasal en un volumen de 50 μ l y siempre simultáneamente (día 0, 3 horas post-infección) a la infección. Los ratones se mantuvieron en el curso del experimento en racs ventilados con un sistema de flujo de aire filtrado y temperatura controlada (ver apartado 4.11). Todos los animales fueron observados durante en un periodo de hasta 15 días.

Grupo 1 (30 animales)	Administración, por vía intranasal, de una suspensión de 5×10^5 ufc/ml de <i>A. pleuropneumoniae</i> (día 0). Por la misma vía 100 μ g/ml (50 μ l) de transferrina porcina sérica cargada con Fe (día 0). Administración, por vía intravenosa, de 300 μ l del Ac monoclonal antes de la infección (días -3,-2,-1) y 100 μ l post infección (días 2, 6 y 15).	Grupo de Prueba: App + tf + AcMc
Grupo 2 (30 animales)	Administración, por vía intranasal, de una suspensión de 5×10^5 ufc/ml de <i>A. pleuropneumoniae</i> (día 0). Por vía intravenosa, administración de 300 μ l del Ac monoclonal (días-3, -2, -1) y 100 μ l post infección (días 2, 6 y 15).	Grupo de Prueba: App + AcMc
Grupo 3 (30 animales)	Administración, por vía intranasal, de 100 μ g/ml (50 μ l) de transferrina sérica porcina cargada con Fe (día 0). Administración, por vía intravenosa, de 300 μ l del anticuerpo monoclonal (días -3, -2, -1) y de 100 μ l post infección los días 2, 6 y 15	Grupo de Prueba: tf + AcMc
Grupo 4 (30 animales)	Administración, por vía intranasal, de una suspensión de 5×10^5 ufc/ml de <i>A. pleuropneumoniae</i> (día 0).	Control de supervivencia (solo infección)
Grupo 5 (30 animales)	Ratones sin infectar ni tratar; animales utilizados como control general, administrando 100 μ l de PBS por vía intranasal (2, 6 y 15) y 300 μ l de PBS por vía intravenosa (-3, -2 y -1) PBS	Testigo de animales sanos

Tabla 13: Resumen de grupos experimentales en el estudio de PMN en la resistencia murina frente la infección por *A. pleuropneumoniae*.

3.19.5.2. Experimentos y pruebas complementarias.

Se incluyeron las siguientes pruebas y determinaciones:

1) Estudio de la población de **neutrófilos** (porcentaje relativo sobre el total de elementos formes de la sangre) en **ratones tratados con el anticuerpo monoclonal Ly-6G**. Se llevó a cabo en 4 grupos de prueba (A-D) y un control, de 30 ratones cada uno, que fueron inoculados con el anticuerpo monoclonal por vía intravenosa, a razón de 300 μ l antes de la infección (días -3,-2,-1) y 100 μ l post infección (días 2, 6 y 15). Los animales fueron muestreados en lotes de 5, 6 veces a lo largo de los 15 días de duración del experimento, los días 1, 2, 3, 6, 10 y 15. La sangre fue obtenida en las condiciones señaladas anteriormente. Los resultados fueron ofrecidos como una media de cada grupo de 5 animales.

2) Estudio de la población de **neutrófilos** (porcentaje relativo sobre el total de elementos formes de la sangre) en **ratones tratados con el anticuerpo monoclonal Ly-6G y transferrina porcina cargada con hierro**. El tratamiento con el anticuerpo monoclonal fue el mismo que se describe en el apartado anterior. En lo que se refiere al tratamiento con transferrina porcina, se llevó a cabo a razón de 100 μ g/ml de transferrina porcina saturada con hierro, en un volumen de 50 μ l, siempre dos horas antes de la infección. El estudio se llevó a cabo a partir de 6 pruebas realizadas con grupos de 30 ratones, como en el caso anterior, en grupos de 5 animales por cada punto de muestreo, ofreciendo los resultados como una media. Se incorporó, además, un grupo adicional de control, sin tratamiento alguno, que fue objeto de los mismos muestreos que los grupos de prueba.

3) Estudio de la población de **neutrófilos** en un grupo adicional, considerado **control** general, de 30 animales, que fueron muestreados los días 1,2, 3, 6, 10 y 15. Cada día se muestrearon lotes de 5 animales, estableciendo el resultado como una media.

3.20. Preparación de una bacterina de *A. pleuropneumoniae* y su aplicación en un modelo murino experimental con ratones NMRI

3.20.1 Cepa utilizada

Se utilizó la misma cepa del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*, que se ha referido en otros capítulos (CM5).

3.20.2. Hemolisinas (Apx I y II)

La cepa bacteriana se mantenía conservada en congelación profunda (-80° C). Para comenzar el trabajo se siembra una alícuota en agar chocolate o PPLO enriquecidos con 20 mg/l de NAD (Sigma) y se comprueba la ausencia de contaminaciones y algunas características fundamentales, como la dependencia del factor V de coagulación de la sangre, la actividad hemolítica, factor CAMP, producción de ureasa, etc., incluyendo su aglutinación con sueros específicos para ratificar el serotipo. Una vez realizado esto se continúa con el procedimiento.

A partir de crecimiento fresco de 18 h o menos, de una densidad óptica (OD₆₅₀) de 0,1, se inocula en caldo PPLO enriquecido con NAD, isovitalex 1%, extracto de levadura al 10% (Pronadisa) y Cl₂Ca 10 mM. Se incuba en un agitador orbital hasta una OD de 1. Se recoge el crecimiento y a partir de una muestra se preparan diluciones para llevar a cabo el recuento en ufc/ml.

Después de centrifugar a 2.000 rpm durante 5 minutos, se separa el sedimento celular del sobrenadante, se filtra este último y se toma una alícuota para valorar la actividad hemolítica y concentración de proteínas. El *pellet* se resuspende en PBS, previo cálculo de las ufc/ml. Tras este paso inactivamos con formaldehído al 5 ‰ tanto células como sobrenadante, incubando durante 18 h a 37° C.

Después se procede a concentrar el sobrenadante con filtros de ultracentrífuga de 10 KDa y nuevamente se valoran proteína y actividad hemolítica. Paralelamente, se han extraído TbpBs enriqueciendo el sobrenadante con de deoxicolato sódico (DOC) al 0,075 % y se ha procedido a inactivar de la misma forma que antes. Igualmente se concentra con filtros de ultracentrífuga y se valora la concentración de proteína. Para evidenciar la existencia de las proteínas en las que pretendemos enriquecer los sobrenadantes se lleva a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de tinción con azul de Coomassie.

La toxina Apx I es fuertemente hemolítica y la Apx II es débilmente hemolítica. Para cuantificar la presencia de las dos toxinas se utilizó el método de Martin *et al.*, (1985) modificado. Se utilizaron glóbulos rojos de cordero al 5 % (Biomérieux) lavados tres veces en TBS-Ca de pH 7,5 [Tris-CIH 10 mM (Gibco), 0,9% NaCl (Sigma), Cl₂Ca 10 mM (Panreac)] a una concentración del 0,75 %. Para proporcionar el control positivo se mezclaron una parte de hematíes al 1,5 % en tres partes de agua destilada con el fin de obtener una absorbancia a 541 nm del producto de la lisis completa de los mismos. Se practicaron diluciones dobles de los sobrenadantes a valorar en volúmenes de 0,5 ml

y se añadió un volumen igual de glóbulos rojos lavados al 0,75 %. El control negativo se obtuvo disponiendo TBS en vez de la muestra. A continuación se incubaron a 37° C durante 2 horas y posteriormente se centrifugaron durante 10 minutos a 3.000 rpm a una temperatura de 4 °C. Posteriormente se procedió a medir la OD₅₄₁ de cada dilución en el espectrofotómetro (Helios Gamma Thermo Spectronic V. 4.55) utilizando TBS como blanco.

Se definió la unidad hemolítica (UH) como la mínima cantidad de hemolisina capaz de producir la lisis del 50 % de los eritrocitos. En consecuencia, el título hemolítico del sobrenadante de prueba resultará el inverso de la dilución más alta del mismo capaz de producir una hemólisis del 50 % de los eritrocitos presentes en la suspensión. La determinación de la dilución a la que corresponde una hemólisis del 50 % se realiza a partir de los porcentajes de hemólisis inmediatamente anterior y posterior al 50 %, mediante el procedimiento de Reed y Muench (1938).

3.20.3. Sobrenadante enriquecido en proteínas de unión a transferrina (TbpB)

Las proteínas TbpB son proteínas de membrana externa con capacidad inmunógena. El DOC a bajas concentraciones, mantiene la integridad de la membrana a la vez que las proteínas de superficie se liberan en el sobrenadante (Goethe *et al.* 2001). Previamente el cultivo se mantiene con un quelante de hierro (dipiridilo, Sigma) a una concentración de 100 µM al inicio de la fase logarítmica con una OD₆₅₀ de 0,3, con el fin de que estas condiciones induzcan la expresión de las proteínas de unión a transferrina (Tbp). El cultivo se incubó hasta alcanzar una OD₆₅₀ de 1 y en este momento se incorporó el DOC junto con una solución tampón (TRIS-CIH 10mM pH 8) y ClNa 50mM, prolongando la incubación durante media hora a 37°C.

Los valores obtenidos en el caso de hemólisis y Tbps, se resumen a continuación:

- 1) Hemolisinas** (Concentración proteica mediante ultracentrifugación y actividad hemolítica)
- | | |
|---|-----------|
| a) Concentración proteica del sobrenadante | 41 µg/ml |
| b) Actividad hemolítica | 250 UH/ml |
| c) Concentración proteica después de concentrar | 400 µg/ml |

2) Sobrenadantes con deoxicolato (concentración proteica mediante ultracentrifugación de sobrenadantes enriquecidos)

- a) Concentración proteica sobrenadante 120 µg/ml
- b) Concentración proteica después de concentrar 1,3 mg/ml

3.20.4. Cuerpos celulares (Unidades Formadoras de Colonias totales).

El recuento de ufc/ml arrojó un valor de $1,78 \times 10^9$ en el momento de su separación del sobrenadante del cultivo, previa centrifugación.

3.20.5. Inactivación

Como se ha señalado antes, se eligió el formaldehído debido a su interés industrial. Se utilizó una concentración del 5 ‰ incubando 18 -24 h a 37° C.

3.20.6. Formulación vacunal

El preparado vacunal se compuso, definitivamente, de cuerpos celulares y toxinas Apx I y II inactivados, así como de otras proteínas presentes en el sobrenadante, entre ellas de forma especial las TbpB.

Inicialmente se formuló la vacuna considerando al cerdo su destinatario natural incluyendo, por dosis vacunal, 10^9 ufc, 100 µg de hemolisinas (600 UH) y 100 µg de TbpB. Para nuestro estudio en ratón la dosis se fraccionó al 25 % (500 µl) manteniendo las proporciones relativas de todos sus componentes.

Como adyuvante se utilizó: Montanide IMS 2215 N VG PR (Seppic) al 20 %, añadiendo timerosal al 1 ‰ como conservante.

Se dispusieron controles de estabilidad de la emulsión manteniendo dos muestras a temperatura ambiente (la primera) y a 37°C (la segunda) durante 48 h. Además se llevaron a cabo controles de esterilidad, incubando 100 µl en 10 ml de caldo TSB incubándolo a 25°C y el mismo volumen en FTM (Fluid Thioglycollate Medium) incubando a 37 °C durante 14 días, con el fin de detectar la presencia de posibles contaminantes.

3.20.7. Vacunación

Se utilizaron 2 dosis de vacuna separadas 15 días y administradas por vía subcutánea en la región escapular, dos semanas después se llevaba a cabo un desafío

utilizando la vía intranasal con las dos dosis de infección, una letal, de 2.88×10^7 y una dosis subletal, de 5×10^5 ufc Se trataba de comprobar la capacidad de protección de la vacuna frente a la muerte de los animales provocada por el desafío con ambos tipos de dosis (letal y subletal) de *A. pleuropneumoniae*.

Según se recoge en la Tabla 15, se establecieron por tipo de infección (letal y subletal) 3 grupos de animales en el experimento. Cada grupo estuvo integrado por un total de 30 animales (ratones NMRI de 30 g de peso) según se recoge en la Tabla 15. En la Tabla 16 se presenta el calendario de vacunación y de obtención de muestras de sangre para el seguimiento.

VI: Grupo de ratones vacunados e infectados
VNI: Grupo de ratones vacunados no infectados (control de vacunación)
NVI: Grupo de ratones no vacunados e infectados (control de infección)

Tabla 14. Diferentes grupos de ratones que fueron vacunados, infectados y tratados. En cada caso, el desafío se llevó a cabo con una dosis letal o subletal, respectivamente.

Días	día 1	día 15	día 29	día 30	día 31	día 32	día 33	día 34	día 35	día 36	día 37	día 38	día 39	día 40
VI	vacuna	vacuna	tf	Infección	Toma de Muestras Sangre (prueba de ELISA)									
VNI	vacuna	vacuna	tf	Infección										
NVI			tf	Infección										

Tabla 15. Calendario de vacunación para 3 grupos de ratones infectados y no infectados con *A. pleuropneumoniae*, tratados con (tf) transferrina porcina y vacunados en un periodo de 40 días.

Un día antes de la infección de *A. pleuropneumoniae* se realizó la inoculación de 100 µg de transferrina porcina sérica por ratón (ver apartado material y métodos 4.14.2.). Todos los datos recogidos (serología, lesiones, síntomas, etc.) se compararon con el grupo control de animales vacunados pero no infectados (VNI).

Se tomaron muestras de sangre por vía intracardiaca, los días de vacunación y revacunación, el día de la infección y durante los últimos 10 días post-infección (1, 2, 4, 6, 8 y 10 días) realizando la prueba de ELISA indirecto (antiglobulina anti-ratón marcada con peroxidasa) (ver apartado 4.9.8.) para determinar la presencia de anticuerpos específicos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Consideraciones Generales

Actinobacillus pleuropneumoniae, objetivo principal de nuestro trabajo, es un miembro de la familia *Pasteurellaceae*, y el agente causal de la pleuroneumonía en la especie porcina. Incluye 15 serotipos que secretan diversas toxinas, principalmente las pertenecientes a la familia de toxinas RTX: ApxI, ApxII, ApxIII, y ApxIV (Schaller *et al.*, 1999; Blackall *et al.*, 2002) a las que se suman el LPS y otros factores de virulencia.

Aunque *A. pleuropneumoniae* es un patógeno con virulencia multifactorial (Fenwick y Osburn, 1986; Inzana y Mathison, 1987; Inzana *et al.*, 1988; Fenwick, 1990; González *et al.*, 1990; Gerlach *et al.*, 1992; Inzana *et al.*, 1993; Dom *et al.*, 1994; Frey, 1995; Reimer *et al.*, 1995) los estudios llevados a cabo por distintos autores coinciden en considerar la implicación principal de las exotoxinas Apx (Inzana *et al.*, 1991; Tascón *et al.*, 1994; Jansen *et al.*, 1995; Reimer *et al.*, 1995; Kamp *et al.*, 1997), considerándose que los serotipos que producen Apx-1 y Apx-II son los más virulentos (Komal y Mittal, 1990; Frey *et al.*, 1994; Frey 1995). Las toxinas Apx son muy inmunogénicas y suelen formar parte de vacunas conjugadas contra la pleuroneumonía porcina, junto a otros antígenos estructurales y proteínas secretadas.

En la actualidad, la mayoría de los brotes de pleuroneumonía porcina suelen ser crónicos, pues el agente circula en las explotaciones generando cierta inmunidad. Se dan brotes agudos coincidiendo con situaciones inmunosupresoras, por errores en el manejo o debido a la presencia de otros agentes primarios.

La pleuroneumonía porcina es una de las enfermedades respiratorias más importantes en la industria porcina (Williams *et al.*, 2000, Huerta *et al.*, 2004), presentando un cuadro agudo con alta mortalidad por neumonía hemorrágico- necrótica; sin embargo, el impacto económico de la enfermedad se centra actualmente en brotes crónicos y más con una disminución de la tasa de crecimiento que puede llegar al 33,6% (Taylor 2002; Assavacheep *et al.*, 2003).

En el diagnóstico son utilizables distintas alternativas, desde el aislamiento, identificación y caracterización de *A. pleuropneumoniae*, a la utilización de recursos moleculares para la detección, como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), o la investigación de la presencia de anticuerpos mediante distintos procedimientos,

principalmente ELISA. Algunos de estos métodos, o todos, son útiles para estudiar la epidemiología del proceso (Klausen *et al.*, 2001).

La utilización del cerdo en estudios experimentales está condicionada y limitada por diversas razones, unas de tipo ético, en relación con el bienestar animal, pero también por problemas de bioseguridad, o por razones económicas, justificadas tanto en el precio de adquisición como en el de alojamiento y mantenimiento de los animales.

Si bien la utilización del hospedador natural es insustituible en determinadas ocasiones, la alternativa que representa un animal de laboratorio permitiría no solo avanzar más rápido en el estudio de los factores de virulencia, críticos en el desarrollo del proceso clínico, sino también facilitar eventualmente una alternativa de gran interés en la valoración de vacunas u otros productos potencialmente útiles en el control de la enfermedad, tanto desde el punto de vista experimental como industrial.

En cualquier caso, desde el punto de vista científico, conocer las claves en que reside la susceptibilidad del cerdo a la infección o la resistencia de otras especies animales representa un desafío de enorme valor, que, una vez resuelto, puede ayudar a prevenir la enfermedad en el primero, o desarrollar modelos experimentales que ayuden en los estudios necesarios para comprender la patogenia de la enfermedad o desarrollar métodos utilizables en el diagnóstico o la prevención.

Además, la disponibilidad de un modelo experimental redundaría también, de modo importante, en otras ventajas, como las que se refieren a cuestiones de bienestar, bioseguridad y coste.

En numerosas ocasiones se ha propuesto el ratón como modelo experimental en la pleuroneumonía porcina, aunque está suficiente contrastado que esta especie sólo resulta adecuada para el estudio de la forma aguda de la enfermedad, sin desencadenarse en él una verdadera infección. En este trabajo pretendemos demostrar que, en determinadas condiciones, los ratones NMRI pueden adaptarse bien a la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* presentando claros síntomas de pleuroneumonía y, sobre todo, permitiendo la multiplicación de la bacteria. La modificación del equilibrio del hierro en el ratón, administrando hierro ligado a la transferrina porcina, permite superar la falta de este oligoelemento en el hospedador experimental, aunque en la resistencia final también participan otros factores, muchos de ellos todavía desconocidos.

4.2. Experimentos iniciales, ajustes previos a los estudios de infección y otros. Observaciones clínicas

4.2.1. Anestesia. Tiempo óptimo de exposición

Se llevó a cabo una determinación del tiempo óptimo de exposición al anestésico halotano, para no comprometer la viabilidad de los animales. A tal efecto, se utilizó un recipiente hermético de desecación en el que se incluía el anestésico y se encerraba el animal objeto del ensayo. En la Tabla 16 se resumen los resultados de tres niveles de exposición, eligiendo la que corresponde entre 15 y 20 segundos (promediando a 18 segundos exactos), para llevar a cabo los experimentos de infección y otros estudios.

Tiempo inhalación	Animales de prueba	ratones anestesiados	ratones muertos	ratones no anestesiados
10-15 segundos	10	Ninguno	Ninguno	Todos
15-20 segundos	10	Todos	Ninguno	Ninguno
20-30 segundos	10	Ninguno (muertos)	Todos	Ninguno (muertos)

Tabla 16. Ajuste del tiempo de exposición al halotano con 30 ratones NMRI (hembras 30 g) en lotes de 10 ratones con diferentes tiempos de inhalación.

4.2.2 Volumen de los inóculos. Elección del volumen de trabajo para inoculación intranasal

En la Tabla 17 se muestran los resultados de un experimento de inoculación que incluyó tres volúmenes diferentes (20, 50 y 100 µl) de una suspensión bacteriana, de transferrina y de PBS, en el que se trataba de comprobar la existencia o no de dificultades ligadas en exclusiva al volumen, por la vía intranasal. Como conclusión, se eligió como volumen de trabajo el de 50 µl.

Volumen	Suspensión bacteriana de <i>A. pleuropneumoniae</i> (dosis subletal)	Transferrina	Placebo (PBS)
20 µl	Sin cambios clínicos	Sin dificultades	Sin dificultades
50 µl	Respiración normal. Sin cambios clínicos. Fácil recuento ufc/ml	Fácil inoculación	Sin dificultades
100 µl	Dificultad al respirar	Difícil aplicación	Problemas al respirar

Tabla 17. Resultados de la inoculación de distintos volúmenes de suspensión bacteriana, 3 diferentes concentraciones de transferrina porcina saturada y PBS, por vía intranasal.

4.2.3 Dosis Letal 50 (DL₅₀)

Se llevaron a cabo un total de 4 experimentos para determinar la DL₅₀ mediante el procedimiento de Reed y Muench. Se utilizaron ratones NMRI de 30 g inoculados por vía intranasal con 6 dosis crecientes de *A. pleuropneumoniae*, desde 5×10^3 a 5×10^8 ufc (Tabla 18). Como resultado de los cálculos correspondientes, la DL₅₀ quedó establecida en $2,56 \times 10^6$ ufc, muy próxima a la descrita por otros autores en la misma especie y raza (DL₅₀, en torno al valor de 10^7 ufc) y por la misma vía (Tascón *et al.*, 1994). Sebunya y Saunders (1982) utilizando ratones de raza *Swiss White* e inoculando, también por vía intranasal (método de Rushton) obtuvieron, con una cepa del serotipo 1, una DL₅₀ de $1,4 \times 10^6$ ufc. Para el serotipo 5, los mismos autores señalaron DL₅₀ de $1,9 \times 10^7$ ufc. Con una cepa del serotipo 9, Van Leengoed y Kamp (1989) establecieron por el mismo procedimiento una DL₅₀ de $6,7 \times 10^6$ ufc. Komal y Mittal (1990) utilizando la vía intraperitoneal y ratones CD-1 obtuvieron valores de DL₅₀ para los serotipos 1 y 5 que oscilaban entre $8,84 \times 10^5$ (serotipo 1) y $3,73 \times 10^7$ ufc, con valores medios de $10,8 \times 10^6$ y $10,5 \times 10^6$ ufc, respectivamente. En el caso del serotipo 2, el valor medio fue de 5×10^8 ufc y en el del serotipo 7, de 2×10^8 ufc. Los mismos autores utilizaron las vías intraperitoneal e intranasal para establecer la actividad letal de *A. pleuropneumoniae*, señalando una mortalidad elevada en las primeras 12 horas post-inoculación, en el caso de los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11. En el caso de la vía intranasal, utilizaron una concentración de 4×10^7 ufc, obteniendo una mortalidad de entre el 75-100 % en el caso de las cinco cepas del serotipo 1 utilizadas. En cualquier caso, conviene señalar también que existe variación en la susceptibilidad de los ratones a la infección; por ejemplo, utilizando ratones ddY SPF, inoculados tanto por vía intraperitoneal como por vía intranasal, con dosis de 5×10^{10} ufc de una cepa del serotipo 2 (Nakai *et al.*, 1984) no se produjeron muertes, ni lesiones macroscópicas y tampoco fueron capaces de recuperar el microorganismo del aparato respiratorio (cavidad nasal, tráquea o pulmones) ni del corazón. Los datos, no solo se corresponden con el citado serotipo sino que, según estos autores, incluyen también cepas de otros serotipos; sin embargo, señalan que la inoculación intraperitoneal de sobrenadantes de cultivo que contenían grandes cantidades de hemolisina indujo lesiones hemorrágicas graves a nivel pulmonar.

El conocimiento de DL_{50} de *A. pleuropneumoniae* en el ratón, utilizando diferentes vías de inoculación, proporciona una valiosa herramienta para la evaluación de la capacidad protectora de posibles inmunógenos, mediante ensayos controlados en el modelo animal. Además, permite llevar a cabo estudios de patogenia y ensayos de eficacia terapéutica, entre otras.

Prueba 1							
dosis	muertos	vivos	proporción	muertos	vivos	Mt/Mt+Vt	%
			muertos	totales	totales		mortalidad
5×10^8	6	0	6\6	18	0	18\18	100
5×10^7	6	0	6\6	12	0	12\12	100
5×10^6	6	0	6\6	6	0	6\6	100
5×10^5	0	6	0\6	0	6	0\6	0
5×10^4	0	6	0\6	0	12	0\12	0
5×10^3	0	6	0\6	0	18	0\18	0
Prueba 2							
dosis	muertos	vivos	proporción	muertos	vivos	Mt/Mt+Vt	%
	muertos	vivos	muertos	totales	totales	Mt/Mt+Vt	mortalidad
5×10^8	6	0	6\6	18	0	18\18	100
5×10^7	6	0	6\6	12	0	12\12	100
5×10^6	3	3	3\6	3	0	3\6	50
5×10^5	0	6	0\6	0	6	0\6	0
5×10^4	0	6	0\6	0	12	0\12	0
5×10^3	0	6	0\6	0	18	0\18	0
Prueba 3							
dosis	muertos	vivos	proporción	muertos	vivos	Mt/Mt+Vt	%
	muertos	vivos	muertos	totales	totales	Mt/Mt+Vt	mortalidad
5×10^8	6	0	6\6	18	0	18\18	100
5×10^7	5	1	5\6	16	0	16\16	80
5×10^6	3	3	3\6	3	0	6\6	50
5×10^5	0	6	0\6	0	6	0\6	0
5×10^4	0	6	0\6	0	12	0\12	0
5×10^3	0	6	0\6	0	18	0\18	0
Prueba 4							
dosis	muertos	vivos	proporción	muertos	vivos	Mt/Mt+Vt	%
	muertos	vivos	Muertos	totales	totales	Mt/Mt+Vt	mortalidad
5×10^8	6	0	6\6	18	0	18\18	100
5×10^7	6	0	6\6	12	0	12\12	100
5×10^6	4	2	4\6	4	0	4\6	30
5×10^5	0	6	0\6	0	6	0\6	0
5×10^4	0	6	0\6	0	12	0\12	0
5×10^3	0	6	0\6	0	18	0\18	0

Tabla 18. Experimento para determinar la DL_{50} utilizando 6 concentraciones diferentes en ratones NMRI (hembras de 30 g). M: animales muertos; Mt: muertos totales = número acumulado de muertos desde la menor concentración a la más alta; Vt: vivos totales = número de vivos desde la mayor concentración a la más baja.

4.2.4 Dosis Subletal (D_{SL})

La dosis subletal se ajustó en aproximadamente 1 unidad logarítmica inferior manteniendo, aproximadamente, el factor multiplicador de la DL_{50} , esto es, en 5×10^5 ufc siendo esta concentración la utilizada en todos los experimentos posteriores,

administrada en un volumen de 50 µl del diluyente (RPMI 1640). Su propósito era impedir la muerte de los animales como consecuencia de los choques, tóxico (Apx) y endotóxico (LPS) y permitir la colonización y posterior infección del aparato respiratorio de los animales, en condiciones adecuadas.

4.2.5. Cuadro clínico. Síntomas y Lesiones

En la parte experimental del trabajo, los animales se infectaron con una dosis subletal (5×10^5 ufc) y fueron inspeccionados diariamente para observar posibles alteraciones clínicas.

Con carácter general, en todos los experimentos, se pudo observar claramente síntomas respiratorios, tanto en los animales que fallecieron, como en algunos de los que sobrevivieron, aunque en estos últimos con menor intensidad.

A las 24 h de la inoculación de los ratones, se observaron en muchos casos algunas de las manifestaciones clínicas (decaimiento y pérdida de su actividad) y a las 72 h en un número elevado de los mismos se constató también erizamiento del pelo y pérdida de brillo, anorexia, etc., y algunos fallecieron.

Otros síntomas incluyeron fatiga, taquicardia, respiración abdominal, etc., todos ellos habituales en una infección respiratoria y que ya han sido descritos en otros estudios con esta misma especie animal (Sebunya y Saunders, 1982). Además, también se observaron animales con conjuntivitis, con párpados cerrados, así como otros síntomas inespecíficos (debilidad generalizada y postración).

Las lesiones macroscópicas observadas en todos los animales infectados eran compatibles con neumonía hemorrágica, con aumento considerable del tamaño pulmonar y en ocasiones adherencias pleurales, observándose áreas de color rojo oscuro en los pulmones. En un 70% de las casos estaban afectados ambos pulmones, mientras que en el resto solo resultó afectado un pulmón, indistintamente derecho o izquierdo. No se pudieron establecer diferencias importantes entre los pesos de los pulmones de los animales de los diferentes lotes inoculados, comparados con los controles. De forma similar a como ha sido descrito (Sebunya y Saunders, 1982), en los ratones fallecidos como consecuencia de las inoculaciones, no se observaron lesiones de pleuroneumonía fibrinosa hemorrágica, como ocurre en el caso del hospedador natural.

En términos patológicos, en particular en los animales fallecidos como consecuencia de la infección, nuestras observaciones coinciden con las descripciones realizadas por Nakai y Jawata (1984) y Jensen y Bertran (1986), que describen cambios similares a los observados en el cerdo infectado, tanto de forma natural como experimental.

4.2.6. Vía de administración

La elección de la vía intranasal para la infección se justifica por su rapidez y sencillez de ejecución, que la hacía especialmente indicada para ser utilizada en el numeroso grupo de animales de nuestro experimento. Los resultados obtenidos por otros autores mediante la administración intranasal del microorganismo (Sebunya y Saunders, 1982^a; Inzana *et al.*, 1988) no difieren de los nuestros, ni tampoco de los de otros investigadores, en este caso obtenidos por la inoculación intraperitoneal (Komal y Mittal, 1990; Rosendal y MacInnes, 1990) más de lo que sería atribuible a la mera utilización de distintas cepas bacterianas y de ratón.

La administración intranasal de la DSL de *A. pleuropneumoniae* produjo una infección que afectó a varios órganos, aunque nosotros estudiamos únicamente los cambios que tuvieron lugar en el pulmón.

En otras investigaciones en las que se han empleado, como en nuestro caso, cepas pertenecientes al serotipo 1 (Komal y Mittal, 1990; Fedorka-Cray *et al.*, 1993), además de haber sido detectado antígeno específico en el pulmón también se ha demostrado, aunque en proporciones mínimas, en otros órganos como el hígado, el corazón y el bazo, datos que igualmente fueron comprobados por nosotros en pruebas iniciales, previas a los experimentos del estudio.

Rioux *et al.* (1998) llevaron a cabo estudios con cobayos y ratones como modelo de infección, utilizando diferentes concentraciones de *A. pleuropneumoniae* del serotipo 1, inoculado intraperitonealmente. No observaron mortalidad en cobayos, pero sí en ratones, aunque solo a partir de dosis de 0,5 ml, con títulos de 4×10^9 ufc. Aparentemente, la muerte sobrevenía por shock séptico, observación que coincidía con datos anteriores que establecían que el modelo ratón sólo serviría para valorar la infección aguda.

4.3. Estudios de supervivencia/ multiplicación de *A. pleuropneumoniae*

4.3.1 Grupo de experimentos con ratones convencionales NMRI dirigidos al estudio de la supervivencia de *A. pleuropneumoniae*, sin modificaciones.

Descripción del primer estudio

En el primer estudio se completaron un total de 16 pruebas (Tabla 19 y Figura 9) valorando la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* (recuentos ufc/ml). En cada prueba se ajustó siempre la dosis inicial de ufc a un valor aproximado a la dosis subletal (en la práctica, entre 4,8808 y 6,0969 log 10 de ufc), realizando un recuento en placa de la suspensión inoculada, con el fin de comprobar exactamente la cantidad de bacterias inoculadas en el "tiempo 0" de cada experimento. Se utilizaron 2 ratones por cada punto horario y en la tabla, el resultado que se presenta es una media del correspondiente a ambos animales, expresado en log 10 de ufc. El tiempo de estudio de la supervivencia se prolongó hasta la anulación de los recuentos (en la práctica, 120 h máximo), obteniendo como resultado que *A. pleuropneumoniae* en dosis subletal era capaz de sobrevivir en el pulmón entre 96 y 120 horas, con un mínimo de ufc. Los datos incluyen el resumen como media de los recuentos de cada punto horario y su representación conjunta.

Prueba / Horario	0	2	6	12	24	28	36	48	72	96	120
1	4,88	5,53	6,60	6,76	4,30	4,17	/	3,00	/	0	0
2	5,20	5,20	4,11	3,91	2,74	0,50	/	0	/	0	0
3	5,30	7,26	7,18	6,73	6,81	/	5,73	4,77	3,27	1,63	0
4	5,39	4,84	4,38	4,37	2,88	0	/	0	/	0	0
5	5,40	4,96	3,71	3,89	4,29	1,77	/	0	/	0	0
6	5,47	5,46	5,23	3,63	1,74	0	/	0	/	0	0
7	5,47	6,58	6,82	6,12	5,98	/	5,84	5,12	4,21	2,20	0
8	5,60	6,62	6,53	6,62	7,70	/	6,56	5,06	4,14	2,17	0
9	5,65	5,72	6,80	6,39	7,54	5,54	/	0	/	0	0
10	5,68	5,43	3,84	3,92	2,60	1	/	0	/	0	0
11	5,69	5,78	5,73	5,41	4,58	/	3,98	3,44	2,38	1,12	0
12	5,78	5,75	5,84	5,91	6,83	/	6,22	5,48	4,39	1,53	0
13	5,84	5,21	5,22	5,03	5,12	/	4,35	4,83	3,72	3,86	0
14	5,90	5,83	5,72	6,24	6,60	/	7,24	6,81	4,30	2,78	0
15	5,95	7,31	7,25	6,14	6,50	/	4,78	3,57	1,01	0	0
16	6,06	6,24	5,55	6,51	5,86	5,90	/	0	/	/	/
Promedio	5,58	5,86	5,66	5,47	5,13	3,58	5,59	2,66	3,43	1,91	0

Tabla 19. Resumen del recuento pulmonar de 16 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae*, en ratones NMRI (hembra 30 g) en un periodo de 0 a 120 días. Valores expresados en log 10 de ufc. /: No se llevó a cabo recuento en ese punto horario; 0: no se obtuvo crecimiento en el recuento.

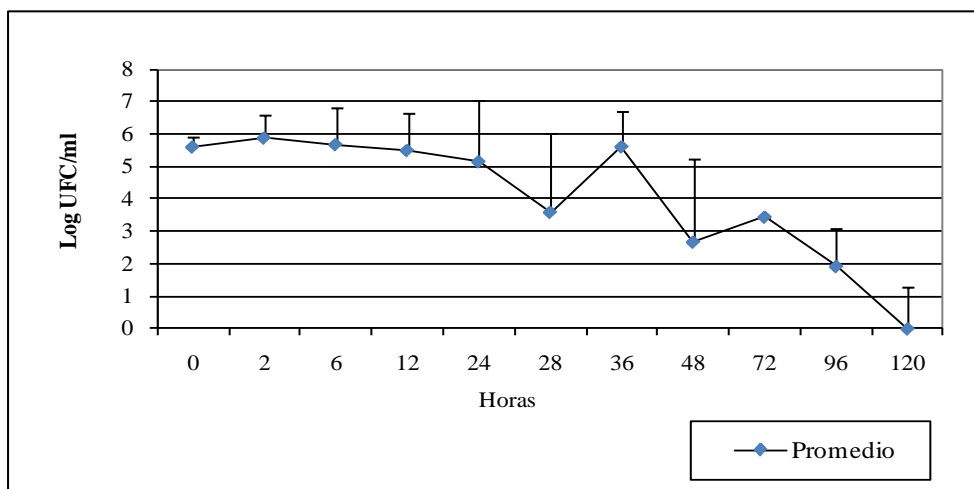
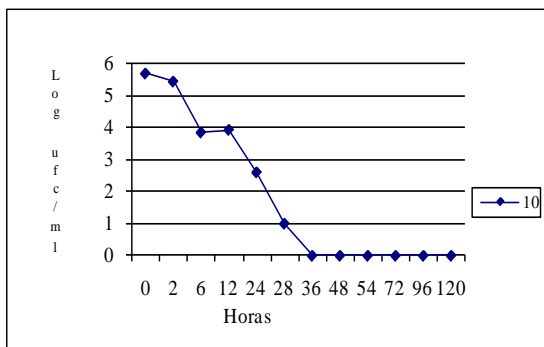
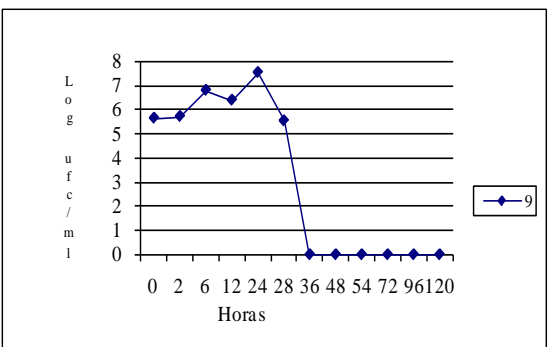
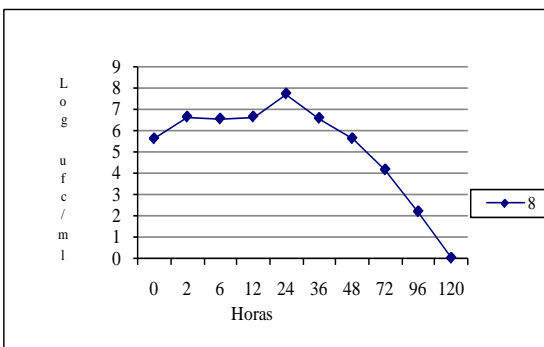
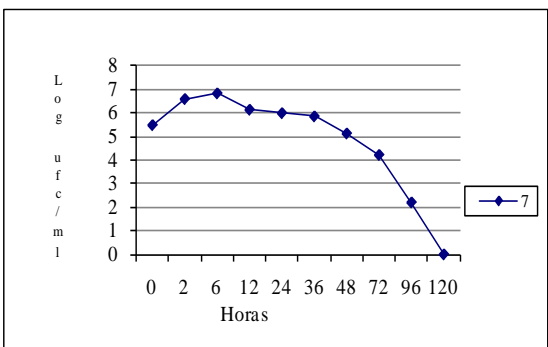
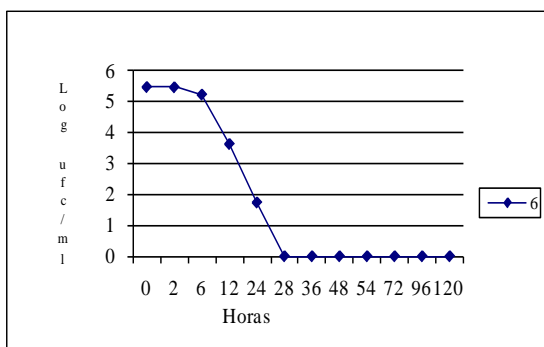
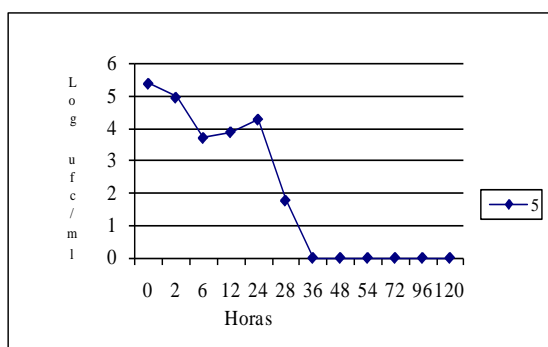
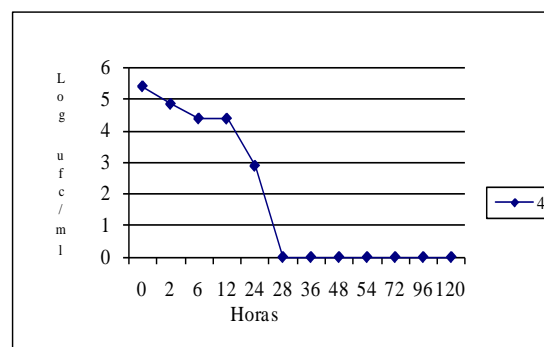
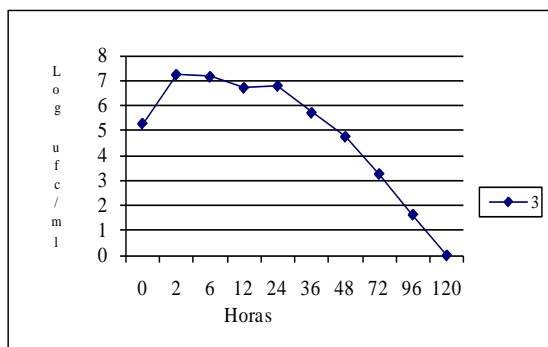
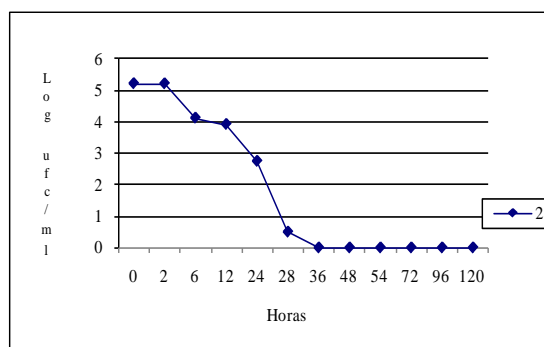
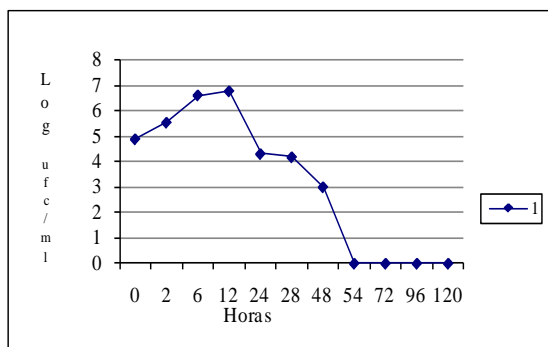


Figura 9. Promedio de 16 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) en un periodo de 0 a 120 h.

Según puede observarse en la Tabla 19, los recuentos se llevaron a cabo en diferentes puntos horarios para determinar la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* desde 0h a 120 h; en concreto a las 2, 6, 12, 24, 28, 36, 48, 54, 72, 96 y 120 h, aunque hay que señalar que como todas las pruebas se realizaron en al menos dos periodos distintos del estudio y se han agrupado para su presentación conjunta, en algunos casos se introdujeron variaciones en los puntos horarios de recuento, que afectaron principalmente a la franja de entre las 28 y las 120 horas, pese a que en todos estos casos existe información de al menos el 50% de las pruebas (8 pruebas) y en el caso concreto de las 48 h, de todos los puntos horarios. Los recuentos positivos se mantuvieron hasta 96 h.

Las siguientes gráficas (Figura 10) corresponden a las 16 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) (en la práctica de 120 h). Puede verse que en no menos de la mitad de los casos el punto crítico son las 28-36 horas, en las que en una proporción importante el recuento cae espectacularmente e incluso se anula. En unos pocos casos se retrasa a las 54-72 horas y en otros el último recuento positivo se produce a las 96 horas, anulándose a las 120 horas, como se ha señalado.

Resultados y Discusión



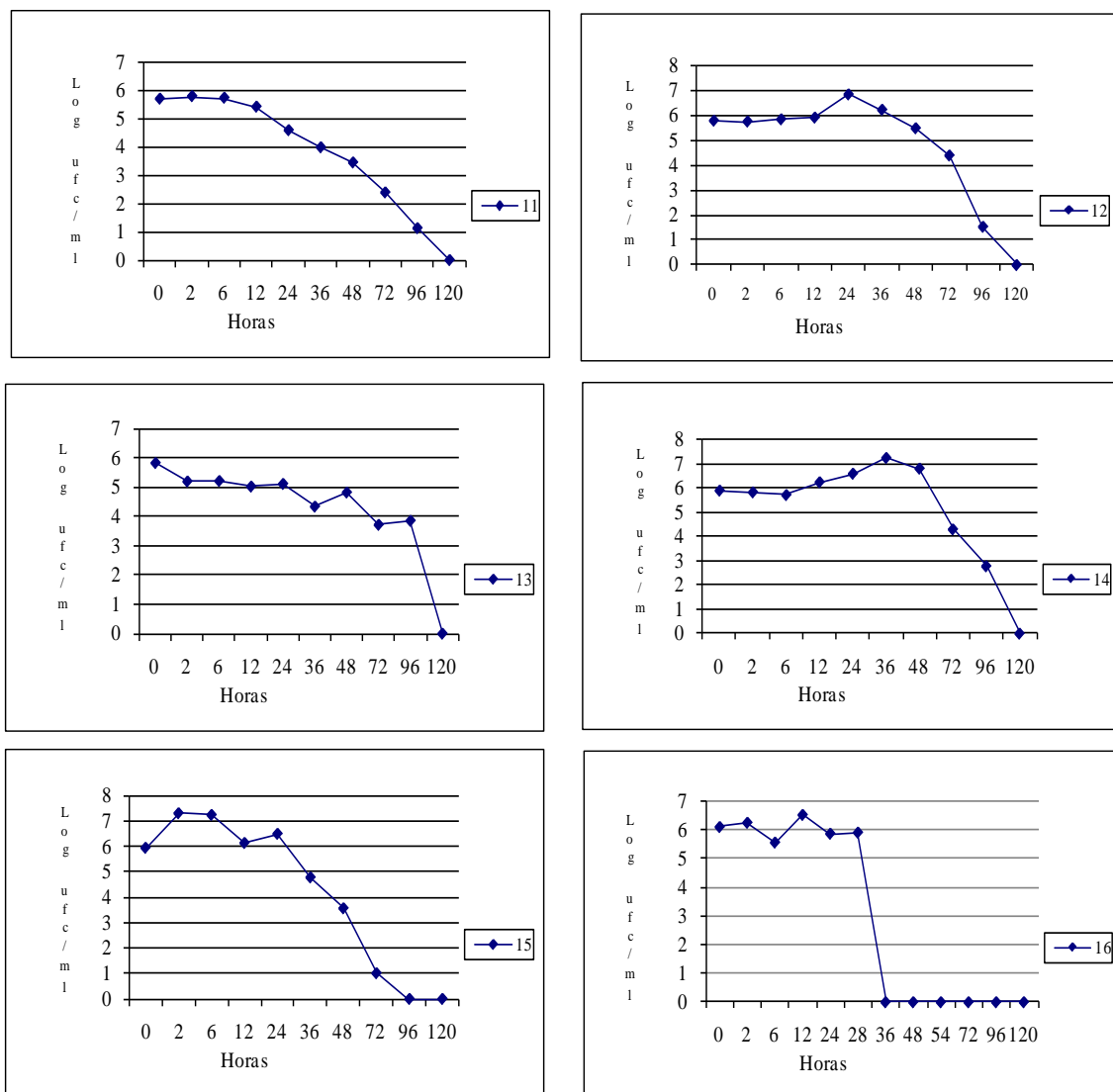


Figura 10. Gráficas individuales de las 16 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI, en la práctica de 120 h.

En un segundo experimento, integrado por 3 pruebas adicionales, se valoró la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones BALB/c SPF inoculados con una dosis subletal (en la práctica, entre 5,4771 y 5,8450 log 10 de ufc) de *A. pleuropneumoniae*, inoculados por vía intranasal hasta la anulación del recuento (en la práctica, 144 h). En la Tabla 20 se relacionan los resultados. Se utilizaron 8 ratones por prueba, a razón de un animal por cada punto horario, comenzando los recuentos a partir de las 12 horas y finalizando a las 168. Puede observarse que en uno de los casos el recuento se anula a las 96 horas, en otro a las 120 y en el tercero, a las 144 horas. En la Figura 11 se representa gráficamente la tendencia seguida por los recuentos medios, observando su descenso claro a las 72 h y la casi anulación a las 96 y 120 h.

	Inoculo								
prueba	tiempo 0	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
1	5,47	4,41	5,66	4,10	3,36	2,80	1,43	0	0
2	5,69	6,45	6,24	5,53	2,45	0	0	0	0
3	5,84	4,41	4,34	5,24	3,69	0,49	0	0	0
promedio	5,67	5,09	5,41	4,95	3,17	1,10	0,47	0	0

Tabla 20. Resumen de los resultados de 3 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones BALB/c SPF (hembras 30g) en un periodo de 12 a 168h. Valores en log 10 de ufc. Se hace constar además que en la prueba 2 existe información de 6 h (5,3573 log 10).

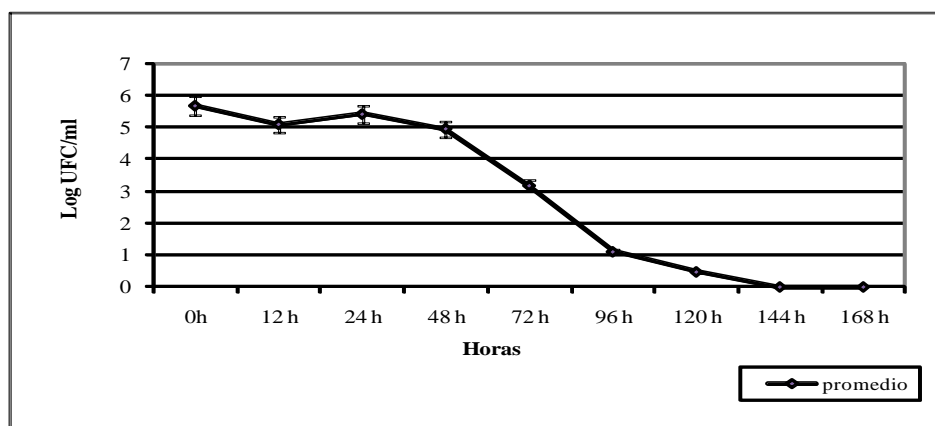
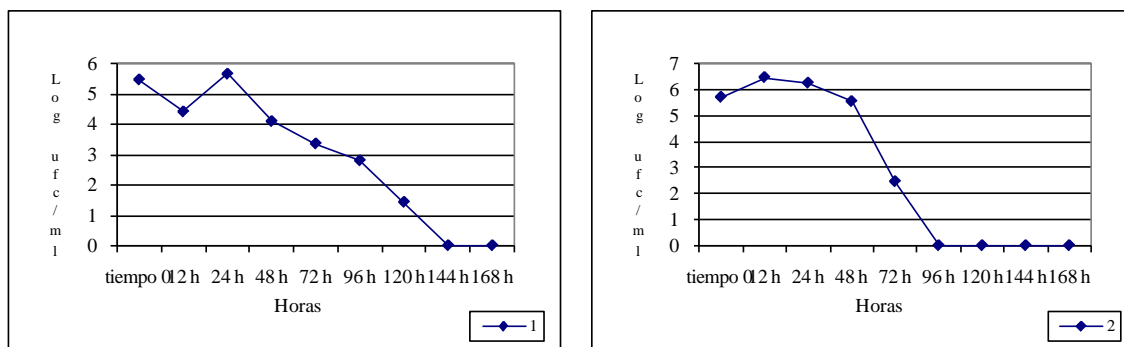


Figura 11. Representación gráfica de los resultados de supervivencia promediode *A. pleuropneumoniae* en tres pruebas, utilizando un total de 24 ratones BALB/c SPF (hembras de 30 g) inoculados en el punto 0 entre 5,4771 y 5,845 log 10 de ufc.

Las graficas individuales correspondientes a las 3 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones BALB/c SPF (hembras 30 g) (en la práctica de 168 h), en este 2º experimento, se recogen en la Figura 12.



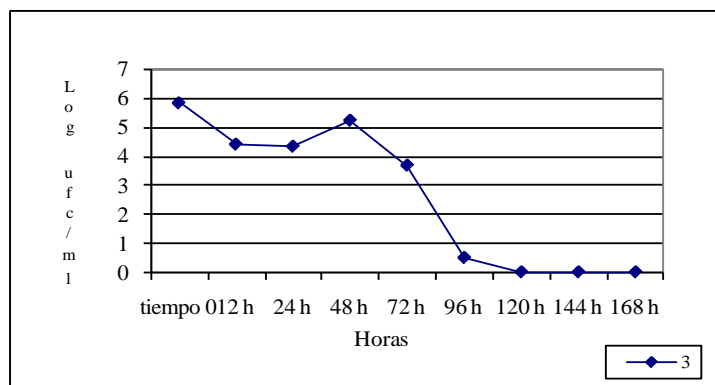


Figura 12. Conjunto de gráficas individuales de tres pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones BALB/c SPF (en la práctica de 168 h)

Síntomas observados: Con carácter general, en los dos experimentos realizados y en todas las pruebas se pudo observar una clara sintomatología respiratoria en los animales que murieron, así como en algunos de los que sobrevivieron, aunque en menor intensidad.

Dentro de los síntomas observados se incluyó síndrome febril, caracterizado por apatía, pelo erizado, falta de apetito, bajo consumo de agua y temblores, acompañado en la mayoría de los casos de conjuntivitis bilateral con párpados cerrados, fatiga, taquicardia, respiración abdominal, así como síntomas inespecíficos (debilidad generalizada, postración y agrupamiento en el fondo de la jaula). Los ratones presentaron síntomas desde las primeras 12 horas hasta las 72 horas.

El grupo control infectado solo con *A. pleuropneumoniae* sin transferrina, presentó síntomas respiratorios, fatiga, taquicardia y en algunos animales se observó conjuntivitis y pelo erizado. En los grupos tratados con transferrina porcina, los ratones presentaron síntomas hasta las 120 horas.

Lesiones: Se localizaron en todos y cada uno de los lóbulos del pulmón (dorsal, ventral y cardíaco). El 70% de los animales presentaron lesiones en todo el pulmón y el resto, solo en la mitad. Se observaron pulmones con focos hemorrágicos, aumento de tamaño, textura suave y fácil de macerar (no fibrosa), adherencias de pleura, zonas de hepatización y nódulos ventrales, pero no se observó la presencia de fibrina.

Las lesiones macroscópicas observadas eran compatibles con neumonía hemorrágica, con aumento del tamaño pulmonar, en ocasiones con presencia de sangre rezumando al corte y abundantes adherencias de pleura.

Todas las lesiones pulmonares que se pudieron observar en los ratones fueron siempre entre las 24 y 72 h, observando una recuperación del pulmón al estado normal en las horas siguientes.

En el 70% de los casos se vieron afectados ambos pulmones, mientras que en los animales restantes sólo aparecía lesionado uno de ellos, indistintamente el derecho o izquierdo; estas lesiones aparecieron en todos los animales infectados. Al realizar el análisis microbiológico de los pulmones durante el curso de la infección se confirmó la presencia de *A. pleuropneumoniae*.

No se detectó ningún tipo de lesión en los ratones que recibieron únicamente transferrina ni en el lote que no sufrió ningún tipo de inoculación. No se pudieron establecer diferencias importantes entre los pesos de los pulmones de los animales de los diferentes lotes.

4.3.2. Análisis y discusión de los resultados de supervivencia de *A. pleuropneumoniae*

El estudio de la supervivencia y, en su caso, multiplicación de *A. pleuropneumoniae*, representa el núcleo principal en el que se fundamenta la hipótesis de trabajo. La base de la discusión consiste en que *A. pleuropneumoniae* no produce una verdadera infección en el ratón, en el que es capaz de producir la muerte, en función de la dosis, en un tiempo de 48 - 72 horas, pero ni sobrevive, ni coloniza, ni se multiplica, al menos de forma importante y estable.

La Tabla 19 recoge los resultados de 16 pruebas realizadas con ratones NMRI. En primer lugar, es destacable que solamente en 7 casos la supervivencia se prolongó hasta las 96 h, anulándose a las 120; próximo a éste, otro caso sobrevivió hasta las 72 h, anulándose a las 96 h. En el resto de las pruebas, la supervivencia fue mucho más reducida: en 2 casos, solamente llegó a las 24 h, anulándose a las 28, en otros 5 casos el último recuento se produjo a las 28 h, anulándose a las 48, y finalmente en un caso sobrevivieron hasta las 48 h, anulándose a las 54.

Se aprecia una discreta relación entre la dosis y la supervivencia, de tal modo que en 5 de los 7 casos que alcanzaron las supervivencias más prolongadas, la dosis de infección se situó en la franja más alta, mientras que en las dos pruebas restantes de este rango de supervivencia, una se situó en el límite de la franja de dosis baja y la última (5,3), en la de dosis intermedia. En relación con las supervivencias más cortas, también se aprecia una discreta relación, pues los dos casos más llamativos (supervivencia de 24 horas) y 2 de los 5 que sobrevivieron hasta las 28 h, se encuentran en la franja de dosis bajas, aunque también resulta paradójico que otros dos de estos últimos casos se correspondan con dosis de la franja alta. Sin embargo, estos casos resultan particularmente extraños, pues los recuentos en ese último periodo antes de la anulación son mucho más altos que la media (5,54 y 5,9 log 10 respectivamente, para una dosis en tiempo cero de 5,65 y 6,09 log 10).

En lo que se refiere a la cadencia de reducción, no es del todo homogénea. Si agrupamos las 16 pruebas en función de la dosis en dos bloques (las 7 primeras pruebas con 4,88 log a 5,47 log 10 y el resto de 9 pruebas desde 5,6 log a 6,09 log 10) puede observarse que en 3 de los 7 casos se produce un aumento de los recuentos 2 horas después de la inoculación, que incluso sigue aumentando en dos de los casos hasta las 6 y/o 12 horas para después iniciar, como los demás, una reducción progresiva. Los cuatro casos restantes de este bloque se caracterizan por una reducción lenta desde el punto cero hasta el final de recuento, sin dientes de sierra apreciables. En lo que se refiere al segundo bloque de pruebas, con inóculos desde 5,6 a 6,09 log 10, también se observan aumentos transitorios de los recuentos a las 2 horas en 5 de los casos, aunque ya a las 6 horas solamente se mantiene la tendencia en una de las pruebas, mientras que el resto va disminuyendo progresivamente, sin saltos, hasta anularse.

El experimento fue repetido utilizando ratones BALB/c SPF en un total de 3 pruebas. Según puede verse en la Tabla 20, los inóculos (DSL) oscilaron entre 5,4 y 5,8 log 10 y la supervivencia se prolongó hasta las 72, 96 y 120 horas, respectivamente. Como había sucedido con los ratones convencionales NMRI, en una de las pruebas se observó un aumento del número de ufc inoculadas en las primeras 12 y 24 horas, para caer a partir de las 48 y dar lugar al caso de mayor precocidad en la anulación de las tres pruebas. Las otras dos siguieron también un comportamiento errático, pues mientras que una produjo claros dientes de sierra, con caída a las 12 horas, recuperación a las 24 y

Resultados y Discusión

nueva caída para mantenerse a partir de las 48 hasta la anulación a las 120 horas, en el caso de la tercera y última prueba el diente de sierra se retrasó hasta las 48 horas, después de caer a las 12 y 24, volviendo a caer a las 72 horas, hasta anularse a partir de las 96 horas. En resumen, el análisis temporal de los resultados de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* (DSL) en el ratón (NMRI, BALB/c y conjunto), pone de manifiesto los siguientes hechos de interés (Tabla 21):

	inóculo	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
16 pruebas con ratones NMRI	5,5851	5,4798 (-0,1053)	5,1334 (-0,4517)	2,6655 (-2,919)	1,7159 (-3,8692)	0,9578 (-4,6273)	0 (-5,5851)	/	/	/
3 pruebas con ratones SPF	5,6737	5,0984 (-0,5753)	5,4176 (-0,2561)	4,9594 (-0,714)	3,1708 (-2,5029)	1,1002 (-4,5735)	0,4775 (-5,1962)	0 (-5,6737)	0 (-5,6787)	/
19 pruebas (conjunto)	5,5991	5,4196 (-0,1795)	5,1781 (-0,421)	3,0277 (-2,571)	2,4463 (-3,1528)	0,9803 (-4,6186)	0,0754 (-5,5237)	/	/	/

Tabla 21. Resumen de los datos más relevantes de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en dos grupos de pruebas llevadas a cabo con ratones (primer grupo de 16 pruebas con ratones NMRI y segundo de 3 pruebas con ratones SPF). Datos expresados del recuento correspondiente en log decimal. Entre paréntesis, diferencia con el inóculo de infección.

I - Por lo que respecta a las 12 horas post-inoculación:

1. El valor medio de los inóculos en la totalidad de las 16 pruebas de supervivencia fue de 5,5851 log 10, siendo de 5,4798 log 10 al cabo de 12 horas, de lo que resulta un descenso medio de 0,1053 log 10.

2. En el conjunto de 16 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* a las 12 post-inoculación, solo 9 (el 56,25% del total) registraron aumento.

3. El valor medio de los inóculos en las 9 pruebas que registraron aumentos fue de 5,6285 log 10 y el promedio (en éstas) a las 12 horas post-inoculación, de 6,3864, de lo que resulta un incremento medio de la población bacteriana (en estas 9 pruebas), de 0,7579 log 10.

4. El cambio de tipo de ratones a BALB/c en un total de 3 pruebas, puso de manifiesto un descenso de la población a las 12 horas post-inoculación, considerada

globalmente, de 0,5735 log 10. Solo en una de las tres pruebas citadas se observó aumento en este periodo de tiempo (0,7593 log 10).

5. Consideradas en conjunto (ratones NMRI y ratones BALB/c) las 19 pruebas de supervivencia, resulta un inóculo medio de 5,5991 log 10 y una población a las 12 horas de 5,4196 log 10, de lo que resulta un descenso de 0,1795 log 10. Si se extraen todas las pruebas en las que se produjeron aumentos (10 en total, 9 con los ratones NMRI y 1 más con los ratones BALB/c, un 52,63%), el incremento promedio a las 12 horas asciende a 0,6581 log 10.

II - Respecto de las 24 horas post inoculación, los datos de mayor interés son los siguientes:

1. En el grupo de 16 ratones NMRI, inoculados con un promedio de 5,5851 log 10, al cabo de 24 horas el promedio de los recuentos ascendió a 5,13364 log 10, de lo que resulta un descenso de 0,45175 log 10. Independientemente, en los ratones BALB/c, sobre el inóculo medio de las tres pruebas (5,77206737 log 10), el recuento promedio al cabo de 24 horas fue de 5,29424176 log 10, lo que supone un descenso de 0,47782561 log 10. Si se lleva a cabo el cálculo conjuntamente (19 pruebas, ratones NMRI y ratones BALB/c) resulta que al cabo de 24 horas se pasa de un promedio inoculado de 5,5991 log 10 a 5,17821 log 10, que supone un descenso de 0,42109 log 10.

2. Si se extraen solamente aquellas pruebas que produjeron aumentos, resulta que en el primer grupo de 16 pruebas, solo se produjeron aumentos al cabo de 24 horas en un total de 7 (se pierden 2 pruebas respecto de las 12 horas), que representaría el 43,75%, siendo de 9 (47,37%) si se consideran las 19 pruebas conjuntamente (ratones NMRI y BALB/c). De igual modo, el análisis de los aumentos en el primer grupo de 7 pruebas representa una diferencia de 1,1878 log 10 (5,6683 a 6,8561), que pasa a ser de 0,9725 log 10 si se consideran las 9 pruebas con aumentos (NMRI y BALB/c; 5,6831 a 6,6556 log 10).

III - A las 48 horas post-inoculación, los datos más relevantes se resumen a continuación:

1. En el grupo de 16 ratones NMRI, inoculados con un promedio de 5,5851 log 10, al cabo de 48 horas el promedio de los recuentos ascendió a 2,6655 log 10, de lo

que resulta un descenso de 2,9196 log 10. Independientemente, en los ratones BALB/c, sobre el inóculo medio de las tres pruebas (5,77206737 log 10), el recuento promedio al cabo de 48 horas fue de 4,9594 log 10, lo que supone un descenso de 0,8126714 log 10. Si se lleva a cabo el cálculo conjuntamente (19 pruebas, ratones NMRI y ratones BALB/c) resulta que al cabo de 48 horas se pasa de un promedio inoculado de 5,5991 log 10 a 3,0277 log 10, que supone un descenso de 2,5714 log 10.

2. Si se extraen solamente aquellas pruebas que produjeron aumentos resulta que en los dos grupos de pruebas (16+3=19), solo se produjeron aumentos al cabo de 48 horas en un total de 2 (se pierden 5 pruebas respecto de las 24 horas en el grupo de 16 y las dos en el grupo de 3 pruebas con ratones BALB/c), lo que representaría el 10,5%. De igual modo, el análisis de los aumentos en el primer grupo de las 2 pruebas representa una diferencia de 0,502 log 10 (5,7525 a 6,2545).

IV - A las 72 horas post-inoculación, los datos de mayor importancia se resumen a continuación:

1. En el grupo de 16 ratones NMRI, inoculados con un promedio de 5,5851 log 10, al cabo de 72 horas el promedio de los recuentos ascendió a 1,7159 log 10, de lo que resulta un descenso de 3,8692 log 10. Independientemente, en los ratones BALB/c, sobre el inóculo medio de las tres pruebas (5,77206737 log 10), el recuento promedio al cabo de 72 horas fue de 3,16708 log 10, lo que supone un descenso de 2,6125029 log 10. Si se lleva a cabo el cálculo conjuntamente (19 pruebas, ratones NMRI y ratones BALB/c) resulta que al cabo de 72 horas se pasa de un promedio inoculado de 5,5991 log 10 a 4,94414463 log 10, que supone un descenso de 3,6551528 log 10.

2. En este punto horario (72 horas) ni en el primer grupo de pruebas (ratones NMRI) ni en el segundo (ratones BALB/c) se registraron ya aumentos en los recuentos, siendo éstos en todos los casos negativos (menores que el inóculo).

V - A las 96 horas post-inoculación, los datos de mayor interés se resumen a continuación:

En el grupo de 16 ratones NMRI, inoculados con un promedio de 5,5851 log 10, al cabo de 96 horas el promedio de los recuentos ascendió a 0,9578 log 10, de lo que resulta un descenso de 4,6273 log 10. Independientemente, en los ratones BALB/c, sobre el inóculo medio de las tres pruebas (5,673720 log 10), el recuento promedio al

cabo de 96 horas fue de 1,1002 log 10, lo que supone un descenso de 4,6718,5735 log 10. Si se lleva a cabo el cálculo conjuntamente (19 pruebas, ratones NMRI y ratones BALB/c) resulta que al cabo de 96 horas se pasa de un promedio inoculado de 5,5991 log 10 a 0,9803 log 10, que supone un descenso de 4,6186 log 10. Como en el caso anterior, en ninguna de las pruebas, de ninguno de los dos grupos, se registraron aumentos en los recuentos.

VI - Finalmente, a las 120 horas post-inoculación, los datos más importantes se resumen a continuación:

En el grupo de 16 ratones NMRI, inoculados con un promedio de 5,5851 log 10, al cabo de 120 horas el promedio de los recuentos ascendió a 0 de lo que resulta la total anulación de los recuentos. Independientemente, en los ratones BALB/c, sobre el inóculo medio de las tres pruebas (5,673720 log 10), el recuento promedio al cabo de 96 horas fue de 0,4874775 log 10, lo que supone un descenso de 5,1962846 log 10. Si se lleva a cabo el cálculo conjuntamente (19 pruebas, ratones NMRI y ratones BALB/c) resulta que al cabo de 120 horas se pasa de un promedio inoculado de 5,5991 log 10 a 0,0754 log 10, lo que supone un descenso de 5,5237 log 10. Como en el caso anterior, en ninguna de las pruebas, de ninguno de los dos grupos, se registraron aumentos en los recuentos.

No resulta fácil explicar los aumentos descritos en las primeras horas después de la inoculación con los ratones NMRI en parte de las pruebas, tal y como se ha señalado, aunque puede especularse que durante ese tiempo las necesidades en hierro y otros oligoelementos pudieran estar satisfechas con los residuos incorporados en el inóculo, como contaminantes. No puede excluirse, tampoco, la existencia de algún mecanismo alternativo de captación de hierro, incluyendo, pese a todo, una capacidad limitada de utilización de la transferrina murina por parte de *A. pleuropneumoniae* (hipótesis rechazada por la mayoría de los expertos) o la disponibilidad de otras fuentes (contaminantes), como se ha señalado. En cualquier caso, este comportamiento ha sido descrito antes por otros autores Sebunya y Saunders (1982), con ratones C3H inoculados con 0,1 DL₅₀, observaron una tasa de multiplicación individual de hasta 25 veces la media, en las primeras doce horas, y en algunos animales observaron neumonía hemorrágica, que se correspondía con cifras altas en los recuentos (1,57 x 10⁷; inóculo de partida: 1,6 x 10⁶).

Igual que sucediera con los ratones convencionales, en el caso de los ratones BALB/c tampoco resulta fácil explicar estos comportamientos (aunque en este caso los incrementos de la población bacteriana solo tuvieron lugar en una de las tres pruebas realizadas), especialmente cuando las recuperaciones y discretas multiplicaciones aparentes de *A. pleuropneumoniae* se suceden después de 12 ó 24 horas a partir de la infección. Podría relacionarse con la colonización pasajera del aparato respiratorio, que produce en intervalos distintos ese aumento del número de bacterias recuperado, pero la falta de un sistema resolutivo para abastecer de hierro necesario haría que las bacterias se aclarasen en un tiempo corto.

En cualquier caso, con una dosis moderada de *A. pleuropneumoniae*, que no supera el millón de bacterias (en un solo caso con ratones convencionales se utilizó una dosis con este montante), el sistema inmune del animal resuelve la infección abortándola en un tiempo, que en el caso más extremo, independientemente del tipo de animal utilizado y siempre por vía intranasal, no supera las 120 horas, sucediéndose casos mucho más precoces, que a las 28 horas ya no permiten recuperaciones.

La información obtenida de otros autores indica que inoculando la misma cepa del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* por la vía intraperitoneal en ratones, se observó mortalidad con dosis de 0,5 ml a partir de títulos de 4×10^9 ufc. En el caso de la inoculación intranasal, se produce la muerte de los ratones (75-100 %) en las 12 h post-infección con dosis de 4×10^7 ufc (Komal y Mittal, 1990). Aparentemente, la muerte sobreviene por un choque séptico, observaciones que coinciden con las nuestras, para establecer que el modelo en ratón solo sirve para reproducir y valorar la infección aguda (Rioux *et al.*, 1998).

Otros autores han utilizado modelos experimentales distintos para estudiar la infección y la inmunidad de la protección frente a *A. pleuropneumoniae*, como sucede en el caso de cobayos (Kume y Nakai, 1988) o ratas, pues su relación filogenética con *Haemophilus influenzae* justificaba el uso de esta especie animal, aunque los resultados no fueron concluyentes (Hansen *et al.*, 1982).

4.4. Supervivencia / multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en ratones inoculados con transferrina sérica porcina.

Según se ha establecido en el apartado 4.16 de Materiales y Métodos, se llevaron a cabo varios experimentos de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* con distintas concentraciones de transferrina porcina. Inicialmente se probaron 3 concentraciones de transferrina (50 µg, 100 µg y 400 µg), cuyos resultados se muestran a continuación.

Primer Experimento. Resultados de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en 5 pruebas con 50 µg de transferrina porcina y el mismo inóculo de *A. pleuropneumoniae* (5,6989 log 10 de ufc, equivalente a 5×10^5 ufc), en un periodo de estudio entre 0-216 h. (Tabla 22).

inóculo								
Prueba	0 h	12 h	24 h	72 h	120 h	168 h	192 h	216 h
1	5,69	7,79	6,98	4,92	3,87	/	0	0
2	5,69	6,00	6,50	2,60	0	0	0	0
3	5,69	6,83	5,79	4,98	3,82	176	0	0
4	5,69	6,86	7,13	5,82	4,82	1,92	0	0
5	5,69	5,69	6,26	6,33	3,23	/	0	0
Promedio	5,69	6,67	6,53	4,93	3,15	1,84	0	0

Tabla 22. Resumen de los valores de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* (log 10 de ufc) en 5 pruebas en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 50 µg de transferrina porcina en un periodo de 0 a 216 h. Conjunto de 64 ratones. 0 h: inóculo inicial; /: no se llevaron a cabo recuentos en ese punto horario.

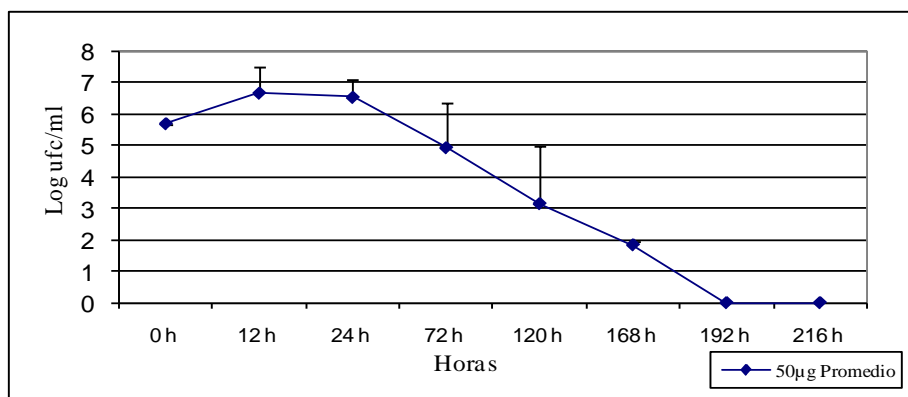


Figura 13. Resumen de 5 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 50 µg de transferrina porcina en un periodo de 0 a 216 h.

Resultados y Discusión

Las siguientes gráficas corresponden a los resultados de las 5 pruebas individuales de supervivencia y multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 50 µg de transferrina sérica porcina (en la práctica de 168 h).

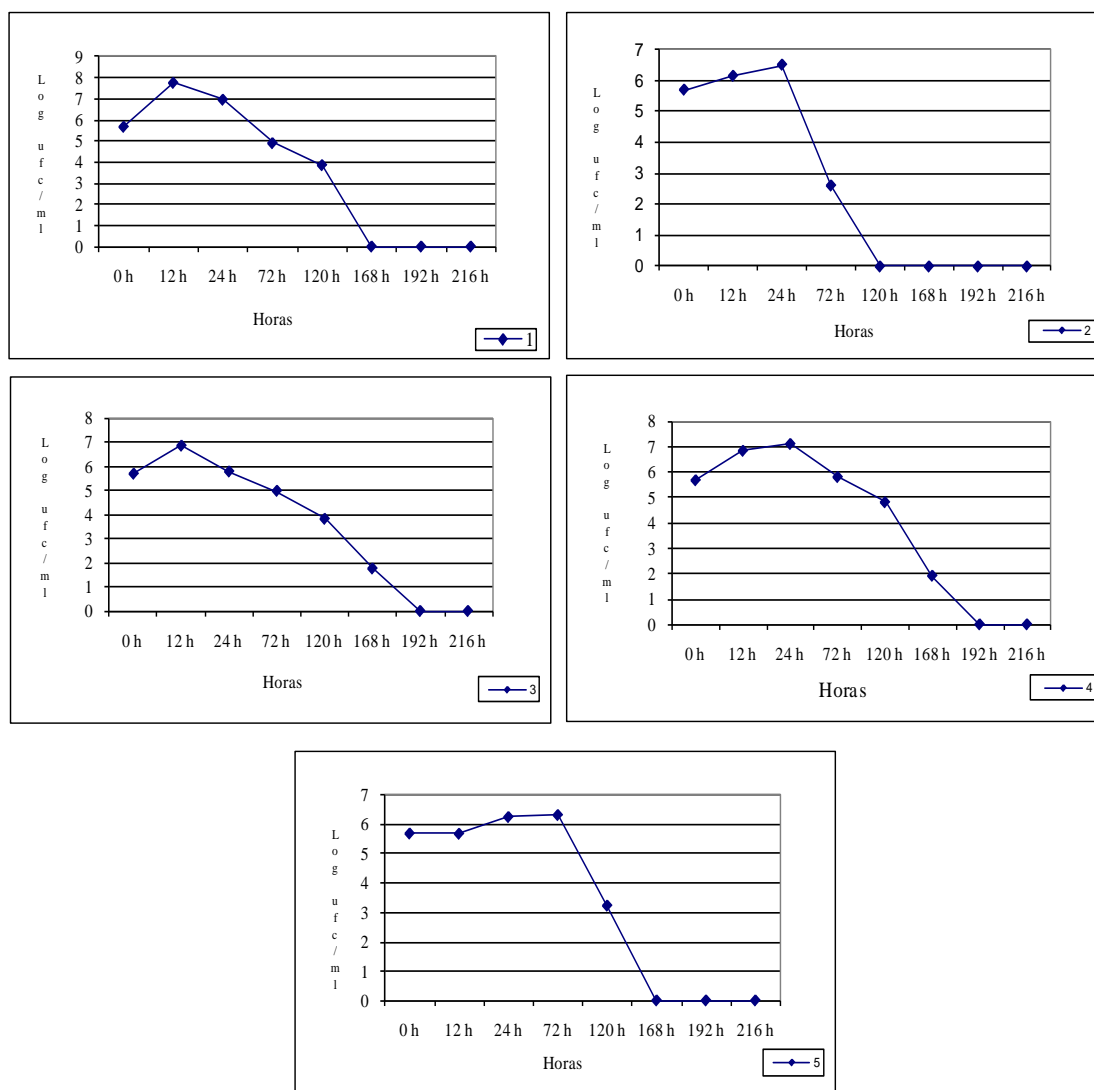


Figura 14. Resultados de 5 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI tratados con 50 µg de transferrina porcina (en la práctica de 168 h).

Segundo Experimento.

Resultados de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en 4 pruebas con el mismo inóculo del microorganismo (5×10^5 ufc, equivalentes a 5,6989 log 10 de ufc) y 100 µg de transferrina porcina. Periodo de estudio: 0 – 216 h (Tabla 23).

	Inóculo							
	Prueba	0 h	12 h	24 h	72 h	120 h	168 h	216 h
	1	5,6989	7,9294	7,8603	4,9216	4,6367	2	0
	2	5,6989	6,0762	6,4807	5,5436	3,4065	2,2900	0
	3	5,6989	6,8893	5,9294	4,8573	5,9493	3,9084	1,9190
	4	5,6989	6,8893	7,0504	7,9294	6,8603	2,9084	1,6216
100µg	Promedio	5,6989	6,9460	6,8302	5,8129	5,2132	2,7767	0,8851

Tabla 23. Resultados de 4 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 100 µg de transferrina porcina en un periodo de 0 a 216 h. Total de 48 ratones utilizados (2 por punto horario; el resultado se refiere como una media). Valores en log 10 de ufc. 0h: inóculo de prueba.

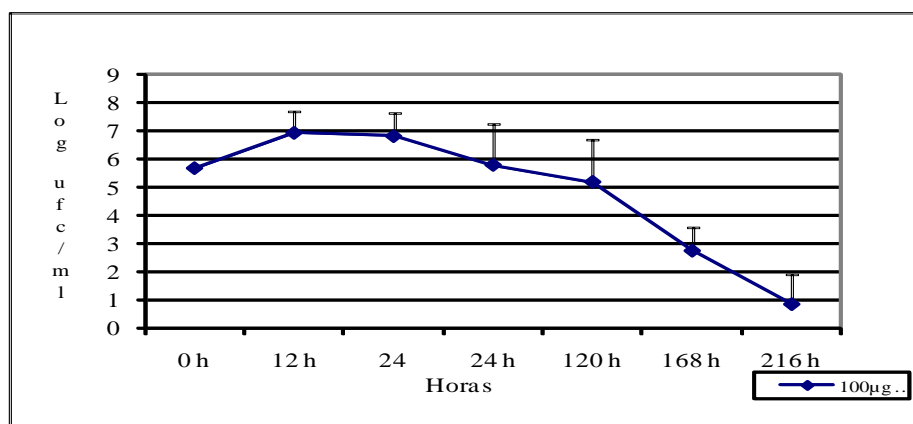
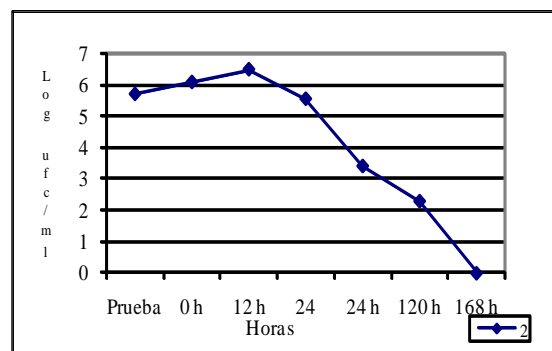
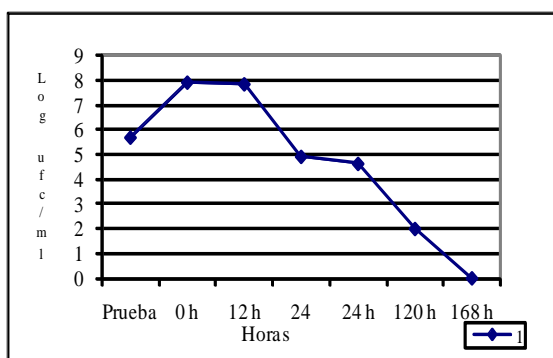


Figura 15. Promedio de 4 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 100 µg de transferrina porcina en un periodo de 0 a 216 h. Número total de ratones utilizado: 48 ratones (2 por punto horario; el resultado se refiere como una media de ambos).

Las siguientes gráficas corresponden a los resultados de las 4 pruebas de supervivencia y multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 100 µg de transferrina porcina (en la práctica de 120 h).



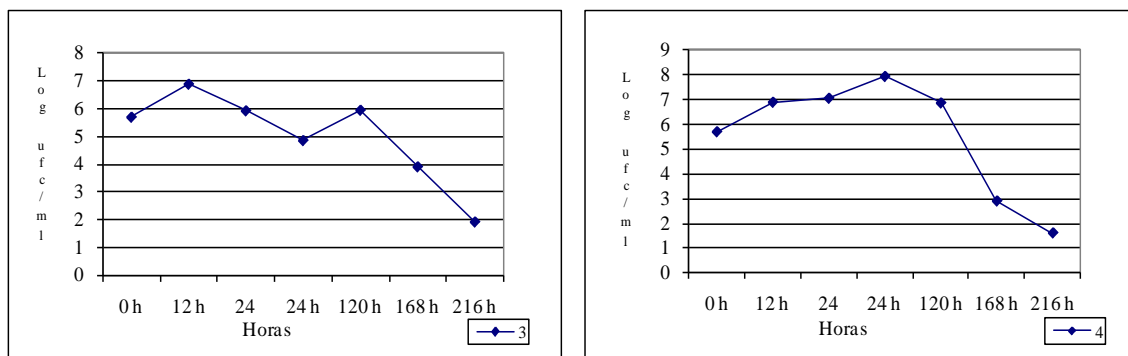


Figura 16. Resultados de las 4 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI tratados con 100 µg de transferrina porcina.

Tercer Experimento.

Resultados de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en 5 pruebas con el mismo inóculo del microorganismo (5×10^5 ufc, equivalentes a 5,6989 log 10 de ufc) y 400 µg de transferrina porcina, en un periodo de estudio entre 0 – 216 h (Tabla 24).

	Prueba	inóculo	0	12	24	72	120	168	192	216
	1	5,6989	7,9268	8,9294	4,8095	3,5797	1	0	0	0
	2	5,6989	6,2848	4,3354	2,7293	2	0	0	0	0
	3	5,6989	6,9294	6,8481	2,8260	1,2041	0	0	0	0
	4	5,6989	6,9294	6,8481	6,9268	4,9294	1,826	0	0	0
	5	5,6989	6,0576	5,9930	5,2938	3,1399	0,6192	0	0	0
400µg	Promedio	5.6989	6.8256	6.5908	4.5171	2.9706	1.2226	0	0	0

Tabla 24. Resultados de 5 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 400 µg de transferrina porcina en un periodo entre 0 – 216 h. Número total de ratones utilizados: 70 (2 por punto horario; el resultado representa una media). Valores en log 10 de ufc.

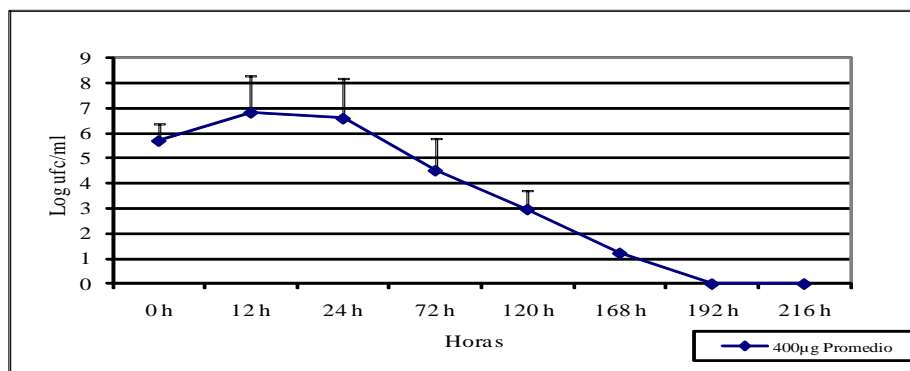


Figura 17. Promedio de 5 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 400 µg de transferrina porcina en un periodo de 0- 216 h. n= 70 ratones (2 por punto horario).

Las siguientes gráficas corresponden a los resultados de las 5 pruebas de supervivencia y multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con 400 µg de transferrina porcina.

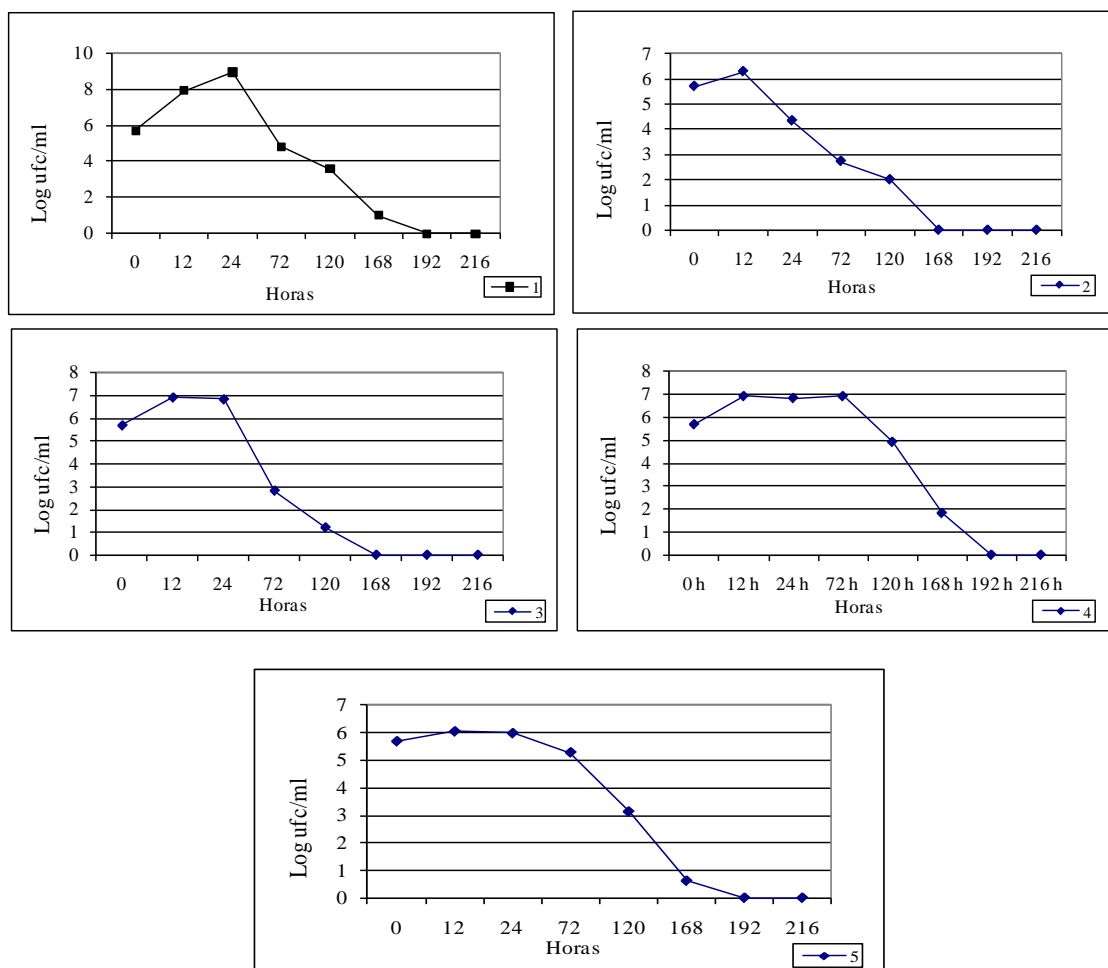


Figura 18. Resultados de 5 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI tratados con 400 µg de transferrina porcina entre 0 – 216 h.

Con carácter general, un análisis superficial de los resultados permitió concluir, además de otros resultados referidos a cuestiones típicas y de manejo de los animales, la mayor supervivencia en el grupo al que se administró 100 µg de transferrina porcina. Por esta razón, los siguientes estudios se llevaron a cabo, exclusivamente, con esta concentración proteica. A tal efecto, los ratones NMRI fueron sustituidos por ratones BALB/c nude SPF.

En esta etapa, el experimento se repitió con 10 pruebas y una sola concentración de 100 µg/ml de transferrina porcina y con ratones SPF (hembras de 30 g) con una dosis

Resultados y Discusión

subletal de *A. pleuropneumoniae* serotipo 1 (CM5) de 5×10^5 ufc. En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos.

Prueba	inóculo	0	12	24	48	72	98	120	168	216
1		4,9242	2,4771	3,0413	2,7781	3	2,6989	2,602	0	0
2		5,4289	4,7721	5,4552	6,1856	5,4532	3,7836	3,7414	2,0149	0,358
3		5,6428	4,7721	5,4552	6,1856	5,4532	3,7836	3,7414	1,1915	0,5274
4		5,6989	4,4864	5,2292	5,0427	5,2091	4,8843	3,8188	2,9068	0,6662
5		5,9019	5,8642	6,4807	6,4589	6,4537	4,8603	4,4847	0	0
6		5,7284	5,0791	6,0374	5,6532	4,566	3,6532	3,4684	0	0
7		5,7481	4,6627	4,3979	3,8573	2,176	2,602	2,6989	0	0
8		5,892	4,903	4,7781	4,2552	3,0791	3,301	3	0	0
9		5,892	4	4,903	4,301	4	3,2552	2	0	0
10		6,0755	4,301	4,301	4,301	4,7481	3,2552	3	0	0
Promedio		5,6932	4,5317	5,0079	4,9018	4,4138	3,6077	3,2555	0,6113	0,1551

Tabla 25 Resumen de 10 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones BALB/c nude SPF (hembras 30 g) tratados con 100 µg de transferrina en un periodo de 0-216h. n= 160 ratones (2 animales por punto horario). El dato que aparece reflejado en la tabla es la media. Valores en log 10 de ufc.

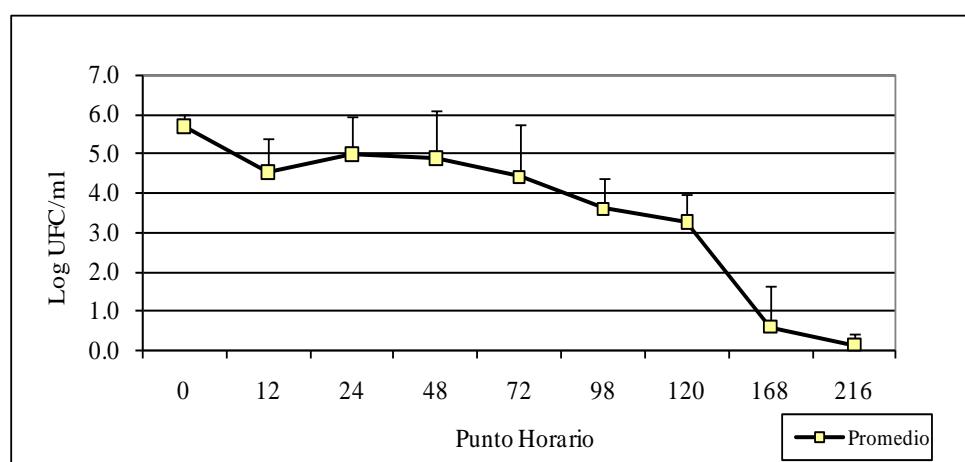


Figura 19. Promedio de 10 pruebas de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones BALB/c nude SPF (hembras 30 g) tratados con 100 µg de transferrina en un periodo de 0 a 216 h.

Las siguientes gráficas corresponden a las 10 pruebas de supervivencia y multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en ratones BALB/c nude SPF (hembras 30 g) tratados con 100 µg de transferrina porcina (en la práctica de 216 h).

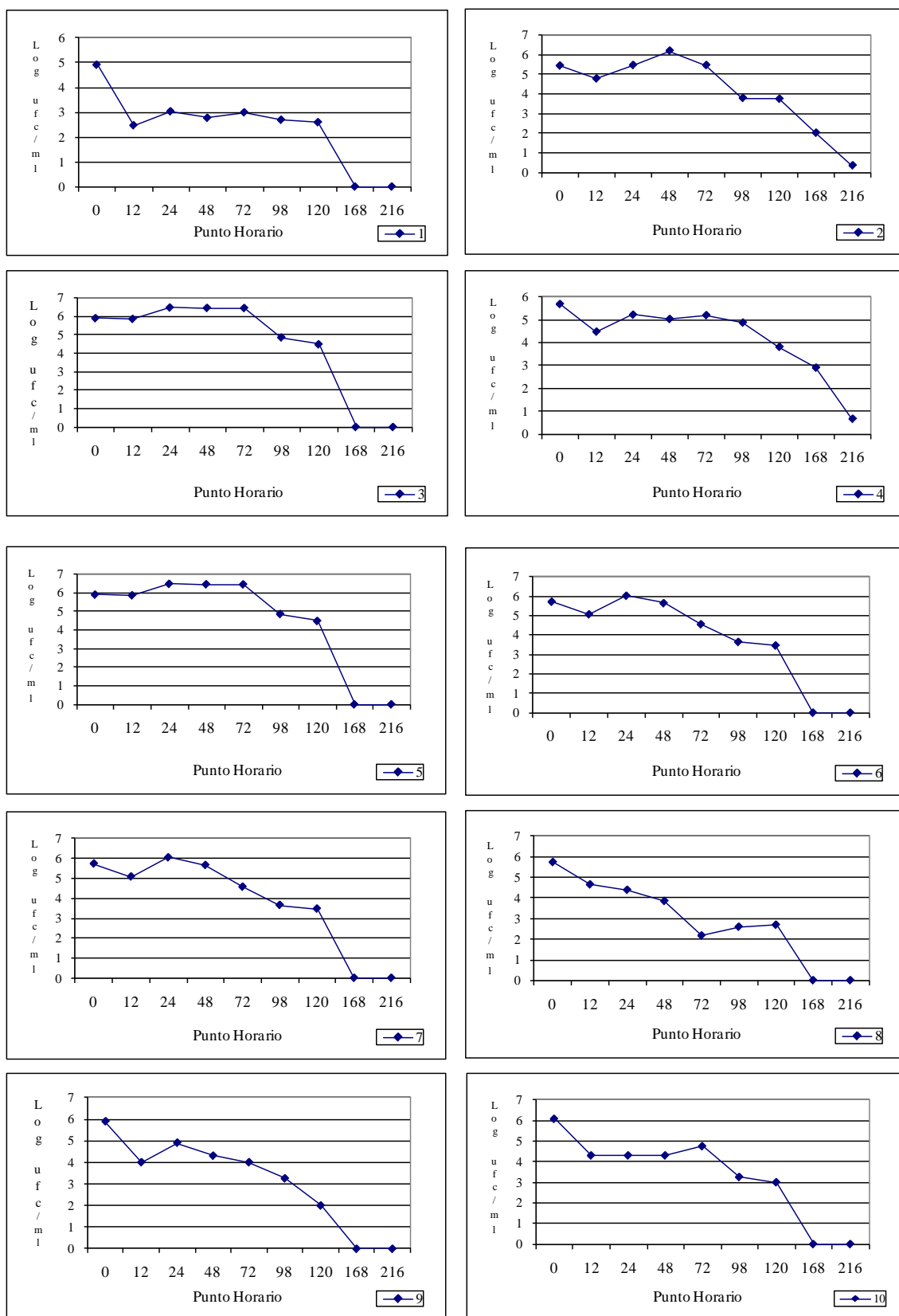


Figura 20. Conjunto de gráficas individuales de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones BALB/c nude SPF tratados con 100 µg transferrina porcina.

4.4.1 Supervivencia de *A. pleuropneumoniae*. Influencia de la administración de transferrina porcina cargada con hierro.

Como se ha señalado repetidamente, la hipótesis principal de este trabajo acerca de la resistencia del ratón a la infección por *A. pleuropneumoniae* reside en la falta de abastecimiento de hierro a partir de la transferrina. Según ella, la transferrina sérica murina no constituiría una reserva de hierro utilizable por la bacteria, que haría del ratón un hospedador inadecuado para ella. En sentido contrario, la aportación exógena de este complejo proteico, directamente dirigido hacia el lugar donde se produce la colonización bacteriana, esto es, el aparato respiratorio (pulmones), debería producir un efecto de facilitación de la infección, al menos en lo que a este inconveniente se refiere, sin que ello suponga necesariamente que solo las necesidades de hierro son responsables de la resistencia o susceptibilidad a la infección en un sentido absoluto.

En este estudio, se probaron los efectos en la supervivencia de una dosis subletal de *A. pleuropneumoniae*, de varias concentraciones de transferrina porcina saturada de hierro, administradas en una dosis única previa a la infección (2 horas antes), en un volumen tolerable físicamente por el animal (50 μ l) y por vía intranasal.

Transferrina a dosis baja. En la Tabla 22 se resumen los efectos sobre la supervivencia de una DSL (5,6989 log 10) de *A. pleuropneumoniae* en un total de 5 pruebas en las que se administró a ratones NMRI una dosis única de 50 μ g de transferrina porcina sérica saturada de hierro. El tiempo de supervivencia controlado se prolongó hasta las 168 horas. El experimento se llevó a cabo de forma simultánea, de tal modo que en las cinco series los inóculos fueron idénticos.

Según puede verse, en los cinco casos existe un aumento claro del número de bacterias a las 12 ó 24 horas post-infección. A partir de las 72 horas se inicia un descenso en los recuentos que al final se anula en todas las pruebas a las 192 horas y en un solo caso a las 120 horas. Si se realiza un análisis de detalle en las diferencias producidas en los recuentos al cabo de las 12 ó 24 horas, resulta que en la primera y cuarta pruebas es donde se observaron los resultados más llamativos, con una diferencia del recuento en la primera prueba con el valor del inóculo inicial de 2,0934 log 10, al igual que en la cuarta prueba en las 24 horas, en que se obtuvo, también, una diferencia apreciable, de 1,4354 log 10. El promedio de las cinco pruebas a las 12 horas determina, en su conjunto, un aumento de casi 1 log 10 (exactamente 0,9721 log 10).

El análisis de los datos de las pruebas en las que se administraron 50 µg de transferrina en relación con la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* determina los siguientes hechos:

1. En el caso de las 5 pruebas en las que se administraron 50 µg de transferrina (el 80% del total) se registraron incrementos de la población bacteriana.

2. A las 12 horas post-inoculación, el valor medio global de los recuentos en las 5 pruebas con 50 µg de transferrina fue de 6,6710 log 10, lo que supone un incremento de la población bacteriana de 0,9721 log 10. Si únicamente se consideran las 4 pruebas en las que se produjeron aumentos (80% del total), la media de los recuentos a las 12 horas post-inoculación fue de 6,9160 log 10, con lo que la diferencia respecto de la media de inóculos se eleva a 1,2171 log 10.

3. A las 24 horas se mantiene el aumento de los recuentos sobre el inóculo original, aunque por debajo de la cifra obtenida a las 12 horas, lo que pone de manifiesto que ha comenzado el aclaramiento. La diferencia en este punto horario es de +0,8377 log 10.

La comparación de los datos de supervivencia de *A. pleuropneumoniae*, sin adiciones complementarias y en los distintos tipos de ratones, en las distintas franjas horarias, con los obtenidos en presencia de 50 µg de transferrina, pone de manifiesto datos muy interesantes. Según puede verse en la Tabla 26, las diferencias más apreciables se producen en las primeras 12 y 24 horas en las que, mientras que en ausencia de transferrina la caída en los recuentos ya es evidente en todas las pruebas (16 con ratones NMRI, 3 con SPF y conjunto), en las 5 pruebas en las que se administraron 50 µg de transferrina a ratones NMRI previamente al inóculo bacteriano, se produjeron aumentos, particularmente notables a las 12 horas y aún mantenidos a las 24 horas, aunque en este caso ya comienza la caída (como hemos señalado antes) que, por otra parte, es mucho más lenta, pues la anulación de los recuentos no se produce hasta las 192 horas frente a las 120 ó 144 horas de los dos grupos de pruebas anteriores.

	Inóculo	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
16 pruebas ratones NMRI	5,5851	5,4798	5,1334	2,6655	1,7159	0,9578	0	/	/	/
		(-0,1053)	(-0,4517)	(-2,9196)	(-3,8692)	(-4,6273)	(-5,5851)			
3 pruebas ratones SPF	5,6737	5,0984	5,4176	4,9594	3,1708	1,1002	0,4775	0	0	/
		(-0,5753)	(-0,2561)	(-0,7143)	(-2,5029)	(-4,5735)	(-5,1962)	(-5,6737)	(-5,6787)	
19 pruebas (conjunto)	5,5991	5,4196	5,1781	3,0277	2,4463	0,9803	0,0754	/	/	/
		(-0,1795)	(-0,421)	(-2,5714)	(-3,1528)	(-4,6186)	(-5,5237)			
5 pruebas	5,6989	6,6710	6,5366		4,9353		3,1536	/	1,2283	0
50 µg transferrina		(+0,972)	(+0,837)		(-0,7636)		(-2,5433)		(-4,3706)	-56989

Tabla 26. Resumen de los datos más relevantes de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en dos grupos de pruebas llevadas a cabo con ratones (primer grupo de 16 pruebas con ratones NMRI y segundo de 3 pruebas con ratones SPF) y su comparación con 5 pruebas en las que se administraron a los ratones NMRI 50 µg de transferrina sérica porcina. Datos expresados en log decimales. Entre paréntesis, diferencias con el inóculo de partida.

4.4.2. Supervivencia en presencia de otras concentraciones de transferrina (100 y 400 µg).

El análisis de los datos de la Tabla 27 demuestra que el empleo de 100 µg de transferrina en las primeras 12 horas de infección, logró un aumento en el recuento de bacterias con relación al inóculo administrado de 1,2472 log 10, aumento que se mantiene a las 24 horas, aunque en este tiempo se inicia ya la tendencia a la baja, que se invierte claramente a partir de las 120 horas. En cualquier caso, con esta concentración de transferrina la supervivencia se mantiene por encima de las 216 horas, en las que todavía en la mitad de las pruebas se detectan recuentos positivos. Traduce estos datos, por un lado, la influencia de la transferrina tanto en la supervivencia como en la multiplicación clara de las bacterias en las primeras horas y, en segundo lugar, la prolongación del periodo de eliminación que pasa de las 96 horas (último recuento positivo en las 16 pruebas con ratones NMRI convencionales) ó 120 horas (en el caso de los ratones SPF) a las más de 216 horas (puesto que no pudo determinarse el límite al agotarse el número de ratones disponibles inoculados), una diferencia de al menos entre 96 y 120 horas en la supervivencia del agente, según se considere un grupo u otro de pruebas.

	Inóculo	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h
16 pruebas	5,58	5,47	5,13	2,66	1,71	0,95	0	/	/	/	/
con ratones NMRI		(-0,10)	(-0,45)	(-2,91)	(-3,86)	(-4,62)	(-5,58)				
3 pruebas	5,67	5,09	5,41	4,95	3,17	1,10	0,47	0	0	/	/
ratones SPF		(-0,57)	(-0,25)	(-0,71)	(-2,50)	(-4,57)	(-5,19)	(-5,67)	(-5,67)		
19 pruebas	5,59	5,41	5,17	3,02	2,44	0,98	0,07	/	/	/	/
(conjunto)		(-0,17)	(-0,42)	(-2,57)	(-3,15)	(-4,61)	(-5,52)				
5 pruebas	5,69	6,67	6,53	/	4,93	/	3,15	/	1,22	0	/
50 µg transferrina		(+0,97)	(+0,83)		(-0,76)		(-2,54)		(-4,3)	(5,69)	
4 pruebas		6,94	6,83	/	5,81	/	5,21	/	2,77	/	0,88
100 µg transferrina		(+1,24)	(+1,13)		(+0,11)		(-0,48)		(-2,92)		(-4,87)

Tabla 27. Resumen de los datos mas relevantes de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en dos grupos de pruebas llevadas a cabo con ratones (primer grupo de 16 pruebas con ratones NMRI y segundo de 3 pruebas con ratones SPF) y su comparación con 5 pruebas en los que se administraron a los ratones NMRI 50 µg de transferrina sérica porcina y con 4 pruebas en las que se administraron a los ratones 100 µg de transferrina. Datos expresados en log decimales. Entre paréntesis, diferencias con el inóculo de partida.

En la Tabla 27 se muestra la comparativa de los resultados de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ausencia y presencia de transferrina, en concentraciones de 50 y 100 µg, pudiendo observar que al duplicar la concentración se consigue prolongar la supervivencia hasta más allá de las 216 horas, manteniéndose la tendencia de aumentos observada en las 12 y 24 horas, particularmente en las primeras 12 horas, que en el caso de la concentración de 100µg sigue siendo patente a partir de las 120 horas (no existen datos de las 96 horas).

En el caso de la administración de 400 µg de transferrina (Tabla 24), nuevamente se pone de manifiesto una relación clara entre la capacidad de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* y la disponibilidad de transferrina sérica porcina, esto es, de la disponibilidad de hierro por parte de la bacteria. Cuando se comparan estos resultados con los correspondientes a las concentraciones de 50 y 100 µg de transferrina, así como en su ausencia (Tabla 27) cabe señalar, en primer lugar, que como en el caso de los 100 µg, los aumentos sobre la media de infección se producen en las primeras 12 horas y se mantienen hasta las 72 horas, iniciándose el descenso a partir de las 96 horas. En este caso, sin embargo, en el punto final de las 216 horas, los recuentos eran sustancialmente más altos que en el caso de la dosis de 100µg, con una reducción sobre la cifra de infección de 1,6061 log 10, lo que supone un resto bacteriano del 74,48% sobre la cifra de infección, mientras que en el caso de la dosis de

Resultados y Discusión

100 µg en el mismo punto horario el resto de infección era solamente del 15,53%. Sin embargo, otros inconvenientes derivados de la falta de tolerancia a una concentración tan alta y la densidad pastosa del inóculo, como ha sido señalado en otros apartados, ocasionaban dificultad respiratoria, que podía interferir con el resultado, falseando posibles causas de muerte de los animales y su propio manejo, lo que hizo aconsejable decidirse a continuar los experimentos manteniendo como cifra de elección para la administración de hierro, la de 100 µg de transferrina sérica porcina, puesto que a la postre, los puntos conclusivos no variaban.

En la Tabla 28 se muestran los resultados comparados de la tabla de supervivencia anterior, a la que se añaden los obtenidos después de la administración de 400 µg de transferrina sérica porcina, como en los experimentos anteriores, administrados de una sola vez dos horas antes de la infección.

	Inóculo	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h
16 pruebas	5,585	5,4798	5,1334	2,665	1,7159	0,9578	0	/	/	/	/
con ratones NMRI		(-0,1053)	(-0,4517)	(-2,919)	(-3,8692)	(-4,627)	(-5,5851)				
3 pruebas	5,673	5,0984	5,4176	4,959	3,1708	1,1002	0,4775	0	0	/	/
con ratones SPF		(-0,5753)	(-0,2561)	(-0,714)	(-2,5029)	(-4,573)	(-5,1962)	(-5,6737)	(-5,678)		
19 pruebas	5,599	5,4196	5,1781	3,027	2,4463	0,9803	0,0754	/	/	/	/
(conjunto)		(-0,1795)	(-0,421)	(-2,571)	(-3,1528)	(-4,618)	(-5,5237)				
5 pruebas	5,698	6,6710	6,5366	/	4,9353	/	3,1536	/	1,2283	0	/
50 µg transferrina		(+0,9721)	(+0,8377)		(-0,7636)		(-2,5433)		(-4,370)	(-5,6989)	
4 pruebas	5,698	6,9461	6,8302	/	5,8130	/	5,2132	/	2,7767	/	0,885
100 µg transferrina		(+1,2472)	(+1,1313)		(+0,1114)		(-0,4857)		(-2,922)		(-4,8137)
4 pruebas 400 µg de transferrina	6,294	7,1029	6,8832	7,150**	7,0848	5,7417*	5,8075*	4,9761**	4,6723	4,4375**	4,6880
		(+0,8083)	(+0,5886)	(+0,260)	(+0,7902)	(-0,751)	(-0,6122)	(-1,914)	(-1,622)	(-2,4527)	(-1,606)

Tabla 28. Resumen de los datos más relevantes de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en dos grupos de pruebas llevadas a cabo con ratones (primer grupo de 16 pruebas con ratones NMRI y segundo de 3 pruebas con ratones SPF) y su comparación con 5 pruebas en las que se administraron a los ratones NMRI 50 µg de transferrina sérica porcina, con 4 pruebas en las que se administraron a los ratones 100 µg de transferrina y con 4 pruebas en las que se administraron 400 µg de transferrina. Datos expresados en log decimales. Entre paréntesis, diferencias con el inóculo de partida. (*): en este caso, media de 3 pruebas; (**): media de 2 pruebas.

El siguiente y definitivo experimento se llevó a cabo mediante la administración de 100 µg de transferrina sérica porcina, dos horas antes de la infección con una DSL, de ratones SPF en un total de diez pruebas, cuyos resultados se comparan con los datos

anteriores en la Tabla 29. Según puede verse, con estos animales desaparecen los aumentos habituales de las 12 y 24 horas y desde el principio se inicia un progresivo descenso que mantiene la supervivencia hasta las 216 horas, en resultados muy similares a los obtenidos con ratones NMRI convencionales (9% de supervivencia frente al 15,53% referido antes).

	inóculo	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h
16 pruebas con ratones NMRI	5,5851	5,4798 (-0,105)	5,1334 (-0,451)	2,6655 (-2,919)	1,7159 (-3,869)	0,9578 (-4,627)	0 (-5,585)	/	/	/	/
3 pruebas con ratones SPF	5,6737	5,0984 (-0,575)	5,4176 (-0,256)	4,9594 (-0,714)	3,1708 (-2,502)	1,1002 (-4,573)	0,4775 (-5,196)	0 (-5,673)	0 (-5,678)	/	/
19 pruebas (conjunto)	5,5991	5,4196 (-0,179)	5,1781 (-0,421)	3,0277 (-2,571)	2,4463 (-3,152)	0,9803 (-4,618)	0,0754 (-5,523)	/	/	/	/
5 pruebas 50 µg transferrina	5,6989	6,6710 (+0,972)	6,5366 (+0,837)	/	4,9353 (-0,763)	/	3,1536 (-2,543)	/	1,2283 (-4,370)	0 (-5,6980)	/
4 pruebas 100 µg transferrina	5,6989	6,9461 (+1,247)	6,8302 (+1,131)	/	5,8130 (+0,111)	/	5,2132 (-0,485)	/	2,7767 (-2,922)	/	0,8852 (-4,813)
4 pruebas 400 µg transferrina	6,2946	7,1029 (+0,808)	6,8832 (+0,588)	**7,1508 (+0,260)	7,0848 (+0,790)	*5,7417 (-0,751)	5,8075* (-0,612)	**4,9761 (-1,914)	4,6723 (-1,622)	**4,4375 (-2,452)	4,6885 (-1,606)
10 pruebas 100 µg transferrina ratones SPF	5,6923	4,5318 (-1,160)	5,0079 (-0,684)	4,9019 (-0,790)	4,4138 (-1,278)	3,6077 (-2,084)	3,2556 (-2,436)	/	0,6113 (-5,081)	/	0,5172 (-5,175)

Tabla 29. Resumen de los datos más relevantes de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en dos grupos de pruebas llevadas a cabo con ratones (primer grupo de 16 pruebas con ratones NMRI y segundo de 3 pruebas con ratones SPF) y su comparación con 5 pruebas en las que se administraron a los ratones NMRI 50 µg de transferrina sérica porcina, con 4 pruebas en las que se administraron a los ratones 100 µg de transferrina, con 4 pruebas en las que se administraron 400 µg de transferrina y, finalmente, 10 pruebas adicionales en ratones SPF con 100 µg de transferrina. Datos expresados en log decimales. Entre paréntesis, diferencias con el inóculo de partida. (*): en este caso, media de 3 pruebas; (**): media de 2 pruebas.

Puede considerarse demostrado, por tanto, que la administración de transferrina sérica porcina, cargada con hierro, prolonga la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en el modelo ratón, existiendo variaciones en función de la dosis y el tipo de animal, fundamentalmente en lo que se refiere a la existencia de incrementos pasajeros del log decimal de la cifra de infección en las primeras 12 horas y en los porcentajes de supervivencia de las bacterias a las 216 horas, tiempo considerado de referencia para llevar a cabo los análisis. Explicar la existencia y desaparición de los aumentos en las 12 y 24 horas que se observaban con ratones convencionales, ha de entenderse relacionado con la mayor susceptibilidad de la raza (BALB/c respecto de NMRI) y su condición (SPF respecto de ratones convencionales). Esta observación ha sido descrita

anteriormente por Sebunya y Saunders (1982) y por Tascón (1995); este último autor, que utilizó también ratones NMRI y dosis similares a las nuestras, observó el mayor número de bacterias (en torno a 7 unidades logarítmicas) a las primeras horas de la infección, mientras que a las 48 horas (última medición efectuada) el logaritmo se había reducido prácticamente a la mitad. Por su parte, Sebunya y Saunders (1982) emplearon una cepa perteneciente al serotipo 5 y una línea de ratones diferente y comprobaron que la mayor tasa de multiplicación bacteriana, que dependía de la dosis inoculada por vía intranasal, se alcanzaba entre las 4 y las 12 horas posteriores. Al igual que en el estudio de Tascón (1995), la observación concluía a las 48 horas, cuando los niveles bacterianos habían disminuido considerablemente en algunos animales, mientras que en otros se había producido ya el aclaramiento pulmonar completo. Los resultados de ambos estudios son bastante similares a los nuestros a los 2 días de la infección, en tres de los experimentos efectuados, mientras que en los dos restantes los últimos datos de crecimiento bacteriano se registraron a las 32 y 44 horas de la inoculación, como ya ha sido expuesto.

4.5. Influencia de la actividad del complemento en la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en el ratón.

Como se ha señalado, se estudió la influencia de la descomplementación de los animales mediante el tratamiento con veneno de cobra, en la supervivencia y/o multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en el ratón.

Como paso previo, se llevó a cabo la determinación de la DL_{50} del veneno de cobra, antes de la determinación de las dosis subletales de uso, inicial y mantenimiento. La DL_{50} se obtuvo mediante una tabla simple tipo Reed y Muench, a partir de cuatro pruebas con lotes de 6 ratones por prueba y 5 concentraciones diferentes del veneno de cobra (Tabla 30). La DL_{50} quedó establecida en 0,0750 mg/kg peso vivo.

Dosis	Dosis y Volumen final	Pruebas				Vivos totales	Muertos total	Mortalidad
		1	2	3	4			
0,01875 mg/kg	13,39 µl + 86,61 µl PBS	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	24	0	0%
0,0375 mg/kg	6,78 µl + 173,22 µl PBS	0 / 6	0 / 6	0 / 6	1 / 5	23	1	4,10%
0,0525 mg/kg	37,5 µl + 162,5 µl PBS	0 / 6	1 / 5	3 / 3	2 / 4	18	6	25%
0,0750 mg/kg	53,5 µl + 146,5 µl PBS	2 / 4	3 / 3	3 / 3	4 / 3	12	12	50%
0,0900 mg/kg	64,2 µl + 135,8 µl PBS	6 / 0	6 / 0	6 / 0	6 / 0	0	24	100%

Tabla 30. Tabla para la determinación de la DL₅₀ del veneno de cobra utilizando 5 concentraciones diferentes y 4 pruebas con lotes de 6 ratones NMRI por prueba (en total, 24 ratones por concentración de veneno de cobra).

4.5.1 Ajuste de la dosis subletal de veneno de cobra.

A la vista de los resultados de las inoculaciones anteriores, se decidió utilizar como dosis subletal inicial la que había proporcionado un valor más próximo a cero (4,1%) y como dosis subletal de mantenimiento, la que había proporcionado el 0% de muertes. En la Tabla 31 se resumen estos datos.

0,0375 mg/kg = 26,78 µl + 73,22 µl PBS	Dosis subletal inicial
0,0187 mg/kg = 13,39 µl + 86,61 µl PBS	Dosis en las aplicaciones de mantenimiento 2 ^a , 3 ^a , 4 ^a y 5 ^a

Tabla 31. Dosis subletal inicial y de mantenimiento de veneno de cobra utilizada en los experimentos de descomplementación de ratones NMRI.

4.5.2. Resultados de supervivencia y/o multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI descomplementados por el tratamiento con una dosis subletal de veneno de cobra en diferentes modalidades de aplicación.

Se llevaron a cabo un conjunto de 3 experimentos con 6 grupos (A-F) de 24 ratones cada uno (ver Tabla 11). Los inóculos de infección fueron, respectivamente, de 5,6989; 5,6989 y 6,6532 log 10 de ufc. En las tablas y figuras que siguen se recogen los resultados correspondientes.

Primer Experimento.

Se utilizaron los grupos señalados (A-F) de los que los grupos E y F fueron controles, respectivamente, de infección y de veneno de cobra. El inóculo fue idéntico

Resultados y Discusión

en todos los grupos (5,6989 log 10 de ufc, equivalente a 5×10^5 ufc) (ver Tabla 32 y Figura 21). El grupo A fue inoculado en la hora 0 con veneno de cobra y la dosis infecciosa de *A. pleuropneumoniae*; el grupo B recibió una primera dosis (0,0375 mg/kg) inicial de veneno de cobra 12 h antes de la infección y cuatro dosis de mantenimiento (0,0187 mg/kg) en las horas 12, 28, 40 y 52 después de la infección. El grupo C recibió la dosis inicial de veneno de cobra 40 horas antes de la infección y dosis de mantenimiento en las horas 28 y 16 antes de la infección y 12 y 52 después de la infección. Finalmente, el grupo D recibió la primera dosis de veneno de cobra 24 horas antes de la infección y de mantenimiento 20 y 12 horas antes de la infección y a las 16, 28 y 52 horas después de ella. El control de supervivencia no recibió veneno de cobra (solo fue infectado con la misma dosis que los grupos de prueba) y el control de veneno de cobra recibió un total de 6 dosis de veneno: la primera dosis a las 40 horas antes de la infección y dosis de mantenimiento a las 36, 28 y 16 horas antes de la infección y a las 0 y 12 horas después de ella. Se utilizaron 24 ratones por grupo.

Grupo / Horas	0h	4h	28h	52h	76h	100h	124h	148h	172h
A	5,6989	6,9214	7,5368	6,5582	5,6247	3,9846	2,8412	0	0
B	5,6989	6,4235	4,3964	4,1286	3,6442	1,9856	0	0	0
C	5,6989	6,9852	7,1028	7,4136	5,1468	3,6349	1,4824	0	0
D	5,6989	6,6248	6,1248	3,1278	2,5594	2,1724	2	0	0
E	5,6989	7,4024	7,6248	5,4589	4,5682	2,5628	1,4286	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 32. Recuento de *A. pleuropneumoniae* en ratones (hembras 30 g) tratados con una dosis de 0,0375 mg/kg (inicial) y 0,0187 mg/kg (mantenimiento) de veneno de cobra por vía intraperitoneal. Dosis de *A. pleuropneumoniae* 5×10^5 ufc= 5,6989 log 10 ufc. en un periodo de 0 – 172 h. Se utilizaron 24 ratones por grupo. Total= 144 animales. Valores de supervivencia en log 10 de ufc. **Grupo A:** En la hora 0, inoculación VC y la DI. **Grupo B:** 1ª dosis de VC -12 h. Mantenimiento de VC en horas +12, +28,+40 y +52. **Grupo C:** 1ª dosis de VC -40 h y mantenimiento de VC en -28 y -16 h. Después de la infección, en +12 y +52. **Grupo D:** 1ª dosis VC a las -24 h y 2 dosis de mantenimiento en -20 y -12 h. Después de la infección, mantenimiento en +16, +28 y + 52 h. **Grupo E:** control supervivencia de *A. pleuropneumoniae*. No hay administración de VC. **Grupo F:** Control VC: 1ª dosis a -40h y mantenimiento en -36, -28 y -16 h. Nuevas en 0 y +12 h.

La Figura 21 recoge la representación gráfica de los valores de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* obtenidos en los distintos grupos de prueba y controles (A-F) después de someter a los animales a distintos tratamientos con veneno de cobra (dosis inicial y dosis de mantenimiento).

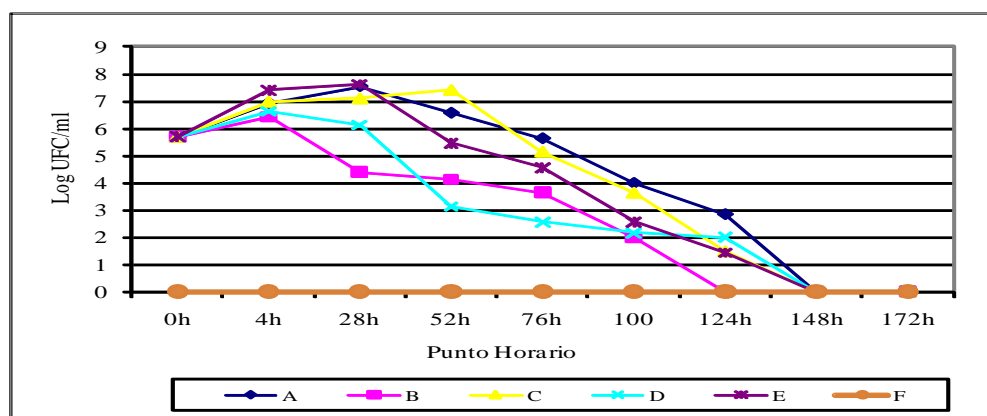


Figura 21. Supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones (hembras 30 g) tratados con veneno de cobra en 4 grupos de prueba (A –D) y controles (E, F) inoculados con 6,66989 log 10 de ufc de *A. pleuropneumoniae* (Primer experimento) entre 0 – 172 h.

Según puede verse, no se observan diferencias apreciables entre los grupos de prueba y el control de infección.

En la Tabla 33 se recogen los resultados correspondientes al número de animales encontrados muertos a lo largo de la experiencia, en los distintos grupos de prueba y controles, así como los animales vivos, que fueron sacrificados para llevar a cabo los recuentos. Según puede verse, todos los grupos de prueba presentaron fallecimientos, especialmente los dos primeros (A y B) mientras que los grupos controles funcionaron perfectamente, sin fallecimientos en el caso del control de infección y con un porcentaje menor en el caso del control de veneno de cobra. En todos los casos, las muertes se produjeron entre las 28 y 76 horas después de la infección.

Grupo / Horas	4h	28h	52h	76h	100h	124h	148h	172h	sacrificados	muertos
	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	%	%
A	2 / 0	1 / 7	1 / 2	1 / 2	2 / 0	2 / 0	2 / 0	2 / 0	54,17%	45,83%
B	2 / 0	1 / 1	1 / 9	1 / 2	2 / 0	2 / 0	2 / 0	1 / 0	50%	50%
C	2 / 0	2 / 0	2 / 4	2 / 3	2 / 0	2 / 0	2 / 0	3 / 0	70,84%	29,16%
D	2 / 0	2 / 1	2 / 1	2 / 2	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	83,4%	16,6%
E	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	100%	0
F	3 / 0	3 / 0	1 / 2	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	91,66%	8,34 %

Tabla 33. Ratones sacrificados (n) y muertos (n) inoculados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con veneno de cobra en 4 grupos de prueba (A –D) y controles (E, F) inoculados con 5,6989 log 10 de ufc de *A. pleuropneumoniae* (Primer experimento) entre 0 – 172 h. **S:** sacrificados. **M:** muertos.

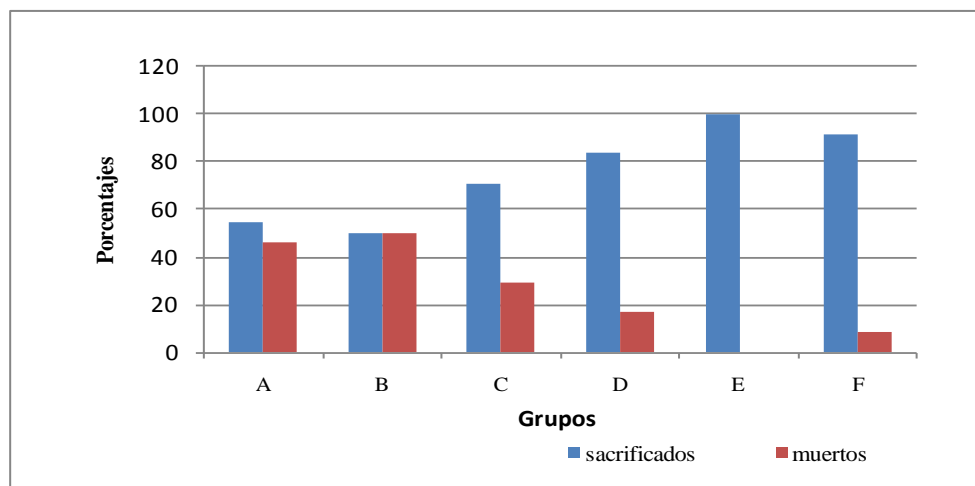


Figura 22. Representación gráfica del número de ratones muertos infectados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 – 172 h (primer experimento).

Segundo Experimento

En este experimento se valoró igualmente la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* (5×10^5 ufc) en 6 grupos (A –F) de 24 ratones tratados con veneno de cobra a lo largo de un periodo de 0 a 172 h. En la Tabla 34 y la Figura 23 se recogen los resultados obtenidos. Igual que sucedió en el primer experimento, no se observan diferencias notables respecto de la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* entre los grupos de prueba y el control de infección.

Grupo / Horas	0h	4h	28h	52h	76h	100h	124h	148h	172h
A	5,6989	6,2246	6,5378	6,5051	5,6232	5,6989	3,9864	1,4698	1
B	5,6989	5,8694	6,4204	4,3919	4,1248	3,6499	2,4692	1,6894	0
C	5,6989	6,2436	6,8643	7,4149	5,1461	4,602	4,6091	3,6367	1,4678
D	5,6989	5,9852	6,0791	6,1083	3,1248	2,5521	2,176	2	0
E	5,6989	6,1284	6,6232	6,4522	4,5641	3,6091	1,2216	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 34. Recuento de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 – 172 h. 24 ratones por punto horario (4 ratones por grupo); Total=192 animales. Valores de supervivencia en log 10 de ufc. 0 h corresponde al inóculo.

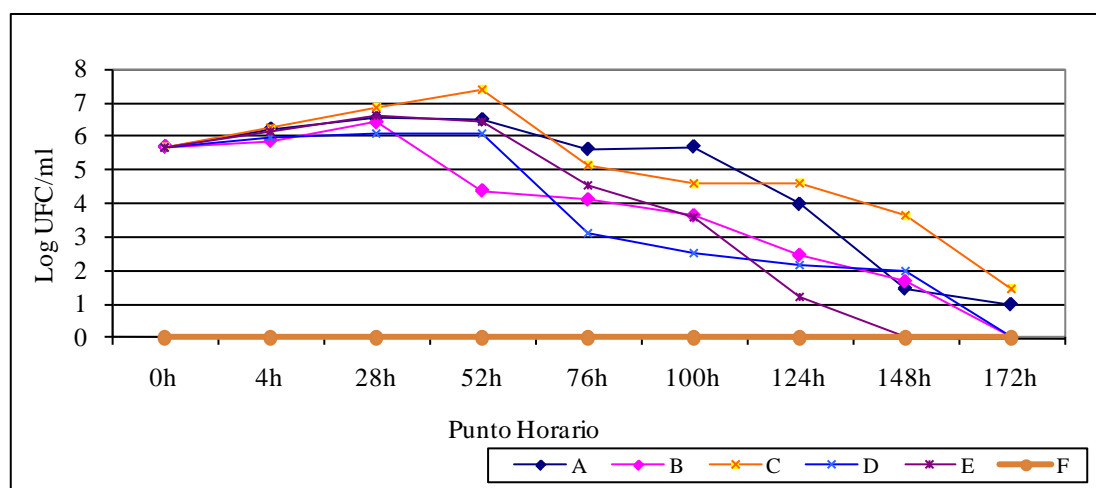


Figura 23. Promedio de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con veneno de cobra en un periodo de 0-172 h. Grupos.

En lo que se refiere a los animales hallados muertos en el curso del experimento, la Tabla 35 pone de manifiesto los mismos hechos descritos en el primer experimento, esto es, la concentración de muertos en los cuatro grupos de prueba, especialmente en los dos primeros (grupos A y B), la ausencia de muertos en el control de infección y la obtención de un número reducido de muertos en el caso del control de veneno de cobra. En este caso, la franja horaria en que aparecieron cadáveres se prolongó hasta las 100 h, siendo especialmente importante en el caso de las 52 y 76 h. La Figura 24 representa gráficamente los resultados anteriores.

Grupo	4h	28h	52h	76h	100h	124h	148h	172h	Sacrificados	Muertos
Horario	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	%	%
A	2 / 0	2 / 8	2 / 4	1 / 1	1 / 0	1 / 0	1 / 0	1 / 0	45,83%	54,17%
B	2 / 0	2 / 3	2 / 6	2 / 1	2 / 1	1 / 0	1 / 0	1 / 0	54,2%	45,8%
C	3 / 0	2 / 1	2 / 2	2 / 5	3 / 0	2 / 0	1 / 0	1 / 0	66,6%	33,4%
D	3 / 0	3 / 0	2 / 1	2 / 2	3 / 0	3 / 0	3 / 0	2 / 0	87,5%	12,5%
E	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	100%	0
F	3 / 0	3 / 0	1 / 2	2 / 1	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	87,5 %	12,5 %

Tabla 35. Sacrificio y muerte de ratones inoculados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 – 172 h. **S**= animales sacrificados. **M**= animales muertos.

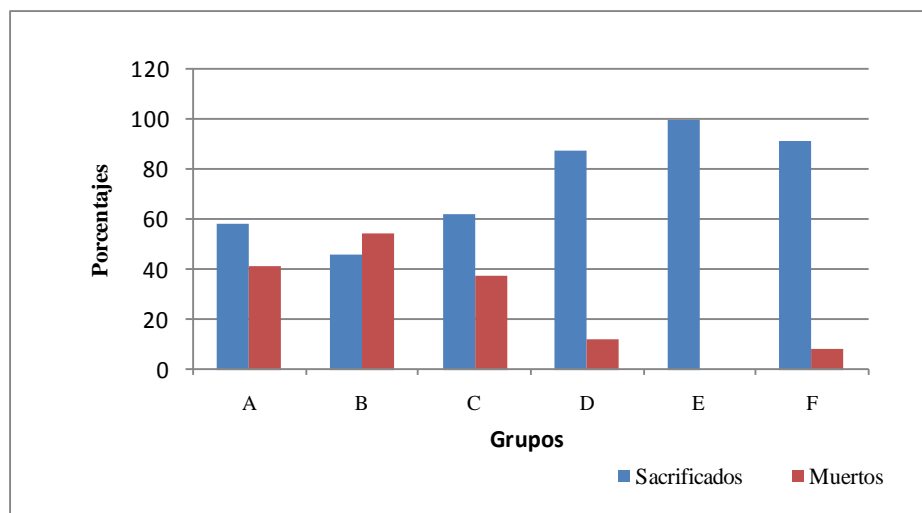


Figura 24. Número de ratones infectados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con veneno de cobra, muertos en un periodo de 0 – 172 h.

Tercer Experimento

En el último experimento (Tabla 36), la dosis de infección fue ligeramente más alta (1 log 10 más) aunque tampoco se observaron por ello diferencias apreciables entre los grupos de prueba y el control de infección, como había sucedido en los experimentos anteriores. La Figura 25 recoge la representación gráfica de los resultados obtenidos.

Grupo / Horas	0h	4h	28h	52h	76h	100h	124h	148h	172h
A	6,6532	6,4289	6,3982	6,124	5,6442	5,489	2,2246	1,5672	0
B	6,6532	6,4124	6,1436	6,6254	4,6022	3,6328	2,4824	0	0
C	6,6532	6,0742	7,1844	7,1268	5,558	3,458	2,170	1,2864	0
D	6,6532	6,8943	7,2486	6,0722	3,4894	2,6874	2	1,5426	0
E	6,6532	6,985	6,6214	7,4596	6,5674	4,6642	2,22	1	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 36. Recuento de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI (hembras 30 g) tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 – 172 h. 24 ratones por punto horario (4 ratones por grupo); Total=192 animales. Valores de supervivencia en log 10 de ufc. 0 h corresponde al inóculo. Grupos: Dosis de *A. pleuropneumoniae* 4.5 x 10⁶ ufc (6,6532 log 10 de ufc).

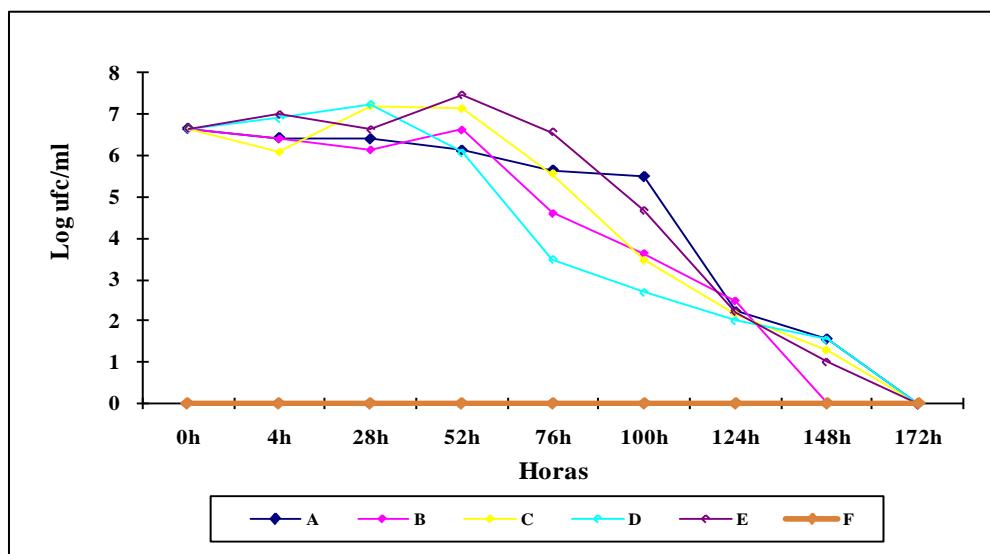


Figura 25. Recuento de *A. pleuropneumoniae* en ratones tratados con veneno de cobra en un periodo de 0 – 172 h.

La Tabla 37 recoge los resultados referidos a los animales encontrados muertos en el curso del experimento. Vuelven a repetirse los hallazgos de experimentos anteriores (primero y segundo), con una concentración de fallecimientos en los grupos de prueba, especialmente en los grupos A y B, aunque en este caso son también altos en el grupo C, y sin fallecimientos en el grupo de infección y muy moderados en el grupo control de veneno de cobra.

Grupo	4h	28h	52h	76h	100h	124h	148h	172h	Sacrificados	Muertos
Horario	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	%	%
A	2 / 0	2 / 8	2 / 4	1 / 1	1 / 0	1 / 0	1 / 0	1 / 0	45,8%	54,2%
B	2 / 0	2 / 3	2 / 6	2 / 1	2 / 1	1 / 0	1 / 0	1 / 0	54,2%	45,8%
C	3 / 0	2 / 1	2 / 2	2 / 5	3 / 0	2 / 0	1 / 0	1 / 0	66,6%	33,4%
D	3 / 0	3 / 0	2 / 1	2 / 2	3 / 0	3 / 0	3 / 0	2 / 0	87,5%	12,5%
E	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	100%	0
F	3 / 0	3 / 0	1 / 2	2 / 1	3 / 0	3 / 0	3 / 0	3 / 0	87,5 %	12,5 %

Tabla 37.-Ratones inoculados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con veneno de cobra, muertos en un periodo de 0 – 172 h. S=animales sacrificados. M= animales muertos.

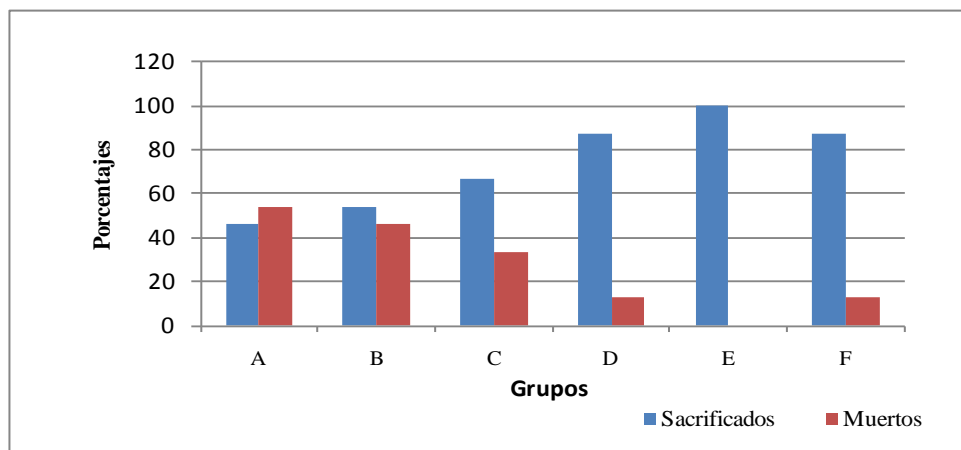


Figura 26. Número de ratones sacrificados y muertos en infectados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con veneno de cobra, muertos en un periodo de 0 – 172 h.

4.5.3. Influencia de la actividad del complemento en la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en el ratón.

El veneno de cobra (VC) contiene un factor (CVF, *cobra venom factor*) que actúa de forma semejante a C3b (es un análogo), formando un complejo muy estable (CVFBb) que provoca una activación masiva del complemento, liberando grandes cantidades de C3b y produciendo, por agotamiento, una depleción de C3 del plasma que termina causando la muerte del animal envenenado, en pocos minutos (García Olivares *et al.*, 2009).

El polisacárido capsular participa en la supervivencia de las bacterias capsuladas y en la resistencia al complemento, como lo demuestra el hecho de que los mutantes acapsulados de bacterias que poseen esta estructura se eliminan con facilidad del suero, precisamente a consecuencia de la actividad del complemento. En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio para determinar si el sistema del complemento influye directamente en la susceptibilidad o resistencia de los ratones NMRI frente a *A. pleuropneumoniae*. Se utilizó veneno de cobra naja (Sigma) cuya DL_{50} ha sido establecida en 1,75 mg/kg peso vivo (Norris, 1989).

Con el fin de determinar la dosis subletal (DSL_{50}) se llevaron a cabo 5 pruebas con otras tantas concentraciones del veneno de cobra. En la Tabla 30 se recogen los resultados de las 5 diferentes dosis de veneno de cobra utilizadas en los distintos grupos de ratones. La DSL quedó establecida en 0,0375 mg/kg y la dosis subletal de mantenimiento (DSL_m) en 0,0187 mg/kg.

Para llevar a cabo el estudio de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones descomplementados mediante el tratamiento con veneno de cobra, se llevaron a cabo un total de 3 experimentos en los que la única variación, además de la temporalidad, tenía lugar en relación con el inóculo. Todos los estudios incluían el protocolo descrito en la Tabla 11, con 4 ensayos de prueba y dos controles, tal y como allí se describe.

En el primero de los ensayos, al que corresponden los resultados recogidos en la Tabla 32, puede verse que el grupo A, al que se sometió al tratamiento con una dosis única de veneno de cobra (dosis inicial) al tiempo de la infección, se comportó de igual forma en la recuperación del microorganismo que los grupos C y D, que recibieron 5 y 6 dosis de veneno de cobra, respectivamente, y de manera muy similar a lo ocurrido con el grupo E, que no recibió tratamiento (control de infección).

Resumiendo, los efectos sobre la supervivencia de una dosis subletal (5,6989 log 10) de *A. pleuropneumoniae* en un total de 6 pruebas en las que se les administró a ratones NMRI diferentes combinaciones de veneno de cobra, que incluían una dosis inicial (0,0357 mg/kg) y una o varias dosis de mantenimiento (0,0187 mg/kg) antes y/o después de la infección, produjo efectos iguales o similares. Con excepción del grupo B y el control F, en el resto de los grupos se produjeron supervivencias hasta las 124 horas, anulándose a las 148 h postinfección. El rango de supervivencia a las 124 horas oscilaba entre 1,4 (grupo C) y 2,8 (grupo A) log 10, siendo de 1,42 log 10 en el caso del grupo E (control de infección sin tratamiento de descomplementación). El grupo B (una dosis inicial de VC 12 horas antes de la infección y 4 dosis de mantenimiento a las 12, 28, 40 y 52 horas después de la infección) produjo un adelantamiento de la eliminación a las 124 horas. De todo ello se deduce que la presencia o ausencia del complemento no influye de forma apreciable en la supervivencia y/o eliminación de *A. pleuropneumoniae*, lo que por otra parte guarda relación con el carácter capsulado de este microorganismo, que neutraliza la activación de este sistema inmune del animal. Tal condición está de acuerdo con los trabajos de Udeze y Kadis (1992) que, utilizando anticuerpos anti-cápsula, consiguieron la activación del sistema del complemento.

En la Tabla 33 se recogen los resultados de los animales que murieron y los que fueron sacrificados en los grupos de prueba. Un análisis cuidadoso de estos datos parece sugerir que el veneno de cobra potencia la acción de *A. pleuropneumoniae* aumentando

su virulencia o, inversamente, la susceptibilidad del animal al microorganismo, aunque los recuentos encontrados en los animales sacrificados no presenten variaciones en la supervivencia. Sin embargo, dosis repetidas (inicial más cinco de mantenimiento) en el control apenas producen un 8,33 % de mortalidad, de lo que parece excluirse la implicación del VC directamente como causa de muerte; de hecho, en el grupo D, al que se administró la misma cantidad de VC que al control F, aunque de distinto modo, el % de mortalidad supone el doble que en el control (16,6%), en cualquier caso lejos de los resultados obtenidos con los otros grupos: el grupo B, presentó el % más alto de mortalidad (50%), seguido del grupo A (45,83% de mortalidad) y el grupo C (29,16%). En el control de infección (solo *A. pleuropneumoniae*) no hubo muertos (0%).

Aunque, como se ha señalado antes, el umbral de las 124 horas es el último en el que se obtienen recuentos, excepto en el caso del grupo B, existen algunas diferencias en los niveles numéricos de los recuentos. El más alto corresponde al grupo A, seguido del grupo D y en tercer lugar el grupo C. Precisamente, el grupo A es el que recibió una única dosis de VC (inicial y ninguna de mantenimiento), mientras que el grupo D recibió 6 dosis (inicial y 5 de mantenimiento) y el grupo C recibió 5 dosis (inicial y 4 de mantenimiento). Si se trata de correlacionar, como se hizo antes, la mayor susceptibilidad del animal o la virulencia del agente con las muertes y directamente con los niveles de los recuentos, lo cierto es que no se aprecia relación numérica alguna. Por un lado, el grupo B, que es el que produce mayor mortalidad, es el que primero se anula (último recuento a las 100 h con un nivel de 1,98 log 10), pero por otra parte, el de mayor supervivencia (grupo A, 2,84 log 10 a las 124 h) le sigue muy de cerca en capacidad mortal.

En el **segundo** de los ensayos, en el que se mantuvo el mismo inóculo de infección, no se repitieron los resultados del primero. En lo que se refiere a supervivencia de *A. pleuropneumoniae* después del tratamiento con VC en los distintos grupos (Tabla 34), en el caso de los grupos A y C se alcanzó el límite de 172 horas sin anularse, mientras que en los dos grupos restantes (B y D) la supervivencia llegó a las 148 horas, curiosamente por encima del nivel de supervivencia del control de infección, E, sin tratamiento con VC. Paradójicamente, los tratamientos con VC, a partir del mismo inóculo de infección, prolongan la supervivencia del microorganismo y en el nivel de las 4-28 h se aprecia, además, un incremento de las poblaciones.

En lo que se refiere a las muertes (Tabla 36), nuevamente se aprecian cifras mucho más altas en los grupos de prueba que en los dos controles, alcanzando secuencias semejantes a las descritas en el primer experimento.

Finalmente, en el **tercero** de los experimentos, con un inóculo de infección de 6,6532 log 10 (Tabla 36), el resultado muestra anulación de todos los grupos a las 172 horas y en el caso del grupo B, a las 148. Solamente los grupos C y D manifestaron incrementos leves en la población microbiana, aunque retrasados a las 28 horas. El control de infección produjo resultados similares a los de prueba. En lo que se refiere a la presentación de muertes de ratones en los distintos grupos (Tabla 37), vuelve a repetirse la misma observación anterior, esto es, los mayores porcentajes se obtienen en los grupos A, B y C. En los tres experimentos, después de la infección intranasal y a partir del día 2 post-infección, los animales presentaron apatía y dificultad respiratoria, con pérdida de peso. En la Tabla 38 se comparan los datos más significativos de los tres experimentos de prueba.

Grupos de prueba	Supervivencia (horas último recuento positivo)	Supervivencia (diferencia log inóculo último recuento positivo)	% mortalidad (en 172 horas)	Incrementos de la población de <i>A. pleuropneumoniae</i>
A1	124	2,8577	45,83	hasta las 76 h
A2	≥172	4,6989	41,66	hasta las 52 h
A3	148	5,086	54,1	sin incrementos
A(media)	≥ 148 ± 24	4,2142 ± 21	47,1 ± 6,3	
B1	100	3,7133	50	hasta las 4 h
B2	148	4,0095	54,16	hasta las 28 h
B3	124	4,1708	45,8	sin incrementos
B(media)	124 ± 24	3,9645 ± 2,3	49,9 ± 4,2	
C1	124	4,2165	29,16	hasta las 52 h
C2	≥172	3,6989	37,5	hasta las 52 h
C3	148	5,3668	37,5	hasta las 52 h
C(media)	≥ 148 ± 24	4,4274 ± 8,5	34,7 ± 4,8	
D1	124	3,6989	16,6	hasta las 28 h
D2	148	3,6989	12,5	hasta las 52 h
D3	148	5,1106	12,5	hasta las 28 h
D(media)	140 ±	4,1694 ± 8,2	13,8 ± 2,4	
E1	124	4,2703	0	hasta las 28 h
E2	124	4,4773	0	hasta las 52 h
E3	148	5,6532	0	hasta las 52 h
E(media)	132	4,8002	0	
F1	-	-	8,3	
F2	-	-	8,3	
F3	-	-	12,5	
F(media)	-	-	9,7	

Tabla 38. Resumen de tres experimentos (cada uno con 6 grupos diferentes, A, B, C, D, E, F) de supervivencia y mortalidad de ratones NMRI inoculados con *A. pleuropneumoniae* y descomplementados con diversas dosis y combinaciones de veneno de cobra

Puede concluirse, por tanto, en los términos señalados en relación con el primer experimento, cuyas reflexiones son ampliables a la totalidad de las pruebas: que la descomplementación de los ratones con veneno de cobra, en diversas combinaciones antes de la infección, simultáneamente con ella y después, no traduce cambios destacables respecto del grupo control de la infección, no descomplementado, con lo cual puede deducirse que este microorganismo, que presenta cápsula antifagocítica, también es funcional frente a este sistema. Por otra parte, en razón de los datos obtenidos, parece que la virulencia del microorganismo se ve influida por el tratamiento o pudiera ser que la influencia tuviera que ver con la susceptibilidad.

4.6. Influencia de la depleción de neutrófilos (PMN) en la infección y supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones NMRI, tratados con transferrina porcina.

Los neutrófilos se consideran la diana celular principal de *A. pleuropneumoniae*. Otras células vulnerables al ataque de los factores de virulencia de este agente, principalmente sus toxinas RTX, incluyen macrófagos alveolares, células epiteliales y células testiculares.

Los neutrófilos son fagocitos que directamente no son capaces de expresar su máximo potencial fagocítico y bactericida, resultando menos resolutivos que los macrófagos en la eliminación de agentes externos. Sin embargo, el contacto previo con un agente primario o con un factor estimulante incrementa su capacidad fagocítica (Reinard *et al.*, 2000), debido más a un incremento en el número de células que se activaron que a un incremento de la capacidad fagocítica individual (Roszkowski *et al.*, 1980; Roszkowski *et al.*, 1990).

El presente estudio se llevó a cabo para valorar la importancia de los neutrófilos en el desarrollo de la enfermedad y muerte de ratones NMRI infectados con *A. pleuropneumoniae*, así como para comprobar su influencia en la supervivencia y/o multiplicación de este agente en el modelo ratón. Con este propósito se llevaron a cabo una serie de experimentos en animales tratados con el anticuerpo monoclonal Ly-6G, que provoca depleción de neutrófilos, y distintas condiciones, incluyendo la administración de transferrina porcina cargada con hierro, además de la correspondiente infección con una dosis subletal del microorganismo.

4.6.1. Elementos formes de sangre periférica y supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en diferentes grupos de ratones infectados y tratados con el anticuerpo monoclonal Ly-6G y 100 µg de transferrina sérica porcina.

Como se señala en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos, se llevó a cabo un estudio para investigar la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* y la mortalidad de los animales inoculados en un total de seis grupos de 30 animales cada uno (grupos 1-6), que fueron inoculados con el anticuerpo monoclonal Ly-6G, transferrina porcina (100 µg) e infectados con *A. pleuropneumoniae* 5×10^5 ufc (grupo 1), con el anticuerpo monoclonal e infectados (grupo 2), un control de infección con *A. pleuropneumoniae* (grupo 3), con el anticuerpo monoclonal y transferrina porcina pero no infectados (grupo 4), solo con anticuerpo monoclonal (grupo 5) y un control sin tratar ni infectar (grupo 6).

El estudio se llevó a cabo durante un periodo de 15 días, utilizando diferentes intervalos para la toma y procesamiento de muestras. Los resultados se recogen en la Tabla 39.

Grupos / Días	inoculo/infección	día 1	día 2	día 3	día 6	día 10	día 15
Grupo 1	5,6989	6,5284	6,5806	6,7883	2,9337	0,4430	0
Grupo 2	5,6989	6,4102	6,7376	7,2612	2,9244	0,1234	0
Grupo 3	5,6989	6,6364	7,5742	6,5240	2,6892	0	0
Grupo 4	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 5	-	-	-	-	-	-	-
Grupo 6	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 39. Recuento (supervivencia) de *A. pleuropneumoniae* en ratones tratados con el anticuerpo monoclonal Ly-6G (clon RB6-8C5) y transferrina porcina saturada de Fe. Valores de los recuentos de ufc expresados en log 10. Inóculo de infección de 5×10^5 ufc (5,6989 log 10), día= día post-infección.

Según puede verse, el dato de supervivencia se prolonga hasta las 144 horas (6 días) en el control de infección (grupo 3) mientras que en los dos grupos de prueba (grupos 1 y 2), en que se administra el anticuerpo monoclonal y la transferrina o solamente el primero, la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* se prolonga por encima de las 240 horas, muy superior al valor obtenido en el correspondiente control de infección. Aunque es cierto que el resultado no proporciona información entre el sexto y

décimo día, el hecho de que se obtenga un resultado positivo, aunque mínimo, pone de manifiesto la influencia de la desaparición o depleción de neutrófilos en la supervivencia del microorganismo y, en su caso, la presencia de transferrina.

La Figura 27 representa gráficamente los resultados y adolece del mismo inconveniente (falta de datos en el intervalo 6 – 10 días).

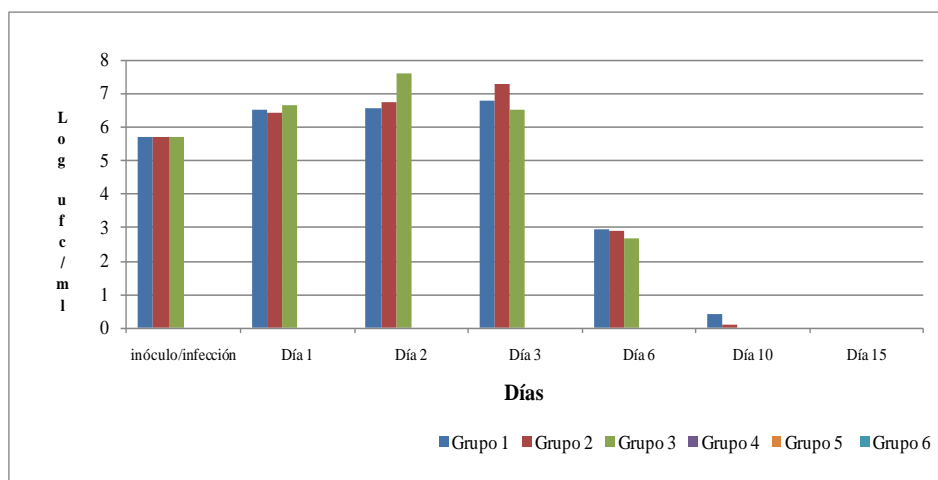


Figura 27. Recuento y supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en ratones tratados con AcMc y transferrina porcina en un periodo de 15 días.

En el curso de los 15 días de duración del experimento se contabilizaron diversos fallecimientos en los animales, en los diferentes grupos. La Tabla 40 recoge las cifras de ratones encontrados muertos y sus porcentajes relativos a lo largo de los 15 días del experimento, diferenciando en cada caso el número de animales en los que se reconocieron previamente síntomas de infección por *A. pleuropneumoniae*. Según puede verse, la mayor susceptibilidad corresponde al grupo 2 (animales inoculados con el anticuerpo monoclonal e infectados), lo que pone de manifiesto la importancia relativa de este hecho en la depleción de neutrófilos, y en consecuencia, del AcMc en la vulnerabilidad a la mortalidad debido a la infección por *A. pleuropneumoniae*. También resulta interesante destacar que es el efecto combinado el que proporciona mayor letalidad (infección + monoclonal + transferrina) como sería de esperar, al facilitar la presencia de Fe^{3+} utilizable, la actividad del microorganismo. Además, la mortalidad en el testigo de infección (grupo 3) y en el control del AcMc y transferrina (grupo 4) fueron prácticamente residual (2 animales en el primero y 1 animal en el segundo).

La Figura 28 representa gráficamente los resultados descritos de la Tabla 40 y puede verse, con claridad, primero que los muertos se concentran en los primeros días del experimento y la importancia relativa de los grupos 1 y 2, sobre el resto.

Grupo		Número	1	2	3	6	10	15	sacrificados	Muertos
		ratones	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	S/M	%	%
Grupo 1	AcMc + Tf+ App	30	4 / 3	3 / 8	2 / 2	2 / 2	2 / 0	2 / 0	50	50
Grupo 2	AcMc +App	30	3 / 2	3 / 6	5 / 1	5 / 1	2 / 0	2 / 0	66,6	33,4
Grupo 3	App	30	5 / 1	5 / 0	5 / 1	5 / 0	5 / 0	3 / 0	93,34	6,66
Grupo 4	AcMc + Tf	30	5 / 0	5 / 1	5 / 0	5 / 0	5 / 0	4 / 0	96,6	3,3
Grupo 5	AcMc	30	5 / 0	5 / 0	5 / 0	5 / 0	5 / 0	5 / 0	100	0
Grupo 6	sano	12	2 / 0	2 / 0	2 / 0	2 / 0	2 / 0	2 / 0	100	0

Tabla 40. Porcentaje de ratones muertos en un periodo de 15 días. S: animales sacrificados, M: animales muertos; AcMc: anticuerpo monoclonal Ly-6G; tf: transferrina porcina; App: *A. pleuropneumoniae*.

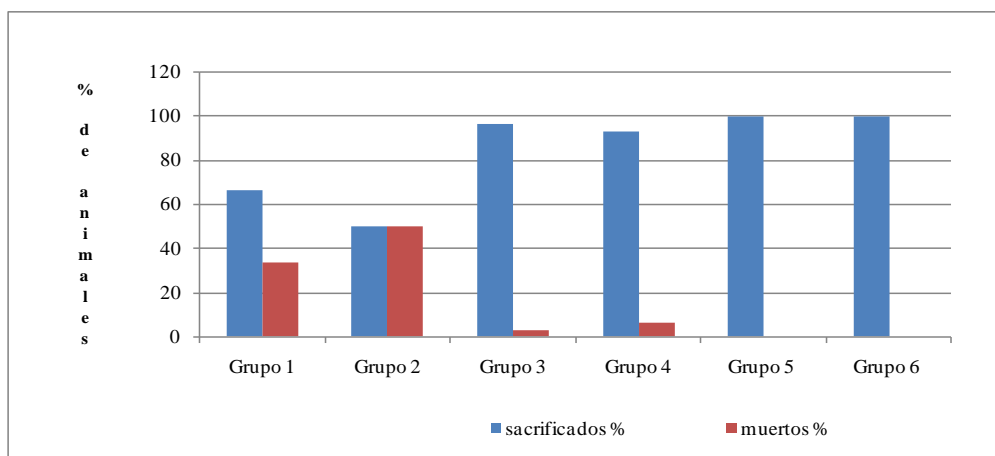


Figura 28. Recuento de sacrificio y muerte de ratones inoculados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con AcMc y transferrina porcina en un periodo de 15 días.

La Tabla 41 muestra los resultados que se refieren a la cifra de neutrófilos en sangre periférica en este experimento. La Figura 29 representa gráficamente los mismos.

Grupo/Día	Tratamiento	infección	día 1	día 2	día 3	día 6	día 10	día 15	Media del grupo
Grupo 1	AcMc + tf+ App	35	21	18	17	15	13	12	16 ± 7,55
Grupo 2	AcMc +App	42	23	21	21	20	18	18	20,16 ± 8,15
Grupo 3	App	47	50	50	47	44	44	41	46 ± 3,14
Grupo 4	AcMc + tf	40	34	31	30	28	25	21	28,16 ± 5,97
Grupo 5	AcMc	38	14,3	18,8	12,3	11,3	17,8	28,3	17 ± 9,03
Grupo 6	sano	44	40,7	48,25	41	41	44	41,5	42,8 ± 2,63

Tabla 41. Porcentaje de neutrófilos sobre el total de elementos formes de la sangre periférica en grupos de ratones inoculados con distintas combinaciones de: anticuerpo monoclonal Ly-6G, transferrina porcina cargada con hierro e infectados (ver texto), en un periodo de 15 días. La cifra se refiere a las medias de los animales supervivientes en cada periodo. AcMc: anticuerpo monoclonal Ly-6G; tf: transferrina porcina; App: *A. pleuropneumoniae*.

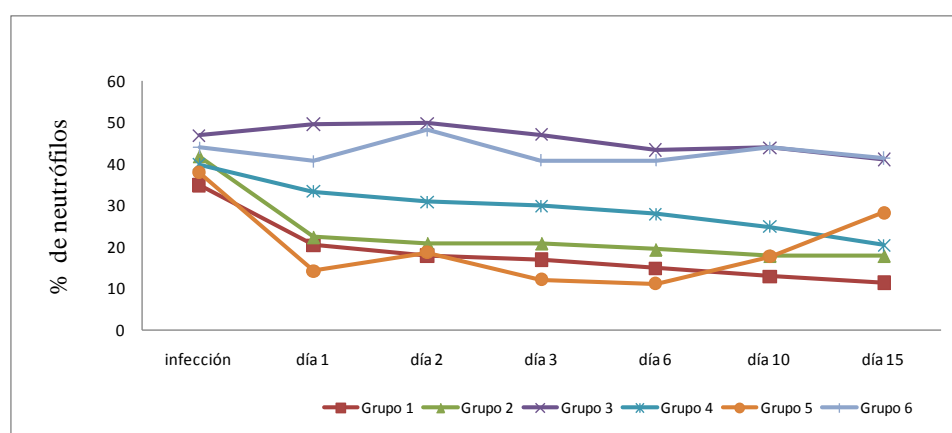


Figura 29. Porcentaje de neutrófilos en sangre periférica (sobre total de leucocitos) de ratones inoculados con *A. pleuroneumoniae* tratados con el AcMc Ly-6G y transferrina porcina (ver texto) en un periodo de 15 días

Si se toma como referencia la cifra de PMN en el grupo 6 (control sano 42,8%) resulta que la infección sola (grupo 3, 46%) es causa del aumento de la cifra de PMN entre el día 1 y 10 una media de 3,2 puntos (42,8% de media en el control sano por 46% de media en el grupo 3, solo infectado), que se reduce a 5 puntos (42,75% de media en el control sano y 47,75% de media en el grupo 3) si solo se consideran los valores con el crecimiento en el control de infección (hasta el sexto día y anulación el décimo). Al comparar el mismo periodo (días 1 a 15) entre el control sano (grupo 6, 42,8%) y los grupos de infección (grupos 1 y 2) lo que resulta es precisamente lo contrario: una clara depleción en la cifra de PMN, que va desde 26,8 puntos en el caso del grupo 1 (16% de media) a 22,64 puntos (20,16% en el caso del grupo 2, respecto de 42,8% en el control sano, grupo 6).

En el caso del grupo 4, no infectado, pero tratado con el AcMc y la transferrina, también se produce depleción, aunque la reducción solamente alcanza 14,64 puntos (28,16% de media en el grupo 4 respecto al 42,8% en el control sano, grupo 6). Finalmente, en el caso del grupo 5 (AcMc solo) la diferencia (25,8 puntos) aboga igualmente por una clara depleción de los PMN atribuibles en exclusiva a la acción del anticuerpo monoclonal.

Resumiendo pues, la infección produce una movilización y diferenciación de neutrófilos, mientras que el tratamiento con el AcMc produce depleción. Ahora bien, la acción combinada del anticuerpo con transferrina y sobre todo con la infección, incrementa claramente la depleción. Este hecho, por otra parte, justificaría la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en los 2 primeros grupos, que se prolonga más allá de los 10 días, seguramente al encontrar menor resistencia celular, demostrando por ello que los neutrófilos murinos constituyen una barrera eficaz frente a la infección, que influye en la resistencia de esta especie animal al microorganismo.

4.6.2. Estudio de la población de neutrófilos por citometría de flujo.

Como se ha señalado en el apartado correspondiente de Materiales y Métodos, las muestras de sangre periférica de los animales objeto del experimento (6 animales) fueron procesadas mediante gradiente de Ficoll separando, por un lado, el sobrenadante que contiene linfocitos y monocitos y, por otro, un pellet integrado por eritrocitos y granulocitos. Los eritrocitos fueron eliminados del pellet por lisis osmótica y los neutrófilos se mantuvieron en suspensión a 4°C en D-PBS con 2% de SFB, siendo marcados con el anticuerpo monoclonal Ly-6G y sometidos después a un análisis celular por citometría de flujo, con el fin de llevar a cabo un estudio particular a lo largo del experimento.

4.6.2.1. Valores de la población de neutrófilos.

En la Tabla 42 y en la Figura 30 y 31 puede observarse la evolución de los porcentajes de neutrófilos de los ratones tratados con el AcMc e infectados con *A. pleuropneumoniae* en presencia de 100 µg de transferrina porcina.

Ratones	pre-trat-inf	post - infección y tratamiento					
de prueba	día -3	1 día	2 día	3 día	4 día	5 día	6 día
1	55,5	30,8	25	13,5	6,7	35,8	3,2
2	15,2	6,2	15,8	26	12,3	35,5	16,6
3	45,2	5,8	10,3	29,8	24,1	12,2	4,6
4	62,6	11,8	19,2	8,3	35,3	2,5	4,5
5	30,6	17,6	20	6,7	13,5	0,4	13,5
6	39,8	45,8	15,8	5,8	7,9	0	16,9
promedio	41,5	19,7	10,1	15,0	16,6	14,4	9,9
desviación estándar	17.1	15.8	5.0	10.4	11.0	17.0	6.5

Tabla 42. Recuento (%) de neutrófilos por citometría de flujo en ratones infectados con *A. pleuropneumoniae* en presencia de 100 µg de transferrina en un periodo de 6 días; pre-trat-inf: tratamiento previo a la infección con el AcMc Ly – 6G.

Después de la infección se observó un descenso significativo del porcentaje de neutrófilos. En los días 3º, 4º y 5º el descenso fue significativo, con un valor de *p* comprendido entre 0,015396* y 0,026311*, tornándose esta diferencia más significativa en el sexto día (*p*= 0,002373**) (Figura 28). Por otro lado, en los dos primeros días post-infección no se observaron diferencias significativas en comparación con los porcentajes en la pre-infección. En la Figura 30 y 31 se representa la evolución de los neutrófilos de un ratón representativo dentro del presente grupo.

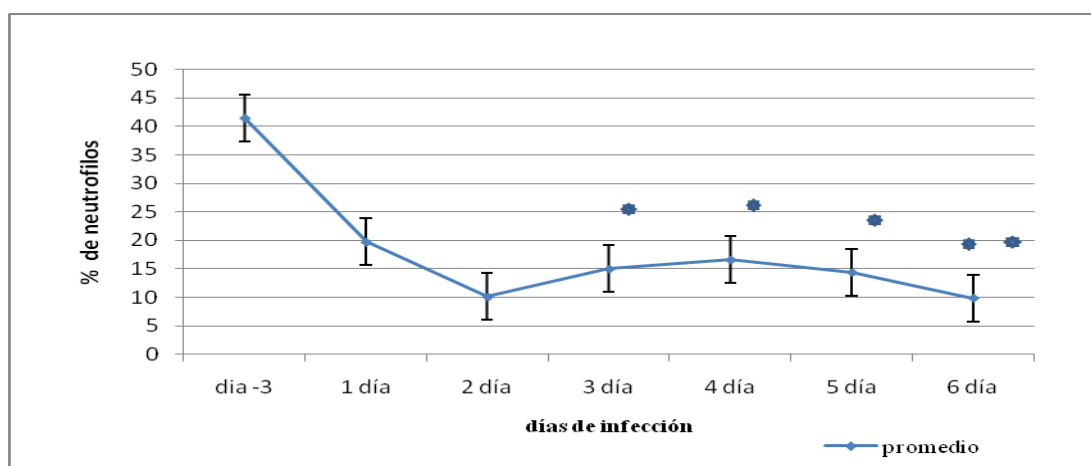


Figura 30. PMN en sangre periférica de ratones tratados con AcMc, infectados con *A. pleuropneumoniae* y tratados con 100 µg de transferrina porcina en un periodo de 6 días.

Parece suceder que la triple dosis de AcMc administrados en los días previos a la infección (-3, -2, -1) es suficiente para mantener reducida la cifra de PMN las 48 horas que siguen, hasta que se produce una nueva administración los días 2 y 6.

En lo que se refiere a las respuestas observadas después de la dosis de AcMc de los días 2 y 6, las respuestas acusan por lo general una disminución rápida de las cifras, aunque en algunos animales se produce el efecto contrario (ratones 2 y 3), que se estabiliza en los días posteriores. En general, estos datos coinciden básicamente con los resultados obtenidos mediante tinción de la sangre periférica y recuento al microscopio y ponen de manifiesto la eficacia del anticuerpo monoclonal provocando una depleción de esta subpoblación celular, clave en la respuesta innata a la infección por *A. pleuropneumoniae*. Las toxinas producidas por este microorganismo (Apx-I y Apx-II, fundamentalmente) inducen el estallido respiratorio en los neutrófilos porcinos y posteriormente este efecto es inhibido como consecuencia de la muerte debida a las propias toxinas (Dom *et al.*, 1992; Udeze y Kadis, 1992). Se puede concluir que el papel de los neutrófilos en la resistencia o susceptibilidad a la infección del ratón por *A. pleuropneumoniae* queda demostrado de forma indirecta, aumentando la supervivencia en su ausencia, tanto en presencia de transferrina porcina, como sin ella, alrededor de 100 horas, cuando se comparan los grupos de prueba con el control de infección.

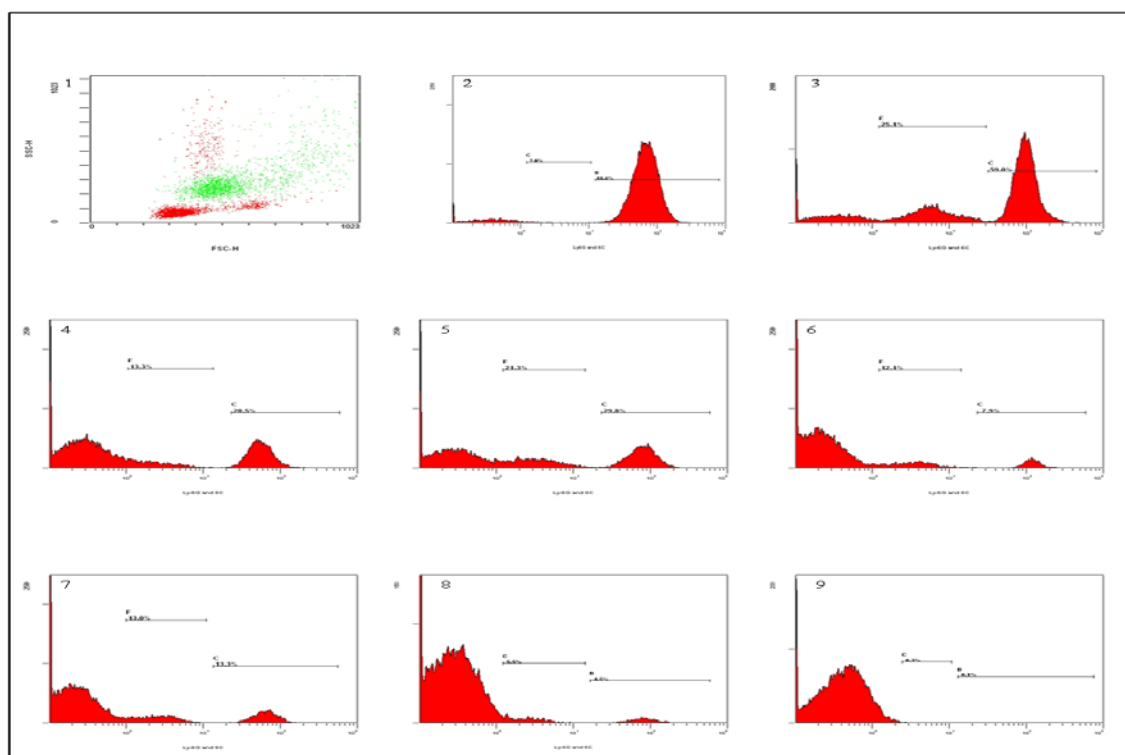


Figura 31. Polimorfonucleares neutrófilos correspondiente al ratón no. 1. Representación por medio de histogramas de la evolución de los neutrófilos (Ly 6G⁺) de los ratones infectados y tratados con 100 µg de transferrina porcina, en los diferentes momentos del estudio. (1) Representación bidimensional del tamaño celular (FSC) frente a la complejidad celular (SSC) de los polimorfonucleares neutrófilos obtenidos mediante el gradiente de densidad. 2-8: Representación de los porcentajes de expresión del AcMo Ly6G en la población total de polimorfonucleares neutrófilos en los diferentes días del experimento (pre y post infección) y 9: Control negativo de la tinción.

4.7. Vacunación de ratones frente a *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, utilizando una bacterina elaborada con cuerpos celulares, toxinas inactivadas y proteínas receptoras de transferrina.

En el apartado de Material y Métodos se ha descrito la composición de la vacuna, que fue diseñada en nuestro laboratorio, principalmente destinada a la protección del cerdo frente a la infección, y adaptada por nosotros al modelo murino.

4.7.1. Grupos de animales

Se utilizaron 3 grupos de ratones de 30 animales cada uno. El primero, designado como VI, correspondió a los animales vacunados e infectados; el grupo VNI, a los animales vacunados pero no infectados (control de vacunación) y finalmente el tercer grupo, NVI, a los animales no vacunados e infectados (control de infección). En todos los grupos se administraron tratamientos de 100 µg de transferrina porcina sérica.

Se tomaron muestras de sangre intracardiaca, con el propósito de determinar la presencia de anticuerpos frente a *A. pleuropneumoniae* mediante una prueba ELISA. También se procedió al sacrificio periódico, con extracción y cultivo bacteriológico del pulmón para el recuento de ufc de *A. pleuropneumoniae* con el fin de determinar su supervivencia, anotando siempre la presencia de cualquier cambio clínico.

4.7.2. Desafío

Los grupos de desafío (VI y NVI) se mantuvieron por duplicado con el objeto de ser investigados en la capacidad protectora de la vacuna frente a dos niveles de desafío con la cepa homóloga (CM5 del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*): una dosis subletal de 5×10^5 ufc en el primer experimento, y otra letal ($2,88 \times 10^7$ ufc en el segundo experimento), en ambos casos administrada por vía intranasal, el día 31 después de la primera dosis de vacuna. En cada experimento se dispuso un grupo control de VNI.

La vacuna que se aplicó en los ratones, al igual que el placebo, en el caso del grupo control, lo fue por vía subcutánea, en la parte ventral, y al lado izquierdo de la línea media del abdomen de los ratones, aplicando una segunda dosis a los 15 días.

Los síntomas que presentaron los animales al desafío fueron erizamiento de pelo, conjuntivitis, párpados cerrados, postración, debilidad y, en algunos casos, muerte.

Primer experimento

En la Tabla 43 y Figura 30 se muestran los resultados de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* después del desafío, con una dosis intranasal de 6×10^5 ufc y 100 µg de transferrina porcina sérica, a lo largo de 10 días (media de 2 ratones por día) estableciendo su comparación entre animales vacunados (VI) y no vacunados (NVI), manteniendo el tercer ratón para los estudios serológicos y como reserva.

Grupo	día 0	día 15	día 29	día 30	día 31	día 32	día 33	día 34	día 35	día 36	día 37	día 38	día 39	día 40
VI	1° vacuna	2° vacuna	transferrina 100 µg	infección subletal (5×10^5)	6,5776	7,1333	6,40415	6,794	5,6982	4,9185	3,8488	2,33905	0,6243	0,2456
NVI					6,5532	7,6134	5,6622	5,8246	3,7432	2,5362	1,3552	0,6248	0	0
VNI	1° vacuna	2° vacuna		no infección	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 43. Recuento de *A. pleuropneumoniae* en los grupos VI y NVI de ratones en el estudio. 1ª vacunación día 0, 2ª vacunados día 15, extracción de pulmones para análisis bacteriológico días 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 y 40. Datos media de 2 animales.

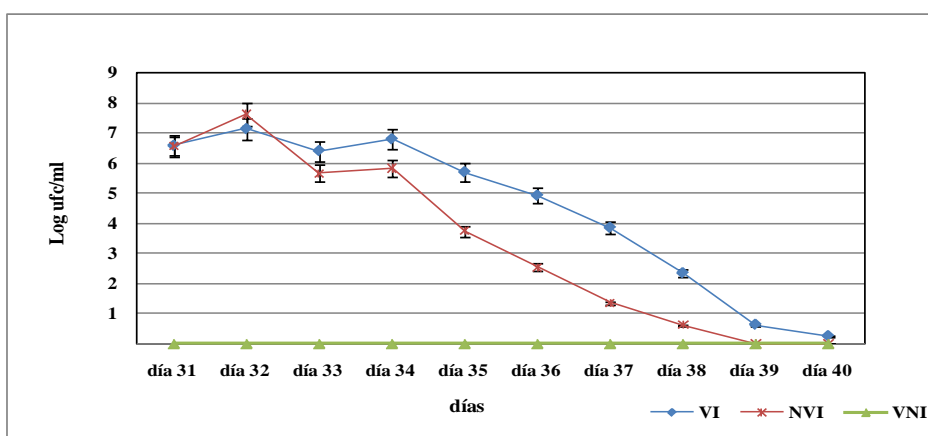


Figura 32. Recuento de *A. pleuropneumoniae* en ratones tratados con transferrina porcina y vacunados en un periodo de 40 días. Datos media de 2 animales

Grupo	1a	2°						transferrina 100µg	Infección					
	vacuna	vacuna	día 0	día 15	día 18	día 20	día 22	día 24	día 29	día 30	día 32	día 34	día 36	día 38
VI	0,045	0,1042	0,6766	0,1773	0,1575	0,3200	0,4165	subletal (5 x 10 ⁵)		0,801	0,788	0,838	0,931	0,306
NVI	0,078	0,087	0,1869	0,189	0,191	0,188	0,373			0,3758	0,4458	0,4547	0,4232	0,567
VNI	0,038	0,1053	0,326	0,6056	0,2692	0,2566	0,5263			0,5094	0,4858	0,5216	0,4378	0,4707
control	0,048	0,045	0,078	0,047	0,056	0,062	0,067			0,062	0,064	0,058	0,062	0,06

Tabla 44. Valores ELISA en los grupos VI (vacunados e infectados), NVI (no vacunados e infectados) VNI (vacunados no infectados), de ratones en el estudio. Datos media de 2 animales.

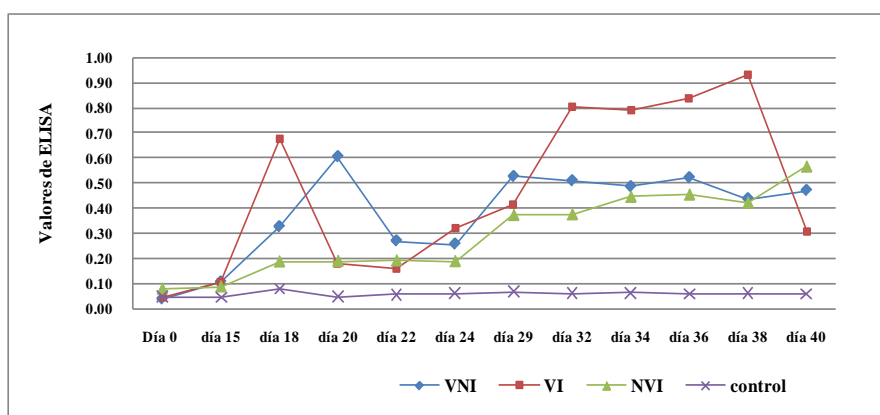


Figura 33. Valores de ELISA en ratones infectados (dosis subletal) con *A. pleuropneumoniae* y vacunados en un periodo de 10 días.

Segundo Experimento

Los resultados de la vacunación en ratones infectados con una dosis letal intranasal de $2,88 \times 10^7$ ufc de *A. pleuropneumoniae*, tratados con 100 µg/ml de transferrina porcina, valorando los parámetros supervivencia de *A. pleuropneumoniae* y ELISA, teniendo solo un grupo vacunado e infectado VI (vacunados el día 1 y revacunado día 15) figuran en la Tabla 45 y en la figura 34. Los resultados correspondientes a los datos obtenidos con el método ELISA, figuran en la Tabla 46 y Figura 35.

Grupo	día 0	día 15	día 29	día 30	día 31	día 32	día 33	día 34	día 35	día 36	día 37	día 38	día 39	día 40
VI	1° vacuna	2° vacuna	transferrina 100 µg	infección letal (2,8 x 10 ⁶)	7,5218	8,5532	8,6134	7,6622	6,8246	5,7432	3,536	3,3552	2,231	0,2486
NVI					7,5440	8,6020	M	M	M	M	M	M	M	M
VNI	1° vacuna	2° vacuna		no infección	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 45. Recuento de *A. pleuropneumoniae* en los grupos VI y NVI de ratones en el estudio. 1ª vacunación día 0, 2ª vacunados día 15, extracción de pulmones para análisis bacteriológico días 31, 32,33,34,35,36,37,38,39 y 40. M= ratones muertos.

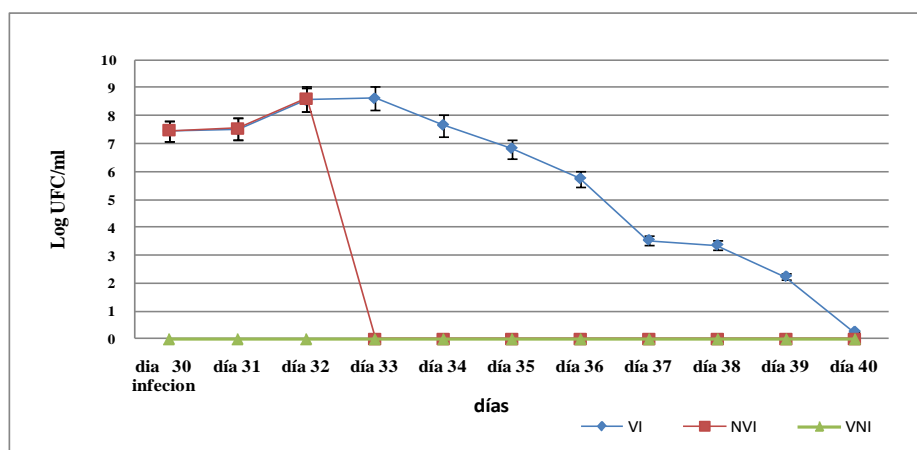


Figura 34. Recuento de *A. pleuropneumoniae* en ratones vacunados y tratados con transferrina porcina en un periodo de 40 días.

Grupo	día 0	día 15	día 18	día 20	día 22	día 24	día 29	día 30	día 32	día 34	día 36	día 38	día 40
VI	0,04236	0,1212	0,4914	0,6442	0,2452	0,218	0,4573	dosis letal (2,8 x 10 ⁶)	0,8709	0,8155	0,9134	0,7985	0,895
NVI	0,03942	0,0669	0,0813	0,0609	0,0724	0,0664	0,2718		0,7228	M	M	M	M
VNI	0,04802	0,0938	0,6979	0,1505	0,1694	0,3157	0,4816		1,0567	1,0261	1,4621	0,4446	1,1866
Control	0,046	0,048	0,068	0,056	0,066	0,065	0,057		0,068	0,066	0,068	0,062	0,072

Tabla 46. Valores ELISA en los grupos VNI (vacunados no infectados), VI (vacunados e infectados), NVI (no vacunados e infectados) de ratones en el estudio.

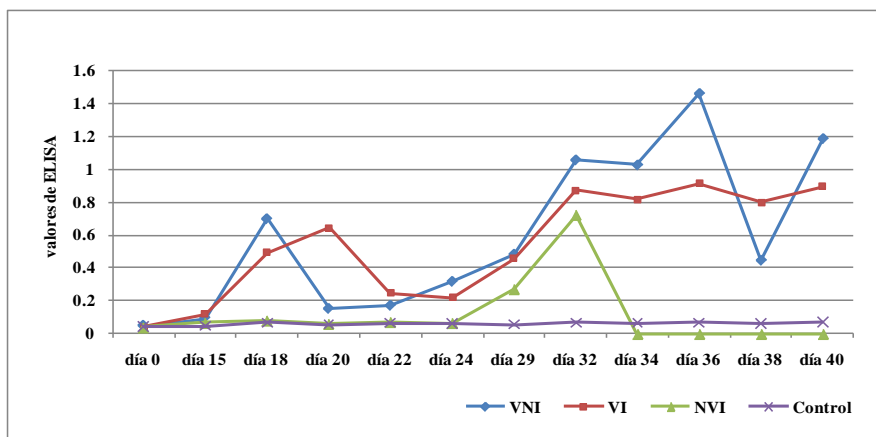


Figura 35. Valores de la prueba de ELISA en suero de ratones infectados y en un periodo de 40 días.

En el primer experimento, con un periodo de 40 días, los grupos de ratones recibieron una dosis subletal por vía intranasal de 6×10^5 ufc. Como podemos ver en la Tabla 43, tanto en el caso de los animales vacunados (VI) como en los no vacunados (NVI), la supervivencia de una dosis subletal de *A. pleuropneumoniae* con 100 μ g de transferrina se prolonga al menos 8 días, llegando a 10 (sin anularse) en el caso de los animales vacunados, lo cual resulta sorprendente toda vez que la presencia de anticuerpos, según se observa en la Tabla 44, es evidente. Tal parece que dichos anticuerpos no son neutralizantes o que su nivel es insuficiente para bloquear al agente y provocar su eliminación. En cualquier caso, el análisis de esta tabla pone de manifiesto una respuesta significativa en la técnica de ELISA entre los grupos (VI, NVI y VNI), pese a que por el momento no puede imputarse la prolongación de la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* a una razón concreta.

En el segundo experimento, desafiando los animales vacunados con la dosis letal del serotipo homólogo (serotipo 1) de *A. pleuropneumoniae*, sí que se observa una clara protección de los animales vacunados (Tabla 45), que sobreviven respecto de los controles (que comienzan a morir a partir de las 48 horas); sin embargo, como sucede en hospedador natural, no se resuelve la condición de portador (supervivencia del *A. pleuropneumoniae*) que en este caso alcanza el límite del estudio (diez días) aunque se observa un progresivo aclaramiento que en esa fecha es prácticamente residual.

En relación con los valores ELISA en este experimento, aunque resultan por lo general algo mayores que en el experimento anterior, en el mismo día que los animales

permanecían vivos después del desafío, no parece que la diferencia justifique la mortalidad.

La utilización del ratón en estudios de inmunidad frente a *A. pleuropneumoniae* ha sido una constante desde comienzos de los años ochenta, cuando comenzó a investigarse sobre la patogenia de este agente y sus posibilidades de control mediante todo tipo de preparados vacunales. Sebunya y Saunders (1982) utilizaron ratones *Swiss White* para evaluar la eficacia de diversas bacterinas elaboradas con el serotipo 5, administradas subcutánea e intranasalmente, obteniendo en el primer caso títulos de seroaglutininas más altos y eficaces que cuando el preparado se administraba por vía intranasal, frente al desafío intranasal, aunque los resultados no fueron calificados como favorables en lo que a protección se refiere, con dosis de desafío superiores a 1,2 DL₅₀ del agente. Bhatia *et al.* (1991) utilizaron ratones CD-1 para estudiar la eficacia protectora de diferentes preparados vacunales a partir de diferentes componentes de *A. pleuropneumoniae*, observando que la inmunización subcutánea con células lavadas y formoladas, polisacárido capsular, LPS o con la hemolisina Apx-I purificada, protegía parcialmente al ratón frente al desafío con una dosis letal del serotipo homólogo o heterólogo, aunque si las células formoladas se suplementaban con la hemolisina purificada o si los ratones se inmunizaban simultáneamente con una dosis subletal de células vivas por vía intranasal y de células formoladas por vía subcutánea, se conseguía protección total, concluyendo el papel crucial que representaban las hemolisinas en la protección frente a la bacteria.

Beudet *et al.* (1994) ensayaron la capacidad protectora en ratones CD-1 con extractos celulares y hemolisina cruda, obteniendo una significativa actividad protectora frente a los serotipos 1 y 5. Byrd y Morris (1997) utilizaron ratones ICR para evaluar el potencial de mutantes termosensibles para inducir protección con 3 dosis de $3,5 \times 10^6$ ufc administradas intranasalmente, con un intervalo de separación de 10 y 17 días, respectivamente, y 15 días después de la última administración se desafiaron con 5 DL₅₀ (10^7 ufc) de la cepa salvaje (serotipo 1), obteniendo distintos resultados de protección, desde la falta de ésta, en el caso del polisacárido capsular y LPS, a una protección evidente en el caso de la hemolisina, que correlacionaba con los resultados correspondientes al título sérico determinado por ELISA. Finalmente, Prideaux *et al.* (1998) utilizaron ratones BALB/c para estudiar la protección frente a *A.*

Resultados y Discusión

pleuropneumoniae previamente inmunizados con una vacuna viva (una cepa avirulenta del serotipo 7), con cepas homólogas y heterólogas del microorganismo, con resultados negativos.

6. CONCLUSIONES

1. El ratón NMRI representa un modelo adecuado para el estudio de la pleuroneumonía porcina aguda, pero se descarta su validez en el caso de la enfermedad crónica, pues el sistema defensivo natural de esta especie aclara el agente presente en una dosis subletal en un plazo de 48 a 96 horas.
2. La inoculación de una dosis subletal de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en el ratón produce ocasionalmente aumentos transitorios de las poblaciones microbianas entre las 12-24 horas post infección. No se puede determinar su razón aunque podría justificarse que su dependencia de hierro se resuelve a partir de restos presentes como contaminantes del inóculo.
3. La administración de transferrina porcina saturada en hierro en ratones (NMRI ó BALB/c) previamente a la infección con *A. pleuropneumoniae* prolonga la supervivencia del agente, siendo el aumento proporcional a la dosis, aunque por encima de 100 µg existen limitaciones de carácter físico que desaconsejan su uso.
4. La presencia o ausencia del complemento no influye de forma apreciable en la supervivencia y/o eliminación de *A. pleuropneumoniae* en el modelo murino de infección crónica.
5. Se demuestra que la población de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos en el ratón desempeña un papel relevante frente a la infección por *A. pleuropneumoniae* responsabilizándose, al menos en parte, de la resistencia natural de esta especie animal a la infección crónica. Su depleción en presencia del anticuerpo monoclonal Ly-6G proporciona mayores tiempos de supervivencia de *A. pleuropneumoniae* e igual sucede, en relación con la mortalidad que, además, se incrementa en presencia de transferrina porcina saturada con hierro, como era esperable, al proporcionar al microorganismo el hierro que precisa para el ejercicio de su actividad patógena.
6. La vacunación de ratones NMRI con una bacterina de *A. pleuropneumoniae*, protege de la muerte frente al desafío con una dosis letal del serotipo homólogo, aunque el microorganismo se recupera durante más de 10 días; en cualquier caso la protección frente a la mortalidad no guarda relación aparente con la presencia de títulos elevados de anticuerpos detectados por ELISA.

Conclusiones

5. RESUMEN

Actinobacillus pleuropneumoniae es un microorganismo de gran interés en patología porcina, el agente causal de la pleuroneumonía, una enfermedad que afecta a todas las edades, especialmente en las fases de transición y cebo, produciendo importantes pérdidas económicas y niveles de mortalidad elevados en brotes agudos. *A. pleuropneumoniae* es un agente específico del cerdo y hasta la fecha se carece de un modelo experimental adecuado. El ratón ha sido propuesto como especie conveniente para la enfermedad aguda reproduciendo las lesiones que se observan en el hospedador natural, principalmente debidas a las potentes toxinas RTX (Apx I – IV) producidas por el microorganismo, pero no en el caso de la enfermedad crónica, pues el sistema defensivo del animal resuelve la infección, en unas pocas horas o días.

En este trabajo se revisa la relación existente entre la resistencia natural de la especie murina y los parámetros que ordinariamente condicionan la supervivencia y multiplicación de *A. pleuropneumoniae* en el hospedador natural; el abastecimiento de hierro, la capacidad bactericida del suero (sistema del complemento) y la participación de la población de PMN. Utilizando parte de la información derivada de los ensayos realizados se valoro en el ratón la eficacia de una bacterina conjugada con proteínas Tbp en la protección frente al desafío con una dosis letal y otra subletal de *A. pleuropneumoniae*.

Los estudios relacionados con la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* en el ratón se llevaron a cabo utilizando una dosis subletal administrada intranasalmente a ratones NMRI y BALB/c en un total de 19 ensayos que incluyeron 328 ratones. Como resultado general pudo establecerse que *A. pleuropneumoniae* es aclarado del pulmón en un tiempo de entre 24 y 144 horas.

Se llevaron a cabo ensayos para determinar el efecto sobre la supervivencia de *A. pleuropneumoniae*, de 3 dosis de transferrina porcina saturada en hierro (50, 100 y 400 µg/ml) para lo cual se realizaron un total de 24 pruebas distribuidas en 4 ensayos (a razón de 5 pruebas con 50 µg, 4 con 100 µg, 5 con 400 µg y 10 con 100 µg de transferrina cargada con hierro, (estos últimos en ratones BALB/c SPF y los anteriores en NMRI) utilizando un total de 342 ratones a los que se administró la transferrina 2 horas antes de la infección, por vía intranasal. De las tres concentraciones, se optó por la concentración intermedia que logró mantener la supervivencia de los animales por encima de las 216

horas e incrementos pasajeros en las primeras 12-24 horas y en los porcentajes de supervivencia a las 216 horas. De ello se dedujo la influencia de la transferrina tanto en la supervivencia como en la multiplicación, evidente, de las bacterias en las primeras horas y por otro lado, la prolongación del periodo de eliminación de hasta más de 216 horas.

La influencia de la actividad del complemento en la susceptibilidad o resistencia de los ratones NMRI frente a *A. pleuropneumoniae* en el ratón se analizó mediante un tratamiento con tres diferentes dosis de veneno de cobra en un total de 18 pruebas distribuidas en 3 experimentos, una dosis inicial de 0,0750 mg/kg y 2 dosis de mantenimiento una de 0,0187 mg/kg y otra de 0,0357 mg/kg de veneno de cobra, administradas en diferentes tiempos, entre las 0 y 172 horas, observando que la descomplementación del ratón con veneno de cobra en diversas combinaciones antes de la infección, simultáneamente con ella y después, no produce cambios destacables respecto al grupo control de la infección. De ello se deduce que el complemento no representa una barrera esencial en la infección por *A. pleuropneumoniae*, que probablemente se debe a la existencia de una capsula bien organizada y gruesa en todos los serotipos y especialmente en el serotipo 1 con el que se llevaron a cabo los estudios.

En relación con la actividad de los PMN del ratón y su influencia en la resistencia natural a la infección por *A. pleuropneumoniae* se llevó a cabo un ensayo con 6 diferentes grupos de ratones (de prueba y controles un total de 180 ratones) que fueron estudiados en un periodo de 15 días, a los que se sometió a un tratamiento con el AcMc Ly-6G, que depleciona esta población sanguínea, siendo después infectados y según el grupo, administrados intranasalmente con transferrina porcina (100 µg).

Se pudo observar un mayor efecto en el grupo de animales inoculados con el anticuerpo monoclonal e infectados, lo que pone de manifiesto la importancia de los PMN en la resistencia natural de esta especie animal al microorganismo.

Finalmente, con una bacterina elaborada a partir del serotipo 1 de *A. pleuropneumoniae* enriquecida en toxinas Apx inactivadas y TbpB, se llevó a cabo un ensayo de protección en ratones NMRI vacunados (dos dosis) y desafiados con una dosis subletal (primer estudio) y letal (segundo estudio) de *A. pleuropneumoniae* (serotipo homólogo) administrado por vía intranasal, en ambos casos, previa administración de 100

µg de transferrina porcina saturada con hierro. En el primer caso, la supervivencia de *A. pleuropneumoniae* se prolongo más de diez días, respecto de las 8 de los controles no vacunados, una diferencia que se estima escasa, toda vez que los niveles de Anticuerpos eran elevados. En el segundo experimento, al desafiar con una dosis letal de *A. pleuropneumoniae* ($2,88 \times 10^7$ ufc) si que se pone de manifiesto la capacidad protectora de la vacuna, que protege de la mortalidad en los animales vacunados respecto de los controles no vacunados, aunque no de la condición de portador (supervivencia de *A. pleuropneumoniae*) que se prolonga hasta el límite de los diez días, una situación que coincide con los resultados de vacunación con bacterinas que habitualmente se observa en el hospedador natural.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abul-Milh, M. ; Paradis S.E. ; Dubreuil J.D. ; Jacques M. 1999. Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* lipopolysaccharides to glycosphingolipids evaluated by thin-layer chromatography. *Infect Immun.* **67**(10):4983-4987.
2. Adrait, A.; Jacquamet, L.; Le Pape, L.; Gonzalez de Peredo, A.; Aberdam, D.; Hazemann, J. L.; Latour, J. M.; Michaud-Soret I. 1999. Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**(19):6248-6260.
3. Althaus, E. W.; Outten, C. E.; Olson, K. E.; Cao, H.; O'Halloran, T. V. 1999. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **38**:6559-6569.
4. Andrew, S. C. 1998. Iron storage in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **40**:281-351.
5. Andrews, S.C.; Robinson, A.K.; Rodríguez-Quñones, F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**:215-237.
6. Arredondo, M.; Muñoz, P.; Mura, C. Nuñez, M.T. 2001. HFE inhibits apical iron uptake by intestinal epithelial (caco-2) cells. *The FASEB Journal.* **15**:1276-1278.
7. Assavacheep, P. M.; Pearsson, S.; Luengyosluechakul, S.; Watanaphansak, D.; Laohasinnarong, P.; Pungkhun, P. Wallgren. 2003. *Actinobacillus pleuropneumoniae* in Thai pig herd. Prevalence of serum antibodies and relation to performance. *J. Vet. Med. B.* **50**:390-395.
8. Baarsch, M.J.; Scamurra, R.W.; Burger, D.; Foss, D.L.; Maheswaran, S.K.; Murtaugh, M.P. 1995. Inflammatory cytokine expression in swine experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **63**(9):3587-3594.
9. Baichoo, N.; Helmann, J.D. 2002. Recognition of DNA by Fur a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* **184**:5826-5832.

10. Baltes, N, Hennig-Pauka I.; Gerlach G.F. 2002. Both transferrin binding proteins are virulence factors in serotype 7 infection. *FEMS Microbiol Lett.* **209**(2):283-287.
11. Baltes, N.; Tonpitak W.; Gerlach G.F.; Hennig-Pauka I.; Hoffmann-Moujahid A.; Ganter, M.; Rothkotter H.J. 2001. *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transport and urease activity: effects on bacterial virulence and host immune response. *Infect Immun.* **69**(1):472-478.
12. Bandara, A.B.; Lawrence M.L.; Veit H.P.; Inzana T.J. 2003. Association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* capsular polysaccharide with virulence in pigs. *Infect Immun.* **71**(6):3320-3328.
13. Beaudet, R.; McSween, G.; Boulay, G.; Rousseau, P.; Bisailon, J.G.; Descoteaux, J.P. ; Ruppner, R. 1994. Protection of mice and swine against infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* by vaccination. *Vet. Microbiol.* **39**:71-81.
14. Belanger, M.; Dubreuil, D.; Harel, J.; Girard, C.; Jacques, M. 1990. Role of lipopolysaccharides in adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal rings. *Infect. Immun.* **58**(11):3523-3530.
15. Bendixen, P. F.; Shewen, P.E.; Rosendal, S.; Wilkie, B. N. 1981. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for porcine lung macrophages, peripheral blood monocytes and testicular cells. *Infect. Immun.* **33**:673-676.
16. Bereswill, S.; Greiner, S.; van Vliet, A.H.M.; Waidner, B.; Fassbinder, F.; Schiltz, E.; Kusters, J.G.; Kist, M. 2000. Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J. Bacteriol.* **182**:5948-5953.
17. Bhatia, B.; Mittal, K.R.; J. Frey. 1991. Factors involved in immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in mice. *Vet. Microbiol.* **29**:147-158.
18. Blackall, P.J.; Klaasen, H.L.; van Den Bosch, H.; Kuhnert, P.; Frey J. 2002. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 15. *Vet. Microbiol.* **84**(1-2):47-52.

19. Blackhall M. I.; Jones R. S. 1973. Lung volume and its subdivisions in normal and asthmatic males. *Thorax*. **28**(1):89-94.
20. Blaxhall, P.C.; Daisley, K.W. 1997. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish. Biol.* **5**:771-781.
21. Bly, J.E.; Miller, N.W.; Clem, L.W. 1990. A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* **14**: 211-221.
22. Boekema, B.K.; Stockhofe-Zurwieden N.; Smith H.E.; Kamp, E.M.; Van Putten J.P.; Verheijden J.H. 2003. Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to primary cultures of porcine lung epithelial cells. *Vet. Microbiol.* **93**(2):133-144.
23. Bog, Y.S.; Andresen, L.O.; Bastholm, L.; Elling, F.; Angen, O.; Heegaard, M. 2001. The transferrin receptor of *Actinobacillus pleuropneumoniae* quantitation of expression and structural characterization using a peptide specific monoclonal antibody. *Vet. Microbiol.* **81**:51-64.
24. Bosch, M.; Tarragó, R.; Garrido, M.E.; Campoy, S.; Fernández de Henestrosa, A.R.; Pérez de Rosas, A.M.; Badiola, I.; Barbé, J. 2001. Expression of the *Pasteurella multcida* ompH gene is negatively regulated by the Fur protein. *FEMS Microbiol. Lett.* **203**(1):35-40.
25. Bossé, J. T.; Johnson, R. P.; Nemeč, M.; Rosendal, S. 1992. Protective local and systemic antibody responses of swine exposed to an aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* **60**:479-484.
26. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
27. Braun, V. 1995. Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD- dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**:295-307.
28. Braun, V.; Killmann, H. 1999. Bacterial solution to the iron and siderophore antibiotic. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:194-201.

29. Bullen, J.J. 1981. The significance of ironin infection. *Rev. Infect. Dis.* **3**:1127-1138.
30. Bunka, S.; Christensen C; Potter, A.A.; Willson, P.J.; Gerlach G.F. 1995. Cloning and characterization of a protective outer membrane lipoprotein of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **63**(7):2797-2800.
31. Byrd, W.; Hoke, A.M. 1997. Temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* induce protection in mice. *Infect. Immun.* **65**(6):2206-2210.
32. Byrd, W.; Kadis, S. 1992. Preparation, characterization and immunogenicity of conjugate vaccines directed against *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence determinants. *Infect. Immun.* **60**:3042-3051.
33. Calver, G.A.; Kenny, C.P.; KushneR, D.J. 1979. Inhibition of the growth of *Neisseria meningitidis* by a reduced ferritin and other iron-binding agents. *Infect. Immun.* **25**:880-890.
34. Campbell, T.W. 1988. Fish cytology and hematology. *Vet. Clin. North. Am.* **18**:349-364.
35. Campbell, T.W.; Murru, F. 1990. An introduction to fish hematology. *Comp. of Cont. Ed. in Vet. Sci.* **12**:525-533
36. Carlson, S.L.; Parrish, M.E.; Springer, J.E.; Doty, K; Dossett L. 1998. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol.* **151**(1):77-88.
37. Carpintero, R.; Piñeiro, M.; Andrés, M.; Iturralde, M.; Alava, M. A.; Heegaard, P.M.H.; Jobert, J.L.; Madec, F.; Lampreave, F. 2005. The Concentration of Apolipoprotein A-I decreases during experimentally induced acute processes in pigs. *Infection and Immunity* **73**, 3184-3187.
38. Chang, C.F.; Chang, W.D. 1994. Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* from nasal cavities of healthy pigs. *J. Chin. Soc. Vet. Sci.* **20**:183–187.
39. Chang, Y.F.; Young, R.; Moulds, T. L.; Struck, D. K. 1989. Secretion of the *Pasteurella* leukotoxin by *Escherichia coli*. *FEMS Microb. Lett.* **60**:169-174.

40. Chiang, Y.W.; Young, T.F.; Rapp-Gabrielson, V.J.; Ross R.F. 1991. Improved protection of swine from pleuropneumonia by vaccination with proteinase K-treated outer membrane of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.* **27**(1):49-62.
41. Chiers, K.; Donné, E.; Van Overbeke. I.; Baele, M.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F. 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Vet. Microbiol.* **85**:343-352.
42. Chiers, K.; van Overbeke. I.; De Laender, P.; Ducatelle, R.; Carel, S.; Haesebrouck, F. 1998. Effects of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with inactivated vaccines containing the Apx toxins. *Vet. Q.* **20**(2):65-69.
43. Choi-kim, K.; Maheswaran, S.K.; Felice, L.J.; Molitor, T.W. 1991. Relationship between the iron outer membrane proteins and the outer membrane proteins of in vivo grown *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* **28**:75-92.
44. Christensen, H.; Bisgaard, M. 2004. Revised definition of *Actinobacillus sensu stricto* isolated from animals. A review with special emphasis on diagnosis. *Vet. Microbiol.* **99**(1):13-30.
45. Clarke, T.E.; Tari, L.W.; Vogel, H.J. 2001. Structural biology of bacterial iron uptake system. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**:7-30.
46. Cooksley, C.; Jenks, P.J.; Green, A.; Cockayne, A.; Logan, R.P.; Hardie, K.R. 2003. NapA protects *Helicobacter pylori* from oxidative stress damage, and its production is influenced by the ferric uptake regulator. *J. Med. Microbiol.* **52**:461-469.
47. Coote, J. C. 1992. Structural and functional relationship among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS. Microb. Rev.* **88**:137-162.
48. Cornelissen, C.N.; Anderson, J.E.; Boulton, I.C.; Sparling, P.F. 2000. Antigenic and sequence diversity in gonococcal transferrin-binding protein A. *Infect. Immun.* **68**:4725-4735.

49. Cornelissen, C.N.; Kelly, M.; Hobbs, M.M.; Anderson, J.E.; Cannon, J.G.; Cohen, M.S.; Sparling, P.E. 1998. The transferrin receptor expressed by gonococcal strain FA 1090 is required for the experimental infection of human male volunteers. *Mol. Microbiol.* **27**:611-616.
50. Cornelissen, C. N.; Sparling, P.F. 1994. Iron piracy acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* **14**:843-850.
51. Coy, M.; Neilands, J. 1991. Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. *Biochemistry.* **30**:8201–8210.
52. Crosa, J. H. 1997. Signal transducción and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol. Molec. Boil. Rev.* **61**:319-336.
53. Cruijssen, A.L.M.; Van Leengoed, L.A.M.G.; Stockhofe-Zurwieden, N.; Kamp, E.M.; Widjaja, A.; Broekhuysen, P.; Ham, M.; Verheijden, J.H.M. 1996. Pathogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 depends upon toxin production. Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna, Italy.
54. Cruijssen, T.; Leengoed, L.A.M.G.; Kamp, E.M.; Bartelse, A. Korevaar; A.; Verheijden, J. H. M. 1995. Susceptibility to *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs from an endemically infected herd is related to the presence of toxin-neutralizing antibodies. *Vet. Microbiol.* **47**:219-228.
55. Cullen, J. M.; Rycroft, A.N. 1994. Phagocytosis by pigs alveolar macrophages of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 mutant strains defective in haemolysin II and pleurotoxin (ApxIII). *Microbiology.* **140**(2):237-244.
56. Danve, B.; Lissolo, L.; Mignon, M.; Duma, P.; Colombani, S.; Schryvers, A.B.; Quentin-Millet, M.J. 1993. Transferrin-binding proteins isolated from *Neisseria meningitidis* elicit protective and bactericidal antibodies in laboratory animals. *Vaccine* **11**:1214-1220.

57. De la Puente, 2001. *Los receptores de transferrina en patógenos porcinos de la familia Pasteurellaceae: Distribución y aplicaciones diagnósticas*. Universidad León.
58. De Luca, N.; Wexler, M.; Pereira, M.J.; Yeoman, K.H.; Johnston, A.W. 1998. Is the fur gene of *Rhizobium leguminosarum* essential?. *FEMS Microbiol. Lett.* **168**(2):289-295.
59. De Voss, J. J.; Rutter, K.; Schroeder BG; Barry CE. 1999. Iron acquisition and metabolism by mycobacteria. *J. Bacteriol.* **181**(15):4443-4451.
60. Del Río González, M.L. 2004. *Sistemas de captación de hierro en Haemophilus parasuis*. Universidad de León.
61. Delany, I.; Spohn, G.; Rappuoli, R.; Scarlato, V. 2001. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **42**(5):1297-1309.
62. Deshper, S.G.; Hendtlass, A.; Slakeski, N.; Jackson, C.; Cross, K.J.; Brownfield, L.; Hamilton, R.; Barr, I.; Reynolds, E.C. 2000. Characterization of a novel outer membrane hemin-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **182**:6456-6646.
63. Devenish, J.; Rosendal S. 1991. Calcium binds to and is required for biological activity of the 104-kilodalton hemolysin produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Microbiol.* **37**(4):317-321.
64. Devenish, J.; Rosendal S.; Bosse, J. T. 1990. Humoral antibody response and protective immunity in swine following immunization with the 104-kilodalton hemolysin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **52**(12):3829-3832.
65. Dom, P.; Haesebrouck F.; Ducatelle, R.; Charlier, G. 1994. *In vivo* association of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 with the respiratory epithelium of pigs. *Infect. Immun.* **62**(4):1262-1267.

66. Dom, P.; Haesebrouck, F.; Mamp, E.M.; Smits, A.A. 1992. Influence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 and its cytolisins on porcine neutrophil chemiluminiscence. *Infect. Immun.* **60**:4328-4334.
67. Du, R.P.; Wang, Q.; Yang, Y.P.; Schryvers, A.B.; Chong, P.; Dlein, M.H.; Loosmore, S.M. 1998. Cloning and expression of the *Moraxella catarrhalis* lactoferrin receptor genes. *Infect. Immun.* **66**:3656-3665.
68. Dubrac, S.; Touati, D. 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the sodB promoter. *J. Bacteriol.* **182**(13):3802-3808.
69. Elkins, C.; 1995. Identification and purification of a conserved heme-regulated haemoglobin-binding outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **63**:1241-1245.
70. Elkins, C.; Chen, C.J.; Thomas, C.E. 1995. Characterization of the *hgbA* locus encoding a haemoglobin receptor from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **63**:2194-2200.
71. Elkins, C.; Totten, P.A.; Olsen, B.; Thomas, C.E. 1998. Role of the *Haemophilus ducreyi* Ton system in internalisation of heme from haemoglobin. *Infect. Immun.* **66**(1):151-160.
72. Elkins, M.F.; Earhart, C.F. 1989. Nucleotide sequence and regulation of the *Escherichia coli* gene for ferrienterobactin transport protein FepB. *J. Bacteriol.* **171**(10):5443-5451.
73. Escolar, L.; Martin, J.P.; de Lorenzo, V. 1999. Opening the iron box: trascriptional metalloregulation by Fur protein. *J. Bacteriol.* **181**:6223-6229.
74. Feder, J. N.; Gnrirke, A.; Thomas, W.; Tsuchihashi, Z.; Ruddy, D. A.; Basava, A.; Dormishian, F.; Domingo, R. Jr., Ellis, M. C.; Fullan, A.; Hinton, L. M.; Jones, N. L.; Kimmel, B. E.; Kronmal, G. S.; Lauer, P.; Lee, V. K.; Loeb, D. B.; Mapa, F. A.; McClelland, E.; Meyer, N. C.; Mintier, G. A.; Moeller, N.; Moore, T.; Morikang, E.; Prass, C. E.; Quintana, L.; Starnes, S. M.; Schatzman, R. C.; Brunke, K. J.; Drayna, D. T.; Risch, N. J.; Bacon, B. R.; Wolff, R. K. 1996. A

- novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genet.* **13**:399-408.
75. Feder, J. N.; Penny, D. M.; Irrinki, A.; Lee, V. K.; Lebron, J. A.; Watson, N.; Tsuchihashi, Z.; Sigal, E.; Bjorkman, P. J.; Schatzman, R. C. 1998. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. *Proc Nat. Acad. Sci.* **95**:1472-1477.
76. Fedorka-Cray, P.J.; Huether, M.J.; Stine, D.L.; Anderson, G.A. 1990. Efficacy of a cell extract from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 1 against disease in swine. *Infect. Immun.* **58**(2):358-365.
77. Fenwick, B.; Henry, S. 1994. Porcine pleuropneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **204**(9):1334-1340.
78. Fenwick, B.W.; Osburn, B.I.; Cullor, J.S.; Henry, S.C.; Olander, H.I. 1986. Mortality in swine herds endemically infected with *Haemophilus pleuropneumoniae*: effect of immunization with cross-reacting lipopolysaccharide core antigens of *Escherichia coli*. *Am. J. Vet. Res.* **47**(9):1888-1891.
79. Fenwick, B.W.; Osburn, B.I.; Olander, H.J. 1986. Resistance of C3H/HeJ mice to the effects of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **53**:474-479.
80. Fenwick, B.W.; Osburn, B.I.; Olander H.J. 1986. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **47**(7):1433-1441.
81. Ferron, L., Ferreiro, C.M.; Criado, M.T.; Andrade, M.P. 1993. Purification of the *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein-2 (TBP2) to homogeneity using column chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **109**:159-166.
82. Finkelstein, R.A.; Yancey, R.J. 1981. Effect of siderophores on virulence of *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect. Immun.* **32**:609-613.

83. Finkelstein, R.A.; Sciortino, C.V.; McIntosh, M.A. 1983. Role of iron in microbe-host interactions. *Rev. Infect. Dis.* **5**:S759-S777.
84. Finlay, B.B.; Falkow, S. 1989. Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **53**:210-230.
85. Fleming, M.D.; Romano, M.A.; Su, M.A.; Garrick, L.M.; Garrick, M.D.; Andrews, N.C. 1998. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:1148-1153.
86. Foster, J. W.; Hall, H. K. 1992. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (fur) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.* **174**(13):4317-4323.
87. Frey, J.; Beck, M.; Stucki, U.; Nicolet, J. 1993. Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Gene* **123**(1):51-58.
88. Frey, J.; Nicolet, J. 1988. Purification and partial characterization of a hemolysin produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae* type strain 4074. *FEMS Microbiology Letters.* **55**(1):41-45.
89. Fujimura, S.; Shibata, Y.; Hirai, K.; Nakamura, T. 1996. Binding of hemoglobin to the envelope of *Porphyromonas gingivalis* and isolation of the hemoglobin-binding protein. *Infect. Immun.* **64**:2339-2342.
90. Fuller, C.A.; Yu, R.; Irwin, S.W.; Schryvers, A.B. 1998. Biochemical evidence for a conserved interaction between bacterial transferrin binding protein A and transferrin binding protein B. *Microb. Pathol.* **24**:75-87.
91. Fuller, T.E.; Martin, S.; Teel, J.F.; Alaniz, G.R.; Kennedy, M.J.; Lowery, D.E. 2000. Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microb. Pathog.* **29**(1):39-51.
92. García Olivares, E.; Alonso, A.; Miranda, J. M.; Peña, J. www.inmunologiaenlinea.es

93. Garrity, G.M. (2001-2003) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Ed. Springer-Verlag, New Cork.
94. Genco, C. A.; Dixon, D. W. 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol. Microbial.* **39**:1-11.
95. Gerlach, G.F.; Anderson, C.; Klashinsky, S.; Rossi-Campos, A.; Potter, A.A.; Willson, P.J. 1993. Molecular characterization of a protective outer membrane lipoprotein (OmlA) from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect. Immun.* **61**(2):565-572.
96. Gerlach, G.F.; Klashinsky, S.; Anderson, C.; Potter, A.A.; Willson, P.J. 1992. Characterization of two genes encoding distinct transferrin-binding proteins in different *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Infect Immun.* **60**(8):3253-3261.
97. Ghassemian, M.; Straus, N.A. 1996. Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology* **142**(6):1469-1476.
98. Gilmur, N.J.; Donachie, W.; Sutherland, A.D.; Dilmour, J.S.; Jones, G.E.; Quirie, M. 1991. Vaccine containing iron-regulated proteins of *Pasteurella haemolytica* A2 enhances protection against experimental pasteurellosis in lambs. *Vaccine* **9**:137-140.
99. Goethe, R.; Flores, O.; Lindner, T.; Gerlach, G.F.A. 2001. Novel strategy for protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccines, detergent extraction of cultures induced by iron restriction. *Vaccine* **19**:996-975.
100. Gómez, J.A.; Agra, G.; Ferro, L.; Powel, N.; Pintor, M.; Criado, M.T.; Ferreiros, C.M. 1996. Antigenicity, cross-reactivity and surface exposure of the *Neisseria meningitidis* 37 Kda protein (Fbp). *Vaccine* **14**:1340-1346.
101. González, G.C.; Yu, R.H.; Rosteck, P.R. Jr.; Schryvers, A.B. 1995. Sequence, genetic analysis, and expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* transferrin receptor genes. *Microbiology* **141**(10):2405-2416.

102. González-Ramón, N.; Hoebe, K.; Alava, M.; van Leengoed, L.; Piñeiro, M.; Carmona, S.; Iturralde, M.; Lampreave, F.; Piñeiro, A. 2000. Pig MAP/ITIH4 and haptoglobin are interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins in porcine primary cultured hepatocytes. *FEBS Journal* **267**(8):1878-1885.
103. Gray-Owen, S. D.; Loosmore, S.; Schryvers, A. B. 1995. Identification and characterization of genes encoding the human transferrin-binding proteins from *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **63**:1201-1210.
104. Gruer, M. T.; Guest, J. R. 1994. Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*. *Microbiology* **140**(10):2531-2541.
105. Guerry, P.; Pérez-Casal, J.; Yao, R.; McVeigh, A.; Trust, T.J. 1997. A genetic locus involved in iron utilization unique to some *Campylobacter* strains. *J. Bacteriol.* **179**(12): 3997-4002.
106. Haag, H.; Hantke, K.; Drechsel, H.; Stojiljkovic, I.; Jung, G.; Zaher, H. 1993. Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2159-2165.
107. Haag, Y.; Ogino, S.; Ohashi, S.; Ajito, T.; Hashimoto, K.; Sawada, T. 1997. Protective efficacy of an affinity-purified hemolysin vaccine against experimental swine pleuropneumonia. *J. Vet. Med. Sci.* **59**(2):115-120.
108. Haesebrouck, F.; Chiers, K.; Van Overbeke, I.; Ducatelle, R. 1997. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in pigs: the role of virulence factors in pathogenesis and protection. *Vet. Microbiol.* **58**(2-4):239-249.
109. Haesebrouck, F.; Pasmans, F.; Chiers, K.; Maes, D.; Ducatelle, R.; Decostere, A. 2004. Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet. Microbiol.* **100**(3-4):255-268.
110. Hamblin, C.; Barnette, I.T.R.; Hedger, R.S. 1986. A new enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot and mouth disease virus. *J. Immunol. Methods.* **93**:115-125.

111. Hamza, I.; Chauhan, S.; Hassett, R.; O'Brian, M.R. 1998. The bacterial Irr protein is required for coordination of heme biosynthesis with *irn* availability. *J. Biol. Chem.* **273**(34):21669-21674.
112. Hansen, E.J.; Gulig, P.A.; Robertson, S.M.; Prish, C.F.; Haanes, E.J. 1982. Immunoprotection of rats against *Haemophilus influenzae* type B disease mediated by monoclonal antibody a *Haemophilus*-outer-membrane protein. *Lancet* **13**:366-376.
113. Hantke, E. K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Cirr. Opin. Microbiol.* **4**:172-177.
114. Hantke, K.; Braun, V. 1978. Functional interaction of the tonA/tonB receptor system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **135**(1):190-197.
115. Harrison, P.M.; Arosio, P. 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1275**(3):161-203.
116. Hashimoto, K.; Hirai, M.; Kurosawa, Y. 1995. A gene outside the human MHC related to classical HLA class I genes. *Science* **269**:693-695.
117. Hashimoto, K.; Hirai, M.; Kurosawa, Y. 1997. Identification of a mouse homolog for the human hereditary haemochromatosis candidate gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**:35-39.
118. Heegaard, P.M.H.; Klausen, J.; Nielsen, J.P.; González-Ramón, N.; Piñeiro, M.; Lampreave, F.; Alava, M.A. 1998. The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloide a protein are sensitivite indicators of infection. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **119**:365-373.
119. Hensel, A.; Huter, V.; Katinger, A.; Raza, P.; Strnistschie, C.; Roesler, U.; Brans, E.; Lubitz, W. 2000. Intramuscular immunization with genetically inactivated (gosts) *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 protects pigs against homologous aerosol challenge and prevents carrier state. *Vaccine* **18**:2945-2955.

120. Herrington, D.A.; Sparling, P.F. 1985. *Haemophilus influenzae* can use human transferrin as a sole. *Infect. Immun.* **48**(1):248-251.
121. Hestdal, K.; Ruscetti, F.W.; Ihle, J.N.; Jacobsen, S.E.; Dubois, C.M.; Kopp, W.C.; Longo, D.L.; Keller, J.R. 1991. Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells. *J. Immunol.* **147**(1):22-28.
122. Higgs, P.I.; Larsen, R.A.; Postle, K. 2002. Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol. Microbiol.*, **44**(1):271-281.
123. Higgs, P.I.; Myers, P.S.; Postle, K. 1998. Interaction in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD from homomultimers. *J. Bacteriol.* **180**(22):6031-6038.
124. Hine, P.M. 1992. The granulocytes of fish. *Fish Shellfish Immunol.* **2**:79-88.
125. Hirono, I.; Tange, N.; Aoki, T. 1997. Iron-regulated haemolysin gene from *Edwardsiella tarda*. *Mol. Microbiol.* **24**(4):851-856.
126. Holt, J.G.; Krieg, N.R.; Sneath, P.H.A.; Stanley, J.T.; Williams, S.T. 1994. Genus *Actinobacillus*. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
127. Huerta, O.; Herrera, D.; González, N.; Arrieta, M. 2004. Results of the usage of a bacterin against *Actinobacillus pleuropneumoniae* in hog farm in central region in Mexico. Proc. 18th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Hamburgo, Alemania.
128. Ike, K.; Kurotaki, T.; Kume, K. 1996. Studies on immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Apx-toxins. Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna, Italy.
129. Ingham, A.; Zhang, Y.; Prideaux, C. 2002. Attenuation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by inactivation of aro Q. *Vet. Microbiol.* **84**:263-273.
130. Inzana, T.J. 1991. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiol. Pathog.* **11**(5):305-16.

131. Inzana, T.J.; Mathison, B. 1987. Serotype specificity and immunogenicity of the capsular polymer of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **55**(7):1580-1587.
132. Inzana, T.J.; Workman, T.; Gogolewski, R.P.; Anderson, P. 1988. Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.* **56**(8):1880-1889.
133. Inzana, T.J.; Todd, J.; Veit, H.P. 1993a. Isolation, characterization, and evaluation of virulence and immunoprotective properties of temperature-sensitive mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Immun. Infec.* **3**:17-22.
134. Inzana, T.J.; Todd, J.; Veit, H.P. 1993b. Safety, stability, and efficacy of noncapsulated mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* for use in live vaccines. *Infect. Immun.* **61**(5):1682-1686.
135. Inzana, T.J. 1990. Capsules and virulence in the HAP group of bacteria. *Can. J. Vet. Res.* Apr;54 Suppl:S22-27.
136. Irwin, M.; Hauger, R.L; Britton, K. 1993. Benzodiazepines antagonize central corticotropin releasing hormone-induced suppression of natural killer cell activity. *Brain. Res.* **631**(1):114-118.
137. Jacobsen, I.; Gerstenberger, J.; Gruber, A.D.; Bossé, J. T.; Langford, P.R.; Hening-Pawka, I.; Meens, J.; Gerlack, G.F. 2005. Deletion of the ferric uptake regulator Fur impairs the *in vitro* growth and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **73**(6): 3740-3744.
138. Jacquamet, L.; Aberdam, D.; Adrait, A.; Hazemann, J. L.; Latour, J. M.; Michaud-Soret, I. 1998. X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**(8):2564-7.
139. Jacques, M.; Mikael, G. M. 2002. Virulence factors of *Pasteurellaceae*, formidable animal pathogens. *ASM New.* **68**:174-179.
140. Jacques, M.; Paradis, S.E. 1998. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**:45-59.

141. Jacques, M.; Rioux, S.; Paradis, S. E.; Begin, C.; Gottschalk, M. 1996. Identification of two core types in lipopolysaccharides of *Actinobacillus pleuropneumoniae* representing serotypes 1 to 12. *Can. J. Microbiol.* **42**(8):855-858.
142. Jain, N.C. 1989. Acute phase protein. In : *Current veterinary Therapy X : Small animal practice*. pp 468-471. Eds : Kirk R.W., W B Saunders, Philadelphia.
143. Jeannotte, M.E.; Abul-Milh, M.; Dubreuil, J.D.; Jacques, M. 2003. Binding of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to phosphatidylethanolamine. *Infect. Immun.* **71**(8):4657-4663.
144. Jensen, A.E.; Bertram, T.A. 1986. Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect Immun.* **51**(2):419-424.
145. Jensen, R.; Briaire, J.; Kamp, E. M.; Gielkens, A. L. J.; Smits, M. A. 1995. The CAMP effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is caused by Apx toxins. *FEMS Microb. Lett* **126**(2):139-143.
146. Jensen, R.; Briaire, J.; Smits, H. E.; Dom, P.; Haesebrouch, F.; Kamp, E. M.; Gielkens, A. L. J.; Smits, M. A. 1995. Knockout mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 that are devoid of RTX toxins do not activate or kill porcine neutrophils. *Infect. Immun.* **63**(1):27-37.
147. Jones, R.L.; Peterson, C.M.; Grady, R.W.; Kumbaraci, T.; Cerami, A.; Graziano, J.H. 1977. Effects of iron chelators and iron overload on *Salmonella* infection. *Nature* **267**:63-64.
148. Kamp, E. M.; Popma, J. K.; Anakotta, J.; Smits, M. A. 1991 Identification of hemolytic and cytotoxic proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by use of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **59**(9):3079-3085.
149. Kamp, E.M.; Stockhofe-Zurwieden, N.; van Leengoed, L.A.; Smits, M.A. 1997. Endobronchial inoculation with Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* leads to pleuropneumonia in pigs. *Infect. Immun.* **65**(10):4350-4354.

150. Klausen, J.; Andresen, L. O.; Barfod, K; Sørensen, V. 2001. Blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 6 in pig serum. *Vet. Microbiol.* **79**:11–18.
151. Klieneberger, E. 1951. Filterable forms of bacteria. *Bact. Rev.* **15**(2):77-103.
152. Koebnik, R.; Bäumlér, A.J.; Heeseman, J.; Braun, V.; Hantke, K. 1993. The TonB protein of *Yersinia enterocolitica* and its interaction with TonB-box proteins. *Mol. Gen. Genet.* **237**(1-2):152-160.
153. Komal, J.P.S.; Mittal, K.R. 1990. Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet. Microbiol.* **25**:229–240.
154. Koronakis, V.; Cross, M.; Senior, B.; Koronakis, E.; Hughes, C. 1987. The secreted hemolysins of *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* and *Morganella morganii* are genetically related to each other and to the alpha-hemolysin of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**(4):1509-1515.
155. Köster, W. 2001. ABC transport-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res. Microbiol.* **151**:291-301.
156. Köster, W.; Braun, V. 1990. Iron (III) hydroxamate transport into *Escherichia coli*: substrate binding to the periplasmic FhuD protein. *J. Biol. Chem.* **265**(35):21407-21410.
157. Kuboniwa, M.; Amano, A.; Shizukuishi, S.; Nakagawa, I.; Hamada, S. 2001. Specific antibodies to *Porphyromonas gingivalis* Lys-gingipain by DNA vaccination inhibit bacterial binding to hemoglobin and protect mice from infection. *Infect Immun.* **69**(5):2972-2979.
158. Kume, K.; Nagano, I.; Nakai, T. 1986. Bacteriological, serological, and pathological examinations of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in 200 slaughtered pigs. *Nippon Juigaku Zasshi* **48**:965-970.

159. Lalonde, G.; McDonald, T. V.; Gardner, P.; O'Hanley, P. O. 1989. Identification of a hemolysin from *Actinobacillus pleuropneumoniae* and characterization of its channel properties in planar phospholipids bilayers. *J. Biol. Chem.* **264**(23):13559-13564.
160. Larsen, R.A.; Myers, P.S.; Skare, J.T.; Seachord, C.L.; Darveau, R.P.; Postle, K. 1996. Identification of TonB homologs in the family *Enterobacteriaceae* and evidence for conservation of TonB-dependent energy transduction complexes. *J. Bacteriol.* **178**(5): 1363-1373.
161. Larsen, R.A.; Thomas, M.G.; Postle, K. 1999. Protonmotive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* **31**:1809-1824.
162. Lebron, J. A.; Bennett, M. J.; Vaughn, D. E.; Chirino, A. J.; Snow, P. M.; Mintier, G. A.; Feder, J. N.; Bjorkman, P. J. 1998. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell* **93**:111-123.
163. Lebron, J.A.; Bjorkman, P.J. 1999. The transferrin receptor binding site on HFE, the class I MHC-related protein mutated in hereditary hemochromatosis. *J. Mol. Biol.* **289**:1109-1118.
164. Lebron, J.A.; West, A.P. Jr; Bjorkman, P.J. 1999. The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *J. Mol. Biol.* **294**:239-245.
165. Lechtenberg, K.F.; Shryock, T.R.; Moore, G. 1994. Characterization of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* seeder pig challenge-exposure model. *Am. J. Vet. Res.* **55**(12):1703-1709.
166. Lee, G.; Bithel, R; Thomas, C.; Foerster, J.; Athens, J.W.; Lukens, N.; Wintrobe, M. 1994. *Hematología clínica*. 9^a Buenos Aires: Inter-Médica.

167. Lissolo, L.; Maitre-Wilmotte, G.; Dumas, P.; Mignon, M.; Danve, B.; Quentin-Millet, M.J. 1995. Evaluation of transferrin-binding protein 2 within the transferrin-binding protein complex as a potential antigen for future meningococcal vaccines. *Infect. Immun.* **63**:884-890.
168. Litt, D.J.; Palmer, H.M.; Borriello, S.P. 2000. *Neisseria meningitidis* expressing transferrin binding proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* can utilize porcine transferrin for growth. *Infect. Immun.* **68**(2):550-557.
169. Litwin, C.M.; Calderwood, S.B.; 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:137-149.
170. Litwin, M.; Calderwood, S.B. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**(2):137-149.
171. Loftager, M.K.; Eriksen, L. 1993. Protective immunity following immunisation of pigs with aerosol of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. *Res. Vet. Sci.* **55**:281-286.
172. Lorenzo De V.; Herrero, M.; Giovanni, F; Neilands, J.B. 1988. Fur (ferric uptake regulation) protein and CAP (catabolite-activation protein) modulate transcription of the *fur* gene in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **173**:537-546.
173. Merrill, J. E.; Jonakait, G. M. 1995. Interactions of the nervous and immune systems in development, normal brain homeostasis, and disease. *FASEB J.* **9**:611-618.
174. Moeck, G.S.; Coulton, J.W. 1998. TonB-dependent iron acquisition: mechanism of siderophore-mediated active transport. *Mol. Microbiol.* **28**(4):675-681.
175. Morton, D.J.; Williams, P. 1989. Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins. *FEMS Microbiol. Lett.* **53**:123-127.
176. Myers, L.E.; Yang, Y.P.; Du, R.P.; Wng, Q.; Harkness, R.E.; Schryvers, A.B.; Klein, M.H.; Loosmore, S.M. 1998. The transferrin binding protein B of *Moraxella catarrhalis* elicits bactericidal antibodies and is a potential vaccine antigen. *Infect. Immun.* **66**:4183-4192.

177. Nakai, T.; Sawata, A.; Kume, K. 1983. Characterization of the hemolysin produced by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **44**:344-347.
178. Nakai, T.; Sawata, A.; Kume, K. 1984. Pathogenicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* for laboratory animals and possible role of its hemolysin for production of pleuropneumonia. *Jpn. J. Vet. Sci.* **46**:851-858.
179. Negrete-Abascal, E.; García, R.M.; Reyes, M.E.; Godínez, D.; de la Garza, M. 2000. Membrane vesicles released by *Actinobacillus pleuropneumoniae* contain proteases and Apx toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* **191**(1):109-113.
180. Negrete-Abascal, E.; Reyes, M. E; García, R. M.; Vaca. S.; Gíron, J. A.; Garcia, O.; Zenteno, E.; De La Garza, M. 2003. Flagella and motility in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Bacteriol.* **185**(2):664-668.
181. Negrete-Abascal, E.; Tenorio, V. R.; Serrano, J. J.; García, C.; de la Garza, M. 1994. Secreted proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 degrade porcine gelatin, hemoglobin and immunoglobulin A. *Can. J. Vet. Res.* **58**(2):83-86.
182. Nelson, M.; Carrano, C. J.; Szaniszlo, P.J. 1992. Identification of the ferrioxamine B receptor, FoxB, in *Escherichia coli* K12. *Biometals* **5**:37-46.
183. Nicholson, M. L.; Beall, B. 1999. Disruption of tonB in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella pertussis* prevents utilization of ferric siderophores, haemin and haemoglobin as iron sources. *Microbiology* **145**:2453-2461.
184. Nicolet, J. 1985. *Haemophilus pleuropneumoniae*. Bacteriology and epidemiology. Compendium on swine *Haemophilus pleuropneumoniae*. Des. Moines, Iowa. AASP. p. 7-11.
185. Nicolet, J. 1992: *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In, Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.): *Diseases of Swine*. 7th ed. Iowa State University Press, Ames, 401-408.

186. Niederhoffer, E.C.; Naranjo, C.M.; Bradley, K.L.; Fee, J. A. 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*soda* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.* **172**(4):2624-2639.
187. Niven, D. F.; Donga, J.; Archibald, F. S. 1989. Responses of *Haemophilus pleuropneumoniae* to iron restriction: change in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porcine transferrin. *Mol. Microbiol.* **3**:1083-1089.
188. Norris, R. L.; Dart R. C. 1989. Apparent coral snake envenomation in a patient without visible fang marks. *Am. J. Emerg. Med.* **7**(4):402-405.
189. Occhino, D. A.; Wyckoff, E.E.; Henderson, D.P.; Wrona, T.J.; Payne, S.M. 1998. *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol. Microbiol.* **29**(6):1493-1507.
190. Ochsner, U. A.; Vasíl, M. L. 1996. Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa* cycle selection of iron-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:3:4409-4419.
191. Ogunnariwo, J.A.; Schryvers, A.B. 2001. Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*. *J. Bacteriol.* **183**:890-896.
192. Oishi, E.; Hiroya, I.; Okabe, T.; Terakodo, N. 1993. Passive protection of mice against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection by monoclonal antibodies. *J. Vet. Med. Sci.* **55**(5):711-715.
193. Otto, B. R.; Verweij-van Vught A. M.; MacLaren D. M. 1992. Transferrins and heme-compounds as iron sources for pathogenic bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**(3):217-233.
194. Panina, E.M.; Mironov, A.A.; Gelfand, M.S. 2001. Comparative analysis of *FUR* regulation in gamma-proteobacteria. *Nucleic. Acids. Res.* **29**:5195-5206.
195. Paradis, S.E.; Dubreuil, D.; Rioux, S.; Gottschalk, M.; Jacques, M. 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect Immun.* **62**(8):3311-9.

196. Paradis, S.E.; Dubreuil J.D.; Gottschalk, M.; Archambault, M.; Jacques, M. 1999. Inhibition of adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine respiratory tract cells by monoclonal antibodies directed against LPS and partial characterization of the LPS receptors. *Curr. Microbiol.* **39**(6):313-320.
197. Parkkila, S.; Waheed, A.; Britton, R.S.; Bacon, B.R.; Zhou, X.Y.; Tomatsu, S.; Fleming, R.E.; Sly, W.S. 1997a. Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **94**:13198-13202.
198. Parkkila, S.; Waheed, A.; Britton, R.S.; Feder, J.N.; Tsuchihashi, Z.; Schatzman, R.C.; Bacon, B.R.; Sly, W.S. 1997b. Immunohistochemistry of HLA-H, the protein defective in patients with hereditary hemochromatosis, reveals unique pattern of expression in gastrointestinal tract. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **94**:2534-2539.
199. Perry, M.B.; Altman, E.; Brisson, J.R.; Beynon, L.M.; Richards, J.C. 1990. Structural characteristics of the antigenic capsular polysaccharides and lipopolysaccharides involved in the serological classification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains. *Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.* **4**:299-308.
200. Peterson, K. M.; Mekalanos, J. J. 1988. Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect. Immun.* **56**(11): 2822–2829.
201. Pijoan, C. 1984. Etiología, inmunidad y patogenia de las enfermedades respiratorias del cerdo. *Med. Vet.* **1**:517-524.
202. Piñeiro, M. 1999. *Estudio bioquímico de la ITIH4 humana, una proteína plasmática de fase aguda*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
203. Postle, K. 1993. Ton B protein and energy transduction between membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**:591-601.
204. Pradel, E.; Guiso, N.; Menozzi, F.D.; Loch, C. 2000. *Bordetella pertussis* tonB, a Bvg-independent virulence determinant. *Infect. Immun.* **68**:1919-1927.

205. Prideaux, C.T.; Lenghaus, C.; Krywult, J.; Hodgson, A.L. 1999. Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the ApxII operon. *Infect. Immun.* **67**(4):1962-1966.
206. Qureshi, S.T.; Medzhitov, R. 2003. Toll-like receptors and their role in experimental models of microbial infection. *Gene Immun.* **4**(2):87-94.
207. Rapp, V.J.; Ross, R.F. 1986. Antibody response of swine to outer membrane components of *Haemophilus pleuropneumoniae* during infection. *Infect Immun.* **54**(3):751-760.
208. Ratledge, C.; Dover, L.G. 2000. TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect. Immun.* **68**:6329-6336.
209. Reed, L.J.; Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The Am. J. Hyg.* **27**:493-497.
210. Reimer, D.; Frey, J.; Jansen, R.; Veit, H. P.; Inzana, T. J. 1995. Molecular investigation of the role of ApxI and ApxII in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a. *Microb. Pathog.* **18**:197-209.
211. Rhodes, D.A.; Trowsdale, J. 1999. Alternative splice variants of the hereditary hemochromatosis protein HFE. *Immunogenetics* **49**:357-359.
212. Rioux, S.; Galarneau, C.; Harel, J.; Frey, J.; Nicolet, J.; Kobisch, M.; Dubreuil, J.D.; Jacques, M. 1999. Isolation and characterization of mini-Tn10 lipopolysaccharide mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Can. J. Microbiol.* **45**(12):1017-1026.
213. Rioux, S.; Galarneau, C.; Harel, J.; Kobisch, M.; Frey, J.; Gottschalk, M.; Jacques, M. 2000. Isolation and characterization of a capsule-deficient mutant of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Microb. Pathog.* **28**(5):279-289.
214. Robins-Browne, R.M.; Prpic, J.K. 1985. Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **47**:774-779.

215. Rodríguez Barbosa, J.I.; Gutiérrez Martín, C.B.; Tascón, R.I.; Suárez, J.; Rodríguez Ferri, E.F. 1995. Evidence obtained with monoclonal antibodies that O antigen is the major antigen responsible for the cross-reactivities between serotypes 4 and 7 of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2**(5):563-568.
216. Rodríguez Ferri, E.F. 2002. Caracterización y prevalencia de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en España. *Anaporc* **219**:5-51.
217. Rodríguez Ferri, E.F.; Barceló, J.; Gómez, S.; Sánchez Vizcaino, J.M.
Actinobacillus pleuropneumoniae.
<http://www.sanidadanimal.info/cursos/curso/6/inf.htm>
218. Rohrbach, B.W.; Hall, R.F.; Hitchcock, J.P. 1993. Effect of subclinical infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in commingled feeder swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **202**(7):1095-1098.
219. Rokbi, B.; Mignon, M.; Maitre-Wilmontte, G.; Lossolo, L.; Danve, B.; Caugant, D. A.; Quentin-Millet, M.J. 1997. Evaluation of recombinant transferrin-binding protein B variant from *Neisseria meningitidis* for their ability to induce cross-reactive and bacterial antibodies against a genetically diverse collection of serogrup B strains. *Infect. Immun.* **65**:55-63.
220. Rosendal, S.; Lombin, L.; DeMoor, J. 1981. Serotyping and detection of *Haemophilus pleuropneumoniae* by indirect fluorescent antibody technique. *Can. J. Comp. Med.* **45**(3):271-274.
221. Rosendal, S.; MacInnes, J.I. 1990. Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* **51**(5):711-717.
222. Rosendal, S.; Miniats, O.P.; Sinclair, P. 1986. Protective efficacy of capsule extracts of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs and mice. *Vet. Microbiol.* **12**(3):229-240.

223. Rosendal, S.; Mitchell, W.R. 1983. Epidemiology of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs: a survey of Ontario Pork Producers. *Can. J. Comp. Med.* **47**(1):1-5.
224. Rosendal, S.; Mitchell, W.R.; Weber, M.; Wilson, M.R.; Zaman, M.R. 1980. *Haemophilus pleuropneumoniae* lung lesions induced by sonicated bacteria and sterile culture supernatants. Proc. 6th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Copenhagen (Dinamarca). **5**:221.
225. Rossi-Campos, A.; Anderson, C.; Gerlach, G.F.; Klashinsky, S.; Potter, A.A.; Willson, P.J. 1992. Immunization of pigs against *Actinobacillus pleuropneumoniae* with two recombinant protein preparations. *Vaccine* **10**(8):512-518.
226. Roszkowski, W.; Roszkowski, K.; Ko, H. L.; Beuth, J.; Jeljaszewicz, J. 1990. Immunomodulation by Propionibacteria. *Zbl. Bakt.* **274**:289-298.
227. Roszkowski, W.; Szmigielski, S.; Ko, H. L.; Janial, M.; Wrembel, J. K.; Pulverer, G.; Jeljaszewicz, J. 1980. Effect of three strains of Propionibacteria (*P. granulosum*, *P. avidum*, *P. acnes*) and cell-wall preparations on lymphocytes and macrophages. *Zbl. Bact. Hyg.* **246**:393-404.
228. Ruffolo, C.G.; Jost, B.H.; Adler, B. 1998. Iron-regulated outer membrane proteins of *Pasteurella multocida* and their role in immunity. *Vet. Microbiol.* **59**:123-127.
229. Rushton, B. 1978. Induction of pneumonia in mice with *Pasteurella hemolytica*. *J. Comp. Pathol.* **88**:477-480.
230. Schaller, A.; Kuhnert, P.; Puente-Redondo, V.A.; Nicolet, J.; Frey, J. 2000. Apx toxins in pasteurella species from animals. *Vet. Microbiol.* **74**:365-376.
231. Schaller, A.; Kuhn, R.; Kuhnert, P.; Nicolet, J.; Anderson, T.J.; MacInnes J.I.; Segers, R.P.; Frey, J. 1999. Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology* **145**(8):2105-2116.
232. Schermer, S. 1967. *The blood morphology of laboratory animals*. 3^a ed. F. A. Davis Company, Philadelphia.

233. Schryvers, A.B.; Morris, L.J. 1988^a. Identification and characterization of the transferrin receptor from *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **2**(2):281–288.
234. Schryvers, A.B.; Morris, L.J. 1988^b. Identification and characterization of the human lactoferrin-binding protein from *Neisseria meningitides*. *Infect. Immun.* **56**:1144-1149.
235. Schryvers, A.B.; Stojiljkovic, I. 1999. Iron acquisition systems in the pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol.* **32**:1117-1123.
236. Schryvers, A.B.; González, G.C. 1990. Receptors for transferrin in pathogenic bacteria are specific for the host's protein. *Can. J. Microbiol.* **36**:145-147.
237. Schryvers, A.B.; Lee, B.C. 1989. Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding proteins in the family *Neisseriaceae*. *Can. J. Microbiol.* **35**(3):409-415.
238. Sebunya, N.K.; Saunders, J.R. 1982. Pulmonary clearance of *Haemophilus pleuropneumoniae* in mice. *Am. J. Vet. Res.* **43**(10):1799-1801.
239. Segalés, J.; C. Piñeiro, F.; Lampreave, M.; Nofafriás, E.; Mateu, M.; Calsamiglia, M.; Andrés, J.; Morales, M.; Piñeiro Domingo, M. 2004. Haptoglobin and pig-major acute protein are increased in pig with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet. Res.* **35**:275-282.
240. Sidibé, M.; Messier, S.; Larivière, S.; Gottschalk, M.; Mittal, K. R. 1993. Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in the porcine upper respiratory tract as a complement to serological test. *Can. J. Vet. Res.* **57**(3):204-208.
241. Simpson, W.; Olczak, T.; Genco, C.A. 2000. Characterization and Expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **182**:5737-5748.
242. Slierendrecht, W.J.; Lorenzen, N.; Glamann, J.; Koch, C.; Rombout, J.H.W.M. 1995. Immunocytochemical analysis of a monoclonal antibody specific for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) granulocytes and thrombocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **46**:349-360.

243. Smith, H. 1987. The state and future of studies on bacterial pathogenicity. In Roth, J.A. (ed) *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogenes*, American Society for Microbiology, Washinton D.C. (EE.UU), 365-382.
244. Smith, M.; Kamp, E.; Briaire, J.; Jansen, R.; Van Leengoed, L.; van Dijk, J. 1992. Induction of pneumonic lesions by recombinant cytolysins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Proc. 12th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Netherlands.
245. Staudenmaier, H.; van Hove, B.; Yaraghi, Z.; Braun, V. 1989. Nucleotide sequence of the fecBCDE genes and location of the proteins suggest a periplasmic-binding-protein-dependent transport mechanism for iron (III) dicitrate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**:2626-2633.
246. Steffens, W.L.; Byrd, W.; Kadis, S. 1990. Identification and localization of surface sialylated glycoconjugates in *Actinobacillus pleuropneumoniae* by direct enzyme-colloidal gold cytochemistry. *Vet. Microbiol.* **25**(2-3):217-227.
247. Stevenson, P.; Williams, P.; Griffiths, E. 1992. Common antigenic domains in transferrin-binding protein 2 of *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* type b. *Immun.* **60**(6):2391-2396.
248. Stine, D.L.; Fedorka-Cray, P.J.; Huether, M.J.; Anderson, G.A. 1994. Comparison of serum responses in swine after vaccination and challenge exposure with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* **55**(9):1238-1243.
249. Stockhofe-Zurwieden, N.; Kamp, E.; van Leengod, L.; Smits, M. 1996. Pathogenenicity of RTX mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* results of *in vivo* studies. Proc. 14th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna, Italy.
250. Stojiljkovi, C. I.; Baumler, A.; Hantke, K. 1994. Fur regulation in Gram-negative bacteria: identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by Fur titration assay. *J. Mol. Biol.* **236**:531-545.
251. Stojiljkovic, I.; Hantke K. 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol. Gen. Gen.* **247**(2):199-205.

252. Stojiljkovic, I.; Hwa, V.; de Saint Martin, L.; O'Garra, P.; Nassif, X.; Heffron, F.; SO, M. 1995. The *Neisseria meningitidis* haemoglobin receptor: its role in iron utilization and virulence. *Mol. Microbiol.* **15**:531-541.
253. Stojiljkovic, I.; Larson, J.; Hwa, V.; Anic, S.; SO, M. 1996. HmbR outer membrane receptor of pathogenic *Neisseria spp*: Iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. *J. Bacteriol.* **178**:4670-4678.
254. Stojiljkovic, I.; Srinivasan, N. 1997. *Neisseria meningitidis tonB, exbB* and *exbD* genes: Ton-dependent utilization of protein-bound iron in *Neisseria*. *J. Bacteriol.* **179**(3):805-812.
255. Stork, M.; Di Lorenzo, M.; Welch, T.J.; Crosa, L.M.; Crosa, J.H. 2002. Plasmid-mediated iron uptake and virulence in *Vibrio anguillarum*. *Plasmid.* **48**:222-228.
256. Strathdee, C.A.; Lo R.Y.C. 1989. Cloning nucleotide sequence, and characterization of genes encoding the secretion function of the *Pasteurella haemolytica* determinant. *J. Bacteriol.* **171**(2):916-928.
257. Strutzberg, K.; von Olleschik, L.; Franz, B.; Pyne, C.; Schmidt, M.A.; Gerlach, G.F. 1995. Mapping of functional regions on the transferrin-binding protein (TfbA) of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect Immun.* **63**(10):3846-3850.
258. Tarasuik, K.; Hogg, A.; Pejsak, Z. 1996. Evolution of hemolysin neutralization titers in pigs vaccinated with *Actinobacillus pleuropneumoniae* whole cell subunit vaccine. Proc. 14 th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Bologna, Italy.
259. Tarigan, S.; Slocombe, R.F.; Browning, G.F.; Kimton, W. 1994. Functional and structural changes of porcine alveolar macrophages induced by sublytic doses of a heat labile, hemolytic, cytotoxic substances produced by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **55**(11):1548-1557.
260. Tascón, R.I. 1995. *Estudios de patogenicidad en Actinobacillus pleuropneumoniae*. Tesis Doctoral. Universidad de León.

261. Tascón, R.I.; Vázquez Boland, J.A.; Gutiérrez Martín, C.B.; Rodríguez Barbosa, J.I.; Rodríguez Ferri, E.F. 1994. Utilidad del modelo murino para el estudio de la virulencia de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *An. Fac. Vet. León*. **38**:107-118.
262. Tascón, R.I.; Vázquez-Boland, J.A.; Gutiérrez Martín, C.B.; Rodríguez Barbosa, J.I.; Rodríguez Ferri, E.F. 1996. Virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiología SEM*. **12**:171-184.
263. Taylor, D. 2002. Enfermedades del cerdo. 8ª ed. Editorial Interamericana. Buenos Aires, Argentina. pp:563-576.
264. Tepper, T.; Jilderda, J.F.; Huisman, R.M.; van der Hem, G.K.; de Zeeuw, D. 1992. Differences in erythrocyte sodium transport between human plasma and artificial medium: the role and character of sodium efflux and influx stimulating plasma factors. *Clin. Chim. Acta*. **213**(1-3):61-73.
265. Thwaites, R.N.; Kadis S. 1993. Purification of surface-exposed integral outer membrane proteins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and their role in opsonophagocytosis. *Am. J. Vet. Res.* **54**(9):1462-1470.
266. Thwaites, R.N.; Kadis, S. 1991. Immunogenicity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* outer membrane proteins and enhancement of phagocytosis by antibodies to the proteins. *Infect. Immun.* **59**:544-549.
267. Tolmasky, M.E.; Wertheimer, A.M.; Actis, L.A.; Crosa, J.H. 1994. Characterization of *Vibrio anguillarum* fur gene: role in regulation of expression of FatA outer membrane protein and catechols. *J. Bacteriol.* **176**:213-220.
268. Tonpitak, W.; Thiede, S.; Oswald, W.; Baltés, N.; Gerlach, G.F. 2000. *Actinobacillus pleuropneumoniae* iron transpon: a set of *erbBD* genes is transcriptionally linked to the *tbpB* gene and required for utilization of transferrin-bound iron. *Infect. Immun.* **68**:1164-1170.
269. Touati, D. 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**:1-6.

270. Tsolis, R. M.; Baumler, A.J.; Stojiljkovic, I.; Heffron, F. 1995. Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J. Bacteriol.* **177**(16):4628-4637.
271. Udeze, F.A.; Kadish, S. 1992^a. Effects of *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysine on porcine neutrophil function. *Infect. Immun.* **60**(4):1558-1567.
272. Udeze, F.A.; Kadish, S. 1992^b. Inhibition of bactericidal activity of anticapsular antibody by non-specific antibodies reactive with surface-exposed antigenic determinants on *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **60**(9):3852-3860.
273. Udeze, F.A.; Latimer, K.S.; Kadish, S. 1987. Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.* **48**(5):768-773.
274. Ultera, V.; Pijoan, C. 1991. Fimbriae in *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains isolated from pig respiratory tracts. *Vet. Rec.* **128**:357-358.
275. Van den Bosch, H.; Frey J. 2003. Interference of outer membrane protein PalA with protective immunity against *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in vaccinated pigs. *Vaccine* **21**(25-26):3601-3607.
276. Van den Bosch, J.F.; Pennings, A.M.M.A., Cuijpers, M.E.C.M., Pubben, A.N.B., van Vugt, F.G.A.; van der Linden, M.F.I. 1990. Heterologous protection induced by an *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine. *Proc. Int. Pig Vet. Soc.* 11:11.
277. Van Leengoed, L.A.; Dickerson, H.W. 1992. Influence of calcium on secretion and activity of the cytolytic enzymes of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.* **60**:352-359.
278. Van Leengoed, L.A.; Kamp, E.M.; Pol, J.M.A. 1989. Toxicity of *Haemophilus pleuropneumoniae* to porcine lung macrophages. *Vet. Microbiol.* **19**:337-349.

279. Van Overbeke, I.; Chiers, K.; Donne, E.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F. 2003. Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 of pigs vaccinated with bacterins consisting of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 grown under NAD-rich and NAD-restricted conditions. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health.* **50**(6):289-293.
280. Van Overbeke, I.; Chiers, K.; Ducatelle, R.; Haesebrouck, F. 2001. Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public. Health* **48**(1):15-20.
281. Van Vliet, A.H.M.; Rock, J. D.; Madeleine, L.N.; Ketley, J.M. 2000. The iron-responsive regulator Fur of *Campylobacter jejuni* is expressed from two separate promoters. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**:115-118.
282. Veken, J.W.; Oudega, B.; Luirink, J.; Graaf, F.K. 1994. Binding of bovine transferrin by *Pasteurella multocida* serotype B:2.5 a strain which causes haemorrhagic septicaemia in buffalo and cattle. *FEMS Microbiol. Lett.* **115**:253-258.
283. Vonder Haar, R.A.; Legrain, M.; Kolbe, H.V.; Jacobs, E. 1994. Characterization of a highly structured domain in Tbp2 from *Neisseria meningitidis* involved in binding to human transferrin. *J. Bacteriol.* **176**(20):6207-6213.
284. Ward, C.K.; Lawrence, M.L.; Veit, H.P.; Inzana, T.J. 1998. Cloning and mutagenesis of a serotype-specific DNA region involved in encapsulation and virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5a: concomitant expression of serotype 5a and 1 capsular polysaccharides in recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Infect Immun.* **66**(7):3326-3336.
285. Weimberg, E.D. 1995. Acquisition of iron and other nutrients *in vivo*. Virulence mechanisms of bacterial pathogens, 2nd ed. Edited by: Roth, J.A.; Bolin, C.A.; Brogden, K.A.; Minion, F.C.; Wannemuehler, M.J. *American Society for Microbiology*. Washintong D.C., USA.

Bibliografía

286. Welch, R.A. 1991. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**:521-528.
287. Wendersman, C.; Stojiljkovic, I. 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:215-220.
288. West, D.; Reddin, K.; Matheson, M.; Heath, R.; Funnell, S.; Hudson, M.; Robinson, A.; Gorringer, A. 2001. Recombinant *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein A protects against experimental meningococcal infection. *Infect. Immun.* **69**:1561-1567.
289. Williams, J.; Torres, M.; Echeverría, P.; Matos, M. 2000. Aislamiento e identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en pulmones de cerdos con pleuroneumonía crónica sacrificados en el rastro municipal de Mérida, Yucatán. México. *Rev. Biomed.* **11**:175-181.
290. Wilson, R.A. 1993. Immunity and immunoregulation in helminth infections. *Curr. Opin. Immunol.* **5**:538-547.
291. Wintrobe, M. 1979. *Hematología clínica* 3^a ed. Interamericana. Buenos Aires.
292. Wintrobe, M. 1994. *Hepatología Clínica* 7^a ed. Intermédica. Buenos Aires.
293. Yu, R.; Schryvers, A.B. 1994. Transferrin receptors on ruminant pathogens vary in their interaction with the C-lobe and N-lobe of ruminant transferrins. *Can. J. Microbiol.* **40**(7):532-540.
294. Yu, R.H.; Bonnah, R.A.; Ainsworth, S.; Schryvers, A.B. 1999. Analysis of the immunological responses to transferrin and lactoferrin receptor protein from *Moraxella catarrhalis*. *Infect. Immun.* **67**:3793-3799.