

UTILIDAD DEL MODELO MURINO PARA EL
ESTUDIO DE LA VIRULENCIA DE
Actinobacillus pleuropneumoniae)

(MURINE MODEL USEFULNESS FOR *Actinobacillus*
pleuropneumoniae VIRULENCE STUDIES)

R. I. Tascón Cabrero*
J. A. Vázquez Boland**
C. B. Gutiérrez Martín*
J. I. Rodríguez Barbosa*
E. F. Rodríguez Ferri*

Palabras clave: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, modelo murino, DL₅₀, virulencia, hierro.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, murine model, LD₅₀, virulence, iron.

SUMMARY

The usefulness of murine model for *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence studies was established by means of reference strains and field isolates LD₅₀ determinations. One log differences allowed us to cluster strains in two groups. High virulence strains were those belonging to serotypes 1, 5, 9, 10, and 11, which produce ApxI hemolysin. The second group displayed a lower mortality and included strains of serotypes 2, 3, 4, 6, 7, and 8, which do not express ApxI. The major role of ApxI in *A. pleuropneumoniae* pathogenicity for mice was evidenced by these results. This animal model allowed us to establish differences between full-virulent strains and non-hemolytic mutants. Nevertheless, mice are unable to reproduce *A. pleuropneumoniae* natural infection and they seem to be only a good model for acute disease. Iron pool modification by iron dextran and Desferin® inoculation did not significantly improve the murine infection.

* Departamento de Patología Animal. Sanidad Animal (Unidad de Microbiología e Inmunología). Facultad de Veterinaria. León.

** Departamento de Patología Animal I (Microbiología e Inmunología). Facultad de Veterinaria. Madrid

An. Fac. Vet. León, 1992 -1994 38, 107-118

RESUMEN

Se ha establecido la utilidad del modelo murino para estudios de virulencia en *Actinobacillus pleuropneumoniae* mediante la determinación de la DL₅₀ en aislamientos clínicos y cepas de colección. En función de variaciones en la virulencia de al menos un ciclo logarítmico, pudieron diferenciarse dos grupos. El de mayor virulencia incluía cepas de los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11, productores de la hemolisina ApxI. El segundo grupo, que ocasionaba una menor mortalidad, estaba integrado por cepas pertenecientes a los serotipos 2, 3, 4, 6, 7 y 8, que no producían dicha toxina. Estos resultados ponen de manifiesto el papel fundamental de esta toxina en la patogenicidad de *A. pleuropneumoniae* en el ratón. El modelo murino fue útil para establecer diferencias en la virulencia asociadas al fenotipo hemolítico, a través del estudio de mutantes afectados en este carácter respecto de la cepa salvaje original. En cualquier caso, el cuadro característico de la infección natural por *A. pleuropneumoniae* no se reproduce en el ratón y su utilidad para el estudio de la pleuroneumonía porcina estaría circunscrita a la fase aguda. La inoculación de hierro dextrano y de Desferin® en el ratón con el fin de modificar su equilibrio férrico no mejoraba la infección.

INTRODUCCIÓN

Desde el principio de la Microbiología, la utilización 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. Pese a la necesaria restricción en el uso de animales en experimentación, éstos son imprescindibles en los estudios de patogenicidad microbiana, que han de llevarse a cabo manteniendo condiciones que eviten sufrimientos innecesarios. La utilidad de estos modelos se justifica en razones como el bajo coste de adquisición y mantenimiento, ciclos de vida cortos, posibilidad de disponer de líneas homogéneas, susceptibilidad a un gran número de agentes y en último término, la posible extrapolación de los resultados obtenidos (con las debidas correcciones) al hospedador natural²⁸.

La pleuroneumonía porcina es una importante enfermedad respiratoria del cerdo producida por el microorganismo Gram negativo *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Con carácter general, su curso agudo o crónico se caracteriza por la presencia de lesiones hemorrágicas, fibrinosas y necróticas, que asientan en los pulmones del animal y que son causa de su muerte y/o de importantes problemas económicos derivados del menor rendimiento de los animales¹⁸. *A. pleuropneumoniae* es un patógeno específico del cerdo y puede afectar prácticamente a todas las edades, aunque los animales más jóvenes son los más susceptibles coincidiendo con factores ambientales estresantes (manejo, transporte, mezcla de animales, etc.)^{18,33}. La enfermedad se presenta siempre en explotaciones de tipo intensivo, como resultado de su modo de transmisión directo¹⁸.

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 alternativa experimental, en particular en los estudios de inmunidad y virulencia de *A. pleuropneumoniae*. La mayoría de los investigadores ha concluido que la susceptibilidad de este animal a la infección por *A. pleuropneumoniae* depende de la cepa de ratón utilizada 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^{3, 12, 16, 25, 26, 32}.

El presente trabajo se planteó sobre la necesidad de establecer y contrastar la utilidad del modelo murino para el estudio de la pleuroneumonía porcina, así como para clarificar los mecanismos que determinan la virulencia de *A. pleuropneumoniae* en esta especie animal. Con ese fin, se llevaron a cabo determinaciones de Dosis Letal 50% (DL₅₀) a partir de cepas de colección y de aislamientos clínicos obtenidos de muestras de matadero. Por otro lado, son los mecanismos relacionados con la adquisición de hierro los que parecen determinar que la infección en el ratón no sea todo lo adecuada que podría desearse, ya que *A. pleuropneumoniae* produce *in vivo* receptores específicos para la transferrina porcina (pero no para transferrinas de otros orígenes)⁷ que determinan que el microorganismo sólo pueda causar infección en el cerdo⁷. Así pues, se estudió la influencia de algunos compuestos relacionados con el hierro (Desferin® y hierro dextrano) en el desarrollo experimental de la infección en ratones.

El Desferin® (mesilato de desferoxamina B) es un sideróforo microbiano de la familia de los hidroxamatos, que se utiliza con fines terapéuticos en pacientes con una sobrecarga de hierro a consecuencia de transfusiones masivas o envenenamientos²². El Desferin® ejerce en el hospedador un efecto que varía en función de la capacidad del agente infeccioso de utilizar como factor de crecimiento la forma férrica de este compuesto (la desferoxamina); cuando el microorganismo carece de receptores para ella, esta sustancia ejerce un efecto protector al secuestrar el hierro, mientras que estimula la multiplicación de bacterias que sí pueden utilizarla. La administración parenteral de hierro dextrano puede ejercer un efecto favorecedor de la infección, bien porque supone un suministro directo de hierro (en el caso de los microorganismos capaces de utilizarlo en esta forma), o indirectamente a través del mantenimiento del nivel orgánico de transferrina, o provocando una inmunosupresión en el hospedador tratado^{10, 15, 19}.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas. Las cepas de *A. pleuropneumoniae* utilizadas en este estudio, se citan en la Tabla 1. La cepa CM5 Nx' (derivada de *A. pleuropneumoniae* CM5, una cepa del serotipo 1 utilizada en numerosas investigaciones sobre virulencia e inmunogenicidad de esta bacteria²³) es un mutante espontáneo resistente al ácido nalidíxico utilizado como cepa parental para la obtención, por inserción del transposón mini-Tn10, del mutante no hemolítico CM5 NH-4^{29, 30}.

Tabla 1. Cepas de *A. pleuropneumoniae* utilizadas en este estudio.

Cepa	Descripción	Fuente
ATCC ^a 27088 (Shope 4074)	Cepa de referencia del serotipo 1	Colección
ATCC 27089 (1536)	Cepa de referencia del serotipo 2	Colección
ATCC 27090 (1421)	Cepa de referencia del serotipo 3	Colección
ATCC 33378 (M-62)	Cepa de referencia del serotipo 4	Colección
ATCC 33377(K17)	Cepa de referencia del serotipo 5a	Colección
ATCC 33590 (Femø)	Cepa de referencia del serotipo 6	Colección
WF83	Cepa de referencia del serotipo 7	Nielsen, R. ^b
405	Cepa de referencia del serotipo 8	Nielsen, R.
CVJ13261	Cepa de referencia del serotipo 9	Nielsen, R.
D13039	Cepa de referencia del serotipo 10	Nielsen, R.
56163	Cepa de referencia del serotipo 11	Nielsen, R.
8329	Cepa de referencia del serotipo 12	Nielsen, R.
CM5 Nx ^r	Mutante espontáneo	Tascón <i>et al.</i>
CM5 NH-4	Mutante no hemolítico	Tascón <i>et al.</i>
S538	Cepa de campo del serotipo 1	Rosendal, S. ^c
F93	Cepa de campo del serotipo 1	Nuestro laboratorio
F40, F46, F48, F50, F51, F59B	Cepas de campo del serotipo 2	Nuestro laboratorio
BC181, EM4431	Cepas de campo del serotipo 3	Rosendal, S.
F22, F53A, F66, F77	Cepas de campo del serotipo 3	Nuestro laboratorio
F2, F3, F5, F6, F8, F10, F12, F13, F17, F23, F24B, F25, F27, F35, F41B, F42A, F42B, F43, F44, F47, F54, F56, F64, F81, F95, F102, F103, G72, M9, M12	Cepas de campo del serotipo 4	Nuestro laboratorio
MG131	Cepa de campo del serotipo 5	Rosendal S.
F28, F31	Cepas de campo del serotipo 6	Nuestro laboratorio
F45, G58	Cepas de campo del serotipo 7	Nuestro laboratorio
F7	Cepa de campo del serotipo 8	Nuestro laboratorio
F14, F15, F21A, F21B, F76	Cepas de campo del serotipo 9	Nuestro laboratorio
F63, M1, M2, M3, M4, M5, M7	Cepas de campo del serotipo 10	Nuestro laboratorio

^a American Type Culture Collection, Rockville, Maryland (EE.UU.).

^b State Veterinary Serum Laboratory, Copenhagen (Dinamarca).

^c Ontario Veterinary College, University of Guelph, Guelph, Ontario (Canadá).

Medios de cultivo. Las cepas se cultivaron durante 6 h en agar PPLO (Difco) suplementado con 50 µl ml⁻¹ de suero de caballo estéril y 10 µg ml⁻¹ de NAD (Sigma).

Dosis Letales 50%. Se utilizaron ratones NMRI hembra, de 5 a 6 semanas de edad (entre 20 y 25 g de peso) a los que se suministró agua y alimento *ad libitum*. Los ani-

males, en grupos de cinco, fueron inoculados por vía intraperitoneal, con 0.5 ml de una suspensión de bacterias en PBS estéril, o diluciones de la misma en base cinco. Se anotaron las muertes que se producían en los cinco días posteriores a la inoculación, y la DL₅₀ se determinó de acuerdo con el procedimiento de Reed y Muench²¹.

Efecto de compuestos de hierro en la infección experimental de los ratones. Los animales fueron inoculados por vía intraperitoneal con una solución de hierro dextrano al 10% (Laboratorios Ovejero, S.A., León) (250 mg kg⁻¹ de peso vivo) inmediatamente antes de ser infectados, o con mesilato de desferoxamina (Desferin®, Ciba-Geigy, Barcelona) (200 mg kg⁻¹ de peso vivo) 24 h antes, o bien con una combinación de ambas sustancias.

RESULTADOS

Dosis Letales 50%. En la Tabla 2 se presentan los resultados de las determinaciones del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) correspondientes a las DL₅₀ en ratón. Todos los animales murieron dentro de las 24 h siguientes a la inoculación.

En líneas generales, los resultados pueden agruparse en dos perfiles: el de las cepas pertenecientes a los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11, cuyas DL₅₀ estaban en torno a valores de 10⁷ UFC, y el referido al resto de las cepas (serotipos 2, 3, 4, 6, 7 y 8), cuyos valores oscilaban en el rango de 10⁸. Solamente se produjeron desviaciones puntuales de este patrón, que afectaban a 7 de las 72 cepas estudiadas. La media de los valores de las cepas de campo en el serotipo 4 (aquel que disponía de mayor número de representantes) estaba muy próxima a la DL₅₀ de la cepa de referencia ATCC 33378 (4.81 x 10⁸ y 3.12 x 10⁸, respectivamente). Lo mismo ocurría en el serotipo 10, si excluíamos el valor de la cepa F63 (1.16 x 10⁷ para la cepa de referencia D13039 y 3.21 x 10⁷ la media de las 6 cepas de campo). En el serotipo 9 la diferencia entre ambos valores (9.57 x 10⁷ en la cepa de referencia CVJ13261 y 1.42 x 10⁸ la media de las cepas de campo) tampoco era muy amplia, si bien ello se relacionaba más bien con unas DL₅₀ anormalmente elevadas. Las mayores divergencias, de hasta casi un ciclo logarítmico, afectaban a los serotipos 2 y 3, cuyas respectivas cepas de referencia, ATCC 27089 y 27090, presentaron unos valores que se desviaban del patrón general para alcanzar el rango de 10⁹.

Efecto del hierro dextrano y el Desferin® en la DL₅₀ de *Actinobacillus pleuropneumoniae* en ratón. Se intentó mejorar la resolución de la infección experimental en el modelo murino mediante diversos ensayos relacionados con el hierro. Los ratones fueron inoculados antes de la infección con el quelante Desferin®, con hierro dextrano, o bien con ambas sustancias. Posteriormente se calculó la DL₅₀ de las cepas CM5-Nx^r y NH-4, comparando los valores obtenidos con los alcanzados en circunstancias normales. En la Tabla 3 se presenta el resultado de las determinaciones, y la distancia relativa existente bajo distintas condiciones entre las DL₅₀ de las dos

Tabla 2. Resultados DL₅₀ en ratón*.

serotipo 1		continuación	
4074	1'78 x 10⁷	F47	2'06 x 10 ⁸
CM5	2'88 x 10 ⁷	F54	8'60 x 10 ⁸
S538	1'28 x 10 ⁷	F56	6'16 x 10 ⁸
F93	3'00 x 10 ⁸	F64	1'17 x 10 ⁸
serotipo 2	(5'74 x 10 ⁸)	F81	5'68 x 10 ⁸
1536	1'01 x 10⁹	F95	1'68 x 10 ⁸
F40	7'85 x 10 ⁸	F102	9'71 x 10 ⁸
F46	1'40 x 10 ⁸	F103	3'05 x 10 ⁸
F48	1'29 x 10 ⁸	M9	1'41 x 10 ⁹
F50	9'27 x 10 ⁸	M12	1'13 x 10 ⁹
F51	5'81 x 10 ⁸	serotipo 5a	
F59B	8'81 x 10 ⁸	K17	2'50 x 10⁷
serotipo 3	(2'94 x 10 ⁸)	MG131	1'83 x 10 ⁷
1421	2'43 x 10⁹	serotipo 6	
BC181	1'25 x 10 ⁸	Femø	3'02 x 10⁸
EM4431	8'53 x 10 ⁷	F28	3'23 x 10 ⁸
F22	1'22 x 10 ⁸	F31	3'42 x 10 ⁸
F53A	6'04 x 10 ⁸	serotipo 7	
F66	1'76 x 10 ⁸	WF83	1'77 x 10⁸
F77	6'53 x 10 ⁸	F45	3'64 x 10 ⁸
serotipo 4	(4'81 x 10 ⁸)	serotipo 8	
M-62	3'12 x 10⁸	405	4'92 x 10⁸
F2	2'91 x 10 ⁸	F7	4'86 x 10 ⁸
F3	2'93 x 10 ⁸	serotipo 9	(1'42 x 10 ⁸)
F5	8'84 x 10 ⁸	CVJ13261	9'57 x 10⁷
F6	2'38 x 10 ⁸	F14	1'97 x 10 ⁸
F8	3'73 x 10 ⁸	F15	1'27 x 10 ⁸
F10	6'50 x 10 ⁸	F21A	6'20 x 10 ⁷
F12	8'20 x 10 ⁸	F21B	2'73 x 10 ⁸
F13	6'17 x 10 ⁸	F76	5'29 x 10 ⁷
F17	1'47 x 10 ⁸	serotipo 10	(1'61 x 10 ⁸)
F23	2'41 x 10 ⁸	D13039	1'16 x 10⁷
F24B	8'37 x 10 ⁷	F63	9'33 x 10 ⁸
F25	2'91 x 10 ⁸	M1	1'80 x 10 ⁷
F27	1'94 x 10 ⁸	M2	1'81 x 10 ⁷
F35	4'43 x 10 ⁸	M3	3'27 x 10 ⁷
F41B	4'69 x 10 ⁸	M4	2'10 x 10 ⁷
F42A	5'43 x 10 ⁸	M5	2'63 x 10 ⁷
F42B	1'82 x 10 ⁸	M7	7'66 x 10 ⁷
F43	3'76 x 10 ⁸	serotipo 11	
F44	4'63 x 10 ⁸	56163	6'91 x 10⁷

*: Entre paréntesis, después de la indicación del serotipo, se señala la media aritmética de las determinaciones de las cepas de campo, cuando éstas eran más de tres. En negrita, los valores de las correspondientes cepas de referencia. Las DL₅₀ subrayadas son los valores extremos de las cepas de campo para un serotipo dado.

cepas estudiadas. Como puede apreciarse, solamente la utilización del quelante del hierro se tradujo en un aumento apreciable en la diferencia de letalidad entre ambas cepas; la utilización combinada de las dos sustancias ensayadas también determina un aumento, aunque menor, del cociente entre las DL₅₀ de las cepas parental y mutante, pero esta circunstancia puede atribuirse al Desferin® a la vista de los resultados obtenidos con el hierro dextrano. En todos los casos, las muertes seguían produciéndose dentro de las 24 h siguientes a la inoculación.

Tabla 3. DL₅₀ después de los siguientes tratamientos:

Cepa	Ninguno	Desferin®	Hierro dextrano + Desferin®	Hierro dextrano
CM5-Nx'	3'20 x 10 ⁷	3'80 x 10 ⁷	2'90 x 10 ⁷	4'78 x 10 ⁶
Mutante NH-4	7'14 x 10 ⁸	1'34 x 10 ⁹	8'33 x 10 ⁸	1'15 x 10 ⁸
Cociente				
DL ₅₀ (CM5-Nx')	22'31	35'26	28'72	24'06
DL ₅₀ (NH-4)				

DISCUSIÓN

Los resultados de las DL₅₀ permitieron dividir las cepas de *A. pleuropneumoniae* en dos grupos en base a su letalidad en el modelo murino. Uno altamente virulento y otro que causaba baja mortalidad en el ratón. Este esquema coincide con el descrito por Komal y Mittal¹⁶, quienes apuntaron la correlación positiva existente entre sus resultados y el perfil hemolítico de los distintos serotipos^{5,13}. El actual conocimiento de la distribución en los distintos serotipos de *A. pleuropneumoniae* de las toxinas RTX y de la funcionalidad de las mismas⁶, permite precisar con mayor detalle esta relación. Así, el grupo de cepas más virulentas incluye aquellas poseedoras de al menos la toxina fuertemente hemolítica y citotóxica ApxI (las pertenecientes a los serotipos 1, 5, 9, 10 y 11). Por el contrario, las cepas que causaban una mortalidad menor, cuya DL₅₀ era superior en un ciclo logarítmico o más, pertenecían bien a los serotipos productores de la toxina débilmente hemolítica y citotóxica ApxII, y de la toxina fuertemente citotóxica, pero no hemolítica, ApxIII (serotipos 2, 3, 4, 6 y 8), o bien al serotipo 7 (productor solamente de ApxII).

Estos resultados constituyen una importante evidencia, en el sentido de que la toxina ApxI es un factor fundamental sobre el que descansa la patogenicidad de este microorganismo en el ratón, pues con un carácter prácticamente constante, las cepas pertenecientes a los serotipos productores de esta exoproteína manifestaban diferencias evidentes en su virulencia para el ratón. Igual ocurre en el hospedador natural de *A. pleuropneumoniae*, en el que los principales brotes agudos de enfermedad se relacionan en su mayoría con estos serotipos^{2,17,20,31}.

Las divergencias puntuales que con respecto al patrón general se encontraron en algunas cepas no constituyen tampoco novedad alguna, ya que han sido referidas con

anterioridad por Komal y Mittal¹⁶. Una explicación para este fenómeno es la distorsión debida a las variaciones individuales en el modelo animal. Por otro lado, los operones *apx* parecen ser inherentes a sus respectivos serotipos, ya que el perfil de toxinas RTX de las distintas cepas de campo de *A. pleuropneumoniae* experimenta muy escasa variación con respecto a la cepa de referencia en un serotipo dado; así, ni Kamp *et al.*¹⁴ ni Beck *et al.*¹ encontraron discrepancia alguna en relación con el modelo descrito por Frey *et al.*⁶, en sendos estudios realizados con 103 y 191 cepas de campo del biotipo 1 de *A. pleuropneumoniae*, excepto en lo referido a cuatro y tres cepas, respectivamente. Si asumimos que la virulencia de este microorganismo en el ratón está directamente influenciada por el perfil de toxinas RTX, una interpretación complementaria se refiere a una posible asignación errónea del serotipo en los aislamientos. Beck *et al.*¹ describieron esta circunstancia en algunas cepas cuyo perfil *apx* no se correspondía con el de su aparente cepa de referencia; después de una repetición del tipado estas cepas pudieron ser encuadradas en su serotipo correcto. En todos los casos se trataba de aislamientos que habían presentado ciertas dificultades en su clasificación. Esta última particularidad también se presentó en algunas de nuestras cepas^{8,9}.

La elección de la vía intraperitoneal de inoculación en estos experimentos se realizó en base a la sencillez de la técnica, que la hacía especialmente indicada para ser utilizada en un elevado número de animales. En cualquier caso, los resultados obtenidos por otros autores mediante la administración intranasal del microorganismo^{12,26} no difieren de los nuestros, ni de los de otros investigadores también obtenidos por la inoculación intraperitoneal^{16,25}, mas de lo que sería atribuible a la mera utilización de distintas cepas bacterianas y de ratón. Por otro lado, nosotros hemos conseguido administrar una dosis repetitiva de microorganismos por vía intranasal³⁰ sin encontrar los problemas descritos por otros autores^{24,25}.

Nuestros resultados corroboraron la limitada utilidad del modelo murino en estudios de virulencia de *A. pleuropneumoniae*^{3,12,16,25,26,32}. Solo un número muy elevado de bacterias resultaba letal para el ratón, además de que únicamente pudo ser reproducida la fase inicial de la enfermedad, pues la muerte de los animales sobrevenía en todos los casos en las primeras 24 h postinoculación. Ambos datos sugerían que las toxinas eran cruciales en la patogenicidad de *A. pleuropneumoniae* en el ratón, y que en este animal no se desencadenaba una verdadera infección en la consideración que del término se tiene para describir la persistencia duradera del microorganismo o su multiplicación⁴ que en el hospedador natural induce la enfermedad.

En relación con la administración de Desferin® y hierro dextrano, nuestros resultados no ofrecieron avance importante alguno, pues en ningún caso mejoraba la infección, pero sí que fueron acordes con los datos ya conocidos relativos a este modelo. Aunque *A. pleuropneumoniae* es incapaz de utilizar la transferrina murina como fuente de hierro, el hecho es que el agente es capaz de multiplicarse y sobrevivir en este hospedador hasta 48 h después de ser inoculado^{27,30}. Ello puede deberse a la posible captación por parte del microorganismo de hierro a partir de otras fuentes, a una limitada capacidad de utilizar la transferrina murina *in vivo*, o bien a la utilización de las trazas de hierro existentes en el PBS utilizado para preparar la suspensión

bacteriana inoculada. En estas condiciones, el Desferin® podría actuar secuestrando el escaso hierro disponible a partir de las mencionadas fuentes, lo que justificaría el aumento de la DL₅₀ de las cepas estudiadas.

El hierro dextrano determinaba el único descenso apreciable de la DL₅₀ en ambas cepas y ya que parece poder descartarse que el microorganismo sea capaz de utilizar esta forma férrica⁷, podríamos vincular este fenómeno a la interferencia del hierro con el funcionamiento normal de las células fagocíticas, que permitiría a *A. pleuropneumoniae* escapar en cierta medida de la cavidad peritoneal para desencadenar la muerte de los animales a una dosis menor. Finalmente, la inoculación conjunta de Desferin® y de hierro dextrano, apenas ejercía ningún tipo de efecto en la DL₅₀ de las cepas.

Así pues, la modificación del equilibrio férrico en el ratón mediante las sustancias estudiadas, no parece ser un mecanismo adecuado para mejorar la infección por *A. pleuropneumoniae*, ya que las muertes seguían sobreviniendo en las primeras 24 h postinoculación, y solo el hierro dextrano consiguió rebajar ligeramente la DL₅₀ de las cepas estudiadas, y ello probablemente en base a un mecanismo inespecífico. Tampoco fue mejor la discriminación entre cepas de alta y baja virulencia, ya que solo se conseguía ampliar la distancia existente entre las DL₅₀ del mutante no hemolítico y de la cepa parental mediante la utilización del Desferin® que, paradójicamente, de forma individual ejercía un efecto protector frente a la inoculación del agente. Para conseguir asimilar la infección en el ratón a la que tiene lugar en el hospedador natural de *A. pleuropneumoniae* podría ser de utilidad la aproximación realizada por Holbein¹¹, quien inyectaba a los ratones con transferrina humana para proporcionar una fuente asimilable de hierro a *Neisseria meningitidis*. El único problema al respecto reside en la no disponibilidad comercial de transferrina porcina.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por el Programa Nacional de Investigación y Desarrollo Ganadero de la CICYT (proyecto GAN89-0317).

BIBLIOGRAFÍA

- 1) BECK, M., VAN DEN BOSCH, J.F., JONGENELEN, I.M.C.A., LOEFFEN, P.L.W., NIELSEN, R., NICOLET, J., y FREY, J. (1994). RTX toxins and phenotypes in *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 2749-2754.
- 2) FALES, W.H., MOREHOUSE, L.G., MITTAL, K.R., BEAN KNUDSEN, C., NELSON, S.L., KINTNER, L.D., TURK, J.R., TURK, M.S., BROWN, T.P., y SHAW, D.P. (1989). Antimicrobial susceptibility and serotypes of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* recovered from Missouri swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1, 16-19.

- 3) FENWICK, B.W., OSBURN, B.I., y OLANDER, H.J. (1986). Resistance of C3H/HeJ mice to the effects of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Infect. Immun.*, 53, 474-479.
- 4) FINLAY, B.V., y FALKOW, S. (1989). Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Rev.*, 53, 210-230.
- 5) FREY, J., y NICOLET, J. (1990). Hemolysin patterns of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 28:232-236.
- 6) FREY, J., BECK, M., y NICOLET, J., (1994). RTX-toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En FREER, J., AITKEN, R., ALOUF, J.E., BOULNOIS, G., FALMAGNE, P., FENRENBACH, F., MONTECUCCO, C., PIEMONT, Y., RAPPUOLI, R., WADSTRÖM, T., y WITHOLT, B. (eds.): *Bacterial Protein Toxins*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (Alemania), 322-332.
- 7) GONZALEZ, G.C., CAAMANO, D.L., y SCHRYVERS, A.B. (1990). Identification and characterization of a porcine-specific transferrin receptor in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Mol. Microbiol.*, 4,1173-1179.
- 8) GUTIÉRREZ, C.B., TASCÓN, R.I., VÁZQUEZ-BOLAND, J.A., RODRÍGUEZ FERRI, E.F. (1991). Cross-reactivity between *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes comparing different antigens and serological tests. *Res. Vet. Sci.*, 50, 308-310.
- 9) GUTIÉRREZ, C.B., TASCÓN, R.I., RODRÍGUEZ, J.I., GONZÁLEZ, O.R., VÁZQUEZ-BOLAND, J.A., y RODRÍGUEZ FERRI, E.F. (1993). Characterization of V factor-dependent organisms of the family *Pasteurellaceae* isolated from porcine pneumonic lungs in Spain. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 16, 123-130.
- 10) HOLBEIN, B.E. (1980). Iron-controlled infection with *Neisseria meningitidis* in mice. *Infect. Immun.*, 29, 886-891.
- 11) HOLBEIN, B.E. (1981). Enhancement of *Neisseria meningitidis* infection in mice by addition of iron bound to transferrin. *Infect. Immun.*, 34, 120-125.
- 12) INZANA, T.J., MA, J., WORKMAN, T., GOGOLEWSKI, R.P., y ANDERSON, P. (1988). Virulence properties and protective efficacy of the capsular polymer of *Haemophilus (Actinobacillus) pleuropneumoniae* serotype 5. *Infect. Immun.*, 56, 1880-1889.
- 13) KAMP, E.M., y VAN LEENGOED, L.A.M.G. (1989). Serotype-related differences in production and type of heat-labile hemolysin and heat-labile cytotoxin of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 1187-1191.
- 14) KAMP, E.M., VERMEULEN, T.M.M., SMITS, M.A., y HAAGSMA, J. (1994). Production of Apx toxins by field strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Actinobacillus suis*. *Infect. Immun.*, 62, 4063-4065.
- 15) KEOWN, P., y DESCAMPS-LATSCHA, B. (1983). In vitro suppression of cell-mediated immunity by ferroproteins and ferric salts. *Cell. Immunol.*, 80, 257-266.
- 16) KOMAL, J.P.S., y 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.
- 17) MITTAL, K.R., HIGGINS, R., LARIVIERE, S., y LEBLANC, D. (1984). A 2-mercaptoethanol tube agglutination test for diagnosis of *Haemophilus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Am. J. Vet. Res.*, 45, 715-719.
- 18) NICOLET, J. (1992). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. En LEMAN, A.D., STRAW, B., MENGELING, W., D'ALLAIRE, S. y TAYLOR, D.J (eds.): *Diseases of swine* (7ª ed), Iowa State University Press, Ames (Iowa, EE.UU), 401-408.
- 19) PAYNE, S.M., y FINKELSTEIN, R.A. (1977). Imferon agar: improved medium for isolation of pathogenic *Neisseria*. *J. Clin. Microbiol.*, 6, 293-297.
- 20) RAPP, V.J., ROSS, R.F., y ERICKSON, B.Z., (1985). Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* by rapid slide agglutination and indirect fluorescent antibody tests in swine. *Am. J. Vet. Res.*, 46, 185-192.
- 21) REED, L.J., y MUENCH, H. (1938). A simple method for estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.*, 27, 493-497.
- 22) ROBINS-BROWNE, R.M., y PRPIC, J.K. (1985). Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 47, 774-779.
- 23) ROSENDAL, S., CARPENTER, D.S., MITCHELL, W.R., y WILSON, M.R. (1981). Vaccination against pleuropneumonia of pigs caused by *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can. Vet. J.*, 22, 34-35.
- 24) ROSENDAL, S., MINIATS, O.P., y SINCLAIR, P. (1986). Protective efficacy of capsular extracts of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs and mice. *Vet. Microbiol.*, 12, 229-240.
- 25) ROSENDAL, S., y MACINNES, J.I. (1990). Characterization of an attenuated strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.*, 51, 711-717.
- 26) SEBUNYA, T.N.K., y SAUNDERS, J.R. (1982). Studies on immunity to *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in mice. *Am. J. Vet. Res.*, 43, 1793-1798.
- 27) SEBUNYA, T.N.K., y SAUNDERS, J.R. (1982). Pulmonary clearance of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Serratia marcescens* in mice. *Am. J. Vet. Res.*, 43, 1799-1801.
- 28) SMITH, H. (1987). The state and future of studies on bacterial pathogenicity. En ROTH, J.A. (ed.): *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, American Society for Microbiology, Washington D.C. (EE.UU), 365-382.
- 29) TASCÓN, R.I., RODRÍGUEZ-FERRI, E.F., GUTIÉRREZ-MARTÍN, C.B., RODRÍGUEZ-BARBOSA, J.I., BERCHE, P., y VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. (1993). Transposon mutagenesis in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with a Tn10 derivative. *J. Bacteriol.*, 175, 5717-5722.
- 30) TASCÓN, R.I., VÁZQUEZ-BOLAND, J.A., GUTIÉRREZ-MARTÍN, C.B., RODRÍGUEZ-BARBOSA, J.I., y RODRÍGUEZ-FERRI, E.F. (1994). The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. *Mol. Microbiol.*, 14, 207-216.

- 31) TURK, J.R., FALES, W.H., MADDOX, C.W., RAMOS, J.A., FISCHER, J.R., JOHNSON, G.C., KREEGER, J.M., MILLER, M.A., PACE, L.W., TURNQUIST, S.E. y GOSSER, H.S. (1993). Pleuropneumonia in Missouri swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5, 101-103.
- 32) UDEZE, F. A., LATIMER, K.S., y KADIS, S., (1987). Role of *Haemophilus pleuropneumoniae* lipopolysaccharide endotoxin in the pathogenesis of porcine *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Am. J. Vet. Res.*, 48, 768-773.
- 33) WILLSON, P.J., FALK, G., y KLASHINSKY, S. (1987). Detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Can. Vet. J.*, 28, 111-116.

RESIDUOS DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS EN LECHE ENTERA UHT

(ORGANOCHLORINE PESTICIDE RESIDUES IN UHT WHOLE MILK)

J.R. Martínez Álvarez,*

M.T. Terán Somaza,*

J.J. García Viéitez,*

M. Sierra Vega,*

M.J. Díez Liébana*

Palabras clave: Insecticidas organoclorados. Residuos en Leche.

Key words: Organochlorine pesticide. Residues in milk.

SUMMARY

Residual levels of nine organochlorine pesticides (aldrin, p,p'-DDE, p,p'-DDT, dieldrin, endrin, heptachlor-epoxide, lindane, o,p'-TDE and p,p'-TDE) were determined in UHT whole milk and they were compared with the maximum levels allowed by the European Union in these foods. The highest incidence percentage of the insecticides researched was for heptachlor-epoxide (59.38%), followed by lindane (56.25%). Moreover, the highest mean residual level was for p,p'-DDT (0.1872 ppm). None of the samples analyzed exceeded the maximum levels allowed by the European Union.

RESUMEN

En este trabajo se determinaron los residuos de nueve insecticidas organoclorados (aldrin, p,p'-DDE, p,p'-DDT, dieldrin, endrin, heptacloro epóxido, lindano,

* Dpto. Fisiología, Farmacología y Toxicología. Universidad de León.
Facultad de Veterinaria
An. Fac. Vet. 1992-1994, 38, 119-124