

Caracterización de Cepas Virulentas de *Bordetella pertussis* y *Bordetella bronchiseptica* aplicables a la Producción de Vacunas *

Beatriz PASSERINI de ROSSI **, Laura FRIEDMAN, Silvina DARNAUD,
Ramón de TORRES *** y Mirta FRANCO

Cátedra de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
U.B.A., Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. Las enfermedades producidas por *Bordetella spp* son prevenibles por vacunación. La inmunogenicidad de las cepas bacterianas usadas para la producción de vacunas se relaciona con su virulencia, que, a su vez, puede sufrir modificaciones por las condiciones de cultivo. En este trabajo se estudiaron diferentes marcadores de virulencia y se analizó su relevancia en la caracterización de cepas virulentas de *Bordetella pertussis* y *Bordetella bronchiseptica*. Los resultados obtenidos sugieren la necesidad de utilizar medios diferenciales, tales como Bordet Gengou y Rojo Congo (sin Heptakis para *B. bronchiseptica*) para los estudios morfológicos, que además permiten definir marcadores adicionales como producción de hemólisis y captación del colorante Rojo Congo. La producción de hemagglutininas, el perfil de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa, y la ausencia de motilidad (en *B. bronchiseptica*), permitieron corroborar el fenotipo virulento en cepas caracterizadas como D⁺S⁺ (conexas, lisas), H⁺ (hemolíticas) y RC⁺ (Rojo Congo positivas) por los criterios anteriores. Se propone la conveniencia de utilizar semillas liofilizadas o conservadas con glicerol a -20 °C, y controlar la fase de los cultivos a utilizar en la producción de vacunas. Asimismo, se propone un esquema secuencial de estudio de los marcadores de fase virulenta.

SUMMARY. "Characterization of *Bordetella pertussis* and *B. bronchiseptica* virulent strains applied to vaccine production". Vaccines prevent diseases produced by *Bordetella spp*. The immunogenicity of bacterial strains used for vaccines production is related to their virulence, which depends on culture conditions. In this work we studied different virulence markers and we analyzed their relevance in the characterization of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* virulent strains. The results suggest the need of using differential media, such as Bordet Gengou and Congo Red (without Heptakis for *B. bronchiseptica*) for morphological studies, which also define additional markers as hemolysis production and Congo Red uptake. Hemagglutinin production, outer membrane enriched proteins profiles, and motility absence (in *B. bronchiseptica*), corroborated the virulent phenotype of bacterial strains characterized as D⁺S⁺ (domed, smooth), H⁺ (haemolytic) and RC⁺ (Congo Red positive), by the previous criteria. We propose the convenience of using lyophilized seeds, or preserving them with glycerol at -20 °C. Furthermore, we suggest to control the culture phase used in the vaccines production. A sequential study of the virulent markers is proposed.

PALABRAS CLAVE: *B. bronchiseptica*, *B. pertussis*, Virulencia.

KEY WORDS: *B. bronchiseptica*, *B. pertussis*, Virulence.

* Aspectos parciales de este trabajo fueron presentados en el XV Congreso Panamericano de Farmacia y Bioquímica. EXPOFEPAFARBIO'94. Buenos Aires, Argentina, 14-19 de noviembre de 1994 y en el XII Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica. Buenos Aires, Argentina, 5-10 de septiembre de 1995.

** Autor a quien dirigir la correspondencia.

*** Miembro de la Carrera de Investigador. CONICET.

INTRODUCCION

Las bacterias del género *Bordetella* son patógenos de gran importancia en pediatría y en medicina veterinaria. *B. pertussis* es el agente causal de la tos convulsa y *B. bronchiseptica* es un patógeno respiratorio de animales salvajes, domésticos, de laboratorio y ocasionalmente de humanos ^{1,2}.

Las enfermedades producidas por ambas especies de *Bordetella* se previenen mediante vacunación utilizando células muertas (vacunas celulares) o inmunógenos purificados (vacunas acelulares). La efectividad de estas vacunas depende de la utilización de células que expresen factores de virulencia, que sólo son producidos por microorganismos en fase virulenta y en ausencia de moduladores.

Las células virulentas de *Bordetella* expresan: hemaglutinina filamentosa (FHA) ³, fimbrias ⁴, pertactina (P69) ⁵, toxina dermonecrótica (DNT) ⁶, citotoxina traqueal (TCT) ⁷, toxina adenilato ciclasa-hemolisina (AC-Hly) ⁸ y toxina pertussis (PT) ^{9,10}, esta última sólo en *B. pertussis*. La expresión de estos factores (a excepción de TCT) y de ciertas proteínas de envoltura ¹¹ está regulada en forma positiva y coordinada por el locus *bug* (gen de virulencia de *Bordetella*) ^{12,13} o locus *vir* (virulencia) ^{14,15}. El crecimiento de cepas virulentas de *Bordetella* en condiciones que no permiten la expresión de factores de virulencia (ácido nicotínico 5 mM, MgSO₄ 50 mM ó 25 °C), provoca un cambio fenotípico reversible denominado "modulación antigénica" por Lacey ^{16,17}. Los moduladores inhiben la transcripción de los genes *vag* (genes activados por el locus *vir*) e inducen la de los genes *virg* (genes reprimidos por el locus *vir*); y las cepas moduladas se comportan fenotípicamente como las cepas avirulentas (*vir*⁻) originadas por mutaciones espontáneas en el locus *vir*. En *B. bronchiseptica* el gen que codifica la flagelina es un gen *virg*. Las cepas salvajes (*vir*⁺) son móviles, por flagelos peritricos, sólo en presencia de moduladores; mientras que las cepas *vir*⁻ producen flagelos en cualquier condición de cultivo ¹⁸.

Las mutaciones en el locus *vir* originan el fenómeno generalmente irreversible conocido como "variación de fase", por el cual las células de *Bordetella* dejan de sintetizar factores de virulencia. Este fenómeno fue descrito en *B. pertussis* hace más de 50 años por Leslie y Gardner ¹⁹, quienes establecieron una clasificación serológica y llamaron fase I al fenotipo salvaje, virulento, liso, y fases II, III y IV a las variantes que surgían de sucesivos pasajes en el laboratorio y que sufrían una progresiva degradación hasta obtener bacterias rugosas. Kasuga *et al.* ^{20,21} desarrollaron posteriormente otra clasificación serológica y describieron las fases I, II y III asociadas a fenotipos en Bordet-Gengou (BG). Las fases I, II, III y IV de Leslie y Gardner no son equivalentes a las fases I, II y III de Kasuga *et al.* Pepler ²² utilizó el medio BG y combinó características morfológicas y producción de hemólisis para definir dos fenotipos estables: D⁺H⁺ (colonias "domed" o convexas y hemolíticas) y D⁻H⁻ (colonias chatas y no hemolíticas) que son "pares isogénicos" de una misma cepa. Weiss *et al.* ¹⁴ introdujeron el término "fase virulenta" (fenotipo *vir*⁺) y propusieron definir a la "fase avirulenta", con mayor precisión, como aquella en la cual las bacterias pierden simultáneamente la habilidad de sintetizar tres o más factores de virulencia.

Tampoco existe acuerdo en cuanto a la nomenclatura utilizada para definir los distintos fenotipos de *B. bronchiseptica*. Nakase ^{23,24} utiliza medios con sangre para diferenciar las variantes fenotípicas que denomina fases I, II, III y IV. Bemis

et al.²⁵ utiliza Agar Brucella para definir los fenotipos de las colonias y los denomina fases I, intermedia y rugosa. Peppler y Schrupf²⁶ definieron los fenotipos predominantes D⁺S⁺H⁺ (convexo, liso y hemolítico; análogo a la fase I de Nakase) y D⁻S⁺H⁻ (chato, liso y no hemolítico, análogo a la fase III de Nakase) en *B. bronchiseptica*.

Se han propuesto distintos marcadores de fase: morfología macro y microscópica, producción de hemólisis^{22, 26}; captación del colorante Rojo Congo²⁷, producción de hemaglutininas²⁸, motilidad¹⁸ y perfiles de proteínas de células totales lisadas y de proteínas de envoltura^{22,26,29,14}. Sin embargo, no existe consenso sobre la relevancia de los distintos criterios en la caracterización de fenotipos virulentos.

El objetivo de este trabajo es definir la utilidad de los distintos criterios para caracterizar cepas en fase *vir*⁺ de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica* aplicables a la producción de vacunas, optimizar los medios de cultivo diferenciales utilizados y establecer la frecuencia de variación de fase en cepas de ambas especies.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas

Se utilizaron las siguientes cepas:

B. pertussis vir⁺: Tohama fase I¹⁴, 165³⁰, 10536 Kendrick Eldering (ATCC 10380), 40103 (Laboratorio Central de Salud Pública de La Plata) y 18323 (ATCC 9797) cepa de desafío en ratones¹.

B. pertussis vir⁻: 347 (Tohama I vir-1::Tn5)¹⁵, avirulenta por inserción del transposón Tn5 en el locus *vir*.

B. bronchiseptica vir⁺: 7200 (cobayo), 7605 (conejo), cerdo-1 y cerdo-2 (Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata) y 7865³¹.

B. bronchiseptica vir⁻: 7866 (31), variante espontánea de la cepa 7865.

Las cepas se conservaron congeladas a -20 °C en glicerol al 15%, y se recuperaron cultivándolas en Bordet-Gengou modificado (BG) con 13% de sangre equina citratada²² a 35 °C, en atmósfera húmeda, durante 72 h (*B. pertussis*) y 24-48 h (*B. bronchiseptica*).

Morfología micro y macroscópica

Se estudió la morfología microscópica (utilizando la coloración de Gram) y la morfología macroscópica de las colonias de cepas *vir*⁺ y *vir*⁻ de *Bordetella* cultivadas en diferentes medios sólidos: BG, Jones-Kendrick (JK)³² y Rojo Congo (RC)²⁷, agregando Agar Nutritivo (AN) (Difco) y Triptona Soja Agar (TSA) (Difco) para *B. bronchiseptica*. El estudio macroscópico de las colonias se realizó utilizando una lupa estereoscópica binocular (40x) (Kyowa Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan).

Producción de hemólisis

La detección de β-hemólisis difusa alrededor de colonias *vir*⁺ de *Bordetella* se efectuó utilizando BG con 13% de sangre equina citrada²², una bicapa de BG sin sangre/ BG con 20% de sangre²⁷, y una bicapa con 13% (*B. pertussis*) ó 5% de sangre (*B. bronchiseptica*). Las placas se incubaron a 35 °C en atmósfera húmeda

por 3-4 días (*B. bronchiseptica*) o por 7 días (*B. pertussts*); el sellado de las mismas con Parafilm previno la desecación por la prolongada incubación.

Captación de Rojo Congo

Suspensiones de las cepas en estudio se sembraron por disseminación en superficie en placas conteniendo medio RC²⁷ y medio RC sin Heptakis. El medio RC es una modificación del medio sólido con ciclodextrina (CSM) desarrollado por Imaizumi *et al.*³³, contiene 10 veces más FeSO₄ y se logra hacerlo diferencial por el agregado del colorante Rojo Congo. La composición del medio RC basal (en g/l), es la siguiente: glutamato monosódico (10,7 g), L-prolina (0,24 g), NaCl (2,5 g), KH₂PO₄ (0,5 g), KCl (0,2 g), MgCl₂.6H₂O (0,1 g), CaCl₂ (0,02 g), Tris (6,1 g), hidrolizado de caseína 5 (Gibco) (0,5 g), 2,6-O-dimetil-β-ciclodextrina (MeβCD o Heptakis) (1 g) y Bacto-Agar (Difco) (18 g), en agua destilada. Se ajusta el pH a 7,4 y se esteriliza por calor húmedo a 121 °C por 15 min. El suplemento, que contiene L-cisteína (0,04 g), FeSO₄.7H₂O (0,1 g), ácido ascórbico (0,02 g), ácido nicotínico (0,004g) y glutatión reducido (0,15 g) en agua destilada csp 10 ml, se esteriliza por filtración y se agrega a un litro de medio basal. Al medio suplementado se agrega una solución madre de colorante Rojo Congo al 1% (p/v), esterilizada a 121 °C por 15 min, para obtener una concentración final de 0,002% (p/v). Las placas se incubaron en las mismas condiciones que para la detección de hemólisis, durante 4-5 días (*B. bronchiseptica*) o durante 6-7 días (*B. pertussts*), y se examinaron las colonias aisladas.

Frecuencia de variación de fase

Se utilizaron los criterios de producción de hemólisis y captación de Rojo Congo. El porcentaje de variación de fase se determinó resuspendiendo: a) una colonia (clon) RC⁺ o H⁺ en 100 µl de buffer fosfato salino (PBS) pH 7,2, sembrando las diluciones 10⁻² y 10⁻³ en BG y RC; b) cultivos heteroclonales de *Bordetella*, que habían sufrido 8 pasajes en BG. Estos cultivos se resuspendieron en PBS para obtener 1x10¹⁰ UFC/ml, sembrando las diluciones 10⁻⁶ y 10⁻⁷ en BG y RC.

Detección de hemaglutininas

Se realizaron suspensiones bacterianas en PBS y se estandarizaron determinando la absorbancia a 530 nm (Spectrophotometer Sequoia-Turner-Corp., Taiwan), correspondiente a 1x10¹⁰ UFC/ml^{22, 27}. Se utilizó la técnica de hemaglutinación en placa: 50 µl de la suspensión estandarizada y diluciones al medio de la misma en PBS hasta 1:1024, se enfrentaron con 50 µl de glóbulos rojos equinos citratados, lavados y resuspendidos en PBS al 1% (v/v). El control negativo se efectuó enfrentando PBS con la suspensión de eritrocitos. Las placas se agitaron suavemente y se incubaron 2-3 h a temperatura ambiente. Los resultados se expresan en unidades hemaglutinantes por 50 µl de muestra (UHA/50 µl) y corresponden a la inversa de la máxima dilución que presenta hemaglutinación franca.

Motilidad

Las cepas *vir*⁺ y *vir*⁻ de *B. bronchiseptica* se sembraron por punción en placas de Petri conteniendo medio Stainer-Scholte³⁴ con 0,4% de agar (SSM)¹⁸ y el

mismo medio suplementado con 40 mM MgSO₄ (SSM-MgSO₄). Las placas se incubaron 18-24 h, a 35 °C.

Perfiles de proteínas

Se utilizaron células cultivadas en BG u. ante 72 h (*B. pertussis*) o 48 h (*B. bronchiseptica*).

Proteínas de células enteras lisadas

Las células cultivadas en BG se resuspendieron en PBS y se centrifugaron a 10.000 x g (Microcentrífuga Presvac EPF-12) durante 5 min.; el pellet se resuspendió en PBS para obtener una absorbancia, a 530 nm, de 0,15 (Spectrophotometer Sequoia-Turner-Corp., Taiwan). Muestras de 1,5 ml se centrifugaron a 10.000 x g durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Los pellets se resuspendieron en 100 µl de solución solubilizante de Laemmli³⁵ y se calentaron 5 min en agua hirviendo.

Preparación de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa

Las bacterias cultivadas en BG y resuspendidas en HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Sigma) 10 mM (pH 7,4), se centrifugaron a 10.000 x g (Sorvall Instruments Dupont RC5C) a 4 °C. Los pellets se lavaron con HEPES 10 mM y aproximadamente 1,5 g (peso húmedo) de células se resuspendieron en 15 ml de este buffer y se congelaron a -70 °C hasta ser procesadas. La fracción enriquecida en proteínas de membrana externa se obtuvo utilizando la técnica de Hellwig y Arp³⁶, modificada³⁷. Las células se descongelaron y se agregó PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma) para obtener una concentración final de 0,1 mM. Las células fueron sonicadas (Sonicator, Ultrasonic Processor XL, Heat Systems) durante 10 min con pulsos de 1 min, mientras se mantenían en un baño de hielo-agua. Las células enteras y los desechos se separaron por centrifugación a 5.000 x g durante 20 min y el sobrenadante se sometió a ultracentrifugación (Sorvall Ultracentrifuge Dupont OTD 55B) a 100.000 x g durante 60 min a 4 °C. El pellet, fracción de membranas totales, se resuspendió en Sarkosyl (sodium lauryl sarcosine, Sigma) al 1% (p/v) disuelto en HEPES 10 mM con PMSF 0,1 mM y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La suspensión se centrifugó a 100.000 x g durante 60 min a 4 °C para obtener el pellet, material insoluble en detergente, que contiene la fracción enriquecida en proteínas de membrana externa. El pellet se resuspendió en agua desionizada y se conservó congelado a -70 °C hasta el momento de realizar la corrida electroforética.

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

Se realizó en placa vertical (Mini-Protean II, Electrophoresis Cell, BIO-RAD) utilizando el sistema de Laemmli³⁵. Se empleó un gel concentrador con 3,9% de acrilamida y 0,1% de bisacrilamida (N,N'-methylenebisacrylamide) y un gel separador con 12,5% de acrilamida y 0,3% de bisacrilamida. Las muestras se solubilizaron en el buffer muestra de Laemmli y se calentaron a ebullición durante 5 min. Se sembraron 10 µl de muestra (5 a 20 µg de proteína) por calle. La electroforesis se efectuó a voltaje constante (120V). Las bandas de proteínas se visualizaron por tinción con azul brillante de Coomassie R-250.

Como sustancias de referencia se emplearon marcadores de masa molecular: 205.000, 116.000, 97.400, 66.000, 45.000 y 29.000 (SDS-6H, Sigma).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la introducción nos hemos referido a la falta de acuerdo en cuanto a la nomenclatura utilizada para definir los fenotipos de las cepas virulentas y avirulentas de *Bordetella*. A continuación se analizan los resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, en relación con la importancia de cada una de las propiedades estudiadas en la caracterización de los fenotipos virulentos.

En los estudios morfológicos se cultivaron todas las cepas indicadas en Materiales y Métodos en los medios BG, JK y RC, agregando AN y TSA para las cepas de *B. bronchiseptica*.

Morfología microscópica

B. pertussis

La observación microscópica, previa coloración de Gram, de células de todos los cultivos incluidos los de la cepa *vir*⁻ *B. pertussis* 347, reveló cocobacilos gramnegativos aislados. Estos resultados son coincidentes con los informados por Pepler²² quien no observó diferencias morfológicas entre variantes isogénicas avirulentas y las cepas salvajes de las que ellas provenían.

B. bronchiseptica

La observación microscópica de las cepas *vir*⁺ de *B. bronchiseptica* cultivadas en BG, JK y RC reveló cocobacilos gramnegativos, pero los cultivos en AN y TSA presentaron además bacilos gramnegativos cortos. En cambio, las células *vir*⁻ de *B. bronchiseptica*, en todos los medios probados, suelen observarse como bacilos o cocobacilos de mayor tamaño que los de las células *vir*⁺ cultivadas en BG, JK o RC. La morfología de las células *vir*⁻ es similar a la de las células *vir*⁺ cultivadas en AN y TSA. Estas diferencias concuerdan con las señaladas por Pittman¹, quien describió que las células *vir*⁺ del género *Bordetella* cultivadas en BG se observan como cocobacilos gramnegativos, y las células *vir*⁻ como cocobacilos de mayor tamaño y formas filamentosas.

Por todo lo expuesto, la morfología microscópica es un criterio útil, de fácil aplicación y de resultado casi inmediato, pero no es concluyente. La observación de cocobacilos gramnegativos no asegura que la cepa posea un fenotipo virulento, mientras que la aparición de bacilos de mayor tamaño, o de filamentos se relaciona con el fenotipo avirulento, y tiene un valor predictivo importante.

Morfología macroscópica

B. pertussis

La morfología de las colonias correspondió en todos los casos al fenotipo virulento D⁺S⁺ ("domed" o convexas, "smooth" o lisas) descrito por Pepler²². Medios como JK o RC sin colorante permitieron un buen desarrollo de *B. pertussis*, pero no aportaron información sobre la fase de la cepa, ya que *B. pertussis* 347 *vir*⁻ produjo colonias D⁺S⁺, indistinguibles de las de las cepas *vir*⁺ de esta especie. En cambio, medios como RC y BG permitieron detectar características diferen-

ciales adicionales, como captación del colorante y hemólisis, respectivamente, que se analizan más adelante.

B. bronchiseptica

La morfología macroscópica de las colonias de las cepas *vir*⁺ no es homogénea. En los medios JK, RC y BG se observó un predominio de colonias D⁺S⁺ y algunas colonias de fenotipo intermedio D⁻S⁺, de mayor tamaño. La proporción de colonias D⁻S⁺ fue mayor en los medios AN y TSA. Los resultados obtenidos indican que la morfología macroscópica en los medios JK, AN y TSA no es suficiente para definir la fase del cultivo. Como se describirá más adelante, la captación de Rojo Congo y la producción de hemólisis en los medios RC y BG, permitió diferenciar entre fenotipos virulento y avirulento, en las colonias D⁻S⁺.

No hemos observado colonias S⁻ (rugosas) de *Bordetella* en ninguno de los medios utilizados.

Producción de hemólisis

La producción de hemólisis aparece como un criterio importante en la caracterización de cepas virulentas de *Bordetella*. Sin embargo, condiciones de cultivo tales como el lote comercial de BG utilizado ¹⁴, la concentración de sangre, etc., pueden influir sobre su detección. Se comprobó la influencia de la utilización de BG con 13% de sangre equina citratada, o de una bicapa BG sin sangre/ BG con 20%, 13% ó 5% de sangre, sobre la visualización de la hemólisis en colonias de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*.

En los cultivos en BG con 13% de sangre y en la bicapa con 20% de sangre la detección de la hemólisis se vio dificultada por el alto porcentaje de sangre; este efecto fue más notorio en las colonias de *B. bronchiseptica*. Nuestros resultados indican que la utilización de una bicapa BG sin sangre/ BG con 13% de sangre para *B. pertussis* o con 5% de sangre para *B. bronchiseptica* aumenta la sensibilidad en la detección de hemólisis.

B. pertussis

Todas las cepas *vir*⁺ presentaron colonias D⁺S⁺H⁺ (hemolíticas), mientras que las colonias de la cepa *B. pertussis* 347 fueron D⁺S⁺H⁻ (no hemolíticas). La utilización del medio BG, y la combinación de características morfológicas y producción de hemólisis, le permitió a Pepler ²² definir los fenotipos virulento: D⁺H⁺ y avirulento: D⁻H⁻ en *B. pertussis*. Nuestros resultados indican que no todas las cepas *vir*⁻ presentan colonias chatas (D⁻) ya que la cepa *vir*⁻ *B. pertussis* 347 presenta un fenotipo D⁺H⁻.

B. bronchiseptica

Las cepas *vir*⁺ de *B. bronchiseptica* en BG presentaron un predominio de colonias D⁺S⁺H⁺(*vir*⁺) sobre colonias D⁻S⁺H⁻ (*vir*⁻), y ocasionalmente, algunas colonias con fenotipo intermedio: D⁻S⁺H⁺, de mayor tamaño (Figura 1). Sólo la utilización de medios de cultivo con sangre, como BG, impide clasificar a estos fenotipos intermedios como avirulentos. Las cepas *vir*⁻ de *B. bronchiseptica* presentaron sólo colonias D⁻S⁺H⁻. Nuestras observaciones coinciden con la descripción de Pepler y Schrupf ²⁶.

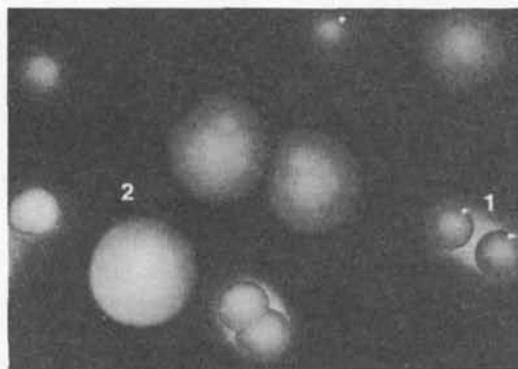


Figura 1. Colonias de *B. bronchiseptica* 7865 en medio Bordet-Gengou bicapa con 5% de sangre. 1: Colonias D⁺S⁺H⁺ (convexas, lisas, hemolíticas). 2: Colonias D⁻S⁺H⁻ (chatas, lisas, no hemolíticas).

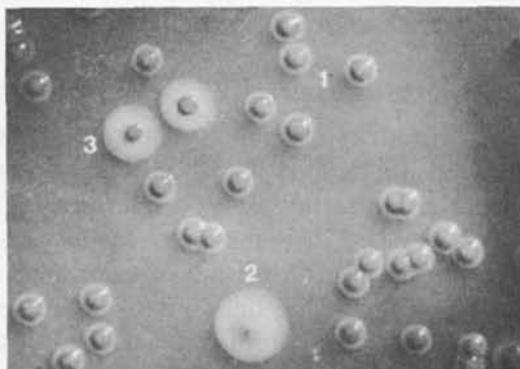


Figura 2. Colonias de *B. bronchiseptica* 7865 en medio Rojo Congo sin Heptakis. 1: Colonias D⁺S⁺RC⁺ (convexas, lisas, rojas). 2: Colonias D⁻S⁺RC⁻ (chatas, lisas, del color del medio). 3: Colonias D⁻S⁺ con fenotipo intermedio respecto a la captación de colorante RC (centro rojo, periferia del color del medio).

Las cepas *vir*⁺ y *vir*⁻ de *B. bronchiseptica* que presentaron fenotipos diferenciales en BG, originaron colonias D⁺S⁺ o D⁻S⁺, o una mezcla de ambas al ser subcultivadas en AN o TSA. Por ello insistimos en que la morfología macroscópica en estos dos medios no debe utilizarse para definir la fase del cultivo. Cuando estas colonias D⁺ S⁺ o D⁻S⁺ (obtenidos en AN o TSA) fueron nuevamente transferidas a BG, las provenientes de cepas *vir*⁺ recuperaron el fenotipo D⁺S⁺H⁺. Nuestros resultados concuerdan con las observaciones de Peppler y Schrupf²⁶ quienes sugirieron que las cepas *vir*⁺ de *B. bronchiseptica* sufren una modulación antigénica reversible al ser cultivadas en AN o TSA. Sin embargo, hemos comprobado que a pesar de la morfología macroscópica compatible con un fenotipo avirulento, cepas *vir*⁺ cultivadas en AN o TSA pueden producir hemaglutininas (HA⁺) (Tabla 3). Esto podría deberse a que el fenómeno de modulación requiera más de un pasaje en un medio con "moduladores" para evidenciarse. Además, podrían existir variaciones en la respuesta dependiendo de la cepa.

La producción de hemolisinas es un marcador de fase de gran importancia ya que es un indicador de la producción de la toxina adenilato ciclasa⁸. Sin embargo, existen mutaciones en el operón AC-Hly que originan cepas no hemolíticas, pero que sintetizan otros factores de virulencia.

Captación de Rojo Congo

Todas las cepas se cultivaron en el medio RC y en el mismo medio sin el agregado de Heptakis, para evaluar la influencia de este compuesto en la captación de colorante.

Las colonias *vir*⁺ de *Bordetella* captan el colorante y se observan como colonias rojas (RC⁺), mientras que las colonias *vir*⁻ aparecen pálidas, del color del medio (RC⁻)²⁷.

B. pertussis

Las cepas de *B. pertussis* no crecieron en ausencia de Heptakis. Todas las cepas *vir*⁺ cultivadas en RC presentaron colonias RC⁺ (rojas), pero la cepa *vir*⁻ *B. pertussis* 347 presentó un fenotipo poco definido en el que se distinguieron dos zonas, una central rojiza similar a la colonia de una cepa *vir*⁺, rodeada de una zona periférica más transparente.

B. bronchiseptica

Todas las cepas crecieron en RC y en RC sin Heptakis, y no se detectaron diferencias significativas en la captación de colorante ni en el tamaño de las colonias o el tiempo de incubación necesario para su visualización. Las cepas *vir*⁺ de *B. bronchiseptica* presentaron un predominio de colonias RC⁺ sobre colonias RC⁻; estas últimas, de mayor tamaño, se originan por la alta frecuencia de variación de fase en esta especie. En algunos casos hemos observado además de los fenotipos descritos, un fenotipo intermedio: centro rojo y periferia transparente, similar al observado en *B. pertussis* 347 (Figura 2). Las cepas *vir*⁻ de *B. bronchiseptica* presentaron sólo colonias RC⁻.

Este simple test visual permitiría diferenciar entre colonias *vir*⁺ y *vir*⁻ de *Bordetella*, ya que las envolturas de las células *vir*⁺ tienen afinidad por el colorante Rojo Congo, siendo dicha afinidad una propiedad regulada por el locus *vir*²⁷. Sin embargo, la cepa *vir*⁻ *B. pertussis* 347 descrita como RC⁻²⁷, tiene en nuestra experiencia un fenotipo poco definido. Por lo tanto, este criterio no debería emplearse en forma aislada.

El medio RC sin el agregado de Heptakis resultó comparable al descrito por Parton²⁷ para diferenciar fenotipos de *B. bronchiseptica*. Esta modificación es de interés dado el alto costo de este componente.

Frecuencia de variación de fase

Se utilizaron los criterios de producción de hemólisis y captación de Rojo Congo para determinar la frecuencia de variación de fase de cepas virulentas y seleccionar variantes avirulentas.

B. pertussis

No hemos podido aislar variantes avirulentas a partir de cepas *vir*⁺ utilizando estos criterios.

B. bronchiseptica

La producción de hemólisis, detectada en bicapa BG sin sangre / BG con 5% de sangre, resultó un criterio útil para determinar la frecuencia de variación de fase. Sin embargo la visualización de colonias H⁻ se vio muchas veces dificultada por la hemólisis de la mayoría de las colonias H⁺ cercanas. Por ello, se realizó el análisis utilizando el criterio de captación de Rojo Congo. La frecuencia de variación de fase resultó ser dependiente de la cepa. Cuando se realizó el análisis a partir del primer subcultivo de colonias aisladas RC⁺ (poblaciones monoclonales), dicha frecuencia nunca excedió el 3%; llegándose hasta valores del 15% al aumentar el número de pasajes, en poblaciones heteroclonales (Tabla 1).

Cepas <i>vir</i> ⁺ <i>B. bronchiseptica</i>	Pasaje N° 1	Pasaje N° 8
7865	0,60 ± 0,26	2,59 ± 0,50
7605	0,57 ± 0,26	2,74 ± 0,74
7200	1,03 ± 0,26	5,90 ± 2,21
cerdo-1	1,77 ± 0,72	8,26 ± 2,65
cerdo-2	1,37 ± 0,50	4,29 ± 1,14

Tabla 1. Análisis de la frecuencia de variación de fase en cepas virulentas de *B. bronchiseptica*. Los resultados expresan el rango, en porcentaje de colonias RC⁻, obtenido a partir de 5 experimentos independientes.

Esta metodología permitió seleccionar variantes avirulentas espontáneas de todas las cepas *vir*⁺ de *B. bronchiseptica* utilizadas en este estudio. El fenotipo *vir*⁻ de las colonias RC⁻ fue confirmado a través de los criterios de producción de hemólisis y de hemaglutininas y perfil de proteínas de envoltura. Estas variantes no mostraron reversión, resultando fenotípicamente estables.

El fenómeno de variación de fase, generalmente irreversible, se debe a mutaciones o rearrreglos en el locus *vir*, que ocurren durante los pasajes in vitro con frecuencias del orden de 10⁻² - 10⁻³ en *B. bronchiseptica*^{26, 31} y de 10⁻⁶ en *B. pertussis*²². Esta menor frecuencia podría explicar que al utilizar los criterios de producción de hemólisis y captación de Rojo Congo no hayamos podido aislar variantes avirulentas de *B. pertussis*. En cambio, dado que la frecuencia de variación de fase es mucho mayor en *B. bronchiseptica*, ambos criterios nos permitieron evaluar dicha frecuencia en distintas cepas de *B. bronchiseptica* y seleccionar variantes avirulentas. En nuestra experiencia, la producción de hemólisis es un criterio que presenta algunas desventajas, que ya han sido mencionadas, respecto al de captación de Rojo Congo.

Debido a la alta frecuencia de variación de fase de las cepas *vir*⁺ de *Bordetella*, en especial de las de *B. bronchiseptica*, es primordial reducir el número de pasajes en la conservación de cepas y controlar el fenotipo preponderante de las cepas que se utilizan en la producción de vacunas.

Detección de hemaglutininas

Las cepas *vir*⁺ de *Bordetella* producen hemaglutininas; *B. bronchiseptica* produce FHA y *B. pertussis* FHA y PT, pero FHA es la principal responsable de la actividad hemaglutinante²⁸. En las condiciones del ensayo se mide fundamentalmente FHA²⁷.

La detección de hemaglutininas se realizó sobre suspensiones estandarizadas de células de *B. pertussis* cultivadas en BG, JK y RC, y de *B. bronchiseptica* cultivadas en dichos medios y en RC sin Heptakis, AN y TSA. Se ensayaron tiempos de 24 y 48 horas, para determinar el tiempo óptimo de incubación en relación a la producción de hemaglutininas en ambas especies.

Cepas de <i>B. pertussis</i>	Bordet Gengou (BG)	Jones Kendrick (JK)	Rojo Congo (RC)
Tohama Fase I	4-64	8-64	256-1024
10536	4-32	4-64	256-1024
40103	2-16	2-32	64-256
165	4-16	4-32	256-1024
18323	8-32	4-32	256-1024
347	0	0	0

Tabla 2. Títulos hemaglutinantes de suspensiones estandarizadas de *B. pertussis* cultivadas en distintos medios sólidos durante 48 horas. Los resultados expresan el rango, en unidades hemaglutinantes por 50 µl de muestra, obtenido a partir de 6 experimentos independientes.

B. pertussis

Los títulos hemaglutinantes de las cepas *vir*⁺ cultivadas en BG o JK no mostraron variación con el tiempo de incubación (24 y 48 h), mientras que los correspondientes al medio RC se incrementaron notoriamente a las 48 h y, por lo tanto, ése fue el tiempo elegido para realizar los ensayos cuyos resultados se presentan en la Tabla 2. Los resultados obtenidos en BG y JK fueron poco reproducibles, pero se mantuvieron las actividades hemaglutinantes relativas de las distintas cepas. Se observó que los títulos obtenidos a partir de cultivos en RC son significativamente superiores a los obtenidos en BG o JK. Es probable que este aumento en los títulos hemaglutinantes se deba a la presencia de Heptakis en el medio RC, ya que el agregado de este compuesto a medios líquidos de cultivo incrementa la producción de hemaglutininas en *B. pertussis* ³⁸⁻³⁹. En nuestra experiencia la cepa 40103 presenta menor respuesta frente al agregado de Heptakis a medios líquidos ³⁹; coincidentemente, el aumento de los títulos hemaglutinantes de cultivos de esta cepa en RC es menos significativo (Tabla 2). Además, como era esperable, la cepa *B. pertussis* 347 no presentó actividad hemaglutinante.

B. bronchiseptica

Los títulos hemaglutinantes de las cepas *vir*⁺ no se modificaron con el tiempo de incubación y en consecuencia se escogió el de 24 h para esta especie. No se observaron diferencias significativas en los títulos hemaglutinantes obtenidos en RC o RC sin Heptakis; estos títulos fueron, algunas veces, ligeramente superiores a los obtenidos en BG o JK, pero siempre significativamente menores que los detectados en *B. pertussis*. La actividad hemaglutinante de los cultivos de cepas *vir*⁺ en AN y TSA fue variable, incluyendo resultados negativos. En la Tabla 3 se muestran los resultados correspondientes a la cepa *B. bronchiseptica* 7865, ya que los resultados de las otras cepas *vir*⁺ fueron semejantes. Como ya se ha señalado esta cepa *vir*⁺ cultivada en AN o TSA puede producir hemaglutininas (HA⁺), a pesar de presentar una morfología macroscópica compatible con un fenotipo avirulento. Por otra parte, no se detectó actividad hemaglutinante en las cepas *vir*⁻.

Cepas de <i>B. bronchiseptica</i>	Agar nutritivo (AN)	Tripticasa soya agar (TSA)	Jones-Kendrick (JK)	Bordet-Gengou (BG)	Rojo Congo (RC)	RC sin Heptakis
7865	0-2	0-8	4-16	4-16	32-64	32-64
7866	0	0	0	0	0	0

Tabla 3. Títulos hemaglutinantes de suspensiones estandarizadas de *B. bronchiseptica* cultivadas en distintos medios sólidos durante 24 horas. Los resultados expresan el rango, en unidades hemaglutinantes por 50 µl de muestra, obtenido a partir de 6 experimentos independientes.

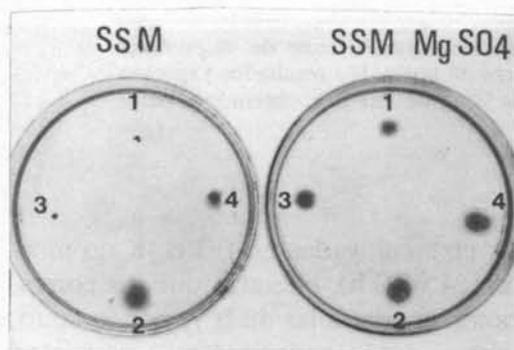


Figura 3. Ensayo de motilidad en agar blando de cepas de *B. bronchiseptica*. *B. bronchiseptica*: (1) 7865 *vir*⁺, (2) 7866 *vir*⁻, (3) 7200 *vir*⁺ y (4) 7200 *vir*⁻. SSM: Stainer-Scholte con 0,4% de agar. SSM-MgSO₄: SSM con 40 mM MgSO₄.

Los resultados obtenidos sugieren que la producción de hemaglutininas es un criterio de gran utilidad para confirmar el fenotipo virulento.

Motilidad

Se estudió la motilidad de cepas *vir*⁺ y *vir*⁻ de *B. bronchiseptica* en los medios SSM y SSM-MgSO₄, en el que el MgSO₄ actúa como modulador. Las cepas *vir*⁺ no fueron móviles en SSM, mientras que la motilidad fue claramente observada en las cepas *vir*⁺ moduladas y en las cepas *vir*⁻ en ambas condiciones de cultivo (Figura 3).

Sin embargo, debido a la alta frecuencia de variación de fase observada en esta especie, cultivos masivos de una cepa *vir*⁺ inoculados en el medio SSM pueden producir resultados poco definidos, que van desde ausencia de motilidad hasta una motilidad positiva, pero siempre mucho menor que la de cepas *vir*⁻. Por ello, es aconsejable realizar el ensayo a partir de colonias aisladas e incluir controles de motilidad, para obtener resultados más precisos, útiles para la caracterización de la fase del cultivo.

Perfiles de proteínas

Perfiles de proteínas de células enteras lisadas

Estos perfiles no aportaron evidencias concluyentes para caracterizar el fenotipo virulento de cepas de *Bordetella* (resultados no mostrados).

Perfiles de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa

La proteína de membrana externa más abundante es la porina selectiva para aniones, que posee una masa molecular de 40.000 en *B. pertussis*, y de 43.000 *B. bronchiseptica*. En ambas especies se expresa constitutivamente, independientemente de la fase.

Las cepas *vir*⁺ de *B. pertussis* presentaron un doblete característico de

30.000-32.000 y otro en la región de 90.000, que han sido asociados a virulencia²⁹. Las cepas *vir*⁺ de *B. bronchiseptica* presentaron perfiles similares, con algunas diferencias cuantitativas. Un ejemplo de ello es el doblete de 30.000-32.000 que es mucho menos pronunciado que el de *B. pertussis*. En las cepas *vir*⁻ de ambas especies se observó la desaparición o disminución de numerosas bandas, incluidas las bandas asociadas a virulencia. En las cepas *vir*⁻ de *B. bronchiseptica* hemos observado una banda muy intensa por encima de la banda correspondiente a la porina selectiva para aniones (Figura 4). Los perfiles de proteínas de *B. bronchiseptica* no han sido exhaustivamente estudiados, por ello es de gran interés definir las bandas asociadas a los distintos fenotipos. La banda que observamos sólo en las cepas *vir*⁻, por encima de la porina, sería un importante marcador del fenotipo avirulento.

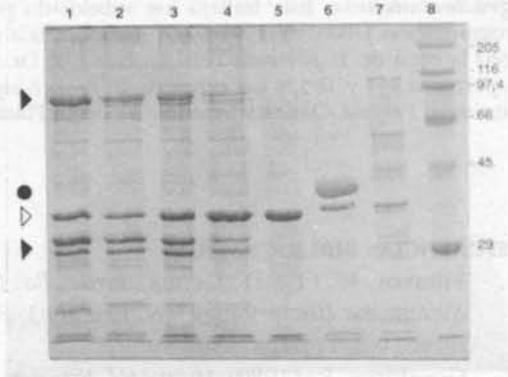


Figura 4. Perfiles de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*. *B. pertussis*: cepas *vir*⁺: 40103 (1), 18323 (2), 10536 (3), Tohama fase I (4) y cepa *vir*⁻ 347 (5). *B. bronchiseptica*: 7866 *vir*⁻ (6) y 7865 *vir*⁺ (7). Marcadores de masa molecular: (8). ∇: porina selectiva para aniones. ●: banda característica de cepas avirulentas. ▶: bandas asociadas a virulencia.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones:

Los marcadores de virulencia analizados deben utilizarse en forma conjunta para comprobar el fenotipo virulento de cepas vacunales de *B. pertussis* y *B. bronchiseptica*. Se propone: a) la utilización de medios diferenciales como BG y RC (sin Heptakis para *B. bronchiseptica*) para poder analizar la morfología micro y macroscópica de las colonias, que agregan un marcador adicional (producción de hemólisis y captación de Rojo Congo); b) la amplificación en BG de las colonias con fenotipo *vir*⁺: D+S⁺ y H⁺ o RC⁺, pequeñas, para comprobar la producción de hemaglutininas y el perfil de fracciones enriquecidas en proteínas de membrana externa asociado a virulencia. El fenotipo *vir*⁺ de las colonias de *B. bronchiseptica* puede confirmarse utilizando además el test de motilidad.

La utilización de una bicapa BG sin sangre/ BG con 13% de sangre para *B. pertussis* o con 5% de sangre para *B. bronchiseptica* aumenta la sensibilidad de la detección de hemólisis.

No se requiere Heptakis para diferenciar fenotipos de *B. bronchiseptica*, al utilizar el criterio de captación de Rojo Congo. Esta modificación es de interés dado el alto costo de este componente.

Las cepas caracterizadas como *vir*⁺, deben conservarse liofilizadas o congeladas con glicerol a -20 °C y deben evitarse los subcultivos, en los que se originan variantes *vir*⁻, debido al fenómeno de variación de fase.

Debe enfatizarse la importancia de controlar la fase en que se encuentra la cepa a utilizar en la producción de vacunas.

El sistema secuencial de utilización de marcadores de fase propuesto es útil para caracterizar cepas aisladas de nuevos brotes de bordetelosis.

Agradecimientos. Este trabajo fue subsidiado por la Universidad de Buenos Aires, a través de la Programación UBACYT 1994-1997. Agradecemos al Dr. Y. Sato (National Institute Health, Tokio, Japón) la cepa de *B. pertussis* Tohama fase I; al Dr. R. Rappuoli (Lab. Sclavo, Siena, Italia) las cepas de *B. pertussis* 347 y 165, y las cepas de *B. bronchiseptica* 7865 y 7866; y al Dr. C. Perfumo (Instituto de Patología, Fac. de Ciencias Veterinarias de La Plata) las cepas de *B. bronchiseptica* cerdo-1 y cerdo-2.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Pittman, M. (1984) "Genus *Bordetella*. Moreno López 1952", en "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" (N. Krieg y J. Holt, ed.) The Williams and Wilkins Co., Baltimore, vol. 1, págs. 388-93
2. Goodnow, R. (1980) *Microbiol. Rev.* **44**: 722-38
3. Loch, C., Ph. Bertin, F. Menozzi & G. Renauld (1993) *Mol. Microbiol.* **9**: 653-60
4. Willems, R., A. Paul, H. van der Heide, A. ter Avesi & F. Mooi (1990) *EMBO J.* **9**: 2803-9
5. Charles, I., G. Dougan, D. Pickard, M. Chatfield, M. Smith, P. Novotny, P. Morrissey & N. Fairweather (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3554-8
6. Livey, Y. & A. Wardlaw (1984) *J. Med. Microbiol.* **17**: 91-103
7. Goldman, W. (1986) "*Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin: damage to the respiratory epithelium" en "*Microbiology*" (D. Schlessinger, ed.) American Society for Microbiology, Washington, D.C., págs. 65-9
8. Glaser, P., D. Ladant, O. Sezer, F. Pichot, A. Ullmann & A. Danchin (1988) *Mol. Microbiol.* **2**: 19-30
9. Irons, L. & A. Mac Lennan (1979) "Substrate specificity and purification by affinity combination methods of the two *Bordetella pertussis* hemagglutinins", en "*International symposium on pertussis*" (C.R. Manclark y J.C. Hill, eds.), Department of Health, Education and Welfare, Washington, D.C., págs. 338-49
10. Nicosia, A. & R. Rappuoli (1987) *J. Bacteriol.* **169**: 2843-6
11. Dobrogosz, W., J. Ezzell, W. Kloos & Ch. Manclark (1979) "Physiology of *Bordetella pertussis*" en "*International Symposium on pertussis*" (C.R. Manclark y J.C. Hill, eds.) Department of Health, Education and Welfare, Washington D.C., págs. 86-93
12. Arico, B., V. Scarlato, D. Monack, S. Falkow & R. Rappuoli (1991) *Mol. Microbiol.* **5**: 2481-91
13. Knapp, S. & J. Mekalanos (1988) *J. Bacteriol.* **170**: 5059-66
14. Weiss A, G. Hewlett, G. Myers & S. Falkow (1983) *Infect. Immun.* **42**: 33-41
15. Weiss A & S. Falkow (1984) *Infect. Immun.* **43**: 263-9
16. Lacey, B. (1960) *J. Hyg.* **58**: 57-93
17. Melton, A. & A. Weiss (1989) *J. Bacteriol.* **171**: 6206-12
18. Akerley, B., D. Monack, S. Falkow & J. Miller (1992) *J. Bacteriol.* **174**: 980-90
19. Leslie, P. & A. Gardner (1931) *J. Hyg.* **31**: 423-34
20. Kasuga, T., Y. Nakase, K. Ukishima & K. Takatsu (1953) *Kitasato Arch. Exp. Med.* **26**: 121-34
21. Kasuga, T., Y. Nakase, K. Ukishima & K. Takatsu (1954) *Kitasato Arch. Exp. Med.* **27**: 37-48
22. Peppler, M. (1982) *Infect. Immun.* **35**: 840-51
23. Nakase, Y. (1957) *Kitasato Arch. Exp. Med.* **30**: 57-72
24. Nakase, Y. (1957) *Kitasato Arch. Exp. Med.* **30**: 73-8
25. Bemis, D., H. Griesen & M. Appel (1977) *J. Clin. Microbiol.* **5**: 471-80
26. Peppler, M. & M. Schrupf (1984) *Infect. Immun.* **44**: 681-7
27. Parton, R. (1988) *J. Med. Microbiol.* **26**: 301-6

28. Cowell, J., Y. Sato, H. Sato, B. An der Lan & Ch. Manclark (1982) "Separation, purification and properties of the filamentous hemagglutinin and the leukocytosis factor-hemagglutinin from *B. pertussis*" en "*Bacterial vaccines*" (J.B. Robbins; J.C. Hill y J. Sadoff, eds.) Thieme-Stratton, Inc., New York, Vol. IV, capítulo 52, págs. 371-9
29. Armstrong, S. & Ch. Parker (1986) *Infect. Immun.* **54**: 308-14
30. Sekura, R., F. Fish, Ch. Manclark, B. Meade & Y. Zhang (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 14.647-51
31. Monack, D., B. Arico, R. Rappuoli & S. Falkow (1989) *Mol. Microbiol.* **3**: 1719-28
32. Jones, G. & P. Kendrick (1969) *Health Laboratory Science* **6**: 40-5
33. Imaizumi, A., Y. Suzuki, S. Ono, H. Sato & Y. Sato (1983) *J. Clin. Microbiol.* **17**: 781-6
34. Stainer, D. & M. Scholte (1971) *J. Gen. Microbiol.* **63**: 211-20
35. Laemmli, U. (1970) *Nature* (London) **227**: 680-5
36. Hellwig, D. & L. Arp (1990) *Am. J. Vet. Res.* **51**: 1188-91
37. Leyh, R. & R. Griffith (1992) *Infect. Immun.* **60**: 958-64
38. Imaizumi, A., Y. Suzuki, A. Ginnaga, S. Sakuma & Y. Sato (1984) *J. Microbiol. Methods* **2**: 339-47
39. Passerini de Rossi, B., P. Sapia, R. de Torres & M. Franco (1994) *Rev Microbiol., São Paulo* **25**: 16-23