

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Química
Centro de Investigación y Desarrollo
en Fermentaciones Industriales



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

TESIS DOCTORAL

*“Aspectos biotecnológicos de la producción de
vacuna contra queratoconjuntivitis infecciosa
bovina: estudios de biodiversidad en aislamientos
locales de Moraxella bovis; expresión y estabilidad
del fenotipo piliado”.*

Claudia Inés Prieto

2004



TESIS
20062

DEDICACION.....

A.....

Fecha 07-04-05

Inv. #..... Inv..... B. S. 7388



El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales Dr. Rodolfo Ertola (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata; bajo la dirección del Dr. Osvaldo Yantorno.

*Con todo mi amor
a Mariana, Camila y Gus*



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

*TESTIS
No 1062*

BONACION.....
A.....
Fecha *07-04-05*.....
Inv. E..... Inv..... B. *57388*

Mi reconocimiento a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y a la Universidad Nacional de La Plata – FOMEC por haber hecho posible la realización del presente trabajo.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de Tesis han sido publicados bajo el título:

- "Análisis of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in *Moraxella bovis* isolated in Argentina". Claudia I. Prieto, O. Mario Aguilar y Osvaldo M. Yantorno. *Veterinary Microbiology* 70 (1999): 213-223.
- "Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for cell-bound *Moraxella bovis* pili". Claudia I. Prieto, María E. Rodríguez, Alejandra Bosch, Fernando G. Chirido y Osvaldo M. Yantorno. *Veterinary Microbiology* 91 (2003): 157-168.

Mi agradecimiento:

- al Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales Dr. Rodolfo Ertola (CINDEFI) donde se me permitió realizar este trabajo de Tesis Doctoral.
- al Dr. Osvaldo Yantorno, porque me dio la oportunidad de entrar al CINDEFI, porque confió en mí, por su estímulo permanente y su optimismo, porque me abrió las puertas para iniciarme en la investigación y me brindó su apoyo dirigiendo este trabajo de tesis.
- a María Eugenia, por compartir su valiosa experiencia y conocimientos
- a Alejandra, por su colaboración y su generoso aporte de ideas y sugerencias
- a mis compañeros de laboratorio, por su apoyo, compañerismo y solidaridad en todo momento.
- a Andrea Bernier y Julio Fígari, por su excelente asistencia técnica, su eficiencia en el trabajo y sobre todo por su calidad humana.
- a Diego, por su buena onda en el laboratorio, por estar siempre dispuesto a dar una mano y sobre todo por "la memoria".
- a José, por los "tanques" compartidos.
- a Ana, por su compañerismo y los "buenos tiempos".
- a Flavia, por su apoyo, consejo, amistad y buena onda.
- a Tato, por su buena predisposición y colaboración en todo momento.
- a todos mis compañeros del CINDEFI, con los que compartí horas y horas, y de una u otra manera me ayudaron durante todo este tiempo.
- a Fernando Chirido, por su tiempo y su experiencia.
- al Dr. Gustavo Zielinsky, por haberse preocupado por mi trabajo en la fase inicial.
- a Mario Aguilar, por su conocimiento.
- a mi madre, por preocuparse y estar pendiente de mí siempre y fundamentalmente porque todo lo que soy se lo debo a ella.
- a Pelusa y Luis, por todas las horas que invirtieron en cuidar con mucho amor a Mari y Cami mientras yo terminaba la Tesis.
- A Gus, por todo...
- y especialmente a toda mi familia, por el cariño y apoyo que me brindaron en todo momento, que hicieron posible que pudiera alcanzar este objetivo.

INDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

Antecedentes de la enfermedad.....	2
Patología	3
Distribución, incidencia y transmisión.....	8
Etiología	11
<i>Moraxella bovis</i>	13
Tratamiento.....	19
Profilaxis	22
Pronóstico	24
Factores de virulencia de <i>Moraxella bovis</i>	25
Variación antigénica de fimbria tipo IV	33
Funciones alternativas de fimbria tipo IV	34
Adhesión.....	35
Twitching motility	35
Corrosión de agar	36
Vacunas	37
Vacunas vivas atenuadas	37
Vacunas inactivadas	38
Bacterinas	38
Vacuna ribosomal	39
Vacunas basadas en pilis	39
Vacunas obtenidas por tecnología de ADN recombinante.....	40
Vacunas con hemolisinas	41
Preparados comerciales inespecíficos.....	42
Vacunas disponibles comercialmente.....	43
Impacto de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina en el ganado de nuestro país	45
Objetivos específicos	48
Bibliografía	49

CAPÍTULO 2. VARIACIÓN INTRAESPECÍFICA EN AISLAMIENTOS DE *Moraxella bovis*

Biodiversidad microbiana. Consideraciones biológicas y evolutivas	61
Materiales y métodos	69
Aislamientos bacterianos y condiciones de crecimiento.....	69
Fingerprint de ADN.....	72
Obtención de las muestras.....	73
Preparación de las reacciones de PCR	74
Análisis de los productos de amplificación en geles de agarosa	74
Interpretación de los resultados	75
Preparación de proteínas de membrana externa (PME)	77
Obtención de LPS	78

Análisis electroforético de PME y LPS.....	80
Resultados.....	80
Análisis de perfiles de PME.....	80
Análisis de perfiles de LPS.....	84
Diversidad genética.....	89
Variaciones asociadas con la persistencia de la bacteria en el hospedador.....	95
Discusión.....	96
Bibliografía.....	101

CAPÍTULO 3. DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *M. bovis* MEDIANTE FT-IR

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR).....	108
Materiales y métodos.....	112
Procedimientos de estandarización.....	112
Cultivo de microorganismos.....	113
Preparación y toma de muestra.....	113
Adquisición de los espectros.....	114
Exigencias de calidad sobre los espectros.....	116
Análisis de los espectros.....	118
Resultados y discusión.....	122
Bibliografía.....	135

CAPÍTULO 4. DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE ENZIMO-INMUNOENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PILIACIÓN EN *M. bovis*

Introducción.....	138
Materiales y métodos.....	139
Microorganismos y condiciones de cultivo.....	139
Purificación de pili.....	140
Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	141
Producción de suero anti-pili.....	141
Inmunobloting.....	142
Procedimiento analítico: ELISA para la cuantificación de pili unido a célula (bact-ELISA).....	142
Procedimiento analítico para la cuantificación de pili soluble (sol-ELISA).....	144
Estadística.....	145
Resultados.....	145
Discusión.....	159
Bibliografía.....	163

CAPÍTULO 5. ROL DEL PILI EN LA ADHESIÓN DE *M. bovis* A CÉLULAS EUCARIOTAS

Introducción	167
Materiales y métodos	168
Sueros	168
Línea celular y condiciones de cultivo.....	168
Ensayo de adhesión.....	169
Determinación de anticuerpos anti-pili por ELISA indirecto.....	170
Análisis estadístico.....	171
Resultados.....	172
Discusión.....	177
Bibliografía	180
CONCLUSIONES	182

Capítulo 1

Introducción



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA

Antecedentes de la enfermedad

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina es una enfermedad infectocontagiosa del ganado bovino, de amplia distribución mundial y conocida desde hace más de 100 años. Ya en el año 1889 Billings informó de la presencia de un diplobacilo gram-negativo en aislamientos de material de conjuntiva de ojos de ganado del estado de Nebraska, Estados Unidos, con síntomas de queratoconjuntivitis. En 1919 Allen informó también sobre el hallazgo de un diplobacilo gram-negativo al que asoció como agente etiológico de la queratitis infecciosa. Este autor describió el microorganismo aislado, hizo inoculaciones en el ojo de un bovino sano y logró reproducir la enfermedad en forma grave. Luego, Little y Jones en 1923, investigando sobre las afecciones oculares del ganado bovino, encuentran diplobacilos gram-negativos a los que asignan el rol de agentes responsables de oftalmias "infecciosas" cuyas características y síntomas eran similares a las descritas por Allen. Little y Jones también reproducen la enfermedad instilando en ojos sanos secreciones procedentes de ojos de animales enfermos y atribuyen a las moscas el papel de agentes diseminadores de la enfermedad. En 1937 Hauduroy y colaboradores clasifican el agente etiológico aislado por Little y Jones, como perteneciente al género *Haemophilus bovis*. Años más tarde, en 1951, Hall-Patch y colaboradores publican los resultados de su investigación respecto del tratamiento de la queratitis con Cloromicetina donde muestran óptimos resultados. Ya en 1952 cambia la nomenclatura de *Haemophilus bovis* por *Moraxella bovis*, y Barnes publica un trabajo sobre este microorganismo y su relación con la queratoconjuntivitis bovina, con el que se clarificó en gran parte el problema etiológico de la afección. En 1954, Formston afirma que la queratoconjuntivitis infecciosa del vacuno es un problema que no distingue la edad del animal. En 1956, Silva publica el resultado de sus investigaciones sobre la búsqueda de *M. bovis* como agente de la queratoconjuntivitis infecciosa de los bovinos; concluye que "se aisló y clasificó", de acuerdo con la nomenclatura del Manual Bergey, un diplobacilo semejante a *M. bovis* como el agente causal comprobado de la queratoconjuntivitis infecciosa de los bovinos,

sosteniendo además que es la primera vez que se comprueba en Colombia este hallazgo. En 1957, Scott, investiga la respuesta al tratamiento de la queratitis infecciosa con la aplicación local de corticoides y concluye que su empleo da excelentes resultados. Desde ese año, la queratoconjuntivitis ha sido estudiada por numerosos autores que han tratado de entender el comportamiento del organismo en el hospedador con el fin de definir una profilaxis efectiva para controlar y eventualmente erradicar una enfermedad de gran impacto económico para el sector ganadero.

Patología

La queratoconjuntivitis es un proceso inflamatorio que compromete principalmente dos de las distintas partes anatómicas del órgano de la visión: 1) la **córnea**, que es un disco incluido dentro de la esclerótica que forma la parte anterior de la capa externa del globo ocular y cuyo proceso inflamatorio se denomina queratitis, (“quera”=córnea, “itis”=inflamación), y 2) la **conjuntiva**, que es una membrana que tapiza la cara interna de los párpados y que a la vez cubre toda la porción anterior del globo ocular, y a cuya reacción inflamatoria se la identifica como conjuntivitis (Fig. 1).

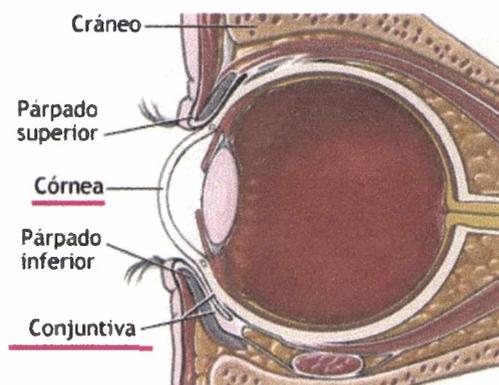


Fig. 1. Corte transversal del ojo donde se observa la localización de la córnea y la conjuntiva

Se puede definir la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB), también conocida como “Ojo rosado” u “Oftalmia infecciosa”, como una enfermedad infecto-contagiosa que ataca principalmente a bovinos y ovinos de distintas razas y edades, causada por la bacteria *Moraxella bovis* (Aikman et al., 1985;

Punch and Slatter, 1984) (Fig. 2a y 2b). Esta enfermedad, de amplia distribución mundial, si bien presenta una tasa de mortandad considerada reducida, ocasiona al sector ganadero un fuerte impacto económico, como consecuencia de pérdidas de peso y problemas de visión en los animales afectados. Por lo general aparece de manera súbita y progresa rápidamente, caracterizada clínicamente por queratitis, conjuntivitis, fotofobia, con presencia de abundante lagrimeo y secreción purulenta, blefarospasmo (contracción espasmódica del músculo orbicular de los párpados), a veces panoftalmia (inflamación piógena de todas las estructuras del globo ocular), pérdida progresiva de la visión y otras alteraciones oculares. El cuadro se acompaña con pérdida progresiva de peso en el animal enfermo.



Fig. 2a. Bovino afectado de queratoconjuntivitis



Fig. 2b. Bovino mostrando signos de ceguera como consecuencia de un cuadro avanzado de queratoconjuntivitis (estadio terminal)

Por su evolución, desde el punto de vista clínico, las queratoconjuntivitis se clasifican en agudas y crónicas.

La queratoconjuntivitis aguda es la forma de presentación más frecuente en el ganado bovino. El período de incubación es usualmente de dos a tres días, y en ensayos experimentales se ha extendido a tres semanas. Se caracteriza porque se presenta súbitamente con manifestaciones tales como arborización de los capilares del ojo y congestión de las mucosas oculares. El animal enfermo presenta un proceso febril que puede pasar inadvertido y simultáneamente se observa blefaritis (inflamación de los párpados), secreción lagrimal abundante, continuo parpadeo con conjuntivitis marcada y fotofobia (Fig. 3 a). Este cuadro luego se agrava. Hay exoftalmia por el aumento de la presión intraocular, mayor sensibilidad de los ojos afectados tanto a la palpación como a la luz fuerte, natural o artificial y se registra un ligero enturbamiento en la parte central de la córnea (Torres Moreno, 1971). La conjuntiva, muy congestionada, hace contraste con el blanco arborizado de la esclerótica, de lo cual se deriva el nombre de "ojo rosado" (Baptista, 1979; Chandler et al., 1979). Progresando el período agudo, entre los 4 y 6 días, hay opacidad total (Fig. 3 b), degeneración de la córnea y la abundante secreción lagrimal se transforma en densa y purulenta que es expulsada por la gotera lagrimal, adhiriéndose a toda la región inferior de la cabeza y aglutinando los pelos, lo cual favorece la presencia de moscas y la instalación de miasis, que es una de las complicaciones más graves. En muchos casos, entre los dos y cuatro días de iniciado el proceso, la opacidad que presenta la córnea puede encontrarse ya extendida a toda la superficie, con blefaroespasmo y exoftalmia por el aumento de la presión intraocular. Luego aparece un queratocono (protuberancia central sin pérdida de la transparencia de la córnea, que se produce por adelgazamiento de la córnea y la presión intraocular que la prolapsa hacia fuera), que más tarde se rompe y forma úlceras. Si éstas alcanzan a interesar las capas profundas de la córnea, membrana de Descemet, la enfermedad se convierte en crónica. El color de la córnea en la queratitis tiende del blanco lechoso al amarillo fuerte, para terminar en celeste (Fig. 3 c). En este estado la visión se ha perdido totalmente (Baptista, 1979; Punch and Slatter, 1984; Wilcox, 1968).

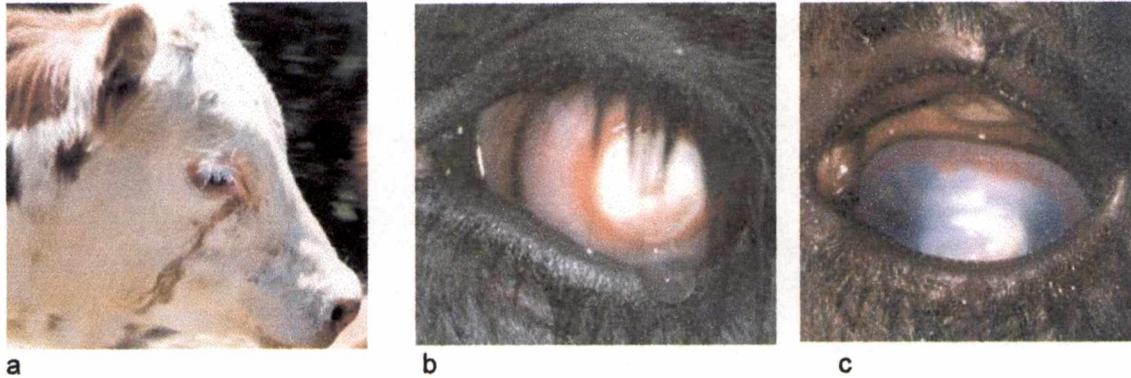


Fig. 3. a) Primer estadio de QIB. Se observa abundante secreción lagrimal; b) segundo estadio de QIB, se observa opacidad corneal con formación de una úlcera; c) tercer estadio de QIB, el centro del ojo se torna azul y luego comienza a clarificar.

La enfermedad comienza afectando un solo ojo y muy pronto se instala en los dos llegando los animales a quedar completamente ciegos (Fig. 1b). Esto ocasiona traumatismos (heridas, fracturas, desgarros, etc.), al tropezar el animal con distintos elementos, tales como árboles, cercas, etc.

La queratoconjuntivitis crónica resulta como consecuencia de la manifestación aguda de la enfermedad no tratada o deficientemente medicada y se caracteriza por: a) presencia de úlceras en la córnea con pérdida de sustancia (humor acuoso y/o vítreo), b) presencia de queratocono, c) mayor inflamación de la córnea, d) presencia de pus en la cámara anterior del ojo (hipopión) con o sin pérdida del cristalino, casos en los cuales el animal enfermo presenta pérdida definitiva de la visión. De no ser así, el ojo enfermo puede comenzar lentamente a recuperarse, disminuyendo la fotofobia, la exoftalmia y la sensibilidad; pero si se destruye completamente el globo ocular y sus anexos (panoftalmia), la lesión es irreversible. En algunos casos, sin tratamientos, la infección se extiende por vía ascendente y puede ocasionar la muerte del animal por septicemia (Odeon y colaboradores, 1996), que representa la forma rara y fulminante de la enfermedad. Con mayor frecuencia ocurre completa recuperación en tres a cinco semanas, con solo unos pocos animales afectados (en un rodeo infectado) los cuales pueden presentar una cicatriz blanca-azulada persistente en la córnea (Fig. 4). En el 2% de los casos, aproximadamente, el ojo afectado permanece azul y el animal queda ciego de ese ojo.

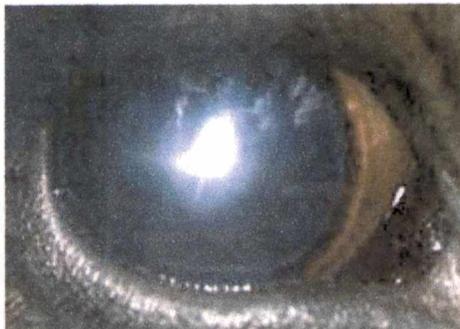


Fig. 4. En algunos casos la cicatrización del ojo deja un punto blanco-azulado persistente en el centro de la córnea.

Complicaciones: una vez instalada la enfermedad, los efectos colaterales que pueden presentarse muchas veces suelen resultar de mayor gravedad que la afección en sí. Las principales complicaciones son derivadas de la pérdida de la visión:

- a) Los bovinos enfermos tienen dificultad o imposibilidad para buscar el alimento, el agua de bebida y la sombra, lo cual se traduce en una disminución del peso del animal.
- b) La imposibilidad para evitar los obstáculos o el peligro trae como resultado fracturas de distinto tipo y en distintas partes del cuerpo (cráneo, aparato locomotor, etc.). Se producen heridas traumáticas al chocar con postes, árboles, piedras, palenques, etc. También se observan heridas desgarradas las cuales pueden complicarse con procesos de miasis.
- c) Las lesiones patológicas que sufre el globo ocular, generan localmente un campo propicio para que a través de moscas se produzcan miasis que rápidamente destruyen el ojo.

En cuanto a las pérdidas que produce la queratoconjuntivitis puede decirse que, en los animales de selección, la pérdida de uno o de los dos ojos, disminuye el valor del animal como reproductor. En los animales de cría la dificultad para alimentarse suficientemente los lleva a una hiponutrición progresiva, cuya consecuencia es que su ciclo estral no se presente o sea poco manifiesto y no fértil, produciéndose por ende una pérdida económica. En los

animales de engorde el proceso infeccioso acarrea una disminución de peso. En los animales destinados a lechería su producción disminuye hasta un 25% o más diariamente. Además hay que tener en cuenta los animales que no se pueden aprovechar en ninguna forma porque se ahogan al introducirse en ciénagas o mueren al rodar o caer en cañadas, alcantarillas, etc (Lorenzo y Suarez, 1994; Pugh et al., 1986). Además se debe considerar el impacto económico negativo debido a los costos de tratamientos y el tiempo (costo de la mano de obra) utilizado para realizarlos.

Distribución, incidencia y transmisión

La QIB es una enfermedad de distribución mundial, aunque la mayor incidencia parece encontrarse en el norte, centro y sur de América, Europa, India, Sudáfrica y Australia. La queratoconjuntivitis se presenta con mayor incidencia cuando las temperaturas son más altas, final de primavera, verano y comienzos del otoño en los países cuatriestacionales (Lepper and Barton, 1987). El pico de prevalencia es precedido por los máximos valores de radiación ultravioleta (UV) (Hughes and Pugh, 1970; Smith and Blakenship, 1990). En los países en los que no se diferencian las cuatro estaciones, la enfermedad se da con mayor frecuencia en las zonas tropicales que en las frías, lo que guarda una directa relación con las características ecológicas, con la existencia de mayor cantidad de polvo y la presencia de tábanos, moscas y mosquitos. Estos insectos son los principales transmisores o propagadores de la enfermedad ya que al posarse sobre los ojos de los animales enfermos, se ponen en contacto con el agente etiológico al que luego transmiten a los animales sanos (Pugh and McDonald, 1986). La incidencia de esta enfermedad es variable de año a año. Su importancia radica en la presentación en forma epizootica (lo cual significa que es **epidémica**: enfermedad transitoria que ataca al mismo tiempo y en el mismo país o región a gran número de animales; y **enzoótica** o endémica: que aparece en épocas fijas del año o por influencia de una causa local), con elevadas tasas de contagio, producción de pérdidas económicas en los rodeos afectados (Kopecky et al, 1986), presencia de alto número de lesiones de diversa severidad, portadores que reciclan la enfermedad haciéndola persistente en el rodeo (Pugh and McDonald, 1986) o

generan fuentes de infección en rodeos libres (Vandergaast and Rosembuch, 1989). La infección generalmente se transmite de un animal a otro por medio de las secreciones de los ojos que llegan a contaminar pastos, comederos y abrevaderos, piedras o bloques de sal, etc., lugares en los que los animales enfermos dejan sus secreciones y luego los sanos se ponen en contacto con ellas. Otra forma de transmisión es por intermedio de las moscas, tábanos o mosquitos, como se mencionó.

Torres Moreno (1971) en un estudio sobre la patología de esta enfermedad, concluyó que ataca indistintamente a bovinos y ovinos, sin distinción de edad, raza, sexo, color de pelaje y estado nutricional. Sin embargo, Caspari y colaboradores (1980) informan que la luz UV favorece la aparición de enfermedad especialmente en el ganado vacuno que no tiene pigmentación alrededor del ojo. La raza Angus, que es pigmentada, tiene menor prevalencia de la enfermedad con respecto a otras razas que son menos pigmentadas como Hereford, Holando, Shorthorn y Charolais (Figs. 5a, 5b, 5c y 5d). Esta falta de pigmentación permite que el aumento de radiación UV sensibilice al ojo, resultando este más propicio a la inflamación y subsecuente infección. Varios autores demuestran que niveles elevados de pigmentación en los párpados reducen la incidencia y severidad de QIB (Frisch, 1975; Ward and Nielson, 1979; Slatter, D. and Edwards, M., 1982).



Fig. 5a. Raza Angus (raza con menor prevalencia de la enfermedad)



Fig. 5b. Raza Hereford (raza frecuentemente afectada)



Fig. 5c. Raza Charolais

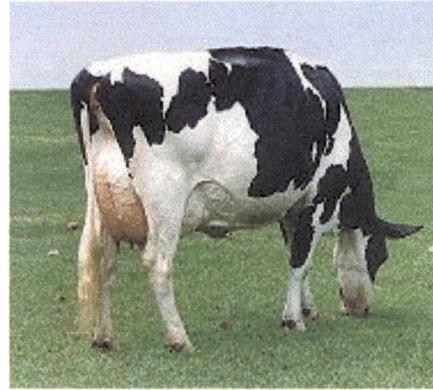


Fig. 5d. Raza Holando Argentina

Las moscas no sólo actúan como irritantes al alimentarse de las secreciones de los ojos, sino que también sirven como medio de transmisión de la bacteria de animales infectados a no infectados. Las moscas de la cara pueden mantenerse infectadas con *M. bovis* hasta tres días después de haberse alimentado de material infectado (Gerhardt and Allen, 1982). Bajo condiciones experimentales la transmisión de la enfermedad es común con la presencia de las moscas y no lo es en su ausencia (Kopecky et al, 1986) (Fig. 6).

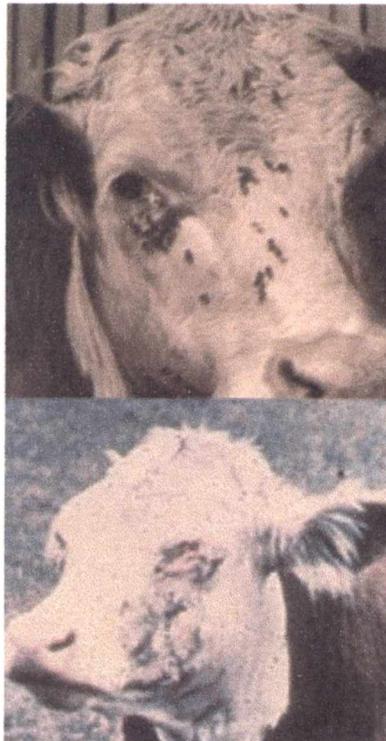


Fig. 6. Presencia de moscas de la cara en bovinos

La gravedad de los brotes varía en función de factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad, tales como:

- Mal estado orgánico general o de hiponutrición.
- Deficiencias vitamínicas (especialmente de la vitamina A).
- Marcada incidencia sobre los ojos de luz intensa, solar o artificial.
- Conjuntivitis traumáticas o banales.
- Existencia de elevado número de moscas.

La transmisión de *M. bovis* se produce, como se mencionó, a través del contacto directo o mediante moscas u objetos inanimados. Al estar el organismo localizado en ojos y cavidades nasales del ganado infectado (Pugh et al., 1980), las secreciones infectadas de estas áreas constituyen una fuente de infección para otros animales. El ganado infectado y asintomático puede actuar como portador de *M. bovis* en sus cavidades nasales por un período que puede exceder el año. Estos animales "carriers" son los que dan lugar a la persistencia de la QIB, en un sitio particular de un año a otro (Pugh and Hughes, 1972; Harris et al., 1980).

La radiación UV, moscas, plantas en crecimiento y producción de polen tienen su nivel máximo en el verano y otoño y explican la alta incidencia de QIB durante este período. Se ha constatado que los animales más jóvenes (menores de 2 años) son más susceptibles a la enfermedad que los mayores ya que estos pueden haber desarrollado una inmunidad adquirida (anticuerpos protectores en la superficie del ojo) como resultado de exposiciones previas (Hughes and Pugh, 1970; Webber and Selby, 1981). Si bien no se ha determinado definitivamente predilección de la enfermedad por el sexo, se ha reportado mayor prevalencia en machos (Powe and Nusbaum, 1992).

Etiología

M. bovis es el principal agente etiológico de la QIB. Otros organismos relacionados con la enfermedad incluyen Chlamydia, Micoplasma, o virus tales como el virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR), los cuales pueden

aumentar la severidad de la enfermedad o pueden actuar como factores predisponentes de la misma permitiendo con su presencia una infección secundaria con *M. bovis* (Tabla 1). Otros factores implicados en la irritación de los ojos, con lo cual facilitan la invasión de *M. bovis* y la subsecuente enfermedad, son la excesiva luz ultravioleta (UV) (luz solar), distintos tipos de moscas, (mosca de la cara (*Musca autumnalis*) (Kopecky and Pugh, 1986), mosca de la casa (*Musca domestica*), mosca de establo (*Stomoxys calcitrans*)), materiales de plantas y polvo (Brown et al., 1998).

Tabla 1. Síndrome de queratoconjuntivitis infecciosa bovina. Agentes etiológicos encontrados en aislamientos realizados en animales con diagnóstico de QIB. Diagnóstico por rodeo, en distintos lugares de Argentina, desde el año 1994 hasta el año 2003 (Laboratorio Azul)

Agente diagnosticado	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	Total	%
<i>Moraxella</i> sp	10	12	12	16	6	9	9	1	5	5	80	30,42
IBR aislamiento	2	0	0	0	2	1	2	0	2	0	9	3,42
<i>Chlamydia</i> sp	0	0	0	0	4	0	1	0	2	3	10	3,80
<i>Morax/Chlamyd</i>	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0	5	1,90
<i>Moraxella/IBR</i>	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	4	1,52
<i>Chlamydia/IBR</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,38
Sin agente	2	7	7	9	22	14	18	25	19	34	154	58,56
Total	14	21	21	26	36	26	31	26	29	43	263	

Como se puede observar de los datos presentados en la Tabla 1, de todos los organismos aislados de animales enfermos en rodeos de distintas regiones de Argentina, *M. bovis* es el hallado en mayor proporción. Del total de casos estudiados, en el 30,42% de los mismos se aisló solamente *M. bovis*. En la mayoría de los casos no fue posible aislar ningún agente (58,56%), y en baja proporción se aislaron otros agentes distintos a *M. bovis*, como el virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina (IBR) y *Chlamydia* sp (3,42% y 3,80% respectivamente). La proporción en el caso de aislamientos combinados de dos agentes (1,90%, 1,52% y 0,38%) resultó baja. Estos datos locales están en concordancia con lo anteriormente expresado, que *M. bovis* es el principal agente etiológico.

Las bacterias que se encuentran adheridas a la conjuntiva del ojo pueden encontrar condiciones favorables para su desarrollo cuando se altera uno o más de los cuatro factores que se oponen al crecimiento microbiano y que son:

- 1) *La corriente del líquido lagrimal.* Esto produce una verdadera limpieza fisiológica arrastrando todo cuerpo extraño que llega a la conjuntiva llevándolo hacia las fosas nasales o hacia el ángulo interno del ojo para su eliminación definitiva, por lo que la constante circulación lagrimal se opone a la adhesión microbiana, condición imprescindible para asegurar la presencia bacteriana a nivel local para su posterior desarrollo.
- 2) *La baja temperatura de la superficie conjuntival.* Esto es consecuencia de la lenta evaporación de las lágrimas y conduce a que el desarrollo microbiano no prospere.
- 3) *La presencia de la lisozima de Fleming.* Esta enzima constituye un magnífico bactericida que no permite el desarrollo de gérmenes en las lágrimas.
- 4) *La ausencia de elementos nutritivos en las lágrimas.* Esta condición normalmente no favorece el desarrollo microbiano. El análisis químico de las lágrimas indica que están constituidas por cloruro de sodio, carbonato de sodio, sulfato de magnesio, etc., que hace que las mismas tengan poder bactericida, circunstancia favorecida por la presencia de la lisozima (Torres Moreno, 1971).

Moraxella bovis

M. bovis, es un organismo Gram negativo, no móvil, que se presenta en general en forma de cocobacilos, predominantemente en pares o cadenas cortas (Manual Bergey's, 9th edition, 1986). No forma esporas ni presenta flagelos. Puede tener o no pilis. Es un organismo aerobio estricto. La temperatura óptima para su crecimiento se ubica entre 35 y 37°C y el pH óptimo entre 7,0 y 7,5. No fermenta hidratos de carbono, es catalasa (+), oxidasa (+), nitrato (-), indol (-), gelatinasa (+) (Tabla 2).

Tabla 2. Características diferenciales de las especies del género *Moraxella*^a (Manual Bergey)

Características	Subgénero <i>Moraxella</i>					Subgénero <i>Branhamella</i>				
	1. <i>M. (M.) lacunata</i>	2. <i>M. (M.) bovis</i>	3. <i>M. (M.) nonliquefaciens</i>	4. <i>M. (M.) atlantae</i>	5. <i>M. (M.) phenylpyruvica</i>	6. <i>M. (M.) osloensis</i>	7. <i>M. (B.) calanthalis</i>	8. <i>M. (B.) caviae</i>	9. <i>M. (B.) ovis</i>	10. <i>M. (B.) curvicuti</i>
Morfología cel:										
Bacilos	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Cocos	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Test Oxidasa	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
Test Catalasa	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+
Presencia de anhidrasa carbónica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido de glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	-	[+]	-	-	-	-	-	D	[+]	-
Licuefacción de gelatina	-	[+]	-	-	-	-	-	-	-	-
Licuefacción de suero	+	[+]	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en sales minerales+NH ₄ ⁺	-	-	-	-	[-]	[+]	-	-	-	-
Crecimiento 5°C	-	[-]	-	-	[+]	-	-	-	-	-
Crecimiento en NaCl 6%	-	-	-	-	[+]	-	-	-	-	-
Crecim. estimul. por sales biliares	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Fenilalanina deaminasa	-	-	-	-	[+]	-	-	-	-	-
Produc. indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	d	[-] ^b	-	-	-	-
Reduc. nitrato	+	[-]	+	-	[+]	d	[+]	+	[+]	-
Reduc. nitrito	-	-	-	-	-	-	[+]	[+]	-	-
Utilizac. en medio complejo de:										
Butirato	+	+	-	-	-	[+]	d	+	+	-
Caproato	+	+	-	-	-	[+]	-	-	+	-
Etanol	d	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Propionato	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Lactato	+	+	+	-	+	+	[+]	+	+	+
Acetato	+	+	[-]	-	+	+	d	d	d	-
Aislado de:										
Humanos	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
Ganado bovino	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Carneros	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Cabras	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Caballos	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Cerdos	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Conejos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Cobayos	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-

^aSímbolos: +, todas las cepas testeadas positivas; [+], la mayoría de las cepas positivas; d, diferentes resultados entre cepas; [-], la mayoría de las cepas negativas; -, todas las cepas testeadas negativas; D, débilmente positivo.

^bAlgunas cepas son débilmente ureasa positivas.

Este organismo crece en agar tripticase soja (ATS) suplementado con 7 % de sangre de caballo desfibrinada (ATSs), a 37°C, produciendo hemólisis. Morfológicamente se pueden observar tres tipos de colonias en agar sangre: piliadas, no piliadas e intermedias (Bovre and Froholm, 1972). Las colonias piliadas (Fig. 7) son rugosas, pequeñas (1-2 mm de diámetro), secas, tienen un borde bien demarcado, presentan doble halo el cual es observado con lupa binocular, tienden a fragmentarse cuando son picadas con un ansa y corroen el agar. Las zonas de corrosión, que se ven como depresiones o surcos que quedan en la superficie del agar cuando las colonias piliadas son removidas con el ansa, son del mismo diámetro que la colonia correspondiente (Ruehl et al, 1988). Las colonias no piliadas son lisas, más grandes que las piliadas (2-4 mm de diámetro), mucosas, sin doble halo y no corroen el agar. Cuando se ven en placas de agar sangre estas colonias tienen una textura característica granular (Pedersen, 1970; Sandhu et al, 1974; Simpson et al, 1976; Wilcox, 1970) (Fig. 8).

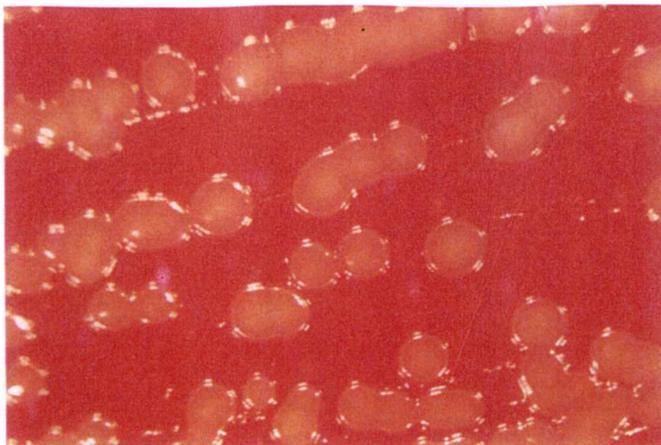
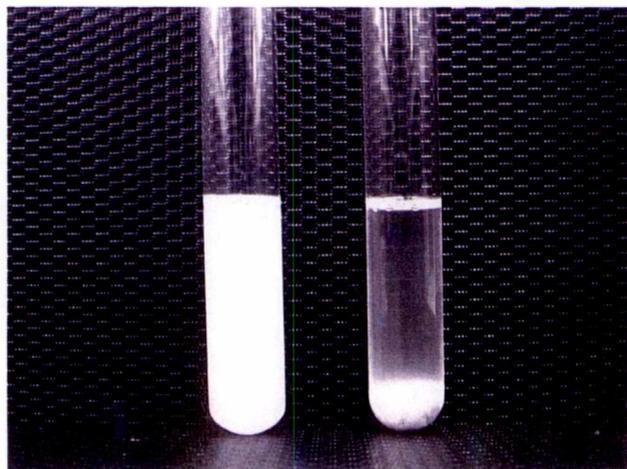


Fig. 7. Colonias de *M. bovis* piliadas en agar sangre tripticase soja (TSAS)



Fig. 8. Colonias de *M. bovis* no piliadas en agar sangre tripticase soja (TSAS)

Las colonias piliadas al ser resuspendidas en medio líquido y PBS muestran autoaglutinación celular mientras que las no piliadas no (Fig. 9)

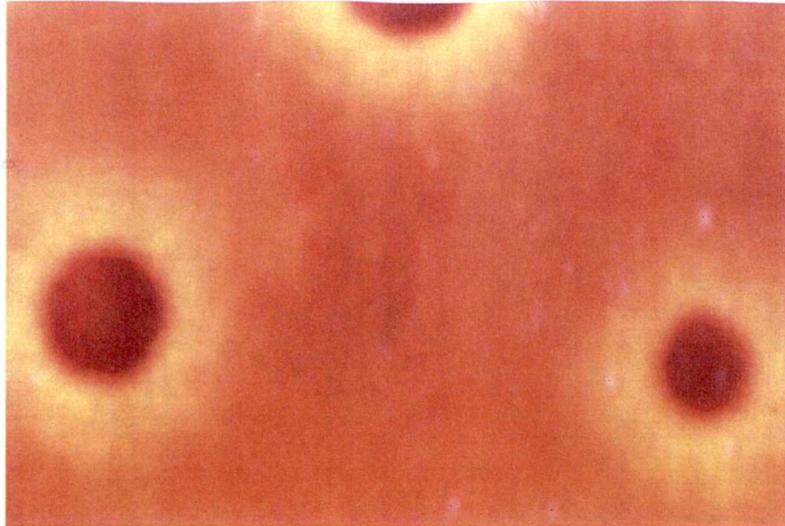


1 2

Fig. 9. Células de *M. bovis* resuspendidas en PBS: 1, células no piliadas (P⁻); 2, células piliadas (P⁺).

La autoaglutinación se puede prevenir suspendiendo las colonias en Cloruro de Magnesio al 10% (Pugh and Hughes, 1970), procedimiento que produce remoción de los pilis de las células (Annuar and Wilcox, 1985). La aplicación del colorante cristal violeta (cv) sobre colonias crecidas en medio sólido, permite observar que las colonias piliadas se tiñen (Fig. 10A) en tanto que las no piliadas no lo hacen, permaneciendo de color blanco (Fig. 10B). Las colonias intermedias toman el color violeta en el borde, en tanto que el centro de las mismas permanece de color blanco. Esto demuestra lo observado por Bovre y Froholm (1972), que reportan que estas colonias son mixtas, formadas por bacterias piliadas que se disponen en los bordes y bacterias no piliadas que se agrupan hacia el centro de la colonia (Fig. 10C). Las colonias, luego del tratamiento con cristal violeta se mantienen viables por 4 minutos, pudiendo en ese lapso de tiempo ser subcultivadas. Cuando se subcultiva una colonia teñida con cv en placas de agar sangre, las colonias resultantes mantienen todas el fenotipo piliado. Por lo tanto la tinción con cv permite la rápida selección fenotípica de las colonias para subcultivar con una característica definida (Schurig et al, 1984). Esto es esencial en la etapa de inicio del proceso de producción de vacunas.

A



B



C

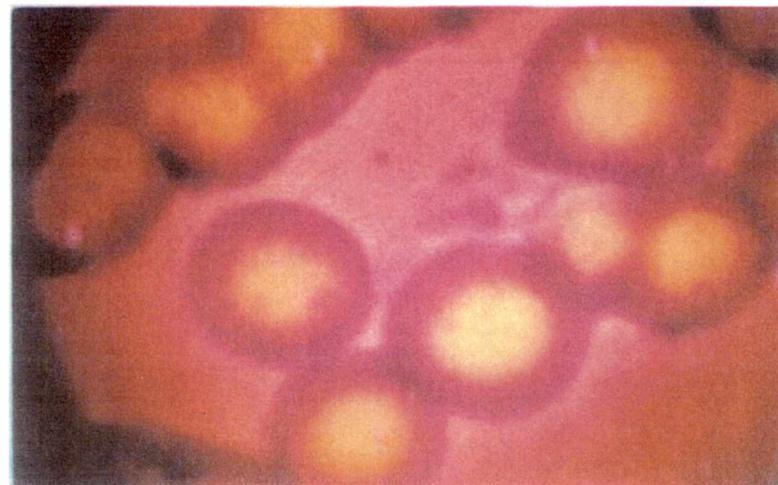


Fig. 10. Colonias de *M. bovis* en agar sangre, coloreadas con cristal violeta:
A, piliadas; B, no piliadas; C, intermedias

Tratamiento

Entre los métodos de tratamiento específicos para el ganado con infección ocular por *M. bovis* se describen en bibliografía la administración de antimicrobianos por vía subconjuntival, tópica y parenteral (Allen et al, 1995; George, 1990; George and Smith, 1985; Roeder et al, 1995). Aunque la terapia antimicrobiana es el tratamiento de elección, ningún protocolo ha podido asegurar el 100% de éxito. El tratamiento antimicrobiano puede no eliminar el estado de portador o mejorar la enfermedad clínica, debido a que el mantenimiento de una apropiada concentración de droga terapéutica en el film lagrimal es muy difícil de lograr ya sea por causas económicas y/o prácticas. Este aspecto representa la mayor dificultad durante el tratamiento local. Los bovinos con QIB producen mucho más lágrimas que lo normal, lo que provoca la rápida eliminación de los antibióticos administrados por vía local. Este problema se puede revertir mediante la administración frecuente de las drogas (por ejemplo seis a ocho veces por día) (Gundin, 1992), lo cual es difícil de lograr.

La forma preferida de medicación tópica en los bovinos es el ungüento oftálmico, generalmente una penicilina de acción prolongada, el cual es eficaz y no irritante. El ungüento debe ser aplicado en el saco conjuntival, alejando el párpado inferior de la córnea. Si el animal es cooperativo se lo puede aplicar también debajo del párpado superior. Sin embargo los envases comerciales son demasiado pequeños en relación al tamaño del ojo bovino y a la cantidad de animales que requieren tratamiento. Luego de aplicar un ungüento oftálmico es conveniente el uso de parches oculares (Fig. 11). Estos confieren protección contra otros irritantes como polvo, moscas y luz solar. Esta protección probablemente tiene valor en un animal en los estadios tempranos de la enfermedad, cuando todavía hay posibilidades de salvar la visión en el ojo. No obstante, negar el acceso a las moscas al ojo afectado ayuda a reducir la diseminación de la enfermedad dentro del rodeo.



Fig. 11. Una máscara para polvillo empleada como parche ocular en un ternero.

Los aerosoles constituyen una alternativa posible de medicación. Los mismos contienen diferentes drogas en solución, suspensión o polvo. La principal ventaja de los aerosoles reside en que el aplicador no toca el ojo. La desventaja es que la medicación llega a alta presión a tejidos que ya se encuentran dañados. El efecto beneficioso de la droga puede quedar neutralizado por el daño que produce el chorro del aerosol. Otra forma de medicar los ojos es mediante inyección subconjuntival o intrapalpebral de antibióticos. La inyección de un antibiótico debajo de la conjuntiva proporciona un depósito a partir del cual la droga difunde a los tejidos y secreciones oculares durante un período más prolongado que el que se logra mediante la medicación tópica. Se recomienda que las drogas se inyecten bajo la conjuntiva ocular y no bajo la palpebral debido a que la primera se halla más cerca de los tejidos a tratar. Sin embargo, muchos profesionales utilizan la conjuntiva palpebral debido a que es más accesible y fácilmente identificable.

Los ojos también pueden medicarse mediante administración parenteral de antibióticos. *M. bovis* es susceptible a gentamicina, cefalosporinas de 1ª generación, trimetoprima-sulfonamidas, nitrofuranos, tetraciclina y sulfonamidas. Trabajos experimentales han demostrado que la oxitetraciclina es la droga más eficaz in vivo en dosis de 20 mg/kg por vía intramuscular con un intervalo de 72 h entre dos aplicaciones. Este tratamiento reduce efectivamente la severidad de la afección y elimina el estado de portador (Piscitelli y Zielinski, 1996). Una ventaja adicional del tratamiento sistémico respecto del local es que no hay necesidad de sujetar la cabeza del animal durante su aplicación. Sin embargo los antibióticos administrados parenteralmente deben darse a niveles terapéuticos considerando todo el

animal, con el objeto de lograr niveles adecuados en el sitio de la infección. Por lo tanto, se requieren cantidades mayores de drogas y el costo del tratamiento resulta mayor que en la terapéutica local. *M. bovis* ha demostrado resistencia aumentada contra cloxacilina, estreptomina, tilosina, lincomicina y eritromicina (Odeon et al, 1996; Punch et al, 1985). *M. bovis* es resistente a cloxacilina con una concentración inhibitoria mínima de 2 µg/ml. La incorporación de 2.5 µg/ml de cloxacilina en agar sangre proporciona un medio de cultivo semiselectivo para el aislamiento primario de *M. bovis* de las secreciones lagrimales y nasales de bovinos con QIB. Aunque *M. bovis* es el agente infeccioso aislado con mayor frecuencia de los casos de QIB, hay un gran número de bacterias potencialmente patógenas y comensales que constituyen la flora normal de los ojos sanos y enfermos. Estas pueden diseminarse rápidamente y tapar a *M. bovis* que es de crecimiento más lento. Como resultado se observa una disminución en la sensibilidad de los procedimientos de aislamiento y se gasta un tiempo considerable en realizar subcultivos a partir de los aislamientos primarios para obtener cultivos puros de *M. bovis*. Con la incorporación de la cloxacilina en el agar sangre se reduce el tiempo requerido para la identificación y aislamiento de *M. bovis* y se incrementa la sensibilidad del aislamiento en un 60% (Webber et al., 1982).

Las poblaciones de *M. bovis* que producen QIB tienen gran capacidad de variar su susceptibilidad a los antibióticos. Se comprobó que esta susceptibilidad era variable no sólo entre distintas cepas aisladas del mismo animal en períodos diferentes, sino también entre cepas aisladas de distintos animales, pertenecientes al mismo rodeo, en la misma fecha (Bretschneider, G. y Pérez, S.E., 1997). Antes de seleccionar el tratamiento antibiótico, se necesita realizar cultivos y test de sensibilidad debido a diferencias en los aislamientos regionales en relación con sus patrones de susceptibilidad (Conceição and Gil Turnes, 2003).

Encuestas realizadas a productores locales han revelado como modalidad más frecuente de tratamiento de animales enfermos al que se realiza a través de la aplicación de distintos antibióticos ya sea en forma de aerosoles o intrapalpebral, luego al uso de vacunas solas o en combinación con otros antibióticos, y en menor medida el empleo de antibióticos por vía

intramuscular; por ultimo se encuentran los ungüentos, la vía de administración subconjuntival y los colirios. (Fig.12).

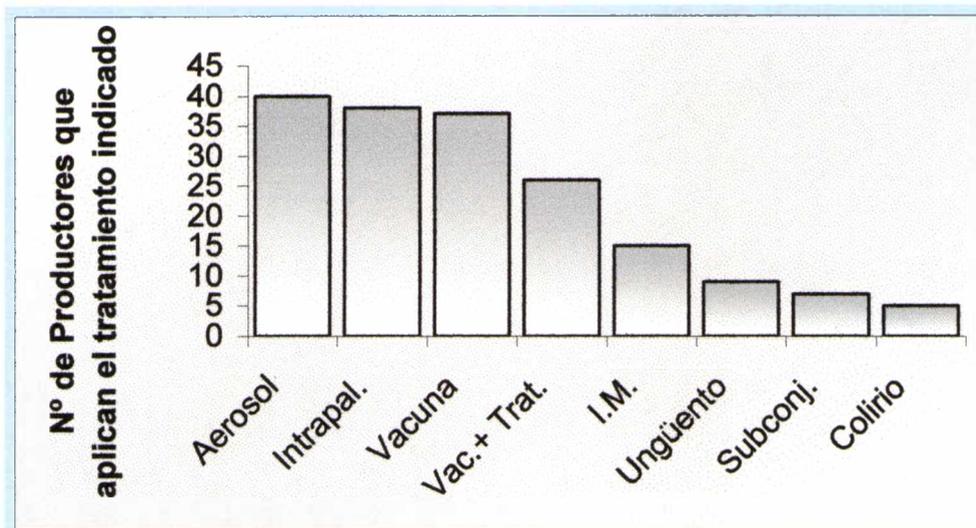


Fig. 12. Tratamientos en uso (Piscitelli y Zielinski, 1996)

Profilaxis

La mejor protección contra la queratoconjuntivitis es la prevención. *M. bovis* es un organismo de amplia distribución en la naturaleza, lo cual hace muy difícil su eliminación. Ante la presunción de la presencia de esta bacteria es de suma importancia la inspección cuidadosa de los ojos del ganado afectado de conjuntivitis, así como el aislamiento de los bovinos afectados. Los portadores deben ser eliminados y ser garantizados los esfuerzos para controlar el vector más importante, la mosca de la cara (*M. autumnalis*). Una vez que se ha diagnosticado la enfermedad del ojo rosado es extremadamente importante el control de las moscas. Un buen control de las mismas es parte importante en cualquier programa de control de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina. Una forma de lograrlo es pulverizar el ganado con spray mata-moscas, lo cual

contribuye a la reducción de casos nuevos de QIB. Algunos productores utilizan etiquetas con insecticidas en las orejas. Es aconsejable rotar el tipo de insecticida año a año. Para que efectivamente se puedan eliminar los portadores en un rodeo, todo el ganado adulto del mismo debería ser tratado adecuadamente durante la estación que no hay vectores y antes de la parición. En el caso de los terneros recién nacidos el tratamiento profiláctico de los ojos, con nitrato de plata al 1.5% resulta muy efectivo, pudiendo además reducir la queratoconjuntivitis si la misma ya está instalada (Perez et al., 1997). La mosca de la cara es el insecto vector más importante y difícil de controlar. Las secreciones oculares del ganado son una dieta ideal para las moscas hembras, las cuales necesitan comer diariamente durante 10 días en la época de puesta de huevos. *M. bovis* puede permanecer viable en las alas y patas de estas moscas por 3 a 4 días y en el tracto digestivo de las mismas por hasta 48 horas (Torres Moreno, 1971). Para que sea efectivo, cualquier método de control de las moscas debe ser iniciado al comienzo de la estación en que se produce la acumulación de las mismas. Además de las moscas se debe controlar el polvo, manteniendo los lugares de trabajo y los corrales húmedos, y los pastos altos deben ser cortados, ya que son irritantes. Otros aspectos a tener en cuenta en prevención y que también son parte de un buen programa de control de la enfermedad, son la provisión de sombra para el ganado, la eliminación de irritantes oculares, y poner en cuarentena por varios días al ganado nuevo antes de introducirlo en el rodeo para evitar que infecten al resto del rodeo en el caso que sean portadores. Cantidades adecuadas de vitamina A no previenen la enfermedad pero ayudan a la resistencia natural.

La protección de la córnea y conjuntiva contra organismos patógenos oportunistas se logra mediante los efectos combinados de la resistencia natural y la adquirida. Las interacciones entre anticuerpos humorales, secretores y reacciones mediadas por células son responsables de la inmunidad o resistencia adquirida. La inmunidad contra la infección por *M. bovis* está mediada inicialmente por IgG con la aparición, 2 semanas más tarde, del anticuerpo IgA secretorio. No ha sido probado que las reacciones mediadas por células estén implicadas en la respuesta inmune bovina a *M. bovis* (Kopecky et al., 1983). Es posible que la ocurrencia de la enfermedad se repita aún cuando algunos animales desarrollen inmunidad protectora. Las vacunas en uso

proveen protección limitada, si lo hacen, contra la enfermedad clínica. La severidad y prevalencia de QIB varía mucho en relación al tipo de vacuna empleada. Las vacunas en uso están focalizadas en el pili bacteriano. Las distintas cepas de *Moraxella bovis* están identificadas por diferencias en sus serotipos de pilis, como se explicará más adelante. Si se usa una vacuna que protege contra un solo serotipo, la misma no será efectiva contra otros serotipos ya que sus pilis son serológicamente distintos. La vacunación con cepas homólogas reduce la prevalencia y severidad de la enfermedad, aunque la infección ocurre (Hughes and Pugh, 1975; Hughes et al., 1976; Hughes et al., 1979; Pugh et al., 1977). Las vacunas contra QIB con cepas heterólogas no son efectivas (Pugh et al., 1976). Vacunas multivalentes con distintos serotipos de pili pueden ser prometedoras si los serotipos de pili causantes de la QIB clínica en la región están incluidos en la vacuna (Pugh et al., 1977).

Pronóstico

El ojo de los bovinos tiene alto poder de curación. La mayor parte del daño hecho al ojo por la enfermedad puede ser reparado, aunque puede ser necesario un largo período de tiempo para que el organismo repare el daño y reemplace el tejido que no está sano. Los casos severos de queratoconjuntivitis infecciosa bovina o tratamiento suspendido pueden resultar en ceguera permanente. Por lo tanto es importante detectar la infección temprana y comenzar un tratamiento efectivo inmediatamente.

Factores de virulencia de *Moraxella bovis*

M. bovis expresa fundamentalmente dos factores de virulencia, una citotoxina (Beard and Moore, 1994) y pilis (Ruehl et al., 1993). Los pilis son proteínas de superficie cuya función es la adhesión mediante la fijación de la bacteria a receptores específicos de las células epiteliales de la córnea y conjuntiva. La citotoxina (citolisina/hemolisina) es una proteína formadora de poros perteneciente a la familia de toxinas tipo RTX (repeticiones en la estructura de la toxina), que promueve la formación de úlceras corneales por medio de lisis de células epiteliales corneales y neutrófilos del hospedador, resultando en la liberación, dentro del estroma de la córnea, de enzimas de degradación derivadas de los neutrófilos (Rogers et al., 1987; Kagonyera et al., 1988, 1989).

El pili está clasificado como pili tipo IV (Ottow, 1975), también llamado fimbria tipo IV. Este tipo de pili se distingue de otros tipos por su ubicación polar, su rol en la movilidad bacteriana y por las secuencias conservadas de su subunidad y de las proteínas de ensamble entre subunidades.

Los pili tipo I están distribuidos en la célula en forma peritrica (ej: *Salmonella typhimurium*) y se caracterizan por producir hemaglutinación de glóbulos rojos y por presentar sensibilidad a manosa (la D-manosa inhibe la hemaglutinación) (Meynell and Lawn, 1967). Los pili tipo II comprenden a los pili sexuales, que actúan como puentes específicos durante la conjugación bacteriana (ej: *E. coli*). Este tipo de pili comparado con los otros se encuentra en muy escasa cantidad, no más de 1-10 por bacteria, y son más largos y anchos (Meynell et al, 1974). Los pili tipo III corresponden a un grupo de apéndices, con forma de tubos huecos, gruesos, adheridos en forma de embudos a la superficie celular. Han sido observados en *Agrobacterium* sp (Ottow, 1975). Los pili tipo V tienen disposición polar y actúan "empujando" a las bacterias para contraerse en grupos con forma de estrella, permitiendo a las células competentes la conjugación. Han sido observados en *Pseudomonas "rhodos"*, *Agrobacterium* spp and *Rhizobium lupini* (Heuman, 1968). A los pilis tipo VI se los encuentra en células Gram positivas y se disponen en forma característica de manojos de pilis, los cuales actúan como antígenos específicos pero no hemaglutinan (Yanagawa and Otsuki, 1970); han sido

observados en *Corynebacterium renale* (responsable de pielonefritis bovina y cistitis).

Los pilis tipo IV son apéndices que emanan de la superficie de varias bacterias gram negativas, incluyendo especies patogénicas para animales y plantas: *Moraxella bovis*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*, *Dichelobacter nodosus*, *Escherichia coli enteropatogénica* (EPEC) y *E. coli enterotoxigénica* (ETEC), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Aeromonas veronii* biovar sobria, *Aeromonas caviae*, *Eikenella corrodens*, *Legionella pneumophila* (Tennent and Mattick, 1994).

Los pilis tipo IV son homopolímeros, compuestos por un tipo de subunidad proteica llamada pilina que se repite entre 1000 y 3000 veces en cada pili. Esta subunidad es muy conservada (Manning and Meyer, 1997). Las subunidades de fimbrias pueden contener de 145 a 160 aminoácidos (aa) y muestran un alto grado de similitud estructural (Dalrymple and Mattick, 1987). En bacterias que expresan pili tipo IV, la pilina se expresa como una proteína tipo pre-pilina con una secuencia líder inusualmente corta de 6 aminoácidos, seguida por un dominio predominantemente hidrofóbico (segmento de 20 a 30 residuos de aminoácidos). El dominio hidrofóbico y la secuencia líder son requeridas para secretar la proteína a través de una vía ATP-dependiente, Sec-independiente (Tennent and Mattick, 1994). Durante el proceso de secreción, una prepilin-peptidasa cliva la secuencia líder y metila el primer aminoácido de la proteína madura, formando un residuo N-metilfenilalanina. En las pre-pilinas tipo IV el dominio amino terminal es altamente conservado (Hobbs and Mattick, 1993; Pugsley, 1993; Alm and Mattick, 1997). Estos pilis se clasifican en dos subclases, IVA y IVB, en base a similitudes de las secuencias de aminoácidos deducidas de sus pre-pilinas. La maquinaria de ensamblaje envuelta en la formación de la fimbria consiste en un set de proteínas codificadas por genes que pueden estar dispersos por todo el genoma bacteriano u organizados dentro de operones consistiendo en 11 a 14 genes (subclase IVB). Muchas de las proteínas asociadas a la biogénesis de pili tipo IV son homólogas a las proteínas envueltas en el sistema de secreción tipo II y en sistemas de transformación natural (DNA uptake) en varias bacterias (Pugsley, 1993).

La determinación de la estructura primaria de las subunidades de la fimbria obtenida por secuenciación de proteínas y genes confirma lo sugerido por Ottow (1975) en el sentido de que la fimbria tipo IV representa un grupo discreto y estrechamente relacionado. Este grupo ha sido llamado como N-metilfenilalanina (NmePhe) fimbria o NmePhe pili, porque el aminoácido modificado N-metilfenilalanina se encuentra comúnmente en el extremo amino-terminal de la subunidad nativa.

La estructura cristalina de la subunidad de pili tipo IV de *N. gonorrhoeae* ha sido determinada por Parge y colaboradores. (1995), (Fig. 13).

Esta estructura cristalina revela conformaciones α - β con un enrollamiento α_1 -helicoidal N-terminal bastante largo (residuos 2 a 54), que da a la molécula en general una forma de cucharón. Otros elementos estructurales son los siguientes: i) un lazo de azúcar con unión a disacárido (residuos 55 a 77), con N-acetilglucosamina- $\alpha(1,3)$ -O galactosa unido en posición Ser-63, ii) dos horquillas β que forman las cuatro hojas β -plegadas antiparalelas (residuos 78 a 93 y 103 a 122), iii) un lazo de conexión β_2 - β_3 , y iv) una región que contiene un puente disulfuro (residuos 121 a 158), la cual a pesar de su naturaleza hipervariable, aparece como una horquilla- β regular (β_5 - β_6) seguida por un lazo de conexión.

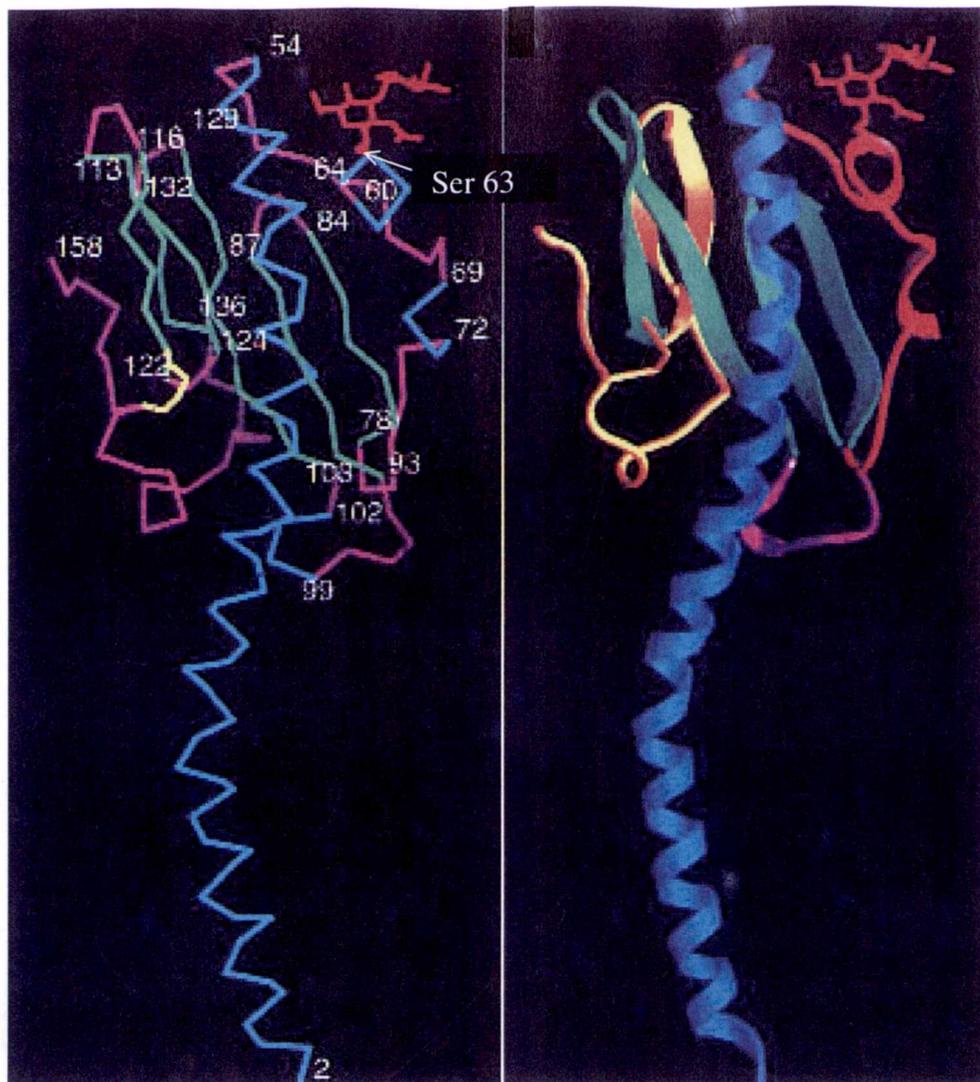


Fig. 13. Representación de pilina tipo IV de *N. gonorrhoeae*. Las regiones coloreadas indican los elementos de estructura secundaria: azul, hélice- α_1 N-terminal (residuos 2 a 54); rojo, loop extendido de azúcar con unión a disacárido (residuos 55 a 77); verde, horquillas- β (residuos 78 a 93 y 103 a 122); magenta, loop β_2 - β_3 (residuos 94 a 102); amarillo, región C-terminal que contiene unión disulfuro (residuos 121 a 158). También se muestra el puente disulfuro (residuos de cisteína 121 y 151), y una Ser-63 con unión covalente a disacárido (Fig. tomada de Parge y colaboradores, 1995).

En términos generales, la subunidad de fimbria tipo IV se puede dividir en 3 regiones (Fig. 14). La región 1 consiste en el dominio conservado N-terminal que puede ser subdividido en 3 regiones, 1a, 1b y 1c. Mientras la región 1b es altamente conservada entre todos los ejemplos de subunidades

de fimbria tipo IV, las regiones 1a y 1c son usualmente conservadas dentro de especies pero muestran algo de diversidad cuando se comparan subunidades de distintas especies. Las regiones 2 y 3 se combinan para formar el dominio variable, donde la región 2 está localizada centralmente y la región 3 se aproxima al tercio C-terminal de las proteínas

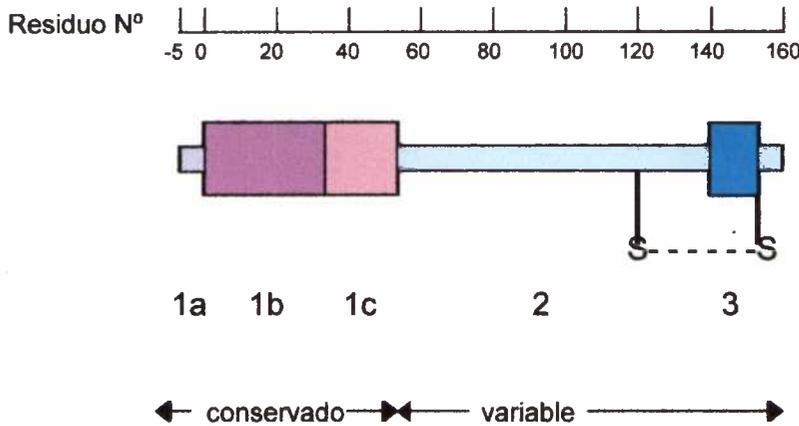


Fig. 14. Diagrama esquemático mostrando las subunidades de la fimbria tipo IV. En el dominio conservado el bloque representa la secuencia líder que consta de 5 a 6 aa (región 1a), el bloque .representa la secuencia hidrofóbica altamente conservada de 32 aa (región 1b) comenzando con el aa modificado NmePhe en la primera posición en la proteína madura, y el bloque representa la región 1c desde el residuo 33 hasta la casi invariable glicina en la posición 54/55, la cual es altamente conservada dentro de especies (o clases dentro de especies) pero que exhibe divergencias entre especies. Se observa homología limitada entre subunidades de especies o clases en el dominio variable, sin embargo hay una región secundaria de secuencia conservada cerca del carboxilo terminal, indicada por el bloque . Por líneas de punto se indica el puente disulfuro entre residuos de cisteína. (Tomado de Tennent and Mattick, 1994)

Los 32 residuos de las regiones amino-terminales de todas las NmePhe pilinas tipo IV exhiben al menos 90 % de homología y son muy hidrofóbicos. Sin embargo, los dos tercios carboxi-terminal de estas subunidades son relativamente hidrofílicos y tienen varios dominios variable e hipervariable. Esta región es la que da origen a las variaciones estructurales y antigénicas entre especies.

Como ha sido descrito las cepas piliadas de *M. bovis* son patogénicas, mientras que las cepas no piliadas no lo son (Jackman and Rosenbusch, 1984; Annuar and Wilcox, 1985; Chandler et al, 1985; Moore and Rutter, 1989). Esto

se puede deber, al menos en parte, a la habilidad de la bacteria piliada para translocarse a través de la superficie epitelial mediante un movimiento denominado twitching motility (Depiazzi and Richards, 1985). Concomitantemente con su rol en la colonización del hospedador, los pilis tipo IV son también importantes antígenos inmunoprotectores y exhiben considerable variación estructural y serológica, lo cual se asume ampliamente que es el resultado de presión inmunológica por parte del hospedador (Lehr et al., 1985; Lepper and Hermans, 1986; Moore and Rutter, 1987; Ruehl et al., 1988). Vacunas con pili purificado ya sea nativo o recombinante, han demostrado ser altamente protectoras contra desafíos homólogos (Lepper et al., 1993).

A pesar de que la presencia de pilis es esencial para la adherencia de la bacteria a la superficie conjuntival y corneal, previniendo la remoción del organismo por el continuo efecto de barrido de las secreciones oculares y por la acción mecánica del pestañeo, facilitando de esta forma la colonización del ojo, la sola presencia de pilis es insuficiente para causar enfermedad.

La β **hemolisina** es otro factor de virulencia requerido para causar queratoconjuntivitis. Las bacterias virulentas son piliadas y hemolíticas, y pueden ser aisladas de casos agudos de QIB (Punch and Slatter, 1984). Sólo estas cepas que dan lugar a colonias denominadas "rugosas", son capaces de reproducir experimentalmente la enfermedad. Las cepas no piliadas y/o no hemolíticas tienen menor o muy poca incidencia en la queratoconjuntivitis experimental (Pugh and Hughes, 1968). La lisis de glóbulos rojos le aporta a la bacteria nutricionalmente exigente, el hierro necesario para su proliferación en el ambiente ocular. Las cepas hemolíticas de *M. bovis* también poseen actividad citotóxica contra neutrófilos bovinos y células epiteliales de la córnea (Pugh and Hughes, 1968). Esta actividad citotóxica es muy importante en la injuria corneal asociada con QIB (Gray et al, 1995). Varios investigadores demostraron la actividad citotóxica de extractos de *M. bovis* libres de células, además de la actividad hemolítica, con lo cual se especuló que existía una citotoxina separada de la hemolisina (Beard and Moore, 1994; Gray et al., 1995; Hoiem-Dalen et al., 1990). Más tarde, Billson y colaboradores (2000), demostraron la neutralización de la toxina contra células epiteliales de córnea, por medio de un anticuerpo monoclonal (epitope-específico) neutralizante de la

hemolisina de *M. bovis*. La mejor explicación posible para esta observación fue que una sola toxina es responsable de ambas actividades: hemolítica y citotóxica. Sin embargo no se puede excluir la existencia de un epítotope común en toxinas diferentes, lo cual requeriría control por un gen regulatorio común que permita la expresión simultánea de varios factores de virulencia, tal como ocurre en la regulación de la expresión de factores de patogenicidad de *Bordetella pertussis* (Weiss et al., 1984).

Después de adherirse a las capas externas de la córnea, *M. bovis* invade el estroma, modificando la disposición regular de las fibrillas del colágeno, necrotizando las células y produciendo una úlcera. En una primera etapa actúan adhesinas (factores primarios) y en una segunda etapa se liberan las toxinas, que afectan varios sustratos presentes en las células de córnea y conjuntiva, sus tejidos blanco (Gray et al., 1995).

La hemolisina es una proteína lábil al calor, dependiente de Calcio. La misma es producida en medios líquidos durante la fase logarítmica del crecimiento y no se observa durante la fase estacionaria (Ostle and Rosenbusch, 1984). Si bien primariamente está asociada a la superficie celular bacteriana, luego puede ser excretada como una exotoxina. La actividad hemolítica está relacionada a vesículas unidas a la membrana externa de *M. bovis*. Muchas bacterias Gram negativas en crecimiento activo liberan este tipo de vesículas debido a la expansión de la membrana externa a una velocidad mayor a la de la capa de peptidoglicano (McG. Beard and Moore, 1992). En cultivos en medio líquido la toxina es fácilmente destruída por proteasas luego de la fase exponencial de crecimiento. Es además muy lábil en procedimientos de rutina de concentración y purificación. Es miembro de la familia de toxinas RTX (exotoxinas bacterianas formadoras de poros en membranas celulares blanco y con un rol para el Calcio en la actividad lítica de la hemolisina). A esta familia pertenecen también las toxinas secretadas por *Escherichia coli*, *Pasteurella hemolítica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, y *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Taichman et al., 1991; Welch et al., 1992). Tiene un mecanismo de acción común al de muchas hemolisinas producidas por bacterias patógenas Gram negativas: inserción de la toxina dentro de la membrana plasmática de la célula blanco y formación de poros de tamaño definido (Bhakdi and Tranum-Jensen, 1988; Clinkenbeard and Thiessen, 1991).

Estas toxinas producen rápida liberación de K^+ de las células blanco a través de estos poros, pero retienen proteínas citoplasmáticas dentro de la célula, resultando en un aumento intracelular de presión coloidosmótica. Esta etapa es seguida por una fase de latencia prelítica, lenta, donde el agua entra a las células intoxicadas en respuesta al aumento de la presión coloidosmótica intracelular y las células se hinchan. Luego comienza la fase lítica en la cual se pierden de la célula una gran cantidad de componentes celulares y finalmente ésta se lisa.

La patogenicidad de cepas de *M. bovis* está asociada también a la habilidad de producir depresiones tipo-hueco en células epiteliales corneales. Este "pitting-factor" sería una enzima hidrolítica. Esta citotoxina de *M. bovis* es además citolítica para neutrófilos bovinos. La misma, al causar daño directo a neutrófilos, produce una gran liberación de enzimas lisosómicas del neutrófilo que contienen colagenasas y otras enzimas proteolíticas, las cuales son las responsables de las injurias corneales. Los neutrófilos están directamente implicados en el desarrollo de lesiones corneales. Gran cantidad de neutrófilos infiltran las córneas de bovinos con QIB y se los observa en varios estados de degeneración y degranulación (Chandler et al., 1981; Rogers et al, 1987). Debido a que *M. bovis* no produce colágenasa (Frank and Gerber, 1981), los abundantes neutrófilos observados serían una buena fuente de esta importante enzima. Esta, aunque no es producida por *M. bovis*, sería importante en la progresión de las úlceras de córnea por degradación del colágeno en sus péptidos componentes. Enzimas de *M. bovis* del tipo de aminopeptidasas pueden hidrolizar péptidos. Tales hidrólisis podrían llevar a disolución de proteínas de matriz de tejido ocular resultando en ulceración corneal. Los neutrófilos dañados no son efectivos en la depuración de *M. bovis*, lo que lleva a un aumento del número de bacterias viables en el ojo. La citotoxicidad para neutrófilos bovinos es un importante factor patogénico que permite la proliferación bacteriana sobre la superficie corneal, protegiendo a *M. bovis* de la fagocitosis y muerte intracelular (Kagonyera et al., 1988, 1989).

Variación antigénica de fimbria tipo IV

Se ha demostrado que la composición antigénica de las proteínas piliares permite caracterizar a las cepas de *M. bovis* en serogrupos, no existiendo una reacción inmunológica cruzada entre los mismos (Lepper and Hermans, 1986). A estas diferencias antigénicas se atribuye, al menos en parte, el bajo nivel de protección de las vacunas actuales. A los efectos de analizar estas diferencias se estableció un sistema unificado para la caracterización serológica de los diversos serovares piliares de *M. bovis*, utilizando principalmente la técnica de aglutinación en placa y otras complementarias en casos dudosos tales como ELISA y TCIE (tandem crossed immunoelectrophoresis) (Moore and Rutter, 1987). Empleando este sistema, Moore y Lepper, en 1991, en un estudio sobre aislamientos de *M. bovis* de distintos países, lograron clasificarlos como pertenecientes a 7 distintos serogrupos, designados con letras de A a G, de acuerdo a su tipo antigénico pilar. Este trabajo demostró que *M. bovis* es antigénicamente heterogénea y que la prevalencia de cada serogrupo varía regionalmente.

M. bovis exhibe no sólo variación antigénica sino también de fase de su pili tipo IV, expresando alternativamente pili tipo Q o I. A esto se le suma la variación entre las formas piliadas (P^+) y no piliadas (P^-) la cual se da a una frecuencia tan alta como 10^{-4} por célula, por generación. Células de *M. bovis* que expresan pili tipo Q son más eficientes al establecer infección que aquellas que expresan pili tipo I, y como se mencionó, células no piliadas de *M. bovis* no pueden establecer infección (Ruehl et al, 1993). Clínicamente la expresión de pili tipo Q aumenta la adhesión de *M. bovis* al epitelio de la córnea bovina, lo que contribuiría al establecimiento de la infección. Estos pilis (Q e I) tienen diferente peso molecular aparente, determinado por migración en electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). La pilina I, también llamada α por Ruehl y colaboradores (1988), tiene un peso molecular relativo de 20.000 Da y la pilina Q (o β , Ruehl et al., 1988) migra con una masa molecular relativa de 17.000 Da. Son distintos productos genéticos compuestos por secuencias de aminoácidos separadas, y comparten aproximadamente 60% de sus antígenos (Ruehl et al, 1993). Los genes que codifican las subunidades de pilina de *M. bovis* están localizados sobre un segmento invertible de ADN de 2,1 Kb. El

switch en la expresión entre los genes de las pilinas *tfpQ* (type four pilin Q) y *tfpI* (type four pilin I) se debe a una inversión de esta región de ADN (Fulks et al., 1990). El extremo amino terminal está codificado fuera del segmento invertible, y los genes para el extremo carboxi terminal de las proteínas de pili tipo Q e I están orientados en direcciones opuestas dentro del segmento invertible (Fig. 15). La orientación del ADN invertible determina cuál gen piliar será transcrito. Cuando *tfpQ* está en el locus de expresión en la orientación 1, se expresa pilina Q, mientras que la orientación 2 tiene a *tfpI* en el locus de expresión, y se expresa pilina I. Para que ocurra la inversión se requiere del gen *piv* que codifica la “putativa” ADN invertasa, el mismo se encuentra inmediatamente adyacente a la región de inversión (Marrs et al., 1990; Lenich and Glasgow, 1994). Esta región invertible contiene un gen completo en el locus de expresión y un gen parcial capaz de invertirse hacia el locus de expresión. Otro gen adicional, llamado *tfpB* se encuentra dentro del segmento invertible, pero su función es hasta ahora desconocida.

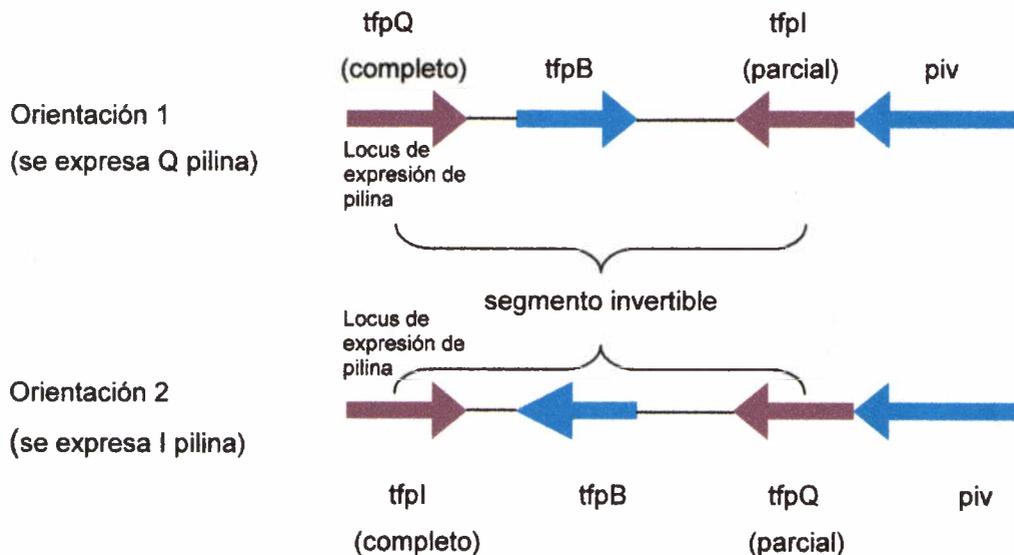


Fig. 15. Organización genómica de la región del gen de la subunidad de pili de *M. bovis*. (Tomado de Tennent and Mattick, 1994)

Funciones alternativas de fimbria tipo IV

Los pilis han sido implicados en una variedad de funciones bacterianas, incluyendo adhesión celular, twitching motility (una forma de locomoción

flagelo-independiente), pero también han sido implicados (directa o indirectamente) con corrosión de agar, transferencia de plásmidos y adsorción a bacteriófagos (Skerker and Berg, 2001; Strom and Lory, 1993; Tennent and Mattick, 1994; Wall and Kaiser, 1999).

Adhesión

Un gran número de estudios han demostrado que la fimbria tipo IV puede mediar la adhesión a células epiteliales in vivo e in vitro (Annuar and Wilcox, 1985; Sato and Okinaga, 1987; Doig et al., 1988; Paranchych and Frost, 1988). La unión no es inhibida por azúcares como el caso de fimbria tipo I (*E. coli*) que es inhibida en su adhesión por manosa. Sin embargo, la unión es al menos específica para la interacción hospedador-pili. La expresión de la fimbria de *M. bovis* en *P. aeruginosa* mostró que altera su unión específica a células epiteliales bovinas. Esta observación también provee fuerte evidencia que la adhesina es la subunidad de fimbria por sí misma. Anticuerpos dirigidos contra fimbria inhiben la unión a células epiteliales.

Twitching motility

El fenómeno de twitching motility en bacterias que expresan pili tipo IV fue descrito por primera vez por Henrichsen en 1975 y paralelamente usado por Ottow (1975) en su definición de este grupo. El mismo se manifiesta como un movimiento irregular de la célula bacteriana cuando se encuentra en suspensión o como parte de colonias en medio sólido y que les permite a éstas diseminarse rápidamente en superficies, tales como cuando son incubadas en agar bajo condiciones húmedas (Henrichsen, 1983). Este movimiento es bastante diferente e independiente de la movilidad flagelar. Así, existen diferencias en la morfología de las colonias compuestas por células piliadas versus células no piliadas (Pedersen et al, 1972; Bovre and Froholm, 1972; Sandhu et al, 1974). Las primeras exhiben usualmente una colonia tipo rugosa y diseminada, mientras que las últimas aparecen lisas. Estudios recientes han revelado que las bacterias, con pili tipo IV como aparatos de movilidad, extienden sus filamentos de pili en un polo de la célula, los adhieren a su extremo distal y luego se retraen para generar movilidad, como se indica en la Fig. 16 (Merz et al, 2000; Skerker and Berg, 2001).



Fig. 16. Modelo de movilidad dependiente de pili tipo IV. Las bacterias extienden los filamentos de pili en un polo de la célula, los adhieren al extremo distal y los retraen para generar movilidad.

Henrichsen en 1983 descubrió una fuerte correlación entre twitching y pili polar; vió que todas las cepas de la misma especie con pili polar exhiben twitching. Además, no encontró este tipo de movimiento en variantes de las cepas que han perdido su pili polar al ser cultivadas. Tampoco se observa twitching en cepas piliadas con pilis peritricos, y por lo tanto, presumiblemente no tipo IV. La pérdida de pili puede ser detectada por pérdida de twitching (Mattick et al., 1996).

Corrosión de agar

Muchas especies microbianas con pili tipo IV corroen medios sólidos (placas con agar) dejando hoyos en los sitios donde desarrollaron las colonias. Se asume que esta es una característica asociada a bacterias que colonizan superficies epiteliales debido a la secreción de enzimas degradativas por parte de estas especies. Mutantes no fimbriadas de *M. bovis* y especies relacionadas no corroen el agar, en contraste con sus equivalentes tipo-salvaje. Más significativamente, la expresión de pili de *M. bovis* o *D. nodosus* en *P. aeruginosa* causa que las células recombinantes den lugar a la formación de un hueco en el agar, mientras que el tipo-salvaje de *P. aeruginosa* no lo hace. Estas observaciones sugieren en forma contundente que las fimbrias heterólogas son responsables *per se* de formar huecos en el agar, posiblemente unidas a componentes oligosacáridos del agar, lo cual se asemeja a los ligandos naturales de la fimbria in vivo.

Vacunas

En los últimos años se ha incrementado el interés por controlar la queratoconjuntivitis infecciosa bovina empleando como principal estrategia la vacunación. Sin embargo la gran variedad de cepas de *M. bovis*, con diferencias antigénicas, representa el mayor obstáculo en el desarrollo de medidas profilácticas (Punch and Slatter, 1984). La presencia de cepas antigénicamente heterogéneas puede determinar que las vacunas no sean efectivas, principalmente cuando las mismas se preparan con cepas provenientes de otra región o país, siendo por lo tanto recomendable que las vacunas incluyan cepas regionales representativas del área geográfica en la que van a ser empleadas (Paolicchi et al, 1991).

Se han desarrollado vacunas contra QIB empleando distintos tipos de antígenos, adyuvantes e inactivantes; sin embargo, los resultados obtenidos con las diferentes formulaciones hasta el momento han sido dispares, informando los autores niveles de protección variables para las distintas experiencias. Es por esto que se continúa en la búsqueda de nuevas vacunas y en el estudio de estrategias de aplicación que permitan obtener una respuesta inmune adecuada, capaz de proteger eficientemente contra la infección por *M. bovis*.

Vacunas vivas atenuadas

Se componen de microorganismos que han perdido parte de su virulencia, generalmente mediante repiques sucesivos en diferentes medios de cultivo y/o huéspedes animales o empleando técnicas de biología molecular, sin haberse modificado en lo posible sus características inmunogénicas. La inmunidad provocada por estas vacunas es de larga duración y muy intensa, parecida a la debida a la enfermedad natural. Las vacunas basadas en organismos vivos atenuados poseen interesantes ventajas sobre los productos inactivados. Estimulan la inmunidad humoral y celular, contienen todos los antígenos relevantes y permiten la administración de una dosis única, ya que requieren un bajo número de células para producir una buena respuesta inmune. Al tener la población la posibilidad de crecer en el punto de

inoculación, asegura una expresión fenotípica in vivo que no es la misma que presentan las vacunas a organismos muertos, que han sido crecidos in vitro en biorreactores. Como desventaja se cita la posibilidad de que las mismas puedan revertir a la forma virulenta (Babiuk and Potter, 1994). Las vacunas vivas atenuadas si bien permiten lograr niveles adecuados de protección, pueden dar lugar a reacciones adversas provocadas tras la inoculación intramuscular, incluyendo anafilaxia, por lo tanto pueden en algunos casos ser consideradas peligrosas para la salud animal (Hughes and Pugh, 1971). La dificultad para lograr vacunas vivas seguras contra QIB se debe probablemente a que existen pocos mutantes no patógenos capaces de producir niveles adecuados de inmunidad sin generar efectos adversos (Pérez et al, 1997).

Un aspecto interesante en el desarrollo de este tipo de vacunas está referido a la forma en que se presenta la formulación: solución líquida o liofilizada. En el caso de vacunas liofilizadas contra brucelosis bovina (cepa 19 de *Brucella abortus*), el número de organismos que sobreviven a la etapa de liofilización es del orden del 50% (comunicación personal empresas productoras nacionales), lo cual constituye un problema de consideración no sólo por sus implicancias económicas, sino porque se administra al animal un número muy grande de organismos entre vivos y muertos.

Vacunas inactivadas

Bacterinas

Son vacunas a base de bacterias muertas que pueden en algunos casos incluir toxoides en su composición. Las vacunas que contienen microorganismos muertos son seguras con respecto a su virulencia residual y contaminación, siendo además relativamente más fáciles de almacenar (Pérez et al, 1997). Como desventaja se debe mencionar la necesidad de emplear varias dosis para mantener un nivel adecuado de anticuerpos séricos. Además requieren una mayor masa microbiana en comparación a las vivas atenuadas y requieren un mayor número de dosis y el empleo de adyuvantes en la formulación. En este tipo de vacunas es necesario dividir la cantidad total de bacterias que se necesita para inducir la protección en varias dosis, con

intervalos de días o semanas, debido a la alta concentración de microorganismos muertos que se deben administrar. En general, la respuesta inmune, fundamentalmente de tipo humoral, es menos intensa y duradera. Un importante problema lo constituye la elección del adyuvante (cualquier sustancia que incorporada a una vacuna acelera, prolonga o potencia la respuesta inmunogénica frente a la misma), que constituye un importante tema de investigación en muchas vacunas.

Vacuna ribosomal

Pugh et al. (1981), basados en investigaciones previas donde vacunas ribosomales de varios géneros bacterianos como *Brucella*, *Salmonella* y *Yersinia* producían inmunidad, aislaron ribosomas de *M. bovis* y los emplearon como inmunógenos. Estas fracciones tendrían ventajas específicas tales como inmunidad de mayor duración y en principio podrían proteger contra serotipos cruzados. En el caso de *M. bovis*, estos autores informaron resultados obtenidos a partir de preparados ribosomales los cuáles fueron mezclados con volúmenes iguales de adyuvante de Freund incompleto, e inoculados en bovinos en dos dosis subcutáneas con veintiún días de intervalo. La efectividad de esta vacuna fue nula, no indujo protección. Cuando los terneros vacunados fueron desafiados experimentalmente con cepas homólogas y heterólogas, todos desarrollaron queratoconjuntivitis uni o bilateral. No se detectaron anticuerpos contra los antígenos ribosomales en ninguno de los terneros vacunados. Se mencionó como causa del fracaso de estas vacunas a una cantidad inadecuada de ribosomas en la formulación y a una dosis excesiva de organismos patógenos en el desafío.

Vacunas basadas en pilis

Vacunas basadas en pilis demostraron grados de protección variables dentro del rango de 45 a 90% (Pérez y col., 1998). Pugh y colaboradores (1977) compararon la eficacia de preparaciones vacunales basadas en pilis, formuladas en base oleosa y acuosa, después de la exposición a un desafío por organismos virulentos homólogos. El porcentaje de terneros que resistió a

la infección fue significativamente mayor para los terneros vacunados con vacuna oleosa. En un estudio posterior Pugh et al. (1980) demostraron la protección de los terneros por transferencia de inmunidad pasiva, mediante el suministro de calostro proveniente de vacas vacunadas con dos dosis de un formulación piliada, aplicada entre el cuarto y sexto mes de gestación. El porcentaje de animales resistentes a la enfermedad fue mayor en los terneros alimentados con calostro de madres vacunadas (46%) que en los terneros provenientes de vacas no vacunadas (19%). Aunque la protección no fue completa se sugirió la posibilidad de la vacunación antes del parto de la vaca en conjunción con la vacunación de los terneros, como medida para reducir la incidencia de esta enfermedad bajo condiciones de campo.

Gil Turnes et al. (1982), estudiaron la importancia de los pilis de *M. bovis* en la inmunización activa contra la QIB, obteniendo mayor protección con una vacuna elaborada con organismos piliados aplicada en dos dosis con tres semanas de intervalo frente a la aplicación de una vacuna elaborada con cepas no piliadas administrada en forma similar.

Gerber et al. (1988) desarrollaron una formulación compuesta por antígenos de adherencia y enzimas degradantes de la córnea, principalmente enzimas hidrolíticas producidas por *M. bovis*, capaces de dañar tejidos lipídicos, mucopolisacáridos y matrices proteicas, la cual protegió al ganado desafiado experimentalmente con cultivos homólogos y heterólogos. Se observó una protección del 92% contra la exposición a campo.

Vacunas obtenidas por tecnología de ADN recombinante

Debido a que la formulación de una vacuna efectiva contra QIB debería contener los siete diferentes serogrupos descritos de pilis de *M. bovis*, la industria se enfrenta a un problema que no resulta fácil de resolver prácticamente. Los inconvenientes aparecen en dos frentes: Uno relacionado a que tipos de pilis incluir y el otro es tratar de mantener, en organismos crecidos en medio líquido, la expresión del fenotipo piliado. En el primer caso se debería hacer un estudio epidemiológico que defina qué tipo de pili son los prevalentes en el área de cobertura de la vacunación. En relación a la estabilidad del fenotipo piliado, está demostrado que mantener estable el nivel de piliación

celular en cultivos en medio líquido es prácticamente imposible. Esto ha llevado a tratar de buscar otros caminos basados en técnicas de biología molecular, que permitan clonar genes de distintas pilinas en hospedadores que crezcan en cultivos de alta densidad y donde estas pilinas se expresen en superficie, como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*.

En algunas formulaciones comerciales se encuentran células piliadas que expresan distintos serogrupos (normalmente dos) o una cepa piliada enriquecida con productos proteolíticos. Se demostró que la vacunación con pili de *M. bovis* expresado en *Pseudomonas aeruginosa* produce un nivel de protección elevado (80%) contra QIB, aunque esta protección no es significativamente distinta a aquella producida con el pili expresado en *Moraxella bovis* (Lepper et al., 1995). Se determinó la factibilidad de formular una preparación multivalente basada en pilis derivados de ADN recombinante a partir de los 7 serogrupos de *M. bovis* (Lepper et al. 1993).

En los primeros ensayos de vacunas basadas en la presencia de pilina se han usado dosis de pili que varían entre 400 µg y varios mg (Lehr et al., 1985; Lepper, 1988; Lepper et al., 1991). Sin embargo estas dosis no son económicas para un producto comercial multivalente. En ensayos posteriores (Lepper et al., 1993) se demostró que una dosis total de 60 µg de pili es capaz de generar una protección efectiva como vacuna monovalente (2 dosis de vacuna, con una concentración en cada una de 15 µg/ml de pili). Es necesario realizar todavía ensayos adicionales para determinar la cantidad de cada antígeno necesaria para obtener una formulación efectiva multivalente de antígenos de pili que otorgue protección contra QIB.

Vacunas con hemolisinas

Recientemente, Angelos y colaboradores (2004), evaluaron la eficacia de una vacuna a subunidad recombinante que incorpora solamente el extremo carboxi-terminal de la citotoxina de *M. bovis*. De distinta forma a lo que ocurre con los pilis, la citotoxina de *M. bovis* está más conservada entre las distintas cepas (Angelos et al., 2001). Antisuero de conejo contra los 284 aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la citotoxina de *M. bovis* neutraliza la actividad hemolítica y citolítica de la citotoxina nativa de distintas cepas de *M. bovis* y

además protege al ganado bovino contra el desafío con aislamientos heterólogos de *M. bovis*. Estos resultados han establecido la importancia de la citotoxina de *M. bovis* en la patogénesis de QIB y en la respuesta inmune del hospedador a la citotoxina, sugiriendo que la vacuna de citotoxina recombinante de *M. bovis* es beneficiosa en la prevención de QIB.

Preparados comerciales inespecíficos

Existen otros preparados comerciales inespecíficos que combinan una mezcla de lisados de tejidos oculares y cultivos de *M. bovis* con otras especies bacterianas.

Lisados oculares

Los lisados de globos oculares de animales sanos adicionados con lisados bacterianos de *Moraxella sp.*, generan una terapia no específica a través de las proteínas que contienen. Si bien *Moraxella sp.* es poco inmunogénica, al sufrir un proceso de digestión liberaría su material génico, aumentando la antigenicidad del lisado por su especificidad hacia el tejido ocular. La protección contra la infección a campo y el efecto curativo de estos lisados fue comprobado por Calvi (1974). En los trabajos efectuados a campo se determinó la regresión de las lesiones en un 85% de los casos y, en la infección experimental, mediante la instilación de cantidades masivas de *M. bovis* a animales previamente vacunados, el nivel de protección alcanzado fue del 98%. Estos niveles de protección si bien resultaron elevados, se deben evaluar teniendo en cuenta que en estos ensayos sólo el 60% de los controles sin vacunar-infectados experimentalmente presentó signos de QIB. Por lo tanto, la interpretación de estos trabajos arroja dudas, no sólo porque no se logró una adecuada reproducción de la enfermedad en animales controles no vacunados, sino también porque en la publicación no fue especificada la cantidad total de animales pertenecientes a cada grupo (grupo control vs vacunados) y no se hace referencia a la virulencia de la cepa de *M. bovis* empleada en el desafío.

Vacunas disponibles comercialmente

Actualmente las vacunas elaboradas por los laboratorios nacionales e internacionales contienen en su mayoría bacterinas piliadas, con una (Bioqueratogen, Lab. Biogénesis; Piliguard Querato, Lab. Schering) o más cepas (Piliguard Querato 1 trivalente oleosa, Lab. Schering-Plough), algunas combinadas con el virus de IBR (virus de Rinotraqueítis Infecciosa Bovina) (PolivacQuerato, Lab. San Jorge Bagó; Vacuna anti IBR con bacterina de *Moraxella bovis*, Centro de Diagnóstico Veterinario) o con toxoides específicos. Generalmente se aplican en primovacunados dos dosis en forma subcutánea a intervalos de 20-30 días, y luego 1 dosis por año , 30 días antes del período de mayor riesgo (Octubre/Noviembre). Cuando en años anteriores ha existido un fuerte brote se recomienda proseguir con dos dosis, a pesar de tratarse de animales vacunados en años anteriores.

En la Tabla 3 se muestra el cálculo promedio de costos por enfermedad y el precio de la vacuna contra *M. bovis* (PolivacQuerato, Lab. San Jorge Bagó).

Tabla 3. Pérdidas económica por animal ocasionadas por QIB (Comunicación personal Dr. Maliandi, San Jorge-Bagó)

Concepto de la pérdida	Tratamiento	Costo del tratamiento diario total de 2 ojos		Precio del Kg de ternero en pie sano	Costo del Kg de ternero en pie trat. 2 ojos	Pérdidas totales en pesos	Costo de vacuna (por dosis)
Enfermedad	Dosis maxibiotic (oxitetraciclina 20%)	\$2.64	\$3.47 (a)	\$2.20	\$1.58	Sin trat. alternativo	\$1.13 por dosis (vac. Mb + IBR)
	Desinfectante local	\$0.23				\$8.09 (a + c)	
	Curabicheras	\$0.15					
	Personal (3 peones a \$15 diario)	\$0.45					
Tratamiento alternativo	Dosis Bagomectina Forte (endoectoparasitocida + vit ADE)	\$1.28 (b)	\$4.75 (a+b)	\$2.20	\$2.16	Con trat. alternativo	
						\$9.37 (a+b + c)	
Ganancia diaria de peso animal sano en Kg	Tiempo de convalesc. (días)	Total de Kg perdidos por enfermedad	Precio del Kg de ternero en pie	Pérdidas en pesos			
0.30	7	2.10	\$2.20	\$4.62 (c)			

El costo del tratamiento de los dos ojos de un animal enfermo es de \$3.47 (incluye drogas y mano de obra para aplicarlas), el cual puede ser aún mayor si se agrega un tratamiento alternativo. Por otro lado, los animales sanos tienen una ganancia de peso diaria de 0.30 Kg. En un animal enfermo, se considera un promedio de convalecencia de 7 días en los cuales el animal no aumenta de peso. En consecuencia el animal enfermo se pierde de ganar 2.10 Kg de peso. Teniendo en cuenta que el precio del Kg de ternero sano es de \$2.20, por animal enfermo se llega a una pérdida en pesos de \$4.62 debido a la falta de aumento de peso. Finalmente si se tienen en cuenta ambos factores (tratamiento y falta de engorde) se produce una pérdida total de \$8.09 por animal enfermo (que llega a \$9.37 con tratamiento alternativo). Pero si en lugar de curar se previene la enfermedad vacunando, las pérdidas son menores, ya que el costo de una dosis de vacuna promedio es de \$1.13 y se considera que

año. Se observa la ventaja de vacunar sobre el tratamiento con antibióticos una vez que el animal se enfermó

Impacto de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina en el ganado de nuestro país

En los Estados Unidos las pérdidas anuales estimadas por brotes de QIB exceden los U\$S 200.000.000. En nuestro País el grado de incidencia se incrementa cada año, con pérdidas económicas importantes, a pesar del aumento en la tasa de vacunación registrada en los últimos diez años. Así, en 1995 se vendieron en Argentina 1.500.000 dosis de vacuna, en tanto que en 1996 las ventas superaron los 3.000.000. Para 1997 estas cifras se incrementaron. Los últimos datos que pudimos obtener corresponden al año 2000, en que las ventas superaron los 3.500.000 dosis. A pesar del incremento notable de la vacunación, no se aprecia todavía una reducción en la incidencia de la enfermedad, lo cual se asocia a la falta de obligatoriedad de la vacunación, el **no contar todavía con una vacuna eficaz**, no conocer el cuadro epidemiológico del País, persistencia de animales portadores sin diagnóstico.

Desde 1960 se han hecho a nivel mundial, numerosos intentos para desarrollar nuevas vacunas contra esta enfermedad, pero la mayoría de las mismas ha tenido un éxito relativo. En Argentina el conocimiento de los graves problemas económicos que la queratoconjuntivitis ocasiona, ha llevado a la importación y a la producción local de vacunas constituidas en todos los casos por células enteras inactivadas.

Para la producción de *M. bovis*, la industria emplea fermentadores clásicos, agitados mecánicamente, donde los microorganismos crecen en medios de cultivo tradicionales, ricos en nutrientes. El sistema de cultivo empleado es el batch, donde la población microbiana alcanza en fase exponencial la máxima velocidad específica de crecimiento. Estas condiciones de crecimiento distan mucho de ser las que presenta la población en su entorno natural, donde expresa todo su potencial de virulencia. In vivo, una de las principales limitaciones al crecimiento es el bajo nivel de hierro disponible.

El desarrollo celular se lleva a cabo previa adhesión a la superficie de la córnea donde la población crece a velocidades de crecimiento submáximas. Esto implica que a nivel industrial, se está produciendo una población bacteriana a ser utilizada como inmunógeno, en condiciones totalmente diferentes a las que la misma encuentra in vivo. Por lo tanto, las características fenotípicas de la población con la que se fabrica la vacuna podrían llegar a diferir marcadamente de la población que se intenta combatir. Esto podría ser la causa por la cual el nivel de protección otorgado por estas vacunas, estimado en ensayos a campo, resulta de sólo un 40 a 60%. La bibliografía internacional reporta niveles de protección con tasas tan variables como bajas. Se citan así tasas de protección, que varían entre un 16% y 65%. Todo esto es indicativo de que aún no se dispone a nivel mundial de un inmunógeno efectivo para el control de esta enfermedad. Trabajos efectuados recientemente en nuestro laboratorio han permitido constatar, empleando técnicas de microscopía electrónica, que vacunas fabricadas en Argentina, a partir del desarrollo de microorganismos en reactores agitados, carecen prácticamente de células piliadas. Además se comprobó que tanto la piliación como la actividad hemolítica caen rápidamente en cultivos líquidos. Estos resultados podrían ser entonces las causas que explicarían el bajo nivel de protección de las formulaciones que se están empleando, que carecen de los dos más importantes inmunógenos: pilis y hemolisina.

La bibliografía internacional no explica con claridad las causas que llevan a la pérdida tanto de pilis como de hemolisina. *M. bovis* produce pilis fácilmente cuando crece sobre medios sólidos, en tanto que ésta característica es perdida en gran proporción cuando se la cultiva en medios líquidos. Sin embargo el cultivo en reactores agitados resulta ser todavía la forma empleada para la producción industrial de microorganismos. Una posible alternativa para superar este inconveniente es tratar de producir estos componentes antigénicos, empleando tecnología de ADN recombinante en un hospedador que sea capaz de crecer a altas densidades en cultivos líquidos, y que pueda además producir en esas condiciones elevadas cantidades de pilinas. Si bien esta estrategia resulta atractiva como forma alternativa a la producción de vacunas conteniendo organismos enteros piliados, es evidente que una formulación que contenga el organismo entero responsable de la enfermedad

(*M. bovis*) y que asegure un grado importante de piliación, permitirá disponer de un mayor número de inmunógenos específicos, incrementando la efectividad de la vacuna. En este sentido se debe reafirmar el carácter multifactorial de la gran mayoría de las infecciones bacterianas, lo cual es indicativo de la conveniencia de contar con vacunas en las cuales el inmunógeno sea el propio agente infeccioso.

Los interrogantes en el tema de QIB son importantes en casi todas las áreas de investigación. Cuando se inició este trabajo no había estudios en nuestro País sobre las características fenotípicas de la población microbiana prevalente en distintas regiones. Esta situación se traducía en el hecho de que los fabricantes de vacunas formulaban las mismas con organismos aislados de diferentes regiones geográficas sin saber si fenotípicamente eran iguales o diferentes. No se disponía de métodos de análisis de piliación para poder evaluar la expresión y estabilidad de este factor de virulencia no sólo durante un cultivo sino también en productos finales como vacunas. Consecuentemente, el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) no analizaba si las vacunas contra QIB estaban formuladas con células piliadas o no piliadas, situación que continúa al presente. Este trabajo se propuso entonces encarar investigaciones que traten de dar respuestas a estos aspectos que resultan esenciales para la obtención de células de *M. bovis* de adecuada inmunogenicidad. El tema resulta de gran significación no solo por sus aspectos básicos, sino también por su trascendencia en lo tecnológico, ya que se pretendió estudiar temas fundamentales, no dilucidados todavía, de la expresión de antígenos esenciales en este patógeno, tales como pilis.

La queratoconjuntivitis es reconocida como una de las patologías de interés prioritario para el sector de producción ganadera y desarrollar una vacuna adecuada contra la enfermedad resulta un desafío de interés general para un País que basa gran parte de sus ingresos en la producción bovina.

La orientación dada a las investigaciones fue producto de consultas realizadas por el grupo de Vacunas Bacterianas del CINDEFI con empresas productoras de vacunas de uso veterinario (San Jorge-BAGO, Bayer División Veterinaria, MED-VET- La Plata). La interacción con las mismas resultó fundamental para identificar los problemas que se expusieron anteriormente.

Objetivos específicos

- Contribuir al conocimiento de la situación epidemiológica de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina en nuestro País, a partir de una apropiada caracterización de organismos de *M. bovis* aislados de lesiones oculares de animales enfermos provenientes de distintas regiones geográficas locales.
- Establecer para la población en estudio su grado de diversidad en base a estudios de fingerprints de ADN y análisis de la expresión de componentes de cubierta celular como proteínas de membrana externa y lipopolisacáridos. Establecer el grado de variabilidad de cada componente en estudio (ADN, PME y LPS) en la población disponible y establecer relaciones con cepas de referencia.
- Establecer el grado de estabilidad de la expresión de PME y LPS frente a los subcultivos.
- Desarrollar una técnica de ELISA que permita la cuantificación del grado de piliación de suspensiones celulares de *M. bovis*. Esta prueba se consideraría de referencia para determinar piliación.
- Aplicar el método desarrollado en el monitoreo de procesos de cultivos batch.
- Analizar la influencia de las condiciones de cultivo en la expresión y estabilidad del fenotipo piliado de *M. bovis*.
- Analizar la diversidad fenotípica dentro de la población disponible de *M. bovis* mediante técnicas espectroscópicas vibracionales y análisis de clusters.
- Establecer correlaciones entre los resultados de la clasificación bacteriana derivada de la aplicación de métodos fisicoquímicos (FTIR), con los agrupamientos resultantes del empleo de fingerprinting de ADN (PCR) y perfiles de PME y LPS.
- Intentar definir qué aislamientos locales serían adecuados para integrar una vacuna efectiva en la profilaxis contra QIB.

Bibliografía

- Aikman, J.G., Allan, E.M. and Selman, I.E. 1985. Experimental production of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet. Rec.* 7; 117 (10): 234-239.
- Allen, J.A. 1919. A preliminary note on infections keratitis. *J.A.M.A.*, 54: 226.
- Allen, L.J., George, L.W., Willits, N.H. 1995. Effect of penicillin and dexamethasone in cattle with Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *JAVMA* 206: 1200-1203.
- Alm, R.A. and Mattick, J.S. 1997. Genes involved in the biogenesis and function of type 4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* 192: 89-98.
- Angelos, J.A., Hess, J.F. and George, L.W. 2001. Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. *Am. J. Vet. Res.*; 62 (8): 1222-1228.
- Angelos, J.A., Hess, J.F. and George, L.W. 2004. Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Vaccine*. In press. Available on line at www.sciencedirect.com.
- Annur, B.O. and Wilcox, G.E. 1985. Adherence of *Moraxella bovis* to cell cultures of bovine origin. *Res. Vet. Sci.* 39: 241-246.
- Babiuk, L.A. and Potter, A.A. 1994. Veterinary vaccines. *Biotech. Adv.* 12: 489-523.
- Baptista, P.J.H.P. 1979. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. A review. *Brit. Vet. J.* 135: 225-242.
- Barnes, R. 1952. A study of *Moraxella bovis* and its relation to bovine keratitis. *Rev. Am. Vet. Res.*, p. 132.
- Beard, M.K. and Moore, L.J. 1994. Reproduction of bovine keratoconjunctivitis with a purified hemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*. *Vet. Microbiol.* 42: 15-33.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ninth edition. Williams & Wilkins. 1986. Vol. 1: 296-302. Baltimore/London
- Bhakdi, S. and Trantum-Jensen, J. 1988. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. *Prog. Allergy* 40: 1-43.
- Billings, F.S. 1889. Keratitis contagiosa in cattle. *Nebraska Agr-ic. Exper. Sta. Bulletin*, 10.

- Billson, F.M., Harbour, C., Michalski, W.P., Tennent, J.M., Egerton, J.R. and Hodgson, J.L. 2000. Characterization of hemolysin of *Moraxella bovis* using a hemolysis-neutralizing monoclonal antibody. *Infection and Immunity*, 68, 6: 3469-3474.
- Bovre, K. and Froholm, L.O. 1972. Variation of colony morphology reflecting fimbriation in *Moraxella bovis* and two reference strains of *M. nonliquefaciens*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 80, 629.
- Bretschneider, G. y Pérez, S.E. 1997. Generalidades sobre queratoconjuntivitis infecciosa bovina. *Therios Vol. 26 N° 136*, Ago. 206-212.
- Brown, M.H., Brightman, A.H., Fenwick, B.W. and Rider, M.A. 1998. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *J. Vet. Intern. Med.* 12: 259-266.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Eighth edition. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- Calvi, S.A. 1974. Observaciones y trabajos sobre prevención y curación de la Queratoconjuntivitis bovina con lisados. *Gac. Vet.* Pp. 219-228.
- Caspari, E.L., Wood, P.P. and Newton, J.M. 1980. Eyelid pigmentation and the incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in Hereford-Friesian cross-bred calves. *Br. Vet. J.* 136: 210-212.
- Chandler, R.L., Baptista, P.J.H., Turfrey, B. 1979. Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *J. Comp. Path.* 89: 441-448.
- Chandler, R.L., Smith, K., and Turfrey, B.A. 1981. Ultrastructural and histological studies on the corneal lesions in infectious bovine keratoconjunctivitis. *J. Comp. Pathol.* 91: 175-184.
- Chandler, R.L., Smith, K., Turfrey, B.A. 1985. Exposure of bovine cornea to different strains of *Moraxella bovis* and to other bacterial species in vitro. *J. Comp. Pathol.* 95: 415-423.
- Clinkenbeard, K. D., and Thiessen, A. E. 1991. Mechanism of action of *Moraxella bovis* hemolysin. *Infect. Immun.* 59:1148-1152.
- Conceição, F.R. and Gil Turnes, C. 2003. *Moraxella bovis*: influence of genotypic and phenotypic characteristics on Infectious Bovine Keratoconjunctivitis control. *Ciência Rural*, Santa María, v.33, n.4: 778-787.
- Dalrymple, B. and Mattick, J.S. 1987. An analysis of the organization and evolution of type 4 fimbrial (MePhe) subunits proteins. *J. Mol. Evol.* 25, 261.

- Depiazzi, L.J. and Richards, R.B. 1985. Motility in relation to virulence of *Bacteroides nodosus*. Vet. Microbiol., 10: 107.
- Doig, P. Todd, T., Sastry, P.A., Lee, K.K., Hodges, R.S., Paranchych, W. and Irvin, R.T. 1988. Role of pili in adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human respiratory epithelial cells. Infect. Immun. 56, 1641.
- Formston, C. 1954. Infections keratoconjunctivitis of cattle (New forest disease). Rev. Vet. Rec., 66:522-527.
- Frank, S. K., and Gerber, J. D. 1981. Hydrolytic enzymes of *Moraxella bovis*. J. Clin. Microbiol. 13: 269-271.
- Frisch, J.E. 1975. The relative incidence and effect of bovine infectious keratoconjunctivitis in *Bos indicus* and *Bos Taurus*. Anim. Prod., 21: 265.
- Fulks, K.A., Marrs, C.F., Stevens, S.P. and Green, M.R. 1990. Sequence analysis of the inversion region containing the pilin genes of *Moraxella bovis*. J. Bacteriol. 172:310-316.
- George, L.W. 1990. Antibiotic treatment of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. Cornell Vet. 80: 229-235.
- George, L.W., Smith, J.W. 1985. Treatment of *Moraxella bovis* infections in calves using a long-acting Oxytetracycline formulation. J. Vet. Pharmacol. Therap. 8: 55-61.
- Gerber J.D., Selzer N.L., Sharpee R.L. and Beckenhauer W.H. 1988. Immunogenicity of a *Moraxella bovis* bacterin containing attachment and cornea-degrading enzyme antigens. Vet. Immunol. and Immunopath. 18: 41-52.
- Gerhardt, R. and Allen, J. 1982. The role of face flies in an episode of infectious bovine keratoconjunctivitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 180: 156-159.
- Gil Turnes, C., Reyes, J.C.S. de Araujo, F.L. and de Souza, R.S.M. 1982. Comparacao da protecao induzida por vacinas de *Moraxella bovis* com e sem antígenos de pili. Congresso Brasileiro de Medicina Veterinaria, Balneario Camboriu, SC. ANAIS.
- Gray, J. T., Fedorka-Cray, P. J., and Rogers, D. G. 1995. Partial characterization of a *Moraxella bovis* cytolysin. Vet. Microbiol. 43: 183-196.
- Gundín, A.L. 1992. Queratoconjuntivitis bovina: actualización del tema. Adaptado de: Hoffsis, G.F. (1987): update in veterinary ophtalmology.

- Proceedings of the 1987 satellite video conference. Therios, 20, N° 26, 22-30.
- Hall-Patch, P.K. 1951. Vet. Record, 63:824.
- Harris, R.E., Cooper, B.S., Steffert, I.J., et al. 1980. A survey of bovine infectious keratitis (pinkeye) in beef cattle. Vet. J. New Zealand 28: 58-70.
- Hauduroy, P., Ehringer, G., Urbain, A., Guillot, G. and MaGrou, J. 1937. Dictionnaire des Bactéries pathogènes.
- Henrichsen, J. 1975. The occurrence of twitching motility among Gram-negative bacteria. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B, 83, 171-178.
- Henrichsen, J. 1983. Twitching motility. Annu. Rev. Microbiol., 37, 81-93.
- Heuman, W. 1968. Conjugation in starforming Rhizobium lupini. Mol. Gen. Genet. 102:132-144.
- Hobbs, M. and Mattick, J.S. 1993. Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DAN transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. Mol. Microbiol. 1: 233-243.
- Hoiem-Dalen, P. S., Rosenbusch, R. F. and Roth, J. A. 1990. Comparative characterization of the leukocidic and haemolytic activity of *Moraxella bovis*. Am. J. Vet. Res. 51: 191-196.
- Hughes D. and Pugh G. 1970. A five-year study of infectious bovine keratoconjunctivitis in a beef herd. J. Am. Vet. Med. Assoc.;157: 443-451.
- Hughes D. and Pugh G. 1971. Experimentally induced Bovine Infectious Keratoconjunctivitis: effectiveness of intramuscular vaccination with viable *Moraxella bovis* culture. Am. J. Vet. Res. 32: 879-885.
- Hughes D.E. and Pugh G.W. 1975. Experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis: Relationship of vaccination schedule to protection against exposure with homologous *Moraxella bovis* culture. Am. J. Vet. Res., 36: 263-265.
- Hughes D.E., Pugh G.W., Kohlmeier, R.H., et al. 1976. Effects of vaccination with a *Moraxella bovis* bacterin in the subsequent development of signs of corneal disease and infection with *M. bovis* in calves under natural environmental conditions. Am. J. Vet. Res., 37: 1291.

- Hughes, D.E., Kohlmeier, R.H., Pugh, G.W., et al. 1979. Comparison of vaccination and treatment in controlling naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Am. J. Vet. Res.*, 40: 241.
- Jackman, S.H. and Rosenbusch, R.F. 1984. In vitro adherence of *Moraxella bovis* to intact corneal epithelium. *Curr. Eye Res.* 3: 1107-1112.
- Kagonyera, G., George, L.W. and Miller, M. 1989. Effects of *Moraxella bovis* and culture filtrates on ⁵¹Cr-labeled bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 50: 18-21.
- Kagonyera, G., George, L.W. and Munn, R. 1988. Light and electron microscopic changes in corneas of healthy and immunomodulated calves infected with *Moraxella bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 49: 386-395.
- Kagonyera, G., George, L.W. and Munn, R. 1989. Cytopathic effects of *Moraxella bovis* on cultured bovine neutrophils and corneal epithelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 50, 10-17.
- Kopecky, K.E., Pugh, G.W. and McDonald, T.J. 1983. Infectious bovine keratoconjunctivitis: Evidence for general immunity. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 260.
- Kopecky, K., Pugh, G.W. and Mc Donald, B.S. 1986. Infectious bovine keratoconjunctivitis: contact transmission. *Am. J. Vet. Res.* 47: 622-624.
- Lehr, C., Jayappa, H.G. and Goodnow, R.A. 1985. Serological and protective characterization of *Moraxella bovis* pili. *Cornell Vet.* 75, 484.
- Lenich, A.G. and Glasgow, A.C. 1994. Amino acid sequence homology between Piv, an essential protein in site-specific DNA inversion in *Moraxella lacunata*, and transposases of an unusual family of insertion elements. *J. Bacteriol.* 176: 4160-4164.
- Lepper A. and Barton I. 1987. Infectious bovine keratoconjunctivitis: seasonal variation in cultural, biochemical and immunoreactive properties of *Moraxella bovis* isolated from the eyes of cattle. *Aust. Vet. J.*; 64: 33-39.
- Lepper, A.W.D and Hermans, L.R. 1986. Characterisation and quantitation of pilus antigens of *Moraxella bovis* by ELISA. *Aust. Vet. J.*, 63, 401-405.
- Lepper, A.W.D., Atwell, J.L., Lehrbach, P.R., Schwartzkoff, C.L., Egerton, J.R. and Tennent, J.M. 1995. The protective efficacy of cloned *Moraxella bovis* pili in monovalent and multivalent vaccine formulations against

- experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). *Vet. Microbiol.* 129: 138 vol 45.
- Lepper, A.W.D., Elleman, T.C., Hoyne, P.A., Lehrbach, P.R., Atwell, J.L., Schwartzkoff, C.L., Egerton, J.R. and Tennent, J.M. 1993. A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the prevention of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Vet. Microb.* 36: 175-183.
- Little, R.B. and Jones, F.S. 1923. An infections ophtalmia of cattle. *Jour. Exp. Medicina*, 38:139-148.
- Lorenzo, R.M. y Suarez, V.H. 1994. Susceptibilidad racial y costos del tratamiento de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina. *Vet. Arg.* Vol. XI N° 107 pp 452-456.
- Manning, P. A., and Meyer, T. F. 1997. Type-4 pili: biogenesis, adhesins, protein export and DNA import. *Proceedings of a workshop. Gene* 192:1-198.
- Marrs, C.F., Rozsa, F.W., Hackel, M., Stevens, S.P. and Glasgow, A.C. 1990. Identification, cloning, and sequencing of piv, a new gene involved in inverting the pilin genes of *Moraxella lacunata*. *J. Bacteriol.* 172: 4370-4377.
- Mattick, J.S., Whitchurch, C.B. and Alm, R.A. 1996. The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa* – a review. *Gene* 179: 147-155.
- McG. Beard, M.K., and Moore, L.J. 1992. Reproduction of Bovine Keratoconjunctivitis with a purified haemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*. *Vet. Microbiol.* 42: 15-33.
- Merz, A.J., So, M. and Sheetz, M.P. 2000. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*, 407: 98-102.
- Meynell, E., Matthews, R.A. and Lawn, A.M. 1974. Antigenic differences between the ends and shafts of sex pili. *J. Gen. Microbiol.* 82: 203-205.
- Meynell, G.G. and Lawn, A.M. 1967. Sex pili and common pili in the conjugational transfer of colicin factor Ib by *Salmonella typhimurium*. *Genet. Res.* 9: 359-367.
- Moore, L.J. and Lepper, A.W.D. 1991. A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. *Vet. Microbiol.* 29, 75-83.
- Moore, L.J. and Rutter, J.M. 1987. Antigenic analysis of fimbrial proteins from *Moraxella bovis*. *J. Clin. Microbiol.* 25, 2063-2070.

- Moore, L.J. and Rutter, J.M. 1989. Attachment of *Moraxella bovis* to calf corneal cells and inhibition by antiserum. Aust. Vet. J. 66: 39-42.
- Odeon, A.C., Chayer, R., Campero, C.M., Moreira, A.R., Bretschneider, G. and Pérez, S.E. 1996. Eficacia terapéutica de la oxitetraciclina de larga acción por vía intramuscular en el tratamiento precoz de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB). Rev. Med. Vet. 77: 19-23.
- Ostle A.G. and Rosenbusch R.F. 1984. *Moraxella bovis* hemolysin. Am. J. Vet. Res. 45: 1848-1851.
- Ottow, J.C.G. 1975. Ecology, physiology and genetics of fimbriae and pili. Annu. Rev. Microbiol., 29, 79-108.
- Paolicchi, F., Casaro, A.P., Altuna, A.M., Terzolo, H.R. 1991. Evaluación de una bacterina piliada contra Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina causada por *Moraxella bovis*. Rev. Arg. Prod. Anim. Vol. 11 2: 241-248.
- Paranchych, W. and Frost, L.S. 1988. The physiology and biochemistry of pili. Adv. Microb. Physiol. 29, 53.
- Parge, H.E., Forest, K.T., Ahickey, M.J., Christensen, D.A., Getzoff, E.D. and Tainer, J.A. 1995. Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. Nature 378:32-38.
- Pedersen, K.B. 1970. *Moraxella bovis* isolated from cattle with infectious keratoconjunctivitis. Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B] 78: 429-434.
- Pedersen, K.B., Froholm, L.O. and Bovre, K. 1972. Fimbriation and colony type of *Moraxella bovis* in relation to conjunctival colonisation and development of keratoconjunctivitis in cattle. Acta Pathol. Microbiol. Scand, Sect. B, 80, 911-918.
- Pérez S., Bretschneider G. and Crenovich H. 1998. Inmunoprofilaxis contra la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB): Breve análisis de los distintos tipos de inmunógenos. Vet. Arg. Vol. XV N° 146: 428-435.
- Pérez, S.E., Bretschneider, G., Terzolo, H. Y Moreira, A.R. 1997. Evolución en el desarrollo de inmunógenos contra la queratoconjuntivitis infecciosa bovina: tipos y características. Therios Vol. 26, N° 138, Dic., 292-303.
- Piscitelli, H.G. y Zielinski, G.C. 1996. Encuesta epidemiológica sobre la queratoconjuntivitis infecciosa bovina en la provincia de Córdoba (Rep. Arg.). Therios, 25: 235-243.

- Powe, T. and Nusbaum, K. 1992. Prevalence of nonclinical *Moraxella bovis* infections in bulls as determined by ocular culture and serum antibody titer. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 78-79.
- Pugh, G.W., and Hughes, D. E. 1968. Experimental bovine infectious keratoconjunctivitis caused by sunlamp irradiation and *Moraxella bovis* infections: correlation with haemolytic ability and pathogenicity. Am. J. Vet. Res. 29: 835-839.
- Pugh, G.W., and Hughes, D. E. 1970. Inhibition of autoagglutination of *Moraxella bovis* by 10% magnesium chloride. Appl. Microbiol. 19: 201-203.
- Pugh, G.W. and Hughes, D.E. 1972. Bovine infectious keratoconjunctivitis: *Moraxella bovis* as the sole etiologic agent in a winter epizootic. J. Am. Vet. Med. Assoc. 161: 481.
- Pugh, G.W., Hughes, D.E., Schulz, C.K. et al. 1976. Experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis: Resistance of vaccinated cattle to homologous and heterologous strains of *Moraxella bovis*. Am. J. Vet. Res., 37:57.
- Pugh, W. G., Hughes, D. E. and Booth, G.D. 1977. Experimentally induced Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: effectiveness of a pilus vaccine against exposure to homologous strains of *Moraxella bovis*. Am. J. Vet. Res. 38: 1519-1522.
- Pugh, W.G., McDonald, T.J., Kopecky, K.E and Beall, C.W. 1980. Experimental Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: effects of feeding colostrum from vaccinated cows on development of pinkeye in calves. Am. J. Vet. Res. 41:1611-1614.
- Pugh, W.G., Phillips, M., McDonald, T.J. and Kopecky, K.E. 1981. Isolation of *Moraxella bovis* ribosomes and their subsequent use in vaccine against Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. Am. J. Vet. Res. 42: 516-520.
- Pugh G. and McDonald T. 1986. Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. Am. J. Vet. Res.; 47: 2343-2345.
- Pugh, W.G., McDonald, T.J., Kopecky, K.E. and Kvasnika, W.G. 1986. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: comparison of infection, signs of disease and weight gain in vaccinated versus nonvaccinated calves. Can. J. Vet. Res. 50: 259-264.

- Pugsley, A.P. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50-108.
- Punch P. and Slatter D. 1984. A review of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet. Bull.* ; 54: 193-257.
- Punch; P.I., Costa, N.D., Chambers, E.D., Slatter, D.H. and Wilcox, G.E. 1985. Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. *Res. Vet. Science.* 39: 179-187.
- Roeder, B.L., Skogerboe, T.L., Clark, F.D. and Kelly, E.J. 1995. Effect of early treatment with parenteral long-acting Oxytetracycline on performance of beef calves with acute eye lesion. *Agripractice.* 16: 6-11.
- Rogers, D. G., Cheville, N. F., nad Pugh, G. W. 1987. Pathogenesis of corneal lesions caused by *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. *Vet. Pathol.* 24: 287-295.
- Ruehl, W.W., Marrs, C.F., Beard, M.K., Shokooki, V., Hinojoza, J.R., Banks, S., Bieber, D. and Mattick, j.S. 1993. Q pili enhance the attachment of *Moraxella bovis* to bovine corneas in vitro. *Molecular Microbiol.* 7: 285-288.
- Ruehl, W:W:, Marrs, C:F:, Fernandez, R., Falkow, S. and Schoolnik, G. 1988. Purification, characterization and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. *J. Exp. Med.* 168: 983-1002.
- Sandhu, T.S., White, F.H. and Simpson, C.F. 1974. Association of pili with rough colony type of *Moraxella bovis*. *Am. J. Vet. Res.*, 35, 437-439.
- Sato, H. and Okinaga, K. 1987. Role of pili in the adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mouse epidermal cells. *Infect. Immun.* 55, 1774.
- Schurig, G.G., Lightfoot, D.R., Troutt, H.F. and Finkler, B.J. 1984. Genotypic, phenotypic and biological characteristics of *Moraxella bovis*. *Am. J. Vet. Res.* Vol 45, N° 1, 35-39.
- Scott, G.C. 1967. The use of cortisone in the treatment of infections keratoconjunctivitis in cattle. *J.A.V.M.A.*, 130: 257.
- Silva, M.O. 1956. Existencia de la queratoconjuntivitis infecciosa en el ganado romosinuano. *Rev. Facultad Medicina Veterinaria y Zootecnia, Bogotá, Colombia*, 116: 471-90.
- Simpson, C.S., White, F.H. and Sandhu, T.S. 1976. The structure of pili (fimbriae) of *Moraxella bovis*. *Can. J. Comp. Med.* 40: 1-4.

- Skerker, J.M. and Berg, H.C. 2001. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:6901-6904.
- Slatter, D. and Edwards, M. 1982. A national survey of the clinical features, treatment and importance of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Aust. Vet. J.* 59: 69-72.
- Smith P. and Blakenship T. 1990. Effectiveness of two commercial infectious bovine keratoconjunctivitis vaccines. *Am. J. Vet. Res.*; 51: 1147-1150.
- Soto, G.E. and Hultgren, S.J. 1999. Minireview. Bacterial adhesions: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181: 1059-1071.
- Strom, M.S. and Lory, S. 1993. Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 565-596.
- Taichman N.S., Iwase M., Lally E.T., Shattil S.J., Cunningham M.E. and Korchak H.M. 1991. Early changes in cytosolic calcium and membrane potential induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in susceptible and resistant target cells. *J. Immunol.* 147: 3587-3594.
- Tennent, J.M. and Mattick, J.S. 1994. in *Fimbriae*, ed. Klemm, P. (CRC, Boca Ratón, FL), pp. 127-146.
- Torres Moreno, A. 1971. La queratoconjuntivitis infecciosa en bovinos y ovinos. Su estudio clínico, control y tratamiento. *Rev. Militar Veterinaria*, 147-175.
- Vandergaast, N. and Rosembuch, R.F. 1989. Infectious bovine keratoconjunctivitis epizootic associated with area-wide emergence of new *Moraxella bovis* pilus type. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1437-1441.
- Wall, D. and Kaiser, D. 1999. Type IV pili and cell motility. *Mol. Microbiol.* 32 (1): 1-10.
- Ward, J.K. and Nielson, M.K. 1979. Pinkeye (bovine infectious keratoconjunctivitis) in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 49: 361.
- Webber, J.J. and Selby, L.A. 1981. Risk factors related to the prevalence of infectious bovine keratoconjunctivitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179:823.
- Webber, J.J., Fales, W.H. and Selby, L.A. 1982. Semiselective medium for isolation of *Moraxella bovis* from cattle with Infectious Keratoconjunctivitis. *J. Clin. Microbiol.* 16: 193-194.

- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Meyers, G.A. and Falkow, S. 1984. Pertussis toxin and extracytoplasmic adenylate cyclase as virulence factors of *Bordetella pertussis*. J. Infect. Dis. 150: 219-222.
- Welch R.A., Forestier C., Lobo A., Pellett S., Thomas W. and Rowe G. 1992. The synthesis and function of the *Escherichia coli* hemolysin and related RTX exotoxins. FEMS Microbiol. Immunol. 5: 29-36.
- Wilcox, G.E. 1968. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. A review. Vet. Bull. 38: 349-360.
- Wilcox, G.E. 1970. An examination of *Moraxella* and related genera commonly isolated from the bovine eye. J. Comp. Pathol. 80: 65-74.
- Yanagawa, R. and Otsuki, K. 1970. Some properties of the pili of *Corynebacterium renale*. J. Bacteriol. 101: 1063-1069.

Capítulo 2

*Variación
Intraespecífica
en aislamientos
locales de
Moraxella bovis*

BIODIVERSIDAD MICROBIANA

Consideraciones biológicas y evolutivas

La diversidad microbiana comprende al amplio espectro de organismos microscópicos distribuidos en distintas familias, géneros y especies, tanto dentro de procariotes como eucariotes (Atlas, 1984). El término **biodiversidad** contempla la variedad y variabilidad de todas las formas de vida, el complejo ecológico en el cual están presentes y los procesos de los que forman parte (Atlas, 1984; Olembo, 1991)

La evidencia actual indicaría que existen 1.5 millones de especies de hongos de los cuales solo se ha descrito el 5%. El número de especies bacterianas puede comprender entre 300.000 a 1 millón de las cuales solo 3.000 han sido reportadas en el Manual Bergey (1994). Los microorganismos ocupan todas las formas de hábitat posible (suelo, agua, aire), incluyendo ambientes extremos.

El valor de la diversidad microbiana está dado por la variedad funcional que pueden desarrollar los microorganismos para mantener una biosfera sostenible. Ellos son hábiles en el reciclado de nutrientes, producen y consumen gases que afectan el clima global, destruyen contaminantes, procesan nuestros desechos, etc. El estudio de la diversidad microbiana es importante para resolver problemas de enfermedades nuevas y emergentes, y para el desarrollo biotecnológico. Igualmente, los patrones de diversidad microbiana pueden ser usados para el monitoreo y la predicción de cambios ambientales. Es así, como los microbios pueden jugar un papel importante en la biología de la conservación y restauración de paisajes.

Desde el punto de vista de su aplicación, los mismos microorganismos constituyen la mayor fuente de agentes antimicrobianos, además producen un amplio rango de compuestos medicinales que incluyen enzimas, inhibidores enzimáticos, antihelmínticos, agentes antitumorales, insecticidas, vitaminas, inmunosupresores e inmunomoduladores.

Desde el punto de vista metodológico, la diversidad microbiana puede ser estudiada mediante técnicas microscópicas, cultivo de microorganismos in vitro y estudio de la población mediante un gran número de técnicas de análisis

de biomoléculas (ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos). Dependiendo de la accesibilidad al organismo o comunidad microbiana en particular y del tipo de hipótesis a responder, se puede seleccionar una o más de las técnicas disponibles.

La biodiversidad está en proceso de conocimiento y caracterización. Aunque el balance químico-ecológico depende en gran medida de los microorganismos, poco se sabe del modo y de la dinámica de los ecosistemas microbianos responsables de mantener este balance. Una razón crítica de por qué la información en esta materia es tan limitada, es que hasta hace muy poco los microbiólogos necesariamente debían cultivar los microorganismos para describirlos. Sin embargo, únicamente una pequeña porción (menos del 1%) de los organismos presentes en el medio ambiente han podido ser cultivados con los medios de crecimiento y condiciones experimentales empleadas.

Tradicionalmente los microorganismos han sido clasificados por sus características fenotípicas, la colección de propiedades celulares observables tales como morfología, propiedades fisiológicas (ej., utilización de nutrientes), y estructura de los componentes celulares (ej., tipos de lípidos). Debido a que el cultivo es un pre-requisito para evaluar tales propiedades, muchos microbios no han podido ser caracterizados en su habitat natural. En la actualidad las técnicas de ADN recombinante y filogenia molecular permiten superar las limitaciones del cultivo y conocer microorganismos del medio ambiente natural que no habían podido ser descritos. Las características fisiológicas de los organismos son puntos importantes de referencia, pero es necesario un concepto más general, cuantitativo, para describir sistemáticamente la diversidad microbiana. La caracterización filogenética de un organismo (filotipo) requiere únicamente conocer la secuencia de uno o más genes. En consecuencia, los diferentes tipos y el número de organismos presentes en comunidades naturales, pueden ser estudiados por secuenciación, por ejemplo, del gen 16S ARNr. Por amplificación selectiva de esta secuencia (por PCR) a partir del ADN genómico y comparando los resultados de bases de datos, los microorganismos pueden ser caracterizados como filotipos y puestos en determinado árbol genético (Olembo, 1991).

En los últimos diez años la identificación epidemiológica o comparación entre aislamientos de una misma especie con el fin de hacer el control de una

infección o análisis de población, se ha visto enriquecida con las técnicas de tipificación molecular basadas en el análisis de ADN. Estas técnicas permiten hacer la identificación y separación de clones o grupos de clones (cepas que tienen un alto grado de relación genética) entre cepas de la misma especie recogidas de diferentes fuentes, sitios y momentos.

Una de las posibles causas de la baja eficacia de algunas vacunas existentes, a sido asignada a la falta de los tipos apropiados de antígenos protectores requeridos. Para conocer qué antígenos son los apropiados para que una vacuna sea efectiva son necesarios estudios epidemiológicos, de manera de determinar la diversidad de la población prevalente en la región estudiada y de analizar su dinámica en el tiempo.

En el caso específico de *M. bovis*, algunos componentes celulares característicos han sido propuestos como responsables de jugar un rol crucial durante una infección por una cepa patogénica. La membrana externa en este tipo de organismo Gram negativo es importante como interface entre el hospedador y el patógeno y como sitio de una variedad de factores de virulencia y resistencia (Buchanan y Pearce, 1979). Las proteínas que están expuestas sobre la superficie de la bacteria resultan ser antígenos útiles en el reconocimiento del patógeno por el sistema inmune del hospedador y también para la identificación clínica de la bacteria (Ostle y Rosenbusch, 1986). Los componentes de superficie son además factibles de cambiar en función de presiones selectivas del entorno o modificaciones en el material genético.

Aunque varios aspectos de la biología de *M. bovis* han sido estudiados, tales como su habilidad para adaptarse a condiciones ambientales cambiantes (Fenwick et al., 1996), el rol de la hemolisina y el pili en la patogenicidad (Bear y Moore, 1994), y la variación de fase del pili (Heinrich and Glasgow, 1997; Marrs et al., 1988), las búsquedas bibliográficas realizadas en el tema no arrojaron información relacionada a la extensión de la variación genética en poblaciones naturales de *M. bovis* así como tampoco sobre la variación en aquellos componentes de superficie celular que se considera que están implicados en la virulencia, en especial LPS (Shands, 1975), y PME (Buchanan y Pearce, 1979; Veglemoy et al., 1983). Estudios previos realizados por Johansen et al., (1990) describieron una variación en el perfil de LPS dentro de un pequeño número de cepas de *M. bovis*.

Los estudios a nivel molecular de bacterias patogénicas generalmente se han enfocado en la composición de la envoltura celular ya que es la superficie la que interactúa directamente con el hospedador. De hecho, es la estructura de la superficie bacteriana la que permite al patógeno evitar o vencer los mecanismos de defensa del hospedador (Smith, 1977). Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes característicos de la membrana externa de bacterias Gram (-) (Fig. 1) y le dan a la superficie fuertes propiedades hidrofílicas, las cuales son importantes para evadir la fagocitosis y en la capacidad para evitar un ataque inmune específico alterando la constitución antigénica a nivel superficial (Nikaido and Vaara, 1985). Los LPS, como moléculas de superficie, son relevantes para la estabilidad de la membrana externa y para la interacción de la bacteria con otros organismos y con el ambiente. El LPS es la endotoxina de las bacterias Gram (-). Se trata de un glicolípido complejo, compuesto por tres regiones (Fig. 2):

-lípidos A, que es la porción más proximal y de carácter hidrofóbico. Esta porción se encuentra dentro de la membrana externa de las bacterias Gram (-). Está formado por un disacárido constituido por dos unidades de glucosamina el cual está unido a 6 ácidos grasos (ác. palmítico, palmitoleico, araquidónico, estearico, oleico y margárico, siendo este último el más prevalente) (Araujo et al., 1989).

-región intermedia, llamada oligosacárido medular o core. Posee dos tipos de azúcares exclusivos de Gram (-): 2-ceto-3-desoxioctulosónico (KDO) y L-glicero-D-manoheptosa.

-región distal (cadena lateral específica, polisacarídica), a base de repeticiones de unos pocos azúcares. Es de carácter hidrofílico y constituye el antígeno somático O de las bacterias Gram (-). Esta porción se proyecta desde la superficie, hacia el exterior de la membrana externa.

De todas estas regiones del LPS, la única indispensable para la viabilidad es el lípido A (Hurley, 1995). En la Fig. 3 se observa un esquema de la arquitectura del LPS en bacterias Gram (-). Los LPS que poseen antígeno O se denominan LPS tipo liso. Este tipo de LPS cuando se resuelve en un gel de SDS-PAGE muestra un bandeo tipo escalera característico; en tanto que los LPS que no poseen antígeno O, los cuales se denominan tipo rugoso, presentan un perfil diferente sin las bandas tipo escalera.

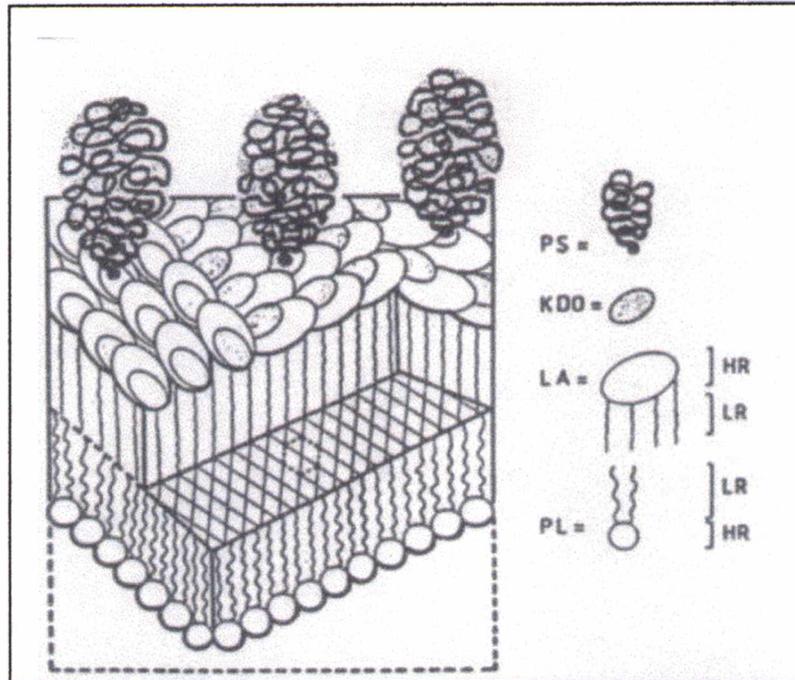


Fig. 1. Vista esquemática de la membrana externa de las bacterias Gram (-) que ilustra la ubicación relativa de los distintos componentes en relación con el ambiente externo (arriba). PL, fosfolípidos; LA, lípido A (HR, región hidrofílica; LR, región lipofílica); KDO, ácido 2-ceto-3-desoxioctulosónico y PS, polisacárido (Tomado de Hurley, J.C., 1995).

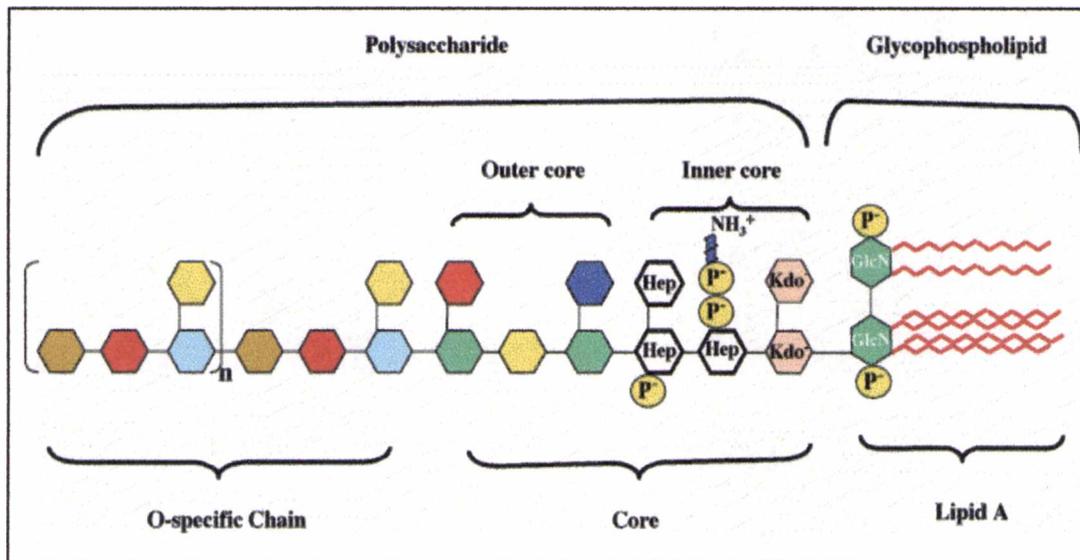


Fig. 2. Representación esquemática de la estructura química del LPS de enterobacterias. Abreviaturas: GlcN, glucosamina; Kdo, ác. 2-ceto-3-desoxioctulosónico; Hep, L-glicero-D-manoheptosa; P, fosfato; líneas en zig-zag, ácidos grasos.

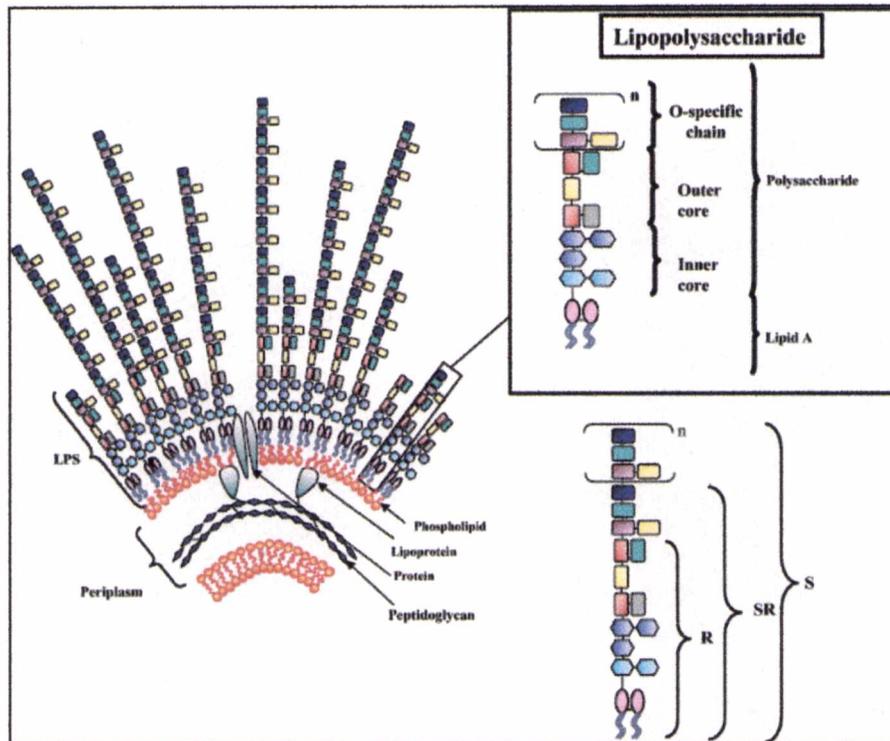


Fig. 3. Representación esquemática de la cubierta celular de enterobacterias Gram-negativas (izquierda) y estructura de un LPS (derecha). R, SR y S indican las estructuras de los LPS tipo Rugoso, Semi-Rugoso (con una sola subunidad de cadena O) y Liso, respectivamente .

La identificación y clasificación de bacterias es de crucial importancia en áreas como epidemiología, ecología, industrias, agricultura y medicina. Actualmente distintos métodos fenotípicos y genéticos están siendo utilizados para la identificación y clasificación microbiana, los cuales permiten un cierto nivel de clasificación filogénica, desde género, especie, subespecie hasta biovariedad de la cepa estudiada (Tabla 1). Cada método tiene sus ventajas y desventajas en lo que se refiere a aplicación, reproducibilidad, requerimiento de equipos y grado de resolución (Akkermans et al., 1995).

Tabla 1. Resolución relativa de varias técnicas de análisis de ADN y de fingerprinting

Familia	Género	Especie	Subespecie	Cepa
Secuenciamiento de ADN				
Secuenciamiento de subunidad 16S ribosomal				
	Reasociación ADN-ADN			
		Perfiles de proteínas de célula entera		
		AFLP		
		Rep-PCR		
FTIR				

Generalmente, los métodos basados en análisis de ADN aparecen como las formas más seguras, simples y baratas para identificar y clasificar microorganismos. De hecho, la designación en género y especie ha estado tradicionalmente basada en métodos de hibridación ADN-ADN y la filogenia moderna se basa cada vez más en el análisis de la secuencia 16S de ARNr. Las técnicas de fingerprint permiten diferenciar especie, subespecie y cepa, tal como los perfiles de proteínas de célula entera. AFLP (amplified fragment length polymorphism), es una técnica de fingerprint genómico basada en la amplificación selectiva de un grupo de fragmentos de ADN generados por digestión con enzimas de restricción. Dentro de estos procedimientos de análisis de fingerprints se encuentra la técnica que se denomina rep-PCR. Bajo condiciones estandarizadas de trabajo, este método es muy confiable, reproducible, rápido y altamente discriminatorio (Lows et al., 1994; Versalovic et al., 1994). Esta técnica aprovecha el hecho de que a lo largo del genoma bacteriano se han identificado elementos o secuencias repetitivas presentes en múltiples copias en los genomas de la mayoría de bacterias Gram (-) y muchas Gram (+). Estas secuencias poseen repeticiones de bases centrales e invertidas, altamente conservadas. En enterobacterias se han descrito elementos repetitivos de dos clases: clase I o secuencias **REP** (Repetitive Extragenic Palindromic) y clase II o secuencias **ERIC** (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (Stern et al., 1988; Hulton et al., 1991). A partir del conocimiento de estas secuencias se diseñaron primers (Tabla 2) dirigidos para lograr la amplificación selectiva de distintas regiones del ADN

genómico localizadas entre los elementos REP o ERIC de diferentes bacterias, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (de Bruijn, 1992).

Tabla 2. Secuencias de los primers utilizados en las rep-PCR. Las letras I indican inosinas (de Bruijn, 1992).

Primer	Secuencia (5' → 3')	Tamaño de la secuencia genómica (pb) (pares de bases)
REP 1	IIICGICGICATCIGGC	35-40
REP 2	ICGICTTATCIGGCCTAC	35-40
ERIC 1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	124-127
ERIC 2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	124-127

Los protocolos correspondientes son llamados REP-PCR y ERIC-PCR y en forma general se los conoce como rep-PCR.

Los productos obtenidos mediante PCR consisten en una mezcla compleja de fragmentos de ADN de distintos tamaños. Esta mezcla puede ser resuelta mediante electroforesis en gel de agarosa, en donde se obtienen los perfiles de bandas o fingerprint de ADN característicos de cada cepa analizada. Cada perfil puede ser comparado a un código de barras que permite diferenciar especie, subespecie y cepa de cada aislamiento bacteriano. Si se controlan las condiciones de obtención de estos perfiles, esta metodología se vuelve reproducible y altamente específica para caracterizar genomas bacterianos. La misma ha sido utilizada exitosamente en distintas áreas para estudios de diversidad (Baldy-Chudzik, 2001; Genersch and Otten, 2003; Sikora and Redzepovic, 2003; Versalovic et al,1994). La última etapa de este trabajo consiste en un análisis, asistido por computadora, de los fingerprinting generados en cada rep-PCR. Estos perfiles son introducidos en un programa tal como GelCompar 4.1, para ser analizados según algoritmos de análisis de

cluster. El análisis de cluster es la manera de hallar grupos dentro de una información determinada y la clasificación de microorganismos y taxonomía son las principales aplicaciones de esta metodología.

El objetivo del trabajo que se presenta en este capítulo fue evaluar el grado de diversidad e identificar relaciones de similitud dentro de una población de aislamientos de *M. bovis* obtenidos de distintas regiones de Argentina, entre 1993 y 1995. Para determinar el grado de heterogeneidad dentro de la población en estudio se compararon perfiles de ADN, de LPS y de PME, incluyendo en el análisis tres cepas de colección. Las bacterias fueron aisladas de lesiones oculares de animales enfermos con síntomas de QIB y caracterizadas como pertenecientes a la especie *M. bovis* mediante el empleo de pruebas bioquímicas.

Este análisis de biodiversidad buscó aportar conocimientos básicos sobre aspectos epidemiológicos de esta enfermedad en Argentina. Como resultado del mismo se logró: 1) obtener información sobre estabilidad de componentes de superficie celular de *M. bovis*; 2) establecer una variación a nivel genético, y 3) definir el grado de variabilidad dentro de la población analizada, lo cual permitió comparaciones con otros estudios internacionales. Esto constituye la base para otros estudios orientados al entendimiento de los mecanismos de virulencia de este patógeno y de la inmunidad del hospedador contra este.

Materiales y métodos

Aislamientos bacterianos y condiciones de crecimiento

Se incluyeron en el estudio dos cepas de *M. bovis* provenientes de la Colección del Instituto Pasteur (CIP, Paris), *M. bovis* bhe 64.9 y *M. bovis* ehi 70.39, y una proveniente de Alemania, *M. bovis* 5-BUTCH, junto con 57 aislamientos locales de *M. bovis* (Tabla N° 3). Los aislamientos fueron gentilmente cedidos por el Dr. Gustavo Zielinski del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Marcos Juárez, Córdoba, Argentina y

fueron obtenidos de ganado con síntomas de QIB en Argentina, entre 1993 y 1995. Estos aislamientos clínicos fueron caracterizados como *M.bovis* por tests morfológicos, culturales y bioquímicos (Manual Bergey, 1994) en dicha institución. La muestra de aislamientos representó una vasta área geográfica en la Argentina (Fig. 4). Diez aislamientos fueron serotipificados en su tipo de pili por el grupo de la Dra. J. L. Tennent, (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Parkville, Vic., Australia). Las bacterias fueron mantenidas liofilizadas y cultivadas en agar tripticosa de soja conteniendo 7% (v/v) de sangre de caballo desfibrinada (TSAB, Merck, Germany). Todas las bacterias fueron además mantenidas a -70°C en glicerol al 20% en caldo infusión cerebro corazón (BHIB, Merck). Subsecuentemente, las bacterias fueron cultivadas en TSAB e incubadas toda la noche a 37°C .

Tabla N° 3. Aislamientos de *Moraxella bovis* empleados en este trabajo

Procedencia	Fecha de aislamiento	Designación (serotipo)*
Córdoba	Febrero-93	CM1b (E)*
	Marzo-93	Ce3a (G)*, HR2 (C)*, Jp6, LC12
	Abril-93	80-4
	Noviembre-94	1194-03 (A)*, 1194-04 (G)*, 1194-29, 1194-142, 1194-145, 1194-20, 1194-42, 1194-30, 1194-140
	Diciembre-94	1294-16, 1294-175, 1294-187
	Enero-95	195-130, 195-136, 195-152, 195-50, 195-128, 195-145, 195-29
	Febrero-95	295-177, 295-18, 295-175, 295-10, 295-19, 295-57
	Marzo-95	395 60, 395 11, 395 12
	Abril-95	495 12, 495 152, 495 160
Bs. As. (1)	Marzo-95	1116
	D	1143
Bs. As. (2)	Marzo-95	1125, 1127
	Abril-95	1141
	D	B1 (G)*, B 5 (G)*, B18 (F)*, B 19 (C)*, B27 (A)*
San Luis	Marzo-95	SC 3, SC 4, Smi 4, Smi 6, Smi9, SM 4, SM10, SM12, SC1
	Abril-95	CH 1
Alemania	D	5-BUTCH
CIP	D	bhe 64.9, ehi 70.39

(1) = Lobos

(2) = Balcarce

D = desconocido

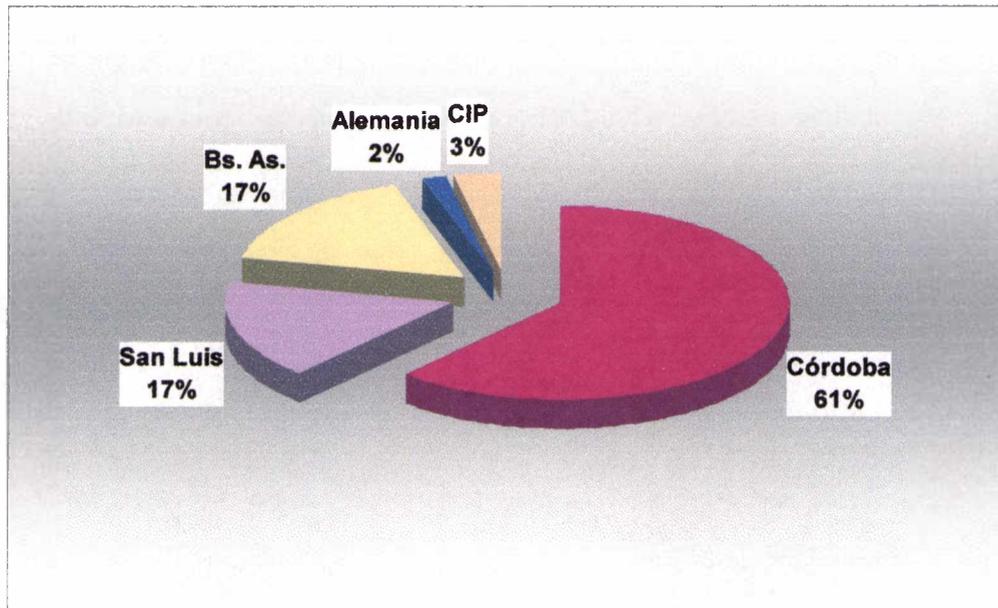


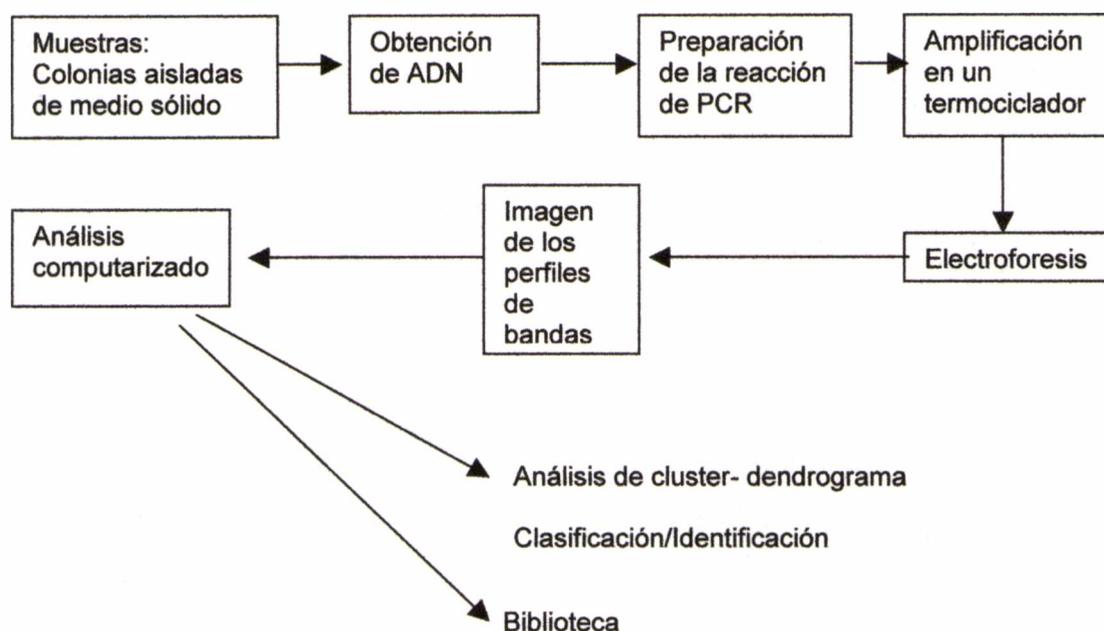
Fig. 4. Distribución de las muestras

Fingerprint de ADN

El desarrollo experimental comprende cuatro etapas:

- 1) Obtención de las muestras y preparación del ADN molde.
- 2) Reacción de PCR.
- 3) Análisis de los productos de amplificación en geles de agarosa.
- 4) Interpretación de los resultados (fingerprinting).

Esquema del protocolo de trabajo

**Obtención de las muestras**

El ADN de los distintos microorganismos a analizar se obtuvo a partir de cultivos puros de 24 h de incubación en medio TSAB (Merck, Germany). Para la obtención del ADN molde se siguió el protocolo que se describe a continuación. Cada extracción se realizó por cuatuplicado sobre cultivos independientes

Protocolo para la obtención de ADN total a partir de cultivos puros en medio sólido:

Para la preparación del ADN se empleó el método rápido descrito por Alippi y Aguilar (1998) en el cual se parte de colonias individuales. Se resuspendieron 3 a 5 colonias en 250 μ l de NaCl 1 M. Se vortexeó y se incubó 20 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugó 2 minutos a 14000 rpm (microcentrífuga Hettich EBA 12, Germany) y se descartó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 200 μ l de agua bidestilada estéril. Nuevamente se vortexeó y se centrifugó 2 minutos a 14000 rpm, descartándose el sobrenadante. Al pellet se le agregó 200 μ l de suspensión acuosa 6 % p/v de

resina Chelex 100 (Bio-RAD), que tiene la capacidad de quelar el ADN (Walsh et al., 1991). Se incubó 15 minutos a 56 °C. Se vortexeó y luego se incubó 8 minutos a 98 °C. Así se obtuvo el ADN templado. Luego se vortexeó y se conservó a -20 °C.

Preparación de las reacciones de PCR

Se usó el ADN genómico total de cada aislamiento y de las cepas de colección como templado para las reacciones de PCR con los primers REP y ERIC, de acuerdo al procedimiento descrito por de Bruijn (1992).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 15 μ l, constituido por 4 μ l de la muestra de ADN (ADN templado) y 11 μ l de la mezcla de reacción (master mix). La composición de esta mezcla de reacción es 1.5 μ l de buffer de la polimerasa (Tris-HCl 10 mM pH 9, KCl 50 mM, Triton X100 0.1%), 1.5 μ l de mezcla de desoxiribonucleótidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP y dTTP cada uno 200 μ M) (Gibco), 1.8 μ l de MgCl₂ 3mM, 0.2 μ l de Taq DNA polimerasa (Promega) 0.55 U, 1.0 μ l de cada uno de los primers en el caso de primer ERIC (ERIC1 y ERIC2 ,1.5 μ M) o 0.7 μ l de cada uno de los primers en el caso de primer REP (REP1 y REP2, 1.5 μ M). En todos los casos la master mix es llevada a un volumen final de 11 μ l con agua bidestilada.

La mezcla de reacción de PCR fue cubierta con una capa de aceite mineral e incubada en un ciclador térmico (Biometra Uno Thermoblock). Para los primers REP, los ciclos usados fueron los siguientes: 1 ciclo a 95°C por 5 min, 35 ciclos (a 94°C por 1 min, a 40°C por 1 min, y a 65°C por 8 min) y luego 1 ciclo a 68°C por 16 min. Para los primers ERIC, el primer ciclo a 95°C por 5 min fue seguido por 35 ciclos (a 94°C por 1 min, a 52°C por 1 min y a 65°C por 8 min); luego 1 ciclo a 65°C por 16 min.

Análisis de los productos de amplificación en geles de agarosa

El ADN amplificado se analizó mediante una electroforesis horizontal en geles de agarosa (grado electroforético, Sigma A-9539) al 1.2 % (17 x 13 cm) sembrando una alícuota de 5-10 μ l de la mezcla de reacción de PCR. El gel se

prepara de acuerdo al siguiente protocolo: se disuelve 1-1.5 g de agarosa en 100 ml de buffer TBE 1x (Tris base: 10.8 g/l, Ácido Bórico: 5.5 g/l, 4 ml EDTA 0.5 M (pH 8.0)). La suspensión se hierva en horno de microondas a máxima potencia (850 W) durante 2 minutos, se agrega 1 µl de Bromuro de Etidio (BrEt) 10 mg/ml, y finalmente se vuelca en el sistema portageles de una cuba Bio-Rad (Mini Sub DNA Cell) a una temperatura aproximada de 45°C. Una vez lograda la gelificación se procede a la siembra de las muestras con buffer de siembra (Promega G188A). El volumen de siembra fue determinado en geles preliminares de tal manera de igualar, aproximadamente, las concentraciones de ADN amplificado en cada calle. Según las pruebas realizadas, las mejores condiciones para correr las muestras resultaron: 80 V en buffer TBE 0.5 X durante 1,5 hs y bromuro de etidio como revelador. Es importante mantener estas condiciones para garantizar la reproducibilidad de cada corrida electroforética. Las bandas de amplificación se visualizan por iluminación del gel con luz ultravioleta (Transiluminador Fotodyne).

Marcadores de peso molecular utilizados

Los marcadores de peso molecular que se utilizan en las electroforesis en geles de agarosa son: ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* + *HindIII*, lo cual resulta en fragmentos de restricción de un tamaño de 21.227, 5.140, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375 y 947 pares de bases.

Interpretación de los resultados

Las bandas resultantes de cada muestra se analizaron comparativamente con el programa GelCompar (versión 4.1: Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Este programa permite almacenar y manejar gran cantidad de información, lo que ha hecho posible que la técnica de fingerprint de ADN sea útil para identificar microorganismos. Básicamente el procesamiento de un gel bajo este programa consta de los siguientes pasos:

- **Conversión:** los geles son fotografiados con una cámara Kodak Digital Science. Estos deben ser convertidos al formato GelCompar. Es en esta primera etapa en donde los geles son reconocidos, convertidos y leídos,

uniformando los perfiles (resolución) y agregando la información específica a cada caso. El resultado es un archivo GelCompar “crudo”.

- **Normalización:** esta es una etapa muy importante y crítica en el proceso de crear una base de datos, porque a pesar de mantener las más estrictas condiciones experimentales, existen siempre discrepancias entre y dentro de los geles. La normalización involucra una corrección de la posición de las bandas, comparándolas con patrones de peso molecular. Estos patrones son incluidos en cada corrida electroforética y sirven para alinear las bandas de manera tal que cada pico de idéntico peso molecular ocupe siempre la misma posición física. El resultado es una base de datos confiable para la siguiente etapa: el análisis y la comparación de estos perfiles.
- **Análisis:** es la fase final e involucra la construcción de dendrogramas cuyos fines son: evidenciar grupos de perfiles relacionados (establecer la similitud u heterogeneidad de la población estudiada), identificar perfiles desconocidos por comparación con la base de datos o con otras librerías, y cuantificar el tamaño y concentración de las bandas. Uno de los métodos más comunes de agrupamiento es la construcción de una matriz de similitud por la técnica de clustering llamada Ward. El método de Ward (1963) fue diseñado con la intención de minimizar la varianza dentro de los conglomerados (en este sentido es semejante al test estadístico de ANOVA). El procedimiento parte del análisis de la suma de cuadrados de cada objeto o variable con respecto a la media del conglomerado donde está agrupada. De este modo dos variables o dos conglomerados se agrupan siempre y cuando la combinación de sus sumas de cuadrados sea una cantidad mínima con respecto a cualquier otra combinación posible. Para medir la similitud entre estos tipos de perfiles, con gran cantidad de bandas, se busca usar una métrica apropiada que genere una medida robusta y confiable. En este caso se usó el coeficiente de Dice (S_D), que es un coeficiente de comparación de bandas, para calcular la similitud entre todos los posibles pares de bandas. El coeficiente de Dice se basa en la presencia de una banda, su posición y le asigna mucho peso a las bandas comunes.

Preparación de PME

Para la preparación de proteínas de membrana externa, se partió de bacterias crecidas a 37°C durante alrededor de 8 h en 100 ml del medio de cultivo BHI (Oxoid, England) en frascos erlenmeyers de 1000 ml, agitados a 120 rpm. Las PME fueron obtenidas por tratamiento con liozima-shock térmico, como fue descrito por Maagd y Lugtenberg (1986) con solubilización diferencial de envolturas celulares con Tritón X-100 (Schnaitman, 1971), como se explica seguidamente. En las bacterias Gram (-) la capa de mureína puede ser atacada por la liozima cuando se las trata con EDTA. Este agente, al quelar el ión Ca⁺⁺, libera una parte de los lipopolisacáridos, desorganiza la membrana externa y permite la acción de la enzima. La liozima rompe el enlace beta glucosídico de la mureína. El tritón X-100 es un detergente no iónico que solubiliza membranas citoplasmáticas en presencia de Mg⁺⁺ (Fig. 5).

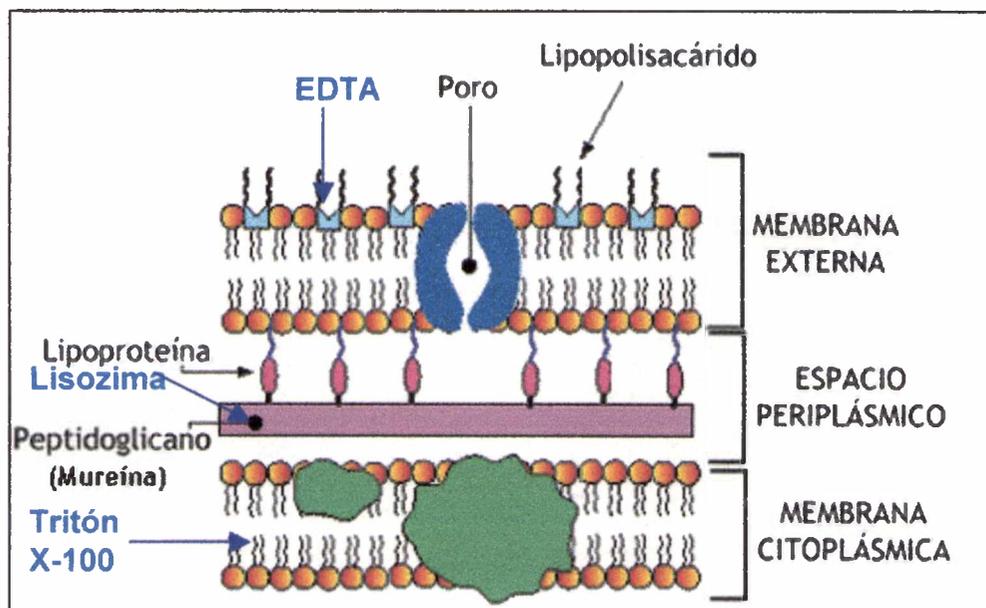


Fig. 5. Modelo de pared celular de bacterias Gram negativas. Se muestra el sitio de acción de EDTA, Liozima y Tritón X-100. (Tomado de Raisman y Gonzalez, 1998)

Para la extracción de las PME, las células provenientes de 10 ml de un cultivo (DO=10) se concentran por centrifugación (8000 x g, 10 min, 4°C), se lavan en PBS y luego se resuspenden en buffer Tris 10 M/EDTA 20mM al que se le adiciona 100 µl de lisozima (9 mg/ml). Se mezcla bien y se deja actuar 1 h a temperatura ambiente. Luego se rompen las células por congelamiento a -70°C, por 1 h, y posterior descongelamiento. Se adicionan 800 µl de MgCl₂ 80mM y las células enteras y los grandes fragmentos se remueven por centrifugación (10000 rpm, 10 min, 4°C). El sobrenadante se recupera y las membranas se sedimentan por centrifugación (20000 x g, 1h, 4°C). El pellet se resuspende en 1 ml de HEPES 10 mM/Tritón X-100 2%/ y se incuba a temperatura ambiente durante 30 min. Con esto se solubilizan las membranas citoplasmáticas. El material insoluble que queda (PMEs) se sedimenta por centrifugación (20000 x g durante 1 h a 4°C) y se repite la extracción con Tritón X-100. El pellet final se resuspende en 100 µl de H₂O bidestilada.

Obtención de LPS

1- Método ETP (resina)

Los LPS fueron obtenidos por el método ETP (EDTA/TEA/polimixina B), un procedimiento rápido para análisis electroforético descrito por Valverde y colaboradores (1997). Brevemente, 20 mg de células húmedas, obtenidas de cultivos de 8 h en medio BHI, fueron resuspendidas en 100 µl de Trietilamina 0.1 M/ EDTA ácido, pH 7.09. El EDTA es un agente liberador de LPS (Leive, 1965) y la trietilamina (TEA) actúa como fuerte dispersante de LPS (Galanos y Lüderitz, 1975). Se mezcló bien para homogeneizar y se dejó en vortex suave durante 15 min. Luego se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min., a 4°C para remover las células enteras y grandes fragmentos. Al sobrenadante que contiene el extracto crudo EDTA-TEA se le agregó 50 µl de resina de unión polimixina B (Affi-Prep Polymixin, Bio-Rad, Hércules, CA). La polimixina B remueve eficientemente LPS (Morrison y Jacobs, 1976) uniéndose en forma selectiva al lípido A (uno de los principales componentes del LPS). Se incubó 15 min. con vortex suave, luego se centrifugó a 14000 rpm, 2 min. a 4°C y se separó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 80 µl de buffer K₂HPO₄

100 mM/NaCl 0.15 M y se agitó por inversión. Se centrifugó nuevamente a 14000 rpm, 2 min., a 4°C y al pellet se lo trató con una suspensión de Proteinasa K en PBS (200 µg/ml), dejándolo 1 h. a 55°C. Posteriormente, los LPS fueron liberados para ser analizados por SDS-PAGE hirviendo la resina en buffer de muestra de Laemmli (Laemmli, 1970). Para esto se lavó la muestra con PBS y luego se agregó 80 µl de buffer de carga: 1 M de Tris/Cl (pH 6.8), SDS (2% p/v), glicerol (10% p/v), azul de bromofenol (0.001% p/v) y β-mercaptoetanol (5% p/v). Se incubó a 100°C durante 5 min. y se sonicó otros 5 min. Luego se centrifugó 2 min. a 14000 rpm y a 4°C, y la fase azul superior obtenida, que contiene el LPS, se sembró en un gel de poliacrilamida para ser analizada por electroforesis.

2- Método del fenol

Para obtener LPS de células de *M. bovis*, el otro procedimiento que se empleó fue el descrito por Westphal y Jann (1965). Brevemente, las células se separaron del sobrenadante por centrifugación a 8000 x g durante 10 min. El pellet celular se resuspendió en agua y se le agregó fenol, previamente calentado a 75°C en baño de agua, hasta una concentración final de 50% v/v. La mezcla se incubó durante 5 min. a 68-70°C con agitación constante. La mezcla se colocó en un baño de agua-hielo y se enfrió hasta 10°C, agitando. La emulsión se centrifugó 15 min. a 12000 x g y 4°C. La fase acuosa queda en la parte superior y la fenólica en la inferior con una interfase que contiene un precipitado gomoso. La fase acuosa opalescente que contiene el LPS se separó y se dejó 0-4°C. La fase fenólica y el material de interfase fueron sometidas a una segunda extracción con un volumen de agua igual al utilizado en la primera extracción. El agua se precalentó a 70°C y la mezcla también se calentó a esta temperatura durante 5 min. Luego se enfrió y se centrifugó. Las capas acuosas de ambas extracciones se juntaron y se dializaron contra cuatro litros de agua a 4°C durante toda la noche. Luego se centrifugó a 30000g durante 20 min. El pellet contiene la muestra de LPS.

Para llevar a cabo las electroforesis, las muestras de LPS se solubilizaron en buffer : 1 M de Tris/Cl (pH 6.8), conteniendo SDS (2% p/v), glicerol (10% p/v), azul de bromofenol (0.001% p/v) y β-mercaptoetanol (5%

p/v), y se las incubó a 100°C durante 10 min. Luego por cada 50 µl de suspensión de LPS, se agregaron 25 µg de Proteinasa K, disuelto en 10 µl de buffer de carga. Las mezclas se incubaron durante 1 h a 60°C, con agitación. Estas muestras luego se aplicaron al gel de poliacrilamida para ser analizadas por electroforesis.

Análisis electroforético de PME y LPS

Las PME y los LPS fueron separados por SDS-PAGE a través del sistema discontinuo de Laemmli (1970). Las PME fueron separadas en geles de resolución al 15% (w/v) y los LPS fueron separados en geles de resolución al 18% (w/v). Se usaron estándares de bajo PM de proteínas (Pharmacia). Las PME y los LPS fueron visualizados por tinción con Coomasie Brilliant Blue y tinción con plata respectivamente (Hitchcock y Brown, 1983).

Resultados

Análisis de perfiles de PME

En primer lugar se estudió si el perfil de PME de un aislamiento de *M. bovis* variaba durante un cultivo o en el transcurso de subcultivos. El objetivo fue tratar de establecer la estabilidad de la expresión de proteínas de cubierta en el contexto de un estudio de biodiversidad. Se compararon los perfiles de PME del aislamiento designado 1194-03 de *M. bovis* después de 6, 8, 12 y 14 h de crecimiento en el medio BHI y al cabo de 5, 10, 20 y 30 subcultivos en TSAB. Los perfiles de PME obtenidos de las células de *M. bovis* provenientes de las distintas condiciones analizadas no demostraron diferencias entre ellos (Fig. 6).

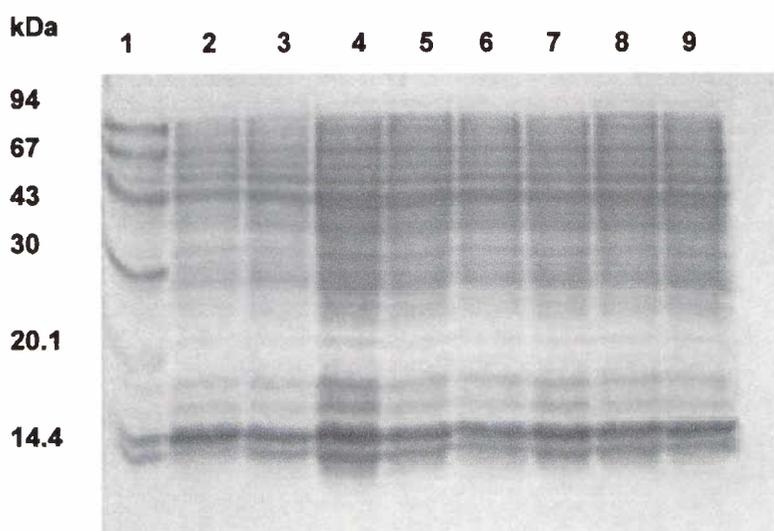


Fig. 6. Perfiles de proteínas de membrana externa de *M. bovis* obtenidos después de 6, 8, 12 y 14 h de crecimiento en BHI (líneas 2-5, respectivamente) y al cabo de 5, 10, 20 y 30 subcultivos en TSAB (líneas 6-9, respectivamente). Línea 1, estándar de proteínas de bajo peso molecular.

Se estudiaron posteriormente en forma comparativa los perfiles de PME de los 57 aislamientos de *M. bovis* disponibles. En el estudio se incluyeron dos cepas de colección del Instituto Pasteur de París (CIP) y una cepa aislada en Alemania. En las figuras 7 y 8 se muestran perfiles de PME de distintos aislamientos de *M. bovis*. Del análisis comparativo realizado se identificaron tres perfiles distintos de PME los cuales fueron designados tipo O1, O2 y O3 (Fig. 9). El perfil de PME designado como O2 resultó ser el más común dentro de la población analizada, ya que fue encontrado en 23 de los 60 aislamientos (38%) (Tabla 5 y Fig. 10). El perfil de PME tipo O2 difirió de las PME tipo O1 y O3 en la falta de la banda correspondiente a un polipéptido de 34.7 kDa (Fig. 9, Línea 7, flecha), la cual se encontró en mayor proporción en el caso del perfil tipo O3. Por otro lado, se encontró una proteína de 39kDa (Fig. 9, Línea 2, flecha) en las PME tipo O1 y O2 pero no en las PME tipo O3. Además, también se detectaron diferencias en el nivel de expresión en una proteína de 47 kDa (Fig. 9, línea 4, flecha) y una de 20.1 kDa (Fig. 9, línea 4, flecha). Ambas fueron expresadas en forma más abundante en células que expresan el perfil de PME tipo O2 que en los tipos O1 y O3. Se observaron resultados similares con la

proteína de 30 kDa, pero la proteína de 28 kDa estuvo presente menos comunmente que en las PME tipo O1 y O3. La proteína de 15.8 kDa (Fig. 9, línea 5, flecha) parece no tener la misma prominencia en la PME tipo O2 como se observa en perfiles tipo O1 y O3.

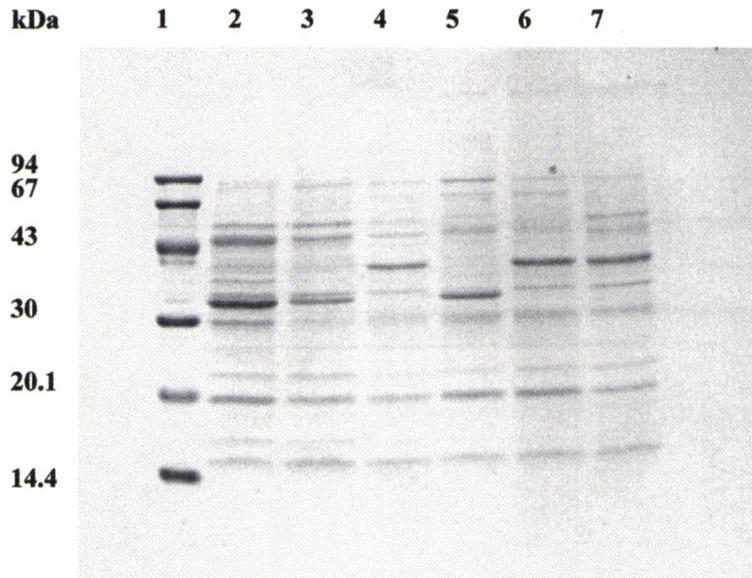


Fig. 7. Gel de SDS-PAGE de PME de varios aislamientos de *M. bovis*, teñido con Coomassie blue. 1, Estándar de proteínas; 2, *M. bovis* 1141; 3, *M. bovis* 80-4; 4, *M. bovis* 1127; 5, *M. bovis* HR2; 6, *M. bovis* B18; 7, *M. bovis* LCI2.

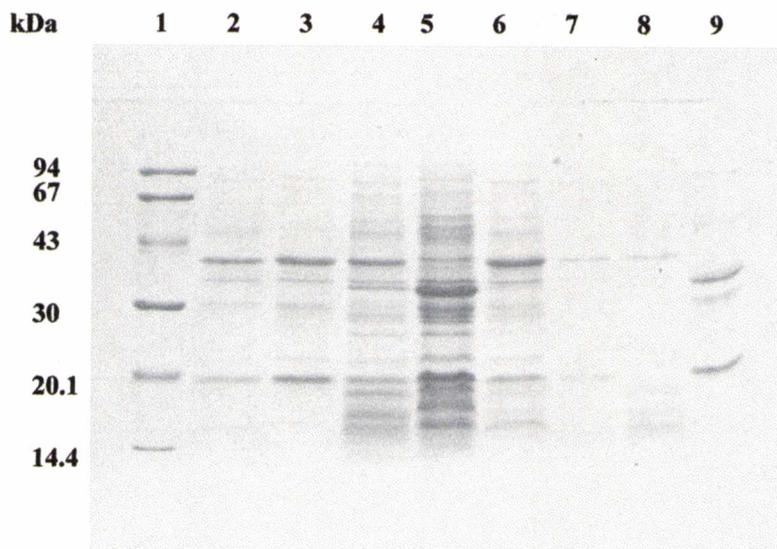


Fig. 8. Gel de SDS-PAGE de PME de aislamientos de *M. bovis*. 1, Estándar de proteínas; 2, *M. bovis* 1194 03; 3, *M. bovis* B27; 4, *M. bovis* B19; 5, *M. bovis* Ce3a; 6, *M. bovis* B5; 7, *M. bovis* 1194 142; 8, *M. bovis* JP6; 9, *M. bovis* HR2.

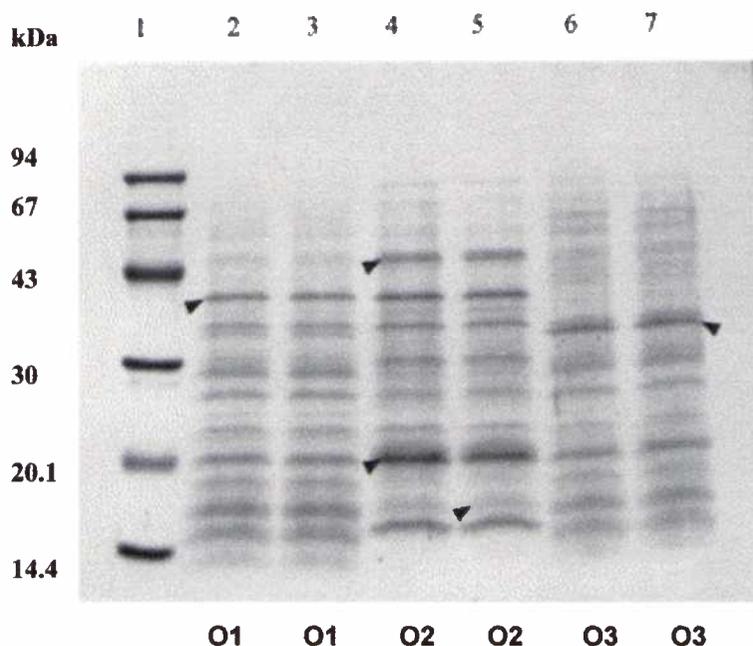


Fig. 9. Gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie-blue donde se muestran los tres tipos diferentes de perfiles de PME obtenidos de *M. bovis* designados tipo O1, O2 y O3 en las líneas 2-3, 4-5 y 6-7, respectivamente. Los aislamientos en las líneas 2-7 son los siguientes: 2, *Mb* 195-145; 3, *Mb* 1194-140; 4, *Mb* 1194-03; 5, *Mb* 1194-142; 6, *Mb* 495-152 y 7, *Mb* HR2. Las flechas indican diferencias encontradas en los perfiles de proteínas de cada grupo. En el carril 1 se sembró un patrón de proteínas de bajo peso molecular (Pharmacia) el cual está integrado por las siguientes proteínas: fosforilasa b (94 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20.1 kDa) y α -lactoalbúmina (14.4 kDa).

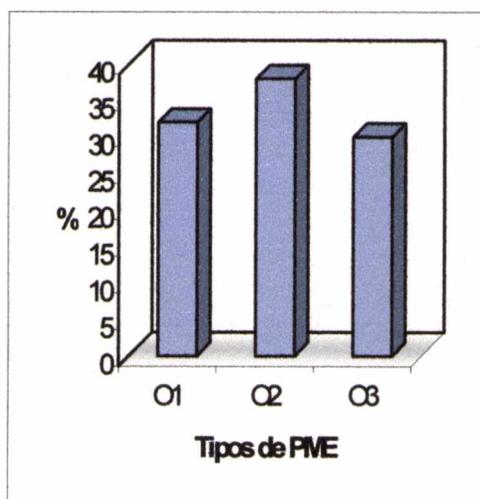


Fig. 10. Distribución del tipo de perfil de proteínas de membrana externa dentro de la población analizada en este trabajo. Los resultados provienen de cinco experimentos independientes los cuales arrojaron los mismos resultados.

Análisis de perfiles de LPS

Al igual que con las proteínas de cubierta en primer lugar se hizo un estudio para establecer si el perfil obtenido en el análisis del LPS se correspondía efectivamente con el fenotipo denominado rugoso. Se aisló LPS de *Bordetella pertussis* Tohama I 8132 (CIP) y de *Escherichia coli* ATCC 25922, los cuales son de tipo rugoso y liso (con antígeno O) respectivamente, y se los comparó con el de *M. bovis*. En la Fig. 11 se ve el antígeno O de *E. coli*, característico de LPS tipo liso, siendo este LPS distinto a los LPS de *Bp* y *Mb*, estos dos últimos de tipo rugoso.

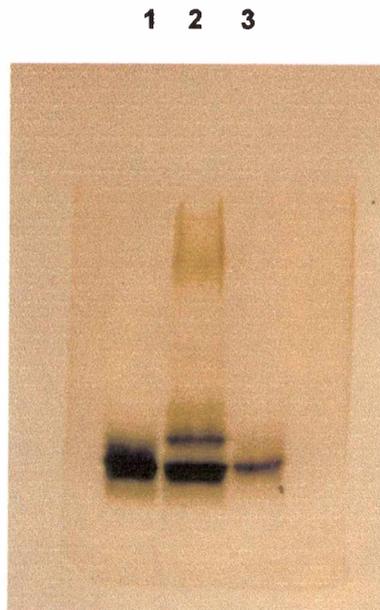


Fig. 11. Gel de SDS-PAGE de LPS: 1, LPS rugoso de *M. bovis*; 2, LPS liso de *E. coli*; 3, LPS rugoso de *B. pertussis*.

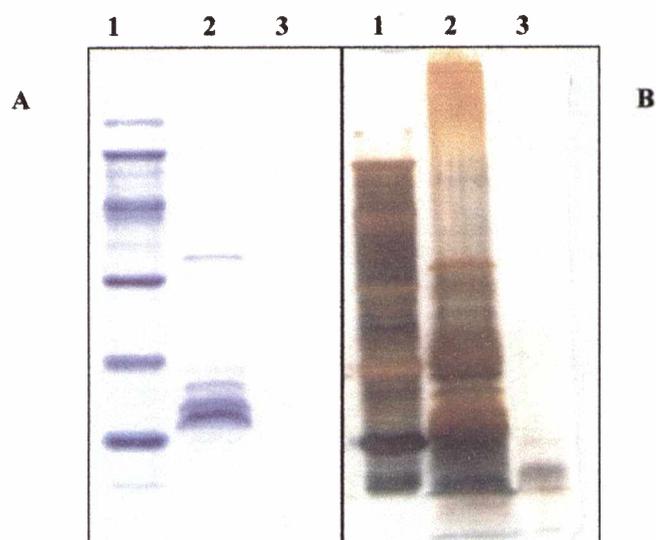


Fig. 12. Gel de SDS-PAGE de LPS de *M. bovis*. A) tinción con Coomassie blue para proteínas, 1, estándar de proteínas de bajo peso molecular; 2, extracción fenólica de LPS; 3, LPS obtenido por el método ETP; B) tinción con plata para proteínas, 1, estándar de proteínas; 2, extracción fenólica de LPS; 3, LPS obtenido por el método ETP.

Se realizó una prueba donde se comparó la extracción de LPS mediante el método descrito de Valverde y colaboradores con la resina polimixina y el método del fenol. En la Fig. 12 se observa una electroforesis en gel de poliacrilamida de LPS de *M. bovis*, en donde se ve comparativamente el LPS extraído por el método del fenol y el LPS obtenido por el método de la resina (método ETP). En el primer carril se sembró un estándar de proteínas de bajo peso molecular. En la Fig. 12A se observa el gel teñido con Coomassie blue, para proteínas, con el objeto de ver en que caso había contaminación con proteínas. Y en la Fig. 12B se observa el mismo gel teñido con plata, también para proteínas. De esta manera se corroboró que utilizando el método ETP para aislar LPS no hay contaminación con proteínas.

Se probaron distintas concentraciones de acrilamida para la electroforesis de lipopolisacáridos: 10%, 12%, 15%, 17% y 18% del gel de separación (el gel de concentración se mantuvo constante a 4%) y se comprobó que a mayor concentración era mayor la resolución de las bandas. Consecuentemente se utilizaron geles de 18% para el resto de los análisis de LPS.

Se estudió si el perfil de LPS analizado por SDS-PAGE del aislamiento de *M. bovis* 1194 03 se modificaba después de 6, 8, 12 y 14 h de crecimiento en BHI

y al cabo de 5, 10, 20 y 30 subcultivos en TSAB. Los análisis realizados no mostraron diferencias entre las muestras (Fig. 13).

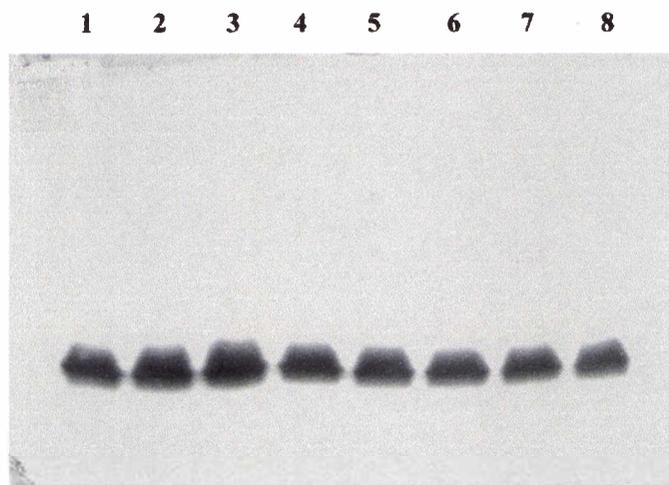


Fig. 13. Perfiles de LPS de *M. bovis* obtenidos luego de 6, 8, 12 y 14 h de crecimiento (líneas 1-4, respectivamente) y después de 5, 10, 20 y 30 subcultivos (líneas 5-8, respectivamente).

En las fig. 14 y 15 se observan perfiles de LPS de distintos aislamientos de *M. bovis*.

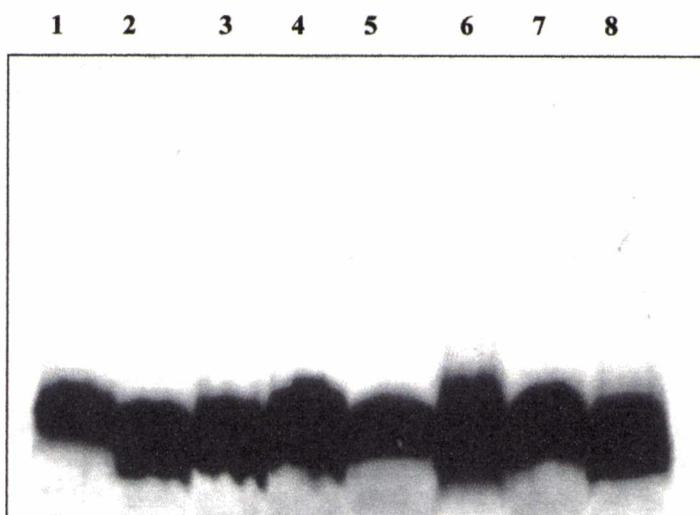


Fig. 14. Perfiles de LPS de *M. bovis* en geles de SDS-PAGE al 18%. 1, *M. bovis* B18; 2, *M. bovis* HR2; 3, *M. bovis* 1127; 4, *M. bovis* JP6; 5, *M. bovis* B1; 6, *M. bovis* B5; 7, *M. bovis* Ce3a; 8, *M. bovis* 5-BUTCH.

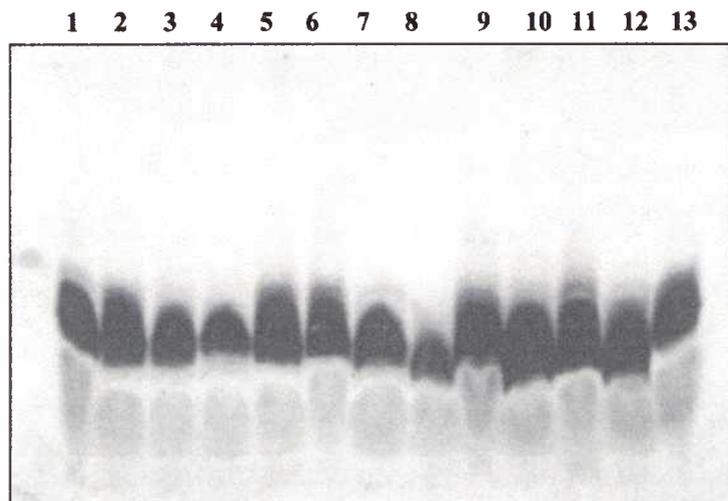


Fig. 15. Perfiles de LPS de *M. bovis* en geles de SDS-PAGE al 18%. 1, *M. bovis* B1; 2, *M. bovis* Ce3a; 3, *M. bovis* 1116; 4, *M. bovis* 1165; 5, *M. bovis* 1194 03; 6, *M. bovis* SM10; 7, *M. bovis* 295 57; 8, *M. bovis* bhe; 9, *M. bovis* ehi; 10, 5-BUTCH; 11, *M. bovis* HR2; 12, *M. bovis* 1127; 13, *M. bovis* SCI.

Los análisis de LPS de las tres cepas de colección y de los 57 aislamientos bajo estudio mostraron tres perfiles diferentes de LPS designados como tipo L1, L2 y L3, respectivamente (Fig. 16). Las diferencias entre los perfiles de LPS se basaron en la migración de la banda de mayor movilidad, la cual corresponde a la región del core-oligosacárido. El LPS tipo 2 representa el tipo más común (77%), mientras la ocurrencia de los tipos 1 y 3 son 15 y 8%, respectivamente (Fig. 17).

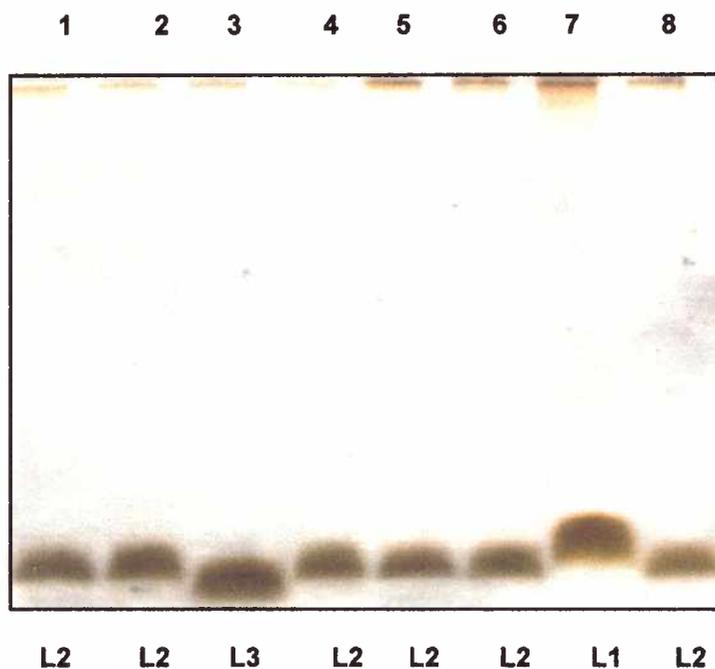


Fig. 16. LPS de *M. bovis* teñidos con plata mostrando LPS tipos L1 (línea 7), L2 (líneas 1,2,4,5,6 y 8) y L3 (línea 3). Los aislamientos de *M bovis* en las líneas 1-8 son los siguientes: 1, *Mb* JP6; 2, *Mb* 1194-140; 3, *Mb*, 195-136; 4, *Mb*195-152; 5, *Mb* 395-12; 6, *Mb* SC3; 7, *Mb* 495-152 y 8, *Mb* 295-18.

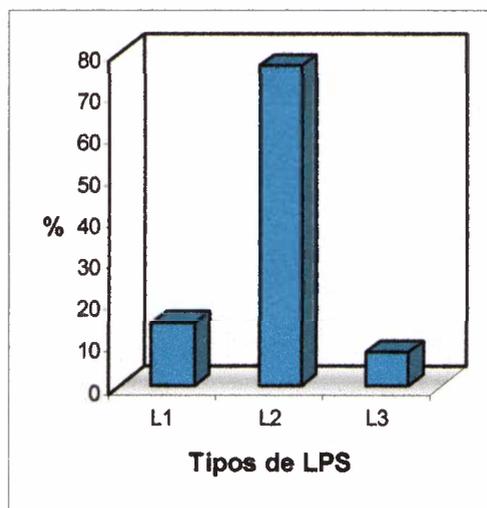


Fig. 17. Distribución de LPS. Los resultados provienen de cinco experimentos independientes los cuales arrojaron los mismos resultados.

Diversidad genética

La diversidad genética dentro de la población de *M. bovis* disponible fue analizada por perfiles de ADN genómico. En las Fig. 18, 19 y 20 se muestran perfiles de Rep-PCR de distintos aislamientos de *M. bovis*, y en las Fig. 21 y 22 se muestran "fingerprints" generados por ERIC-PCR. Los perfiles de amplificación representativos usando primers ERIC se muestran en la Fig. 23. Todos los productos de amplificación tienen una longitud entre 200 y 21.3 bp (pares de bases). En general, encontramos que los perfiles son bastante similares entre los 60 aislamientos y detectamos unas pocas bandas diferentes entre ellos (resaltadas por flechas). Los perfiles fueron ordenados por similitud por el método de clustering de Ward y agrupados en cinco genotipos distinguibles denominados T1-T5. Los genotipos T1 y T5 fueron los más predominantes (55% y 28%, respectivamente) (Fig. 24). La relación genética entre los tipos electroforéticos se muestran en el dendrograma de la fig. 25. En conjunto, todos los aislamientos pudieron ser agrupados en dos clusters principales (T1, T2, T3 y T4, T5), cada uno con un grado de similitud de alrededor del 95%. También examinamos nuestra colección por primers REP, y encontramos que estos primers dieron similares resultados, dando consistentemente los cinco grupos T1, T2, T3, T4 y T5.

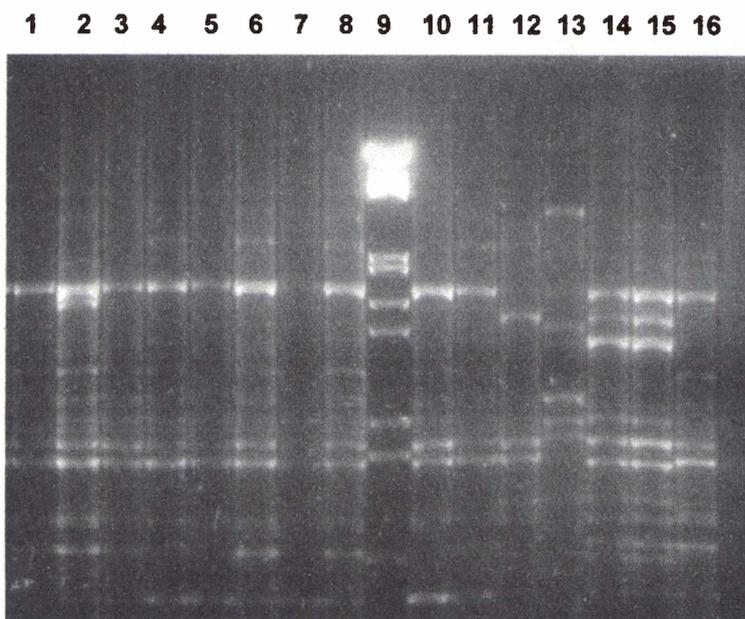


Fig. 18 . Fingerprint resultante de la aplicación de la técnica de Rep-PCR en aislamientos de *M. bovis*. 1, *Mb* SCI; 2, *Mb* 1194 04; 3, *Mb* Ce3a; 4, *Mb* 1194 03; 5, *Mb* 295 57; 6, *Mb* Smi4; 7, *Mb*

1116; 8, *Mb* 1143; 9, fago lambda/Hind III + EcoRI; 10, *Mb* B27; 11, *Mb* B19; 12, *Mb* ehi; 13, *Mb* 1165; 14, *Mb* 5-BUTCH; 15, *Mb* HR2; 16, *Mb* B1.

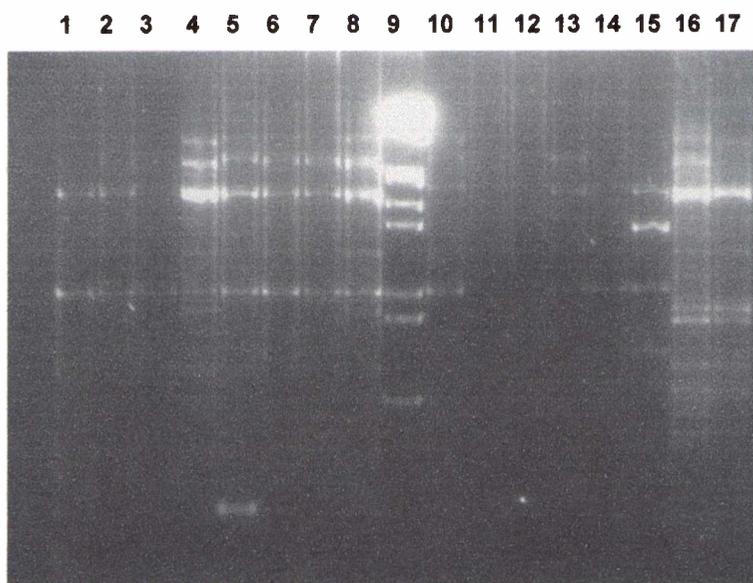


Fig. 19. Fingerprint resultante de la aplicación de la técnica de Rep-PCR en aislamientos de *M. bovis*. 1, *Mb* 1194 29; 2, *Mb* 195 136; 3, *Mb* 395 60; 4, *Mb* Smi4; 5, *Mb* 295 19; 6, *Mb* CHI; 7, *Mb* Smi6; 8, *Mb* 495 12; 9, fago lambda/Hind III + EcoRI; 10, *Mb* SM12; 11, *Mb* 495 152; 12, *Mb* SC4; 13, *Mb* 295 10; 14, *Mb* LCI2; 15, *Mb* HR2; 16, *Mb* 495 152; 17, *Mb* SC4.

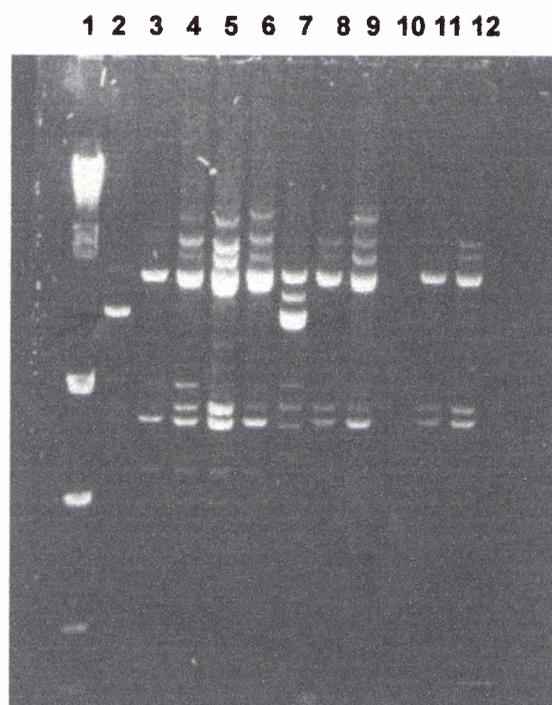


Fig. 20 . Fingerprint resultante de la aplicación de la técnica de Rep-PCR en aislamientos de *M. bovis*. 1, ADN del fago lambda /Hind III + EcoRI; 2, *Mb* 5-BUTCH; 3, *Mb* B1; 4, *Mb* LCI2; 5, *Mb* 1141; 6, *Mb* JP6; 7, *Mb* HR2; 8, *Mb* 80-4; 9, *Mb* 1127; 11, *Mb* CM1b; 12, *Mb* B18.



Fig. 21 . Fingerprint resultante de la aplicación de la técnica de ERIC-PCR en aislamientos de *M. bovis*. 1, fago lambda/Hind III+EcoRI; 2, Mb 1194 20; 3, Mb 1194 30; 4, Mb 1194 140; 5, Mb1294 187; 6, Mb1294 16; 7, Mb 195 29; 8, Mb 195 145; 9, Mb 195 50; 10, Mb 195 128; 11, Mb 195 152; 12, Mb 195 177; 13, fago lambda/Hind III+EcoRI; 14, Mb 295 18; 15, Mb 295 175; 16, Mb 395 11; 17, Mb 395 12; 18, Mb 495 160; 19, Mb SM4; 20, Mb 495 152; 21, Mb Smi9; 22, Mb ehi; 23, Mb 1194 29; 24, Mb HR2..



Fig.22. Fingerprint resultante de la aplicación de la técnica de ERIC-PCR en aislamientos de *M. bovis*. 1, fago lambda/Hindi + EcoRI; 2, Mb 1194 04; 3, Mb SCI; 4, Mb HR2; 5, Mb ehi; 6, Mb LCI2; 7, Mb SM10.

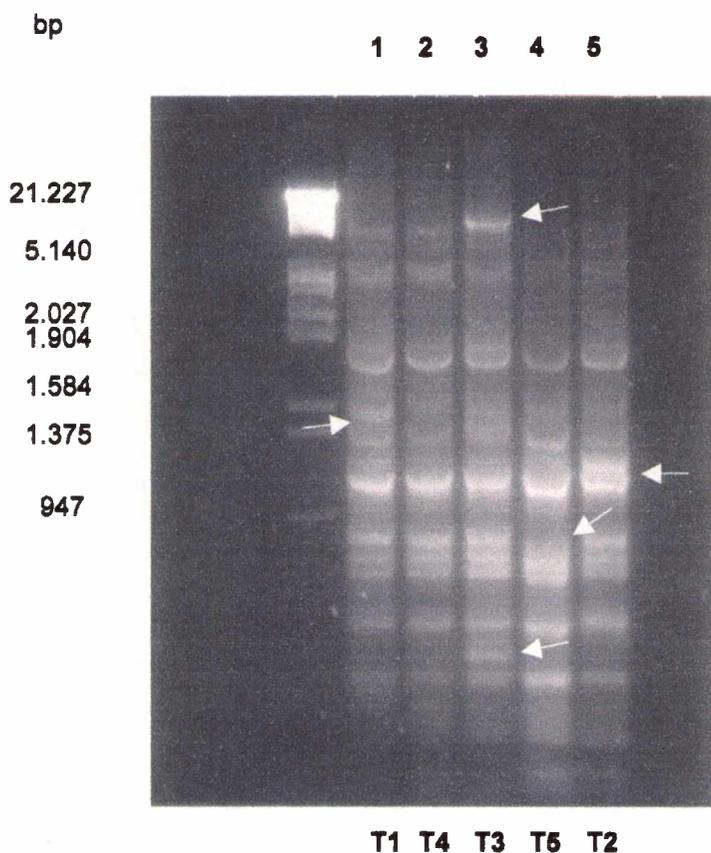


Fig. 23. Fingerprint empleando la técnica de ERIC-PCR representativo de cinco grupos distintos de aislamientos de *M. bovis*. Líneas: 1, Mb 495-152 (T1); 2, Mb Smi 9 (T4); 3, Mb ehi (T3); 4, Mb 1194-29 (T5) y Mb HR2 (T2). Las flechas marcan diferencias entre los aislamientos. En el margen izquierdo está indicada la medida de los fragmentos del ADN del fago lambda digerido con *EcoRI* + *HindIII*.

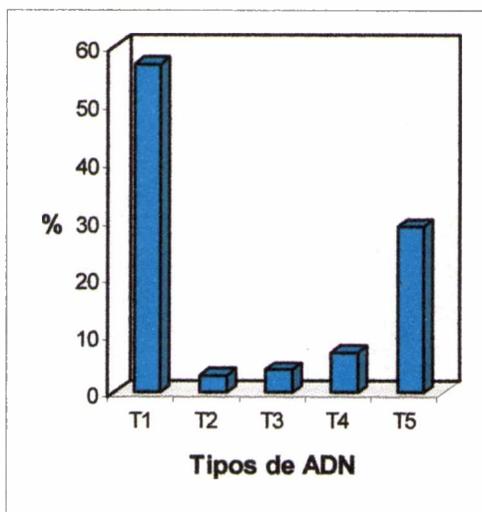


Fig. 24. Distribución de ADN. Los resultados provienen de cuatro experimentos independientes los cuales arrojaron los mismos resultados.

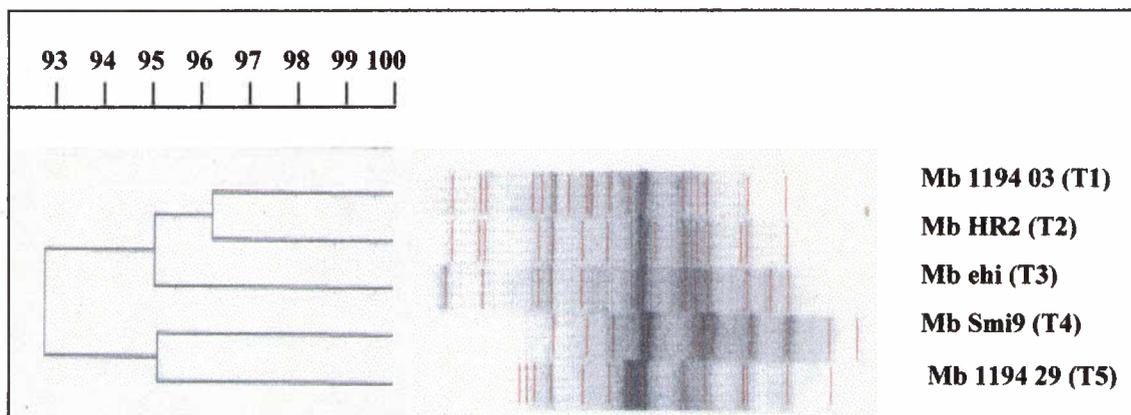


Fig. 25. Dendrograma de aislamientos de *M. bovis* derivado del análisis de ERIC-PCR utilizando el sistema de análisis asistido por computadora GelCompar, de Applied Maths, Kortrijk, Bélgica. El grado de relación genética relativa está indicado arriba del dendrograma en una escala de 93 a 100%. Cada brazo está seguido por un aislamiento representativo de cada grupo.

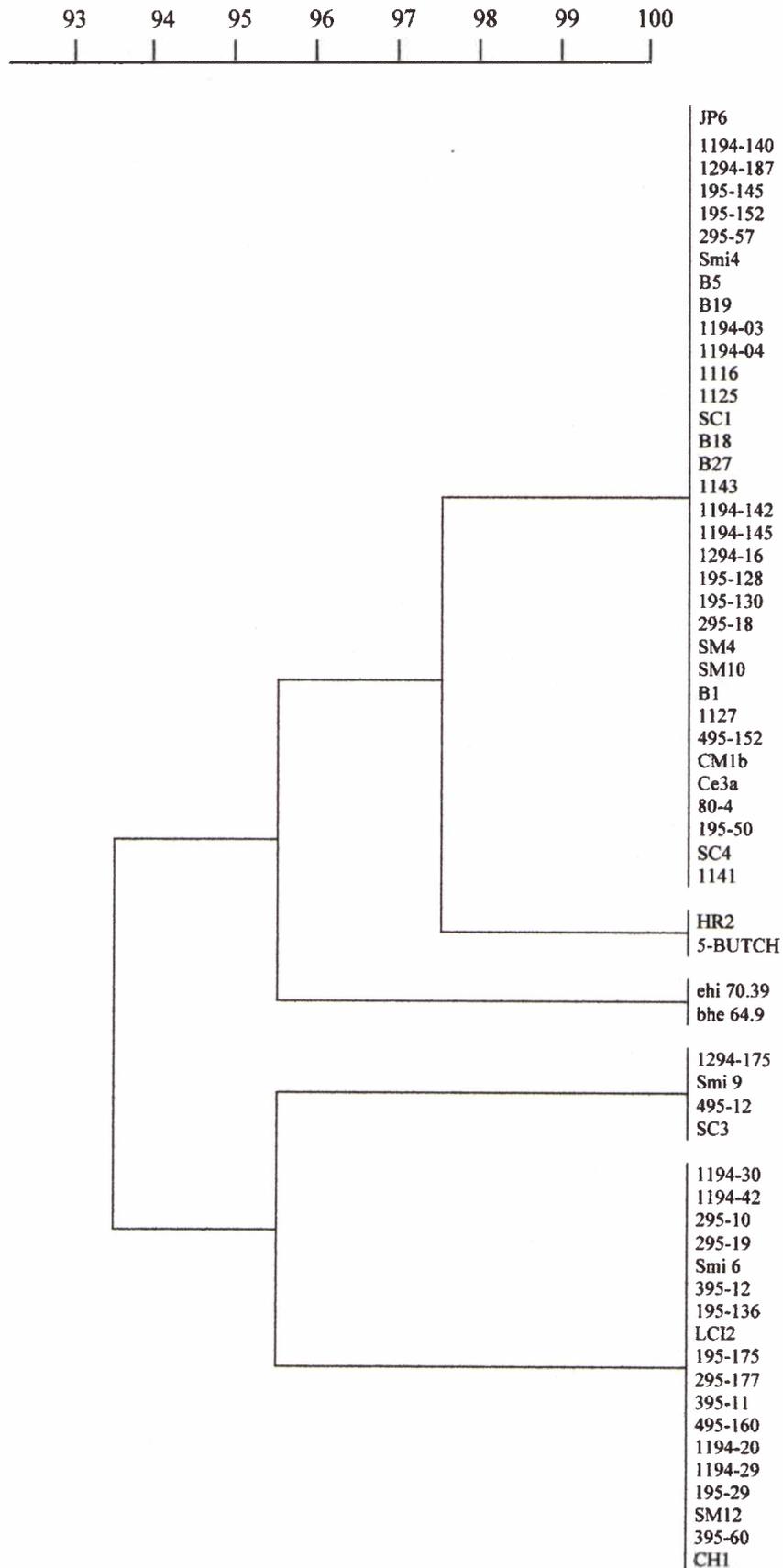


Fig. 26. Dendrograma editado del resultado del dendrograma de la Fig 25, a los efectos de aclarar los componentes de los clusters representados en el dendrograma, en el que se muestra un representante de cada grupo.

Variaciones asociadas con la persistencia de la bacteria en el hospedador

Dentro de los aislamientos estudiados, diez de los mismos provenían de cinco animales, de los cuales se hicieron aislamientos en dos ocasiones con una diferencia de 1-3 meses. Bajo las condiciones de campo, no fue posible asegurar si los aislamientos fueron consecuencia de persistencia microbiana o reinfección.

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos para los 10 aislamientos analizados. De la comparación de resultados, podemos inferir que, en el caso de LPS, solo en un animal encontramos diferencias entre los dos aislamientos de *M. bovis* consecutivos; mientras que en el caso del tipo de PME, tres animales mostraron variaciones. Las modificaciones en el tipo de ADN se observaron en aislamientos consecutivos de dos animales.

Tabla 4. Tipos de PME, LPS y ADN de *M. bovis* aislados de 5 animales en dos momentos diferentes.

Número de animal	Fecha de aislamiento	Tipo de		
		ADN	PME	LPS
145	Noviembre/1994.	T1	O2	L2
	Enero/ 1995.	T1	O1	L2
152	Enero/1995.	T1	O1	L2
	Abril/1995.	T1	O3	L1
29	Noviembre/1994.	T5	O3	L2
	Enero/1995.	T5	O3	L2
175	Diciembre/1994.	T4	O1	L2
	Enero/1995.	T5	O2	L2
12	Marzo/1995.	T5	O1	L2
	Abril/1995.	T4	O1	L2

Discusión

La clasificación dentro de la especie *M. bovis* se ha basado tradicionalmente en serología de pili sin embargo hasta el momento de la realización de nuestro trabajo nada había sido reportado sobre diversidad genética y variación de componentes de superficie en poblaciones de organismos de una región particular. En este trabajo se analizó la diversidad dentro de una población de *M. bovis* aislada durante 3 años de diversos lugares geográficos de Argentina, la cual se comparó con cepas obtenidas de colecciones internacionales, utilizando tres criterios distintos: perfiles de PME, LPS y fingerprinting de ADN. Los análisis de perfiles de PME y LPS han sido ampliamente usados para examinar variación de cepas dentro de especies bacterianas aisladas de procesos infecciosos en animales o humanos (Aucken and Pitt, 1993; Davies and Quirie, 1996; Nishimura et al, 1996). Los análisis de fingerprinting de ADN genómico fueron hallados útiles para caracterizar poblaciones microbianas de diversas especies (Baldy-Chudzik, 2001; Genersch and Otten, 2003; Sikora and Redzepovic, 2003; Versalovic et al., 1991, 1994).

Teniendo en cuenta que características fenotípicas tales como PME y LPS pueden estar influenciadas por las condiciones de crecimiento y podrían cambiar después de subcultivos (Davies and Quirie, 1996), se estudió la estabilidad de los perfiles de PME y LPS de *M. bovis* en función de la fase de crecimiento y del número de subcultivos. Los resultados mostraron que tanto los perfiles de PME como de LPS en un aislamiento de *Mb* se mantienen constantes luego de repetidos subcultivos y en diferentes estadios del ciclo de crecimiento.

Los perfiles de PME de los aislamientos nacionales mostraron gran similitud con los aislamientos examinados por Ostle y Rosenbusch (1986), con menores diferencias entre ellos. Sin embargo, en nuestros geles no pudimos detectar una proteína de 71 kDa que fue encontrada por estos autores.

Los perfiles de LPS no tienen el patrón característico de bandas tipo escalera del LPS "liso", el cual representa las unidades repetitivas adicionales del antígeno O, componente de la molécula de LPS. En cambio, encontramos que fueron similares a aquellos típicos de patrones "rugosos". Estos resultados concuerdan con los reportados por Johansen et al. (1990) quien encontró que

tres de las cuatro cepas que ellos analizaron presentaron LPS tipo rugoso, entre ellas la cepa de referencia ATCC 10900, en tanto que la cepa restante presentó un patrón semi-rugoso.

Ninguno de los tres métodos empleados para evaluar diversidad dentro de *M. bovis* fue particularmente discriminativo cuando se usó solo ya que el grado de heterogeneidad en cada grupo de estructuras de superficie fue limitada. Sólo cinco genotipos, tres tipos de LPS y tres tipos de PME fueron identificados en la población de 60 aislamientos examinados. El genotipo fue quizás más útil que el tipeo por PME y LPS, ya que se pudieron distinguir cinco grupos en lugar de tres.

Las comparaciones entre los tipos de PME y LPS y los genotipos de los aislamientos no mostraron una conexión directa entre ellos. Los aislamientos que se agruparon juntos por un método estarían dispersos hacia grupos muy separados cuando se emplea otro método. Cuando los tres métodos fueron usados en combinación, la población se agrupó en 15 distintos subgrupos (Tabla 5). Este subagrupamiento permitió claramente diferenciar aislamientos del mismo genotipo. Aislamientos de la misma localización fueron separados en diferentes subgrupos (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de subdivisiones de *M. bovis* basado en genotipos, tipos de PME y tipos de LPS.

Genotipo	Tipo PME	Tipo LPS	N° de aislamientos (%)	Aislamientos (serotipo)*	Localización
T1	O1	L2	9 (15%)	Jp6, 1194-140, 1294-187, 195-145, 195-152, 295-57	Córdoba
				B5 (G)*, B19 (C)*	Buenos Aires (2)
				Smi4	San Luis
T1	O2	L1	8 (13.3%)	1194-03 (A)*, 1194-04 (G)*,	Córdoba
				1116, 1143	Buenos Aires (1)
				1125, B18 (F)*, B27 (A)*	Buenos Aires (2)
				SC1	San Luis
T1	O2	L2	9 (15%)	1194-142, 1194-145, 1294-16, 195-128, 195-130, 295-18	Córdoba
				B1 (G)*	Buenos Aires (2)
				SM4, SM10	San Luis
T1	O2	L3	1 (1.7%)	1127	Buenos Aires (2)
T1	O3	L1	1 (1.7%)	495-152	Córdoba
T1	O3	L2	6 (10%)	CM1b (E)*, Ce3a (G)*, 80-4, 195-50	Córdoba
				1141	Buenos Aires (2)
				SC4	San Luis
T2	O3	L3	2 (3.2%)	HR2 (C)*	Córdoba
				5-BUTCH	Alemania
T3	O3	L2	1 (1.7%)	ehi 70.39	CIP
T3	O3	L3	1 (1.7%)	bhe 64.9	CIP
T4	O1	L2	3 (5%)	1294-175, 495-12	Córdoba
				Smi9	San Luis
T4	O3	L2	1 (1.7%)	SC3	San Luis
T5	O1	L2	6 (10%)	1194-30, 1194-42, 295-10, 295-19, 395-12	Córdoba
				Smi6	San Luis
T5	O1	L3	1 (1.7%)	195-136	Córdoba
T5	O2	L2	5 (8.3%)	LCI2, 195-175, 295-177, 395-11, 495-160	Córdoba
T5	O3	L2	6 (10%)	1194-20, 1194-29, 195-29, 395-60	Córdoba
				SM12, CH1	San Luis

(1) Lobos

(2) Balcarce

*El serotipo de pili está indicado entre paréntesis.

Entre los 60 aislamientos estudiados 10 han sido serotipificados (Tabla 5), los demás restan ser analizados. Del análisis de serotipo de pili, no encontramos ninguna relación entre este y los otros criterios de agrupamiento aplicados. Sin embargo, podríamos asumir la consideración de que esta característica incrementaría el número de subgrupos.

El hallazgo de PME/LPS tipo 3/2 en aislamientos de campo recientes y en la cepa CIP ehi 70.39, aislada hace 44 años, marca la aparente existencia de un grupo clonal el cual ha permanecido relativamente inalterado por más de 40 años, aunque se requeriría más trabajo para confirmar clonalidad, por ej. usar análisis electroforético de enzimas (MEE: multilocus enzyme electrophoresis) (Kapur et al., 1992; Van der Zee et al., 1997), análisis de ARNr 16S (Van Berkum et al., 2003), MLST (multilocus sequence typing) y PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) (Sails et al., 2003)

Polipéptidos conservados tales como los de 20.1, 28 y 36 kDa, aparecen en cada aislamiento analizado, tal como lo describen también Ostle y Rosenbusch (1986). Los mismos podrían ser parte de importantes componentes involucrados en la virulencia del organismo, los cuales podrían llegar a integrar futuras vacunas acelulares.

Nuestros análisis revelan cambios en el patrón de características fenotípicas de microorganismos que fueron aislados del mismo animal a diferentes tiempos. No sabemos si en ese lapso de tiempo cambiaron las características de las cepas realmente o si se produjo una reinfección. La persistencia de una bacteria en un hospedador podría proveer las condiciones para la variación. Otra característica que favorece la variación es la alta adaptabilidad de un microorganismo a su ambiente. Las modificaciones observadas en los perfiles de PME y LPS podrían corresponder a una adaptación de las poblaciones a las condiciones ambientales variables del hospedador.

Estos estudios de biodiversidad a nivel genómico y de componentes estructurales de cubierta de *M. bovis* constituyen los primeros realizados en el País. Los mismos demuestran el grado de variabilidad de los aislamientos dentro de la población estudiada y permiten que las empresas productoras de vacunas puedan seleccionar qué tipos de organismos deben integrar las

formulaciones. Los resultados obtenidos de nuestras investigaciones fueron tomados como base en un trabajo publicado recientemente por un grupo de investigación de Brasil (Conceição, 2004). Ellos encuentran mayor diversidad genética en *M. bovis*, trabajando con aislamientos provenientes de Brasil, Argentina y Uruguay, recolectados durante un período de tres décadas, lo cual demuestra que *M. bovis* tiene alto polimorfismo molecular.

Los resultados obtenidos en este trabajo intentan aclarar cuáles son los aislamientos locales que deberían integrar una formulación de vacuna que se adapte a las necesidades de nuestro País. Una vacuna adecuada debería estar integrada, tal como hemos visto, por al menos un representante de cada uno de los grupos mayoritarios prevalentes en nuestro País., correspondientes a las subdivisiones de *M. bovis* basadas en genotipos, tipos de PME y tipos de LPS. Consideramos que de esta manera estaría cubierto el espectro de diversidad intraespecífica con que se presenta *M. bovis* en Argentina.

Un factor importante tenido parcialmente en cuenta en nuestros estudios con relación a los organismos que deberían integrar una formulación, es el asociado al serotipo de pili. La selección dentro de las bacterias que integran los 7 grupos prevalentes, debería considerar incluir serotipos diferentes de pilis.

Bibliografía

- Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D. and de Bruijn, F.J. 1995. Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1-488.
- Alippi, A.M. and Aguilar, O. M. 1998. Characterization of isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* from diverse geographical origin by the polymerase chain reaction and BOX primers. J. Invert. Pathology **72**: 21-27.
- Araujo, F., Alviano, C.S., Angluster, J. and Ricciardi, I. 1989. Chemical composition of lipopolysaccharide from *Moraxella bovis*. Vet. Microbiol., **20**: 165-171.
- Atlas, R. M. 1984. Diversity of microbial communities. In: K.C. Marshall (ed). Advances in Microbial Ecology **7**: 1-47. Plenum Press, New York, USA.
- Aucken, H. M. and Pitt, T. L. 1993. Lipopolysaccharide profile typing as a technique for comparative typing of Gram negative bacteria. J. Clin. Microbiol. **31**: 1286-1289.
- Baldy-Chudzik, Katarzyna. 2001. Rep-PCR- a variant to RAPD or an Independent technique of bacteria genotyping? A comparison of the typing properties of Rep-PCR with other recognised methods of genotyping of microorganisms. Acta Microbiol. Polonica, **50**, 3-4: 189-204.
- Baptista, P.J.H.P., 1979. Infectious bovine keratoconjunctivitis. A review. Br. Vet. J., **135**: 225-242.
- Beard, M.K.McG. and Moore, L.J. 1994. Reproduction of bovine keratoconjunctivitis with a purified haemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*. Vet. Microbiol. **42**: 15-33.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ninth edition. Williams & Wilkins. 1994. Vol. 1: 296-302. Baltimore/London.
- Billson F. M., Hodgson, J. L., Egerton, J. R., Lepper, A. W. D., Michalski, W. P., Schwartzkoff, C. L., Lehrbach, P. R. and Tennent, J. M. 1994. A haemolytic cell-free preparation of *Moraxella bovis* confers protection against Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. FEMS Microbiol. Lett. **124**: 69-74.
- Buchanan, T. M., and Pearce, W. A. 1979. Pathogenic aspects of outer membrane components of Gram-negative bacteria, p. 475-514. In M.



- Inouye (ed.), Bacterial outer membranes, John Wiley & Sons. Inc., New York.
- Conceição, F.R., Dellagostin, O.A., Paolichi, F., Cobo Leturia, A. And Gil Turnes, C. 2004. Molecular diversity of *Moraxella bovis* isolated from Brazil, Argentina and Uruguay over a period of three decades. *The Vet. J.* 167: 53-58.
- Davies, R. L. and Quirie, M. 1996. Intra-specific diversity within *Pasteurella trehalosi* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. *Microbiology* 142: 551-560.
- de Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2180-2187.
- Facklam, Richard. 2002. What happened to the Streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15,4: 613-630.
- Fenwick, B., Rider, M., Liang, J. and Brightman, A. 1996. Iron repressible outer membrane proteins of *Moraxella bovis* and demonstration of siderophore-like activity. *Vet. Microbiol.* 48: 315-324.
- Galanos, C. and Lüderitz, O. 1975. Electrodialysis of lipopolysaccharides and their conversion to uniform salt forms. *Eur. J. Biochem.* 54: 603-610.
- Genersch, Elke and Otten, Christoph. 2003. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of german field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. *Apidologie* 34: 195-206.
- Heinrich, D. W. and Glasgow, A. C. 1997. Transcriptional regulation of type 4 pilin genes and the site-specific recombinase gene, *piv*, in *Moraxella lacunata* and *Moraxella bovis*. *J. Bact.* 179: 7298-7305.
- Hitchcock, P. and Brown, T. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 154: 269-277.
- Hughes, D.E. and Pugh G.W. 1971. Experimentally induced bovine infectious keratoconjunctivitis: Effectiveness of intramuscular vaccination with viable *Moraxella bovis* culture. *Am. J. Vet. Res.* 32: 6. 879-886.

- Hulton, C.S.J., Higgins, C.F. and Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. *Mol. Microbiol.* 5: 825-834.
- Hurley, J.C. 1995. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. *Clinical Microbiology Reviews*, 268-292.
- Johansen, K.A., Wannemuehler, M. J., Rosenbusch, R. F. 1990. Biological reactivity of *Moraxella bovis* lipopolysaccharide. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1, 46-51.
- Kapur, V., White, D. G., Wilson, R. A. & Whittam, T. S. 1992. Outer membrane protein patterns mark clones of *Escherichia coli* O2 and O78 strains that cause avian septicemia. *Infect. Immun.* 60: 1687-1691.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leive, L. 1965. Release of lipopolysaccharide by EDTA treatment of *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 21: 290-296.
- Lepper, A. W. D., Elleman, T. C., Hoyne, P. A., Lehrbach, P. R., Atwell, J. L., Schwartzkoff, C. L., Egerton, J. R. and Tennent, J. M. 1993. A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet. Microbiol.* 36: 175-183.
- Louws, F.J., Fulbright, D.W., Stephens, C.T. and de Bruijn, F.J. 1994. Specific genomic fingerprint of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequence and PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (7): 2286-2295.
- Maagd, R. and Lugtenberg, B. 1986. Fractionation of *Rhizobium leguminosarum* cells into outer membrane, cytoplasmic membrane, periplasmic, and cytoplasmic components. *J. Bacteriol.* 167: 1083-1085.
- Marrs, C.F., Ruehl, W.W., Schoolnik G. K. and Falkow, S. 1988. Pilin gene phase variation of *Moraxella bovis* is caused by an inversion of the pilin genes. *J. Bacteriol.* 170: 3032-3039.
- Miller, T. R. and Gelatt, K. N., 1991. Food Animal Ophthalmology, In: K. N. Gelatt (Ed), *Veterinary Ophthalmology*, 2nd ed., Lea and Feibiger, Philadelphia, pp. 619-624.
- Moore, L. J. and Rutter, M., 1987. Antigenic analysis of fimbrial proteins from

- Moraxella bovis*. J. Clin. Microbiol. 25: 2063-2070.
- Morrison, D. C. and Jacobs, D. M. 1976. Binding of polymixin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. Mol. Immunol. 13: 813-818.
- Nikaido, H. and Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev., 49: 1-32.
- Nishimura, L. S., Ferreira, L. C. S., Pacheco, A. B. F. and Guth, B. E. C. 1996. Relationship between outer membrane protein and lipopolysaccharide profiles and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in Brazil. FEMS Microbiol. Lett. 143: 253-258.
- Olaide Portugal, V. And Aguilera Gómez, L. I., 1998. Microorganisms and Biodiversity. Terra vol 16, 3: 289-292.
- Olembo, R. 1991. Importance of microorganisms and invertebrates as components of biodiversity. Pp 7-15. In: D.L.Hawksworth (ed). The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture. Redwood Press, Melksham, UK.
- Ostle, A.G. and Rosenbusch, R. F. 1986. Outer membrane protein antigens of *Moraxella bovis*. Am. J. Vet. Res. 47: 1419-1421.
- Pugh, G.W., Hughes, D.E., Schultz, V. D. and Graham, M. S. 1976. Experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis: resistance of vaccinated cattle to homologous and heterologous strains of *Moraxella bovis*. Am. J. Vet. Res. 37: 57-60.
- Pugh, G. W. and McDonald T.J. 1982. Experimental infectious bovine keratoconjunctivitis: Efficacy of a vaccine prepared from nonhemolytic strains of *Moraxella bovis*. Am. J. Vet. Res. 43: 1081-1084.
- Raisman, J.S. y González, A.M. 1998. Hipertextos del área de la biología. Universidad Nacional del Nordeste.
- Rietschel, E.T., Kirikae, T., Schade, F.U., Ulmer, A.J., Holst, O., Brade, H., Schmidt, G., Mamat, U, Grimmecke, H-D., Kusumoto, S. and Zahringer, U. 1993. The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. Immunobiol., 187: 169-190.
- Sails, A., Swaminathan, B., Fields, P. 2003. Clonal complexes of campylobacter jejuni identified by multilocus sequence typing correlate with strain associations identified by multilocus enzyme electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 41 (9): 4058-4067.

- Schnaitman, C. 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J. Bacteriol.* 108: 545-552.
- Shands, J.W., Jr. 1975. Endotoxin as a pathogenic mediator of Gram-negative infection. In: D. Schlessinger (ed.), *Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D. C. P 330-335.
- Sikora, S. and Redzepovic, S. 2003. Genotypic characterisation of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep PCR and RAPD analysis. *Food Technol. Biotechnol.* 41: 61-67.
- Smith, H. 1977. Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol. Rev.*, 41: 475-500.
- Smith, P. G., Blankenship, T., Hoover, T. R., Powe, T. and Wright, J. C., 1990. Effectiveness of two commercial infectious bovine keratoconjunctivitis vaccines. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1147-1150.
- Stern, M.J., Prossnitz, E. and Ames, G.F.L. 1988. Role of the intercistronic region in post-transcriptional control of gene expression in the histidine transport operon of *Salmonella typhimurium*: involvement of REP sequences. *Mol. Microbiol.* 2: 141-152.
- Tamzali, Y. and Marmignon, J. 1992. Review of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Maghreb-Veterinaire*, 7: 8-16.
- Valverde, C., Hozbor, D. and Lagares, A., 1997. Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques* 22: 230-236.
- Van Berkum, P., Terefework, Z., Paulin, L., Suomalainen, S., Lindstrom, K. and Eardly, B. 2003. Discordant phylogenies within the *rrn* loci of *rhizobia*. *J. Bacteriol.* 185: 2988-2998.
- Van der Zee, A., Mooi, F., Embden, J.V. and Musser, J. 1997. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp.: phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *J. Bacteriol.* 179: 6609-6617.
- Veglemoy, E., Anderson, M., Froholm, L.O., 1983. Studies on the outer membrane proteins of *Moraxella nonliquefaciens*. *J. Gen. Microbiol.*, 129: 823-827.

- Versalovic, J., Koeuth, T. and Lupski, J. R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J. and Lupsky, J.R. 1994. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5: 25-40.
- Ward, J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58, 23-244.
- Webber, J.J. and Selby, L.A. 1981. Effects of *Moraxella bovis* vaccination schedules on experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1181-1183.
- Westphal, O. and Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further application of procedure. *Meth Carbohydr Chem.* 5: 83.

Capítulo 3

*Diferenciación de
aislamientos de Moraxella
bovis mediante Espectroscopia
Infrarroja con Transformada
de Fourier (FT-IR)*

Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

La identificación y caracterización de microorganismos presentes en un dado ecosistema es una información de vital importancia tanto en el área de salud como a nivel industrial.

Para la identificación y caracterización microbiana se dispone tradicionalmente de métodos bioquímicos basados en aspectos morfológicos, reacciones tintoriales, características de crecimiento, composición de pared celular, fisiología y serología. Los principales problemas de estas metodologías es que a la vez que resultan tediosas y que insumen considerable tiempo, pueden dar como resultado una caracterización ambigua o incompleta. Requerimientos para un diagnóstico más rápido y preciso han llevado en la última década al desarrollo de muchos test, basados en análisis de lípidos (Butler et al., 1991), sondas de ADN (Eisenach et al., 1988), análisis por enzimas de restricción (RFLP), fingerprinting de ADN empleando secuencias de inserción y tecnología de PCR usando una variedad de secuencias blanco (Hughes et al., 1993). En general estas técnicas han resultado de excelente valor en la discriminación de organismos estrechamente relacionados. Sin embargo el empleo de estos métodos requiere de un importante equipamiento, son costosos, emplean un gran número de reactivos, en muchas de estas metodologías los análisis son destructivos, lo cual implica trabajar en distintos tiempos con diferentes muestras lo cual se traduce en un aumento de la probabilidad de aparición de variaciones y además consumen un tiempo considerable.

Una técnica ideal para una rápida caracterización microbiana, debería incluir la mínima preparación de muestra, permitir un análisis automático de muchas muestras seriadas con un bajo costo de reactivos; posibilitar una rápida caracterización a partir de una base de datos estable, debería ser fácil de emplear y ser operada bajo control de PC. Con el reciente desarrollo en instrumentación analítica, estos requerimientos han incrementado los empleos de los métodos de pirólisis-espectrometría de masa y los métodos espectroscópicos vibracionales como la espectroscopia infrarroja con

transformada de Fourier (FT-IR) y espectroscopía Raman con transformada de Fourier (FT-Raman) (Goodacre et al., 1996; Maquelin et al., 2002).

En las últimas décadas ha habido un notable incremento a nivel mundial en el empleo y desarrollo de la espectroscopía infrarroja (IR) aplicada al análisis directo de células y componentes celulares (Helm and Naumann, 1995; Kacuráková et al., 2000). Esta metodología tiene como ventaja el hecho de que no requiere prácticamente procesamiento de la muestra, sólo son necesarias cantidades muy bajas de la población (10-200 μg), y al ser una técnica no destructiva de aplicación directa permite obtener resultados rápidamente (Helm et al., 1991 (a); Naumann, 2000; Naumann et al., 1991). Entre las ventajas se encuentran su velocidad, generalidad de aplicación, relativo bajo costo y eficacia, que se incrementa con los nuevos hallazgos científicos que permiten una mejor comprensión de los espectros obtenidos. Aunque esta metodología no resuelve todos los problemas analíticos, constituye uno de los mejores métodos para el análisis fenotípico de células enteras, permitiendo medidas simultáneas de muchos componentes celulares. **FT-IR** es actualmente un método bien establecido para la caracterización molecular de muestras biológicas, siendo también empleado para testear susceptibilidad a antibióticos e investigar composición de células animales (Lasch et al., 2002).

El espectro que se obtiene de un microorganismo por FT-IR es una imagen muy compleja de la composición química total de una célula, constituyendo un verdadero fingerprint, el cual es altamente reproducible y típico para diferentes células (Fig. 1).

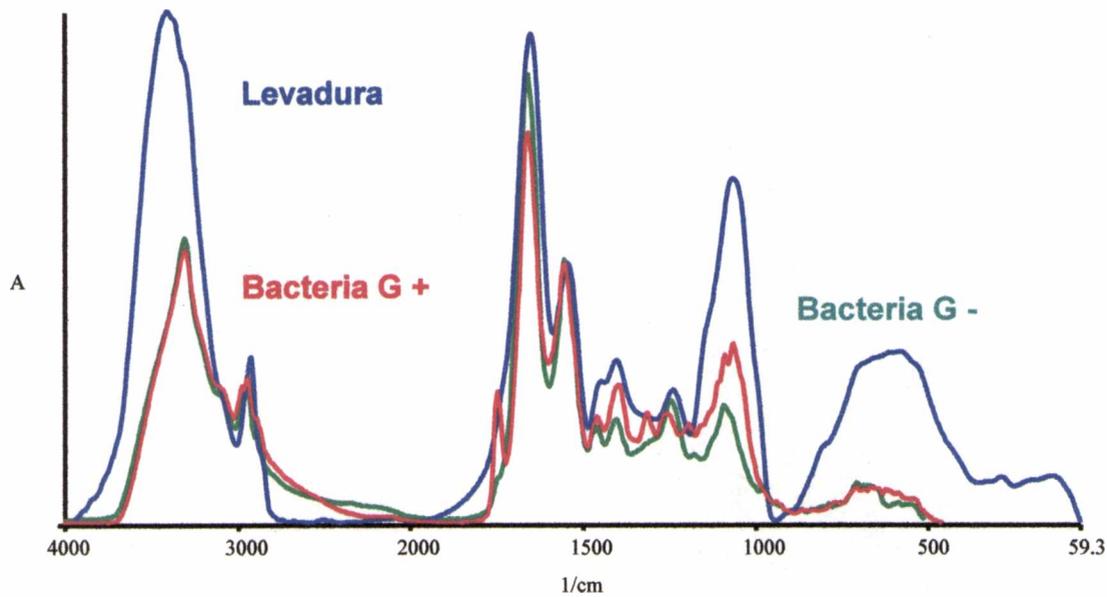


Fig. 1. Espectro infrarrojo de levaduras (—), bacterias Gram + (—) y bacterias Gram - (—).

Dada la multitud de componentes celulares, bandas superpuestas, resultantes de la absorción de distintos grupos funcionales, son observadas a través de todo el rango espectral. Sin embargo, algunos sectores del espectro son dominados por componentes celulares particulares y así es posible subdividir el espectro en ventanas espectrales relativamente específicas. Para hacer uso de la información completa que brinda un espectro, es necesario emplear alguna forma de análisis estadístico multivariado. Si se dispone de un banco de datos espectrales, el espectro de un organismo desconocido puede ser comparado con los de referencia para generar un dendrograma que permita la clasificación de la población. La potencialidad de la espectroscopía infrarroja clásica como una herramienta en diferenciación bacteriana, fue reportada por diversos autores desde 1950 hasta caer en desuso en 1970. Sin embargo más recientemente, los avances en la revolución de los equipos junto con el desarrollo de software para el análisis de datos espectrales impulsó nuevamente el uso de esta metodología. Desde 1985 uno de los impulsores, el Dr. Dieter Naumann y sus colaboradores en el Robert-Koch Institute de Berlín, Alemania, retomaron estos estudios utilizando la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, combinada con análisis estadístico multivariado, para

diferenciar distintos géneros y especies bacterianas (Helm et al., 1991 (b); Naumann et al., 1991, (a) y (b); Naumann et al., 1996). Este mismo grupo ha desarrollado conjuntamente con la empresa Bruker una metodología para la identificación automatizada basada en el análisis de microcolonias microbianas. Esta metodología ha sido empleada con éxito, en la identificación y clasificación de *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* y *Legionella spp*, *Lactobacillus spp*, *Listeria spp* y *Candida dubliniensis* (Curk et al., 1994; Goodacre et al., 1996; Helm et al., 1991; Maquelin et al., 2002; Naumann, 2000; Tintelnot et al., 2000).

La espectroscopia FT-IR requiere, en los estudios de biodiversidad, de la validación de los dendrogramas obtenidos por parametrización de espectros infrarrojos, con los provenientes de la taxonomía clásica y molecular. La parametrización obtenida puede resultar en algunos casos en variaciones en el dendrograma dependiendo la ventana espectral seleccionada para el agrupamiento. Se debe tener en cuenta que los espectros reflejan la composición química global de una célula, la cual no ha sido tomada como la base de la taxonomía.

FT-IR ha sido propuesta a nivel mundial como metodología para el control de calidad de vacunas, medicamentos y alimentos.

En producción industrial el monitoreo de las características fenotípicas de las células durante su crecimiento, constituye una vieja reconocida necesidad, requerida por las normas internacionales de control de calidad, que no ha podido aún ser resuelta por métodos bioquímicos y las técnicas moleculares de análisis.

FT-IR es una técnica sumamente sensible, razón por la cual, pequeños cambios en la composición de la muestra, o en la adquisición de los datos, producen un efecto significativo en el espectro resultante. La composición de los microorganismos (proteínas, lípidos, carbohidratos, DNA), depende de un gran número de variables tales como el sistema de cultivo utilizado, la composición del medio de crecimiento, los tiempos de incubación, el pH, la temperatura, etc. Por lo tanto para la adquisición de espectros infrarrojos **es de crítica importancia, realizar un procedimiento de estandarización a fin de obtener reproducibilidad en los resultados. Los estudios de**

caracterización e identificación de muestras biológicas sólo son absolutamente confiables si la preparación y condiciones de medida son perfectamente ajustadas.

A pesar de no existir una respuesta simple y única para responder a todos los requerimientos de estandarización, la necesidad de lograr repetitividad y reproducibilidad, así como también de compartir resultados entre distintos laboratorios, y construir bases de datos de referencia mundial, ha hecho que se desarrollaran ***protocolos de estandarización que necesariamente deben ser cumplidos***. Al respecto han sido publicados diversos protocolos que incluyen estandarización en las condiciones de cultivo de los microorganismos, en la toma de muestra, así como también en el control de los parámetros de adquisición de los espectros (Helm et al., 1991 (a); Lasch et al., 2002; Maquelin et al., 2002; Naumann et al., 1991, (a) y (b); Tintelnot et al., 2000).

Materiales y métodos

Procedimientos de estandarización

Antes de proceder a cualquier tipo de análisis o estudio sobre los espectros de células, se debe aclarar que los mismos deben corresponder a estados fisiológicos perfectamente definidos y reproducibles. A esto se debe sumar una serie de consideraciones sobre la adquisición de los espectros en sí y a su forma de análisis. Para ello deben respetarse minuciosa y estrictamente la reproducibilidad de las siguientes etapas:

- 1.- Cultivo de microorganismos**
- 2.- Preparación, toma de la muestra y secado**
- 3.- Parámetros para la adquisición de los espectros.**
- 4.- Exigencias de calidad sobre los espectros**
- 5.- Análisis de los espectros**

Cultivo de microorganismos

Como se indicó, es esencial asignar un espectro a un microorganismo creciendo en un determinado medio de cultivo, a un tiempo definido de recolección de muestra, en una condición de aereación, de pH, temperatura, etc. El espectro debe asociarse a un estado fisiológico y condición de cultivo. Este espectro es representativo del fenotipo de un organismo, y como el fenotipo varía con todos los parámetros indicados anteriormente, es fundamental reproducir una condición de cultivo para asegurarnos un espectro microbiano reproducible.

Preparación y toma de muestra

El problema más común en la preparación de muestras es que las suspensiones celulares que se depositan sobre la ventana de ZnSe formen un film homogéneo y traslúcido al secarse. Según las características de cubierta, las células pueden agregarse y formar clumps lo cual dificulta la lectura. Existen distintas estrategias en la preparación de la muestra cuando la misma proviene de un sistema de cultivo sólido o líquido. De modo que la preparación dependerá del origen de la muestra.

Técnica del 3^{er} cuadrante

Los microorganismos son cultivados en el agar nutritivo adecuado, el tiempo y la temperatura se seleccionan dependiendo de cada caso en particular. Pequeñas cantidades de microorganismos son cuidadosamente extraídas de agar con un ansa de platino calibrada (1 mm de diámetro) y resuspendidas en 120 μ l de H₂O destilada estéril. Entre 80 y 100 μ l de dicha suspensión son transferidos a la celda de ZnSe. En general el número de ansadas a disponer en los 120 μ l y el volumen a dispensar sobre la celda de ZnSe debe ser optimizado para cada organismo en particular. En este caso debe hacerse una curva de calibración antes de comenzar cualquier estudio. Para ello se ensayarán distintas cantidades de microorganismos, se medirá la

DO o UFC de la suspensión resultante, se registrarán los espectros correspondientes y se medirá la absorbancia IR obtenida para cada punto de la curva de calibración. Con ello se trazaré una curva de DO (o UFC) vs. Absorbancia IR y la cantidad de material adecuada para ser utilizada será elegida dentro del intervalo donde la gráfica sea lineal, es decir se cumpla la ley de Lambert y Beer.

Técnica del 3^{er} cuadrante con homogeneización

Para algunos microorganismos hemos observado que debido a las características de la muestra no es posible aplicar directamente la técnica del 3^{er} cuadrante, sino que previo a cargar la celda de ZnSe es necesario homogeneizar la muestra. En muchos casos sólo con la aplicación de unos segundos de vortex es suficiente, sin embargo en otros casos es necesario recurrir a sonicar diferentes tiempos y a diferentes potencias, según el microorganismo. Este procedimiento también debe ser optimizado en cada caso.

Secado

El secado de los films líquidos sobre las celdas de ZnSe debió también ser optimizado. Es de suma importancia reducir el tiempo de secado de manera de optimizar la calidad del film bacteriano que se formaba sobre la celda para evitar la dispersión de la luz y minimizar los tiempos de exposición de la muestra al aire. Para lo cual se está utilizando actualmente un sistema de secado al vacío en un desecador conteniendo silica gel o pentóxido de fósforo, operado a temperatura ambiente.

Adquisición de los espectros

Medidas por Absorbancia/Transmitancia (A/T)

Se empleó un espectrómetro Spectrum One de Perkin Elmer, disponible en el CINDEFI. Alternativamente se dispone de equipos Bruker del CEQUINOR-LANAIS-EFO. Espectros por A/T pueden ser obtenidos de soluciones líquidas, suspensiones o films sólidos a partir de suspensiones de microorganismos depositados sobre ventanas constituidas por materiales transparentes al IR. Debido a que el agua está presente en la mayoría de las muestras biológicas se utilizan materiales ópticos insolubles en agua. Dentro de los más comúnmente utilizados (CaF₂, BaF₂, ZnSe, Si), nosotros utilizamos ZnSe. Existen también numerosos modelos de portaceldas, sin embargo la que disponía el modelo Spectrum One era un portacelda que permitía la lectura de una muestra por vez. Para solucionar este problema se diseñó en el laboratorio una rueda de acero inoxidable que permite medir consecutivamente 14 muestras (con desplazamiento manual) sin abrir el sistema.

Resolución, velocidad de medida y número de escaneos

El intervalo de lectura empleado (650 y 4000 cm⁻¹), el número de escaneos (64) y la velocidad a la cuál se llevó a cabo cada medida (1cm/s) debieron ser optimizados previamente. Respecto a la resolución espectral, la medida a emplear fue 6 cm⁻¹ (Nauman, 2000).

Vapor de agua

Se estableció que la única manera que los espectros superaran el valor de vapor de agua exigido por el test de calidad (QT) (será explicado posteriormente), era realizar las medidas bajo corriente de aire seco para lo cual previo al ingreso al equipo se le anexó un sistema de filtros de H₂O y CO₂. Este sistema trabajando a un caudal ya también optimizado, es el que actualmente se encuentra en funcionamiento en nuestro laboratorio.

Exigencias de calidad sobre los espectros

Los principales parámetros a ser considerados para el registro de espectros infrarrojos son: **(1)** La intensidad de la absorción de un espectro debe caer en el rango de 0,345 a 1,245. Cuando se comparan distintos espectros, la absorbancia de los mismos no debe diferir mucho entre sí y debe mantenerse dentro del rango donde se cumple la Ley de Lambert y Beer. **(2)** La relación señal-ruido debe ser suficientemente alta, de manera que a los espectros resultantes se les pueda aplicar técnicas de aumento de resolución (deconvolución y derivadas 1ra y 2da). **(3)** En particular la preparación, homogenización y secado de las muestras debe llevarse a cabo de manera de lograr un film homogéneo sobre la celda de lectura, de manera de evitar dispersión de la luz sobre la superficie de la muestra, que provoca desviaciones en la línea de base. Todos estos parámetros se encuentran resumidos en el **Test de calidad (QT)** desarrollado por el Dr. Dieter Naumann, conjuntamente con la empresa Bruker Optics para evaluar la calidad de los espectros registrados. Las exigencias que deben cumplir todos los espectros para ser considerados válidos son las siguientes:

Tabla 1. Test de Calidad espectral (QT)

Parámetro	1800 1600 (proteínas)	1200 960 (Carb. Hid.)	2100 2000	1847 1837	2200 2000
ΔA mínima	0.345				
ΔA máxima	1.245				
Ruido Máximo			0.00015		
Señal / ruido	200	40			
Vapor agua				0.0003	
Señal / vapor agua	100	20			
Fringes					5 x 10⁻⁵

1. Variación de absorbancia máxima y mínima entre 1800 y 1600 cm^{-1} (ΔA)

Región Amida I. Esta región es donde la mayoría de las muestras biológicas tienen el máximo de absorbancia, por lo cual se toma para analizar si la cantidad de muestra utilizada fue la correcta. Se ha demostrado que la absorbancia IR cumple la Ley de Lambert y Beer entre 0.345 y 1.245 unidades de absorbancia para la mayoría de las muestras biológicas. Para evaluar este parámetro se calcula la diferencia entre el máximo y el mínimo de absorbancia registrados en el espectro (Δ absorbancia). Dicha diferencia **no puede ser menor a 0.35 ni mayor a 1.25**.

2. Cálculo del ruido (r)

Se calcula la diferencia entre el máximo y mínimo valor de la 1er derivada de los espectros en la región 2100 a 2000 cm^{-1} . Se elige este intervalo para calcular el ruido porque en él no se registran absorbancias asociadas a componentes del microorganismo o macromoléculas. Dicha diferencia no puede superar el valor de 1.5×10^{-4} .

3. Relación señal / ruido

Para medir este parámetro una vez registrado el espectro, se obtiene la derivada primera del mismo y allí se mide:

Señal S_1 : la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la derivada primera entre 1800 cm^{-1} y 1600 cm^{-1} (C=O del enlace peptídico)

Señal S_2 : la diferencia entre el máximo y el mínimo valor de la derivada primera entre 1200 cm^{-1} y 960 cm^{-1} (C-C, C-O, C-H de carbohidratos)

Luego se calcula la relación entre los respectivos valores de S_1 y S_2 y el valor del ruido (r) obtenido según el punto (2). Estas relaciones deben ser mayores que **200 y 40** respectivamente. Aunque esto debe ajustarse para cada microorganismo.

4. Vapor de agua

El agua posee bandas rotacionales a lo largo de todo el espectro IR medio, sin embargo se elige el intervalo 1847 y 1837 cm^{-1} de la primer derivada de los espectros para calcular la contribución del mismo al espectro global. Se elige

dicho intervalo debido a que en él no existen absorciones vibracionales por parte del microorganismo pero sí la banda rotacional más característica del agua (1844 cm^{-1}). Se calcula entonces en ese intervalo la diferencia entre el máximo y mínimo de la derivada primera y este valor debe ser menor a 3×10^{-4}

5. Relación señal / vapor de agua (S/v_a)

Con estas relaciones se compara la relación de las señales debidas a las proteínas y carbohidratos con la absorbancia debida al vapor de agua. S_1/v_a y S_2/v_a deben superar el valor de **100** y **20** respectivamente, aunque estos valores también deben ajustarse para cada microorganismo.

6. Fringing

Consiste en una desviación sinusoidal de la línea de base provocada en general por problemas eléctricos, dependiendo su valor del modelo del espectrómetro utilizado. El mismo se mide a través de la amplitud de la derivada primera en el intervalo $2200\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ y debe ser menor que 5×10^{-5} .

Análisis de los espectros

Previo al estudio de caracterización y/o identificación los espectros debieron someterse a una serie de análisis. Dichos análisis se llevaron a cabo mediante diferentes softwares: **Spectrum One** (Perkin Elmer), **Grams 3.0** (Galactic), **Opus 3.0** (versión para sistemas operativos OS/2), **Opus 3.1 y 4.5** (para windows NT). **Matlab**.

Los procedimientos llevados a cabo sobre los espectros fueron:

5.1 Aumento de resolución

5.2 Normalización

5.3 Estudio de reproducibilidad

5.4 Caracterización y/o identificación

Aumento de resolución

Como ya se mencionó los espectros IR de los microorganismos en particular y en general de cualquier muestra biológica, poseen información de la totalidad de la composición química de la célula. De modo que debido a la gran cantidad de componentes celulares solo pueden obtenerse bandas anchas que contienen superposición de bandas más angostas. Esto hace sumamente difícil de comprender la información contenida en ellos. Para poder aumentar la resolución de dichas bandas al menos parcialmente, existen dos alternativas, o bien buscar los picos que las conforman a través de la derivada primera y segunda o aplicar la deconvolución de los espectros. La técnica más utilizada que se efectúa sobre un espectro es el cálculo de sus derivadas 1ra y 2da ya que la deconvolución trae aparejado mucho error.

Normalización

Aunque la toma de muestra haya sido cuidadosamente controlada de manera de tratar de tomar la misma cantidad de muestra para todos los sistemas que quieren ser comparados, siempre es necesario cargar todos los espectros a ser analizados y efectuarles una normalización vectorial. La misma se elegirá según qué se esté estudiando, si se efectúa en todo el rango espectral ($4000 - 650 \text{ cm}^{-1}$) o en diferentes ventanas.

Reproducibilidad

Una vez optimizados todos los parámetros descritos en cuanto a la toma de muestra y en las medidas de los espectros, de manera que los mismos superen el QT, se trabajó en particular en el examen de reproducibilidad de los espectros antes de someterlos a cualquier análisis de caracterización y/o identificación. Para poder cuantificar de alguna manera la reproducibilidad obtenida se definieron ciertos parámetros (Helm et al., 1991; Nauman, 1991;02000) proporcionales a la varianza normal de los sistemas:

RL₁ define la reproducibilidad dentro de distintas alícuotas de una misma muestra de un aislamiento determinado: **RL₁ < 10**

RL₂ describe la reproducibilidad dentro de muestras independientes de un determinado aislamiento crecidas en las mismas condiciones y obtenidas en un período de tiempo entre 6 meses y 1 año: **RL₂ < 25**

Estos valores se obtuvieron calculando el coeficiente de Pearson (en la ventana 1500-900) entre cada set de espectros que se analizó, luego se construyó un dendrograma utilizando el método de Average Linkage y así los valores de fusión obtenidos correspondieron aproximadamente a las distancias espectrales. En dichos dendrogramas **RL** representan la **distancias espectrales máximas**.

Análisis de los espectros para caracterización y/o identificación

Existen dos grandes alternativas para el estudio y análisis de los espectros:

- 1. Análisis de diferentes ventanas espectrales**
- 2. Análisis de reconocimiento de patterns**

Análisis de diferentes ventanas espectrales

Este tipo de análisis es el que se lleva a cabo en el estudio y caracterización de **componentes celulares** particulares como lo son la formación de pilis, endoesporas, componentes de reserva, formación de cápsula así como también en el monitoreo de procesos en medio líquido o en biofilm en los cuales es posible identificar algún producto formado tanto en las células (materiales de reserva como glucógeno o PHB), como en el sobrenadante (consumo de sustratos o producción de metabolitos).

Todos estos estudios se basan en identificar dentro del espectro picos característicos o variaciones en el áreas de alguna banda característica. Dichas análisis se basan principalmente en el estudio de la derivada 2da de los

espectros y el análisis de marcadores o picos característicos en dichas derivadas

Análisis de reconocimiento de patterns

Este tipo de análisis fue el utilizado en la **caracterización y/o identificación** de aislamientos de *M. bovis*. En este caso lo que se llevó a cabo son técnicas computacionales basadas en el reconocimiento de patterns. Los espectros de las especies a analizar fueron considerados como complejos *fingerprints* que pueden ser estudiados para su diferenciación mediante diversas técnicas de análisis multivariante. Una vez asegurada la calidad espectral (QT) y la reproducibilidad de los replicados (RL₁ y RL₂), se realizó la caracterización y/o identificación de los microorganismos sobre la primera o segunda derivada de los espectros IR. Las derivadas de los espectros fueron evaluadas como un fingerprint de la bacteria para lo cual se emplean técnicas de reconocimiento de patterns, que aplican métodos estadísticos multivariantes. Estos últimos pueden ser no supervisados, los cuales no requieren un conocimiento previo de la muestra (por ej. Análisis de cluster (CA), análisis de componente principal (PCA)), o supervisados, los cuales requieren un conocimiento previo de la identidad de la muestra (por ej. Redes neuronales (ANNs)). En nuestro caso se usó el análisis de cluster.

Análisis de clusters (CA)

El objetivo principal del análisis de cluster es establecer similitudes y disimilitudes entre organismos y mostrar dichas diferencias mediante un dendrograma que agrupa en clusters los organismos más semejantes. El procedimiento para realizar un análisis de cluster es el siguiente:

- 1.- Buscar las principales diferencias entre los grupos de espectros a analizar (en qué intervalo de número de onda se encuentran las principales diferencias)
- 2.- Utilizar dichos intervalos para calcular el coeficiente de Pearson, o realizar un estudio de componente principal, para establecer la disimilitud entre los grupos o espectros comparados

3.- Construir un dendrograma que muestre dichas diferencias o disimilitudes.

El objetivo de este trabajo es aplicar FT-IR para la caracterización molecular bacteriana. Se emplearon algunos de los aislamientos de *M. bovis* de Argentina a los que ya se los tenía caracterizados en cuanto a sus características bioquímicas tales como perfiles de ADN, PME y LPS y se relacionaron estas características con los espectros IR de los organismos.

Resultados y discusión

En el trabajo previo realizado sobre 60 aislamientos de *M. bovis* de distintos lugares de Argentina se pudo identificar la existencia de 15 subgrupos distintos en base a un análisis de fingerprints de ADN, perfiles de PME y de LPS. Sin embargo este esquema de clasificación es complejo e insume tiempo. Por esta razón se decidió investigar si la técnica de FT-IR podía ser utilizada alternativamente para facilitar la caracterización e identificación de estos y posteriores aislamientos.

Los métodos bioquímicos permitieron agrupar los 60 aislamientos de *M. bovis* en 15 subgrupos derivados de 3 tipos de LPS (L1-L3), 3 perfiles distintos de PME (O1-O3) y 5 perfiles diferentes de ADN (T1-T5). A fin de verificar si estas diferencias bioquímicas se correspondían con la respuesta espectral de cada organismo, se obtuvieron espectros IR de una muestra de 11 aislamientos de *Moraxella bovis*. Como primer paso, los espectros obtenidos fueron sometidos al test de calidad espectral (QT). Los espectros que pasaron satisfactoriamente este test fueron posteriormente analizados.

Los espectros se pueden estudiar y analizar de dos formas: por análisis de diferentes ventanas espectrales o por análisis de reconocimiento de patterns. Como primera alternativa analizamos las ventanas espectrales, las cuales están asignadas a distintos grupos funcionales. La Fig. 2 muestra un espectro típico bacteriano donde se señalan las distintas ventanas que se analizaron y los picos de absorción más frecuentemente encontrados.

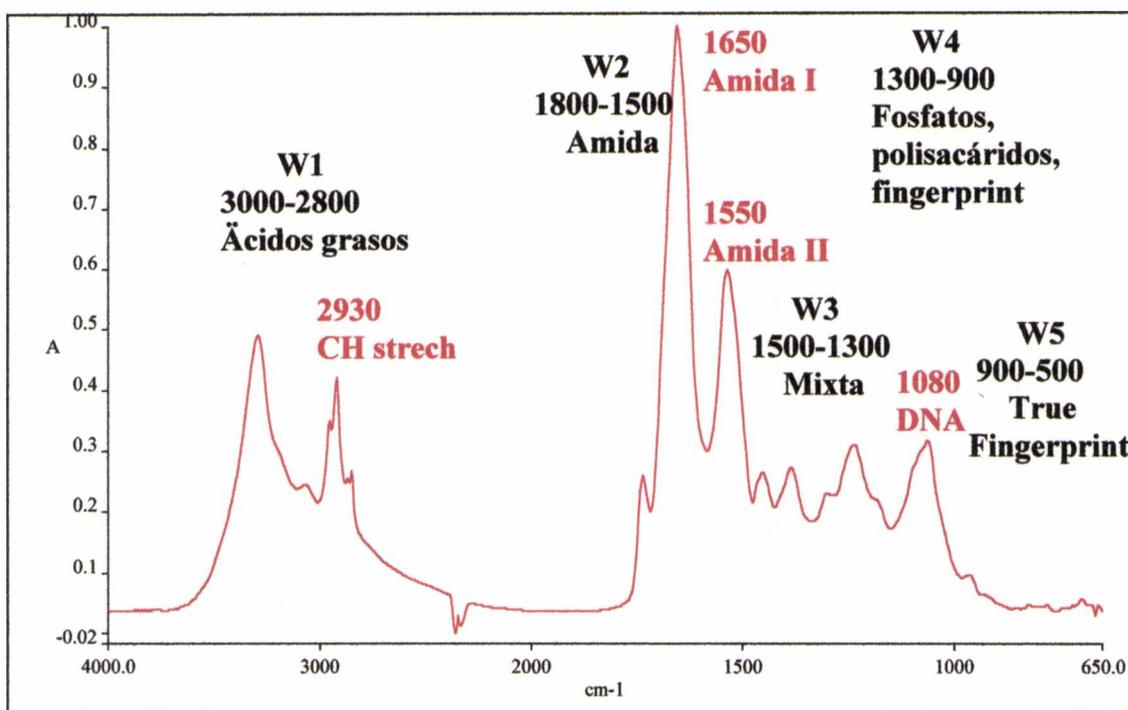


Fig. 2. Ejemplo de espectro de absorción infrarroja microbiana.

Estas ventanas, que se denominan de W1 a W5, corresponden a lípidos (W1), proteínas (W2), carbohidratos (W4), una zona mixta (ADN, proteínas, carbohidratos, lípidos, fosfato) y una zona de verdadero fingerprint (W5). Para procesar los espectros se utilizó el software Spectrum (Perkin-Elmer). Antes de comparar los espectros se los normalizó con respecto al estiramiento CH cercano a 2930 cm^{-1} . Al normalizar se multiplica cada punto de un espectro por un factor, lo que permite comparar espectros de distintas amplitudes. Luego se realizó la comparación de los espectros por medio de la función "compare". El software Spectrum, al comparar estima la similitud entre dos muestras en base a su correlación matemática. La comparación enfatiza aquellas características en el espectro que están relacionadas con la composición química de la muestra. Se empleó como medida de similitud el coeficiente de correlación (R), como se menciona en Materiales y Métodos. Una correlación de 1 es una correlación perfecta. En la práctica es poco probable que ocurra y

probablemente significa que los dos espectros son copias del mismo espectro. Una correlación de 0 indica que los dos espectros son totalmente distintos. Esto también es poco probable, porque siempre hay algunas pequeñas similitudes entre los espectros.

En la Fig. 3 se compararon los espectros IR de *Moraxella bovis* y *Bordetella pertussis* mostrando un bajo coeficiente de correlación global ($R=0.695$), lo cual se corresponde con la heterogeneidad propia de 2 géneros bacterianos diferentes.

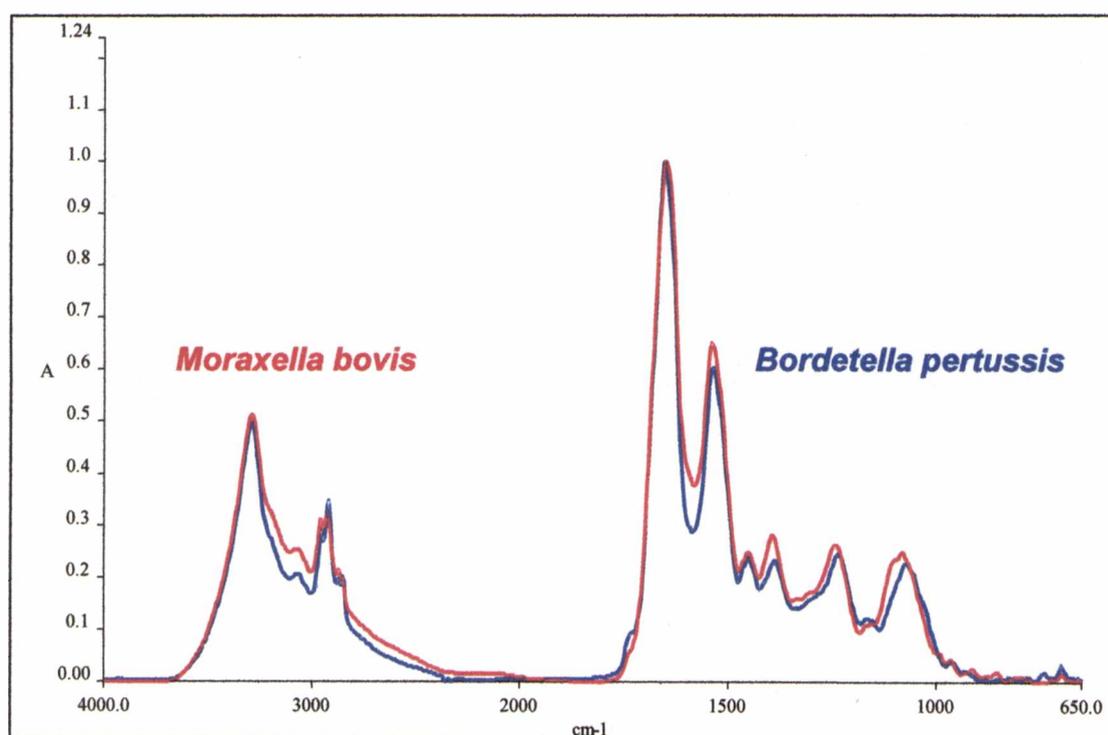


Fig. 3. Espectro de absorción infrarroja de dos géneros bacterianos diferentes: *M. bovis* (-) y *B. pertussis* (-).

Se analizaron luego, en forma comparativa, los espectros de los aislamientos en estudio. Los espectros IR de las 11 cepas de *M. bovis* mostraron bandas de absorción similares, no existen diferencias en las relaciones entre las mismas. En la Tabla 2 se observan los coeficientes de correlación entre pares de aislamientos calculados para cada ventana (W1-W5). La espectroscopia IR detecta diferencias entre organismos con el mismo

tipo de perfiles de ADN, PME, y LPS, lo cual estaría indicando que estos métodos no cubren en conjunto toda la composición molecular de las bacterias.

Tabla 2. Coeficientes de correlación entre pares de aislamientos

Microorganismos comparados	Tipo de Caract. Bioqca.			Diferencias en	Coeficiente de correlación				
	ADN	PME	LPS		Global	W1	W2	W3	W4
Mb 1194 03 Mb 1194 03	1	2	1	-	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Mb 1194 03 Mb B27	1	2	1	-	0.935	0.996	0.991	0.977	0.903
Mb ehi Mb CH1	3	3	2	ADN	0.973	0.998	0.992	0.935	0.717
Mb 1194 03 Mb B1	1	2	1	LPS	0.949	0.997	0.985	0.932	0.858
Mb B19 Mb B1	1	1	2	PME	0.894	0.980	0.834	0.992	0.982
Mb B27 Mb CH1	1	2	1	ADN/PME/ LPS	0.936	0.994	0.985	0.944	0.713
<i>Moraxella bovis</i> <i>Bordetella pertussis</i>				GÉNERO	0.695	0.925	0.697	0.821	0.589

De los resultados obtenidos en este estudio se puede inferir que la comparación de espectros es adecuada para diferenciar bacterias de distinto género. Sin embargo, no fue posible distinguir diferencias en los espectros de *Moraxella bovis* en base a las características de ADN, PME Y LPS, tal como era esperado.

En base a estos resultados decidimos analizar los espectros de los aislamientos de *M. bovis* en base a una segunda alternativa que es por análisis de reconocimiento de patterns. En este caso utilizamos el software Opus que es superior al Spectrum, tiene mayor poder de análisis. Para poder llevar a cabo el análisis de patterns, primero se realizó una normalización vectorial global y se buscó la derivada primera de los espectros para aumentar la resolución. Luego se estudió la reproducibilidad de los mismos. Para esto

definimos nuestro límite de reproducibilidad, se tomó la decisión de aceptar todos aquellos replicados que tuvieran una reproducibilidad menor que 10 y de rechazar aquellos en que la misma fuera mayor que 10. Para analizar la reproducibilidad de los espectros se usó como medida de distancia el coeficiente de Pearson y como método jerárquico de clasificación la unión promedio (“average linkage”) y a partir de ahí se construyó el dendrograma que muestra la reproducibilidad. Como *M. bovis* se puede presentar en fase piliada o no piliada, se hicieron espectros de bacterias piliadas y no piliadas. Como se ve en las Fig. 4 y 5, las bacterias piliadas presentan gran heterogeneidad debido a la presencia de cantidades variables de pilis, en tanto que los espectros registrados a partir de bacterias no piliadas se mostraron más homogéneos. La heterogeneidad se observa en las ventanas 3400-2800 cm^{-1} (Fig. 4) y 1800-800 cm^{-1} (Fig. 5), siendo éstas las ventanas espectrales donde se alcanza mayor capacidad de discriminación. Cuando se hace el dendrograma que muestra la reproducibilidad espectral de las células piliadas, se ve que se obtiene una distancia de 20 (Fig. 6), mientras que para las células no piliadas la heterogeneidad es de 9 (Fig. 7). Por esta razón, para independizarnos de la heterogeneidad que trae aparejada la presencia de cantidades variables de pili es que se usaron para los análisis espectrales comparativos, células no piliadas, tomando como límite máximo de reproducibilidad 9. Aquellos aislamientos cuyos replicados (intra e interensayo) tuvieron reproducibilidad menor o igual que 9 fueron aceptados para ser comparados en el análisis de variación intraespecífica.

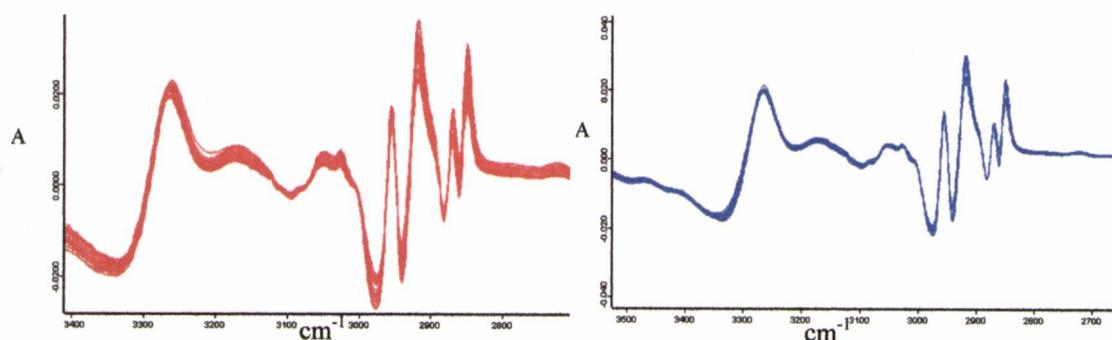


Fig. 4. Primera derivada de los espectros IR de aislamientos de *M. bovis* piliados (-) y no piliados (-) en la ventana espectral 3400-2800 cm^{-1} , mostrando la heterogeneidad de los espectros de 25 replicados de *M. bovis* 1194 03 piliada y no piliada, respectivamente.

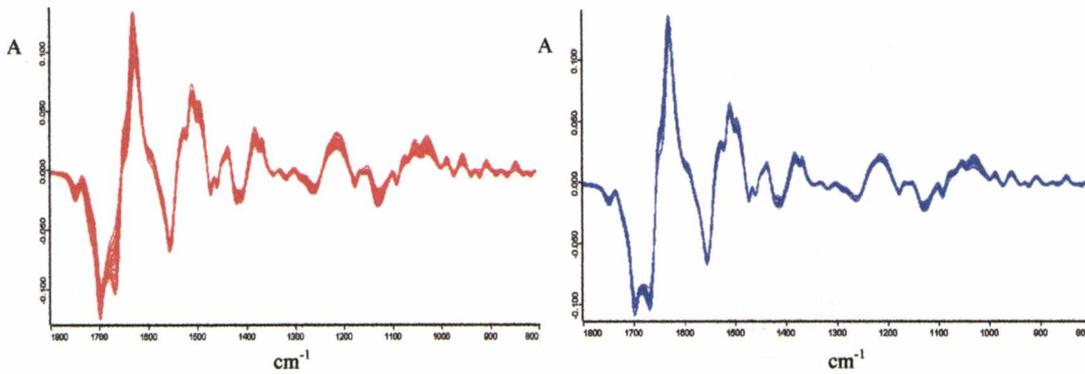


Fig. 5. Primera derivada de los espectros IR de aislamientos de *M. bovis* piliados (-) y no piliados (-) en la ventana espectral 1800-800 cm^{-1} . Se muestran la heterogeneidad de los espectros de 25 replicados de *M. bovis* 1194 03 piliada y no piliada, respectivamente.

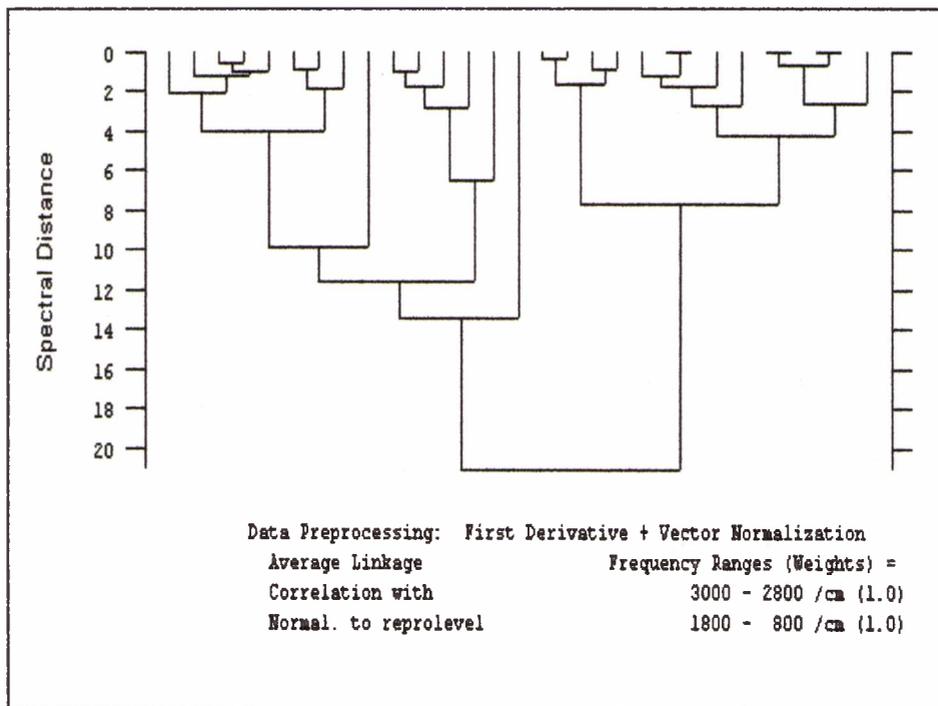


Fig. 6. Dendrograma que muestra la reproducibilidad de los 25 espectros de aislamientos piliados de *M. bovis* 1194-03.

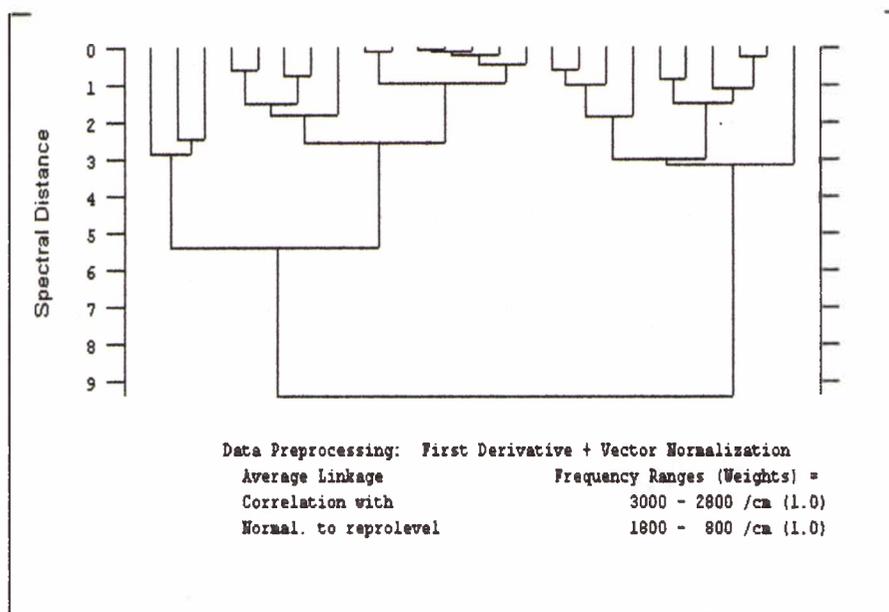


Fig. 7. Dendrograma que muestra la reproducibilidad de los 25 espectros de aislamientos no piliados de *M. bovis* 1194-03.

En las Figs. 8, 9, 10 y 11 se muestran los dendrogramas correspondientes a la reproducibilidad de algunos de los aislamientos de *M. bovis* utilizados, donde se demuestra que los espectros replicados tienen buena reproducibilidad, ninguno supera el valor 9 de distancia espectral.

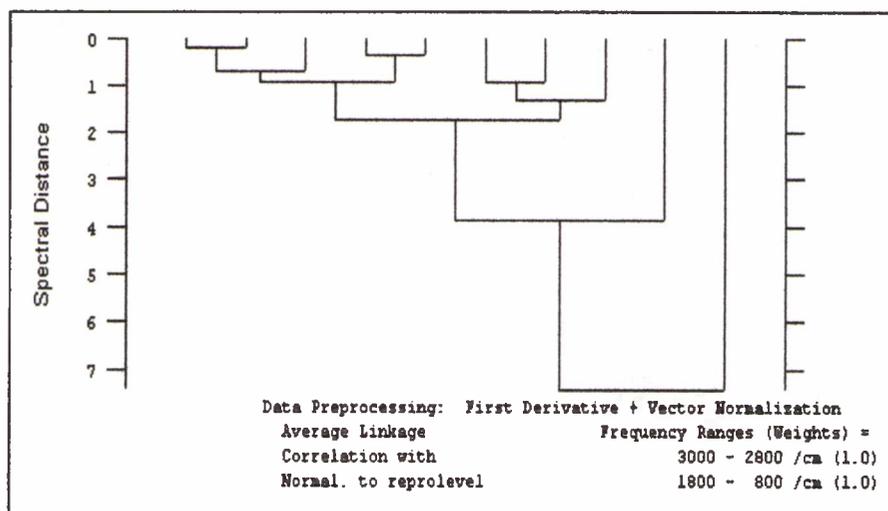


Fig. 8. Dendrograma de reproducibilidad obtenido luego de analizar 10 espectros del aislamiento *M. bovis* 195-175.

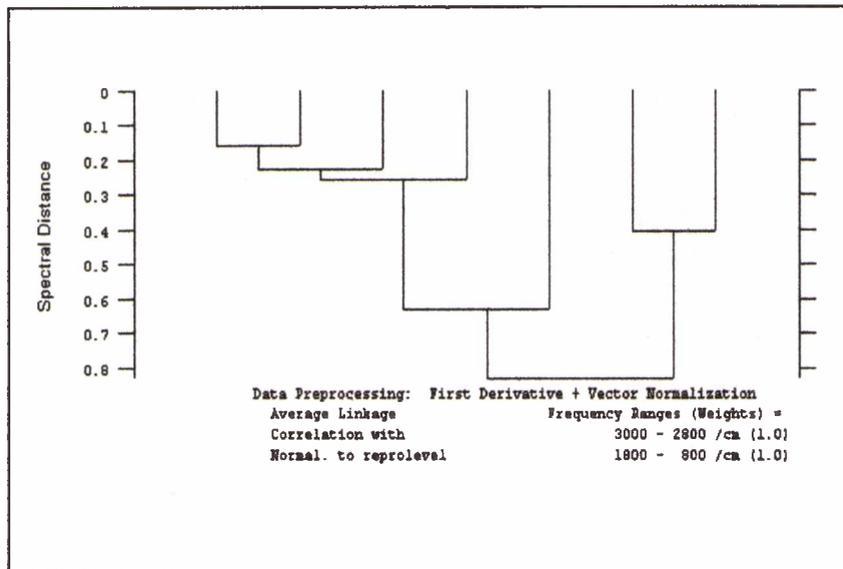


Fig. 9. Dendrograma de reproducibilidad obtenido luego de analizar 7 espectros del aislamiento *M. bovis* Ce3a.

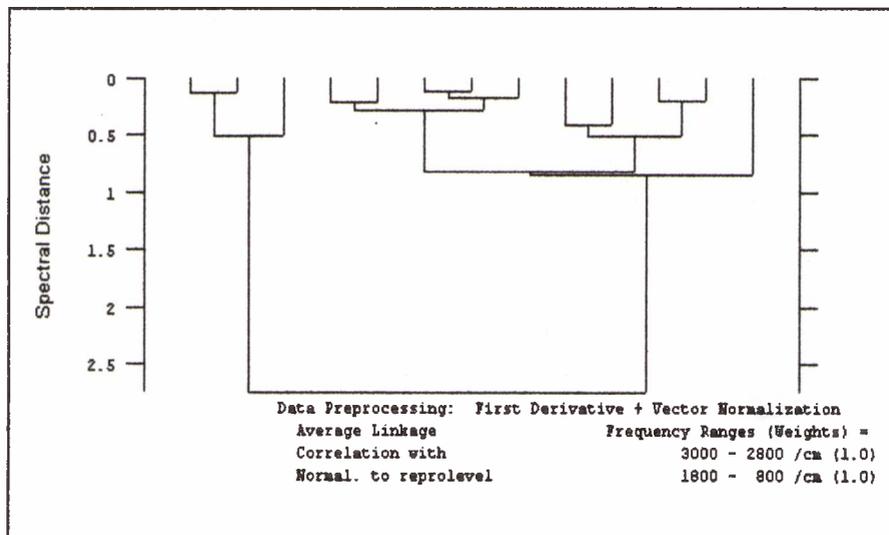


Fig. 10. Dendrograma de reproducibilidad obtenido luego de analizar 13 espectros del aislamiento *M. bovis* 1194-04.

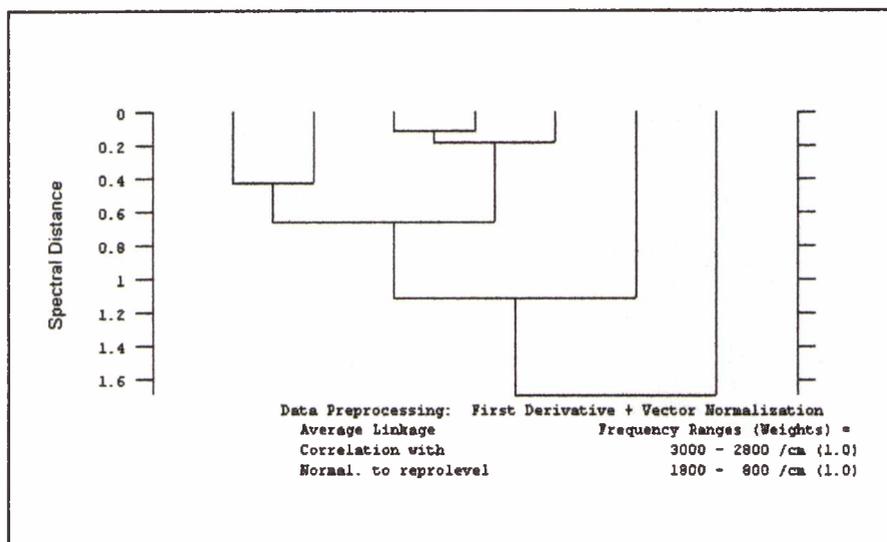


Fig. 11. Dendrograma de reproducibilidad obtenido luego de analizar 7 espectros del aislamiento *M. bovis* B27.

En la Fig. 12 se pueden observar los espectros de las derivadas primeras obtenidas de los aislamientos de *M. bovis* analizados. Entre ellos se incluyó la cepa de referencia *M. bovis* ehi 70.39 de la Colección del Instituto Pasteur (CIP, París). En total se analizaron 110 espectros, correspondientes a 7-10 replicados de cada aislamiento. Estos replicados incluyen a los analizados intraensayo (repeticiones dentro del mismo ensayo, el mismo día) e interensayo (obtenidos en días distintos a lo largo de un período de 6 meses). En la Fig. 12 se observan las ventanas espectrales más discriminatorias para analizar la heterogeneidad de los espectros de *M. bovis*.

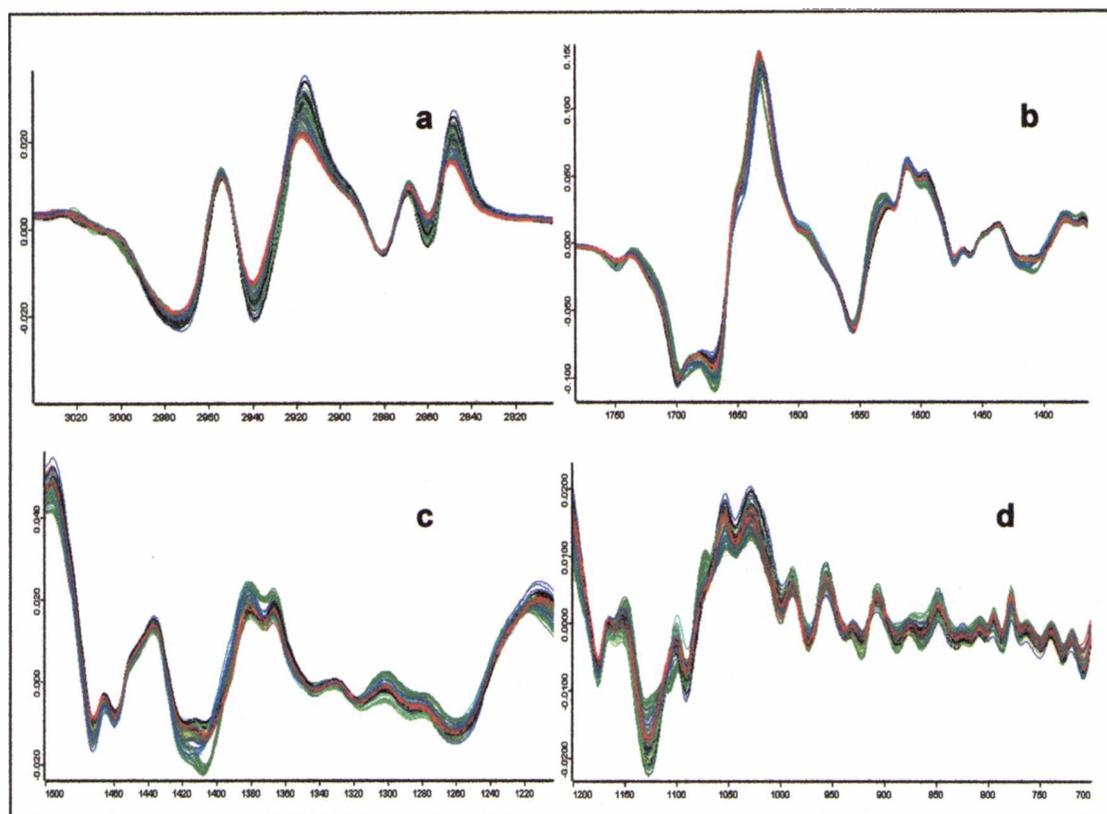


Fig. 12. Heterogeneidad de los espectros IR de los aislamientos de *M. bovis* analizados. Se ve la derivada primera de los espectros en las principales ventanas espectrales: a) 3020-2820 cm^{-1} , b) 1750-1400 cm^{-1} , c) 1500-1220 cm^{-1} y d) 1200-700 cm^{-1} .

Luego, en base a estos rangos espectrales donde se detectaron diferencias entre los espectros, se realizó el análisis de cluster de los 11 aislamientos de *M. bovis* no piliados, utilizando para clasificar por similitud a los espectros el algoritmo de Ward y el coeficiente de correlación de Pearson como medida de distancia (Fig. 13).

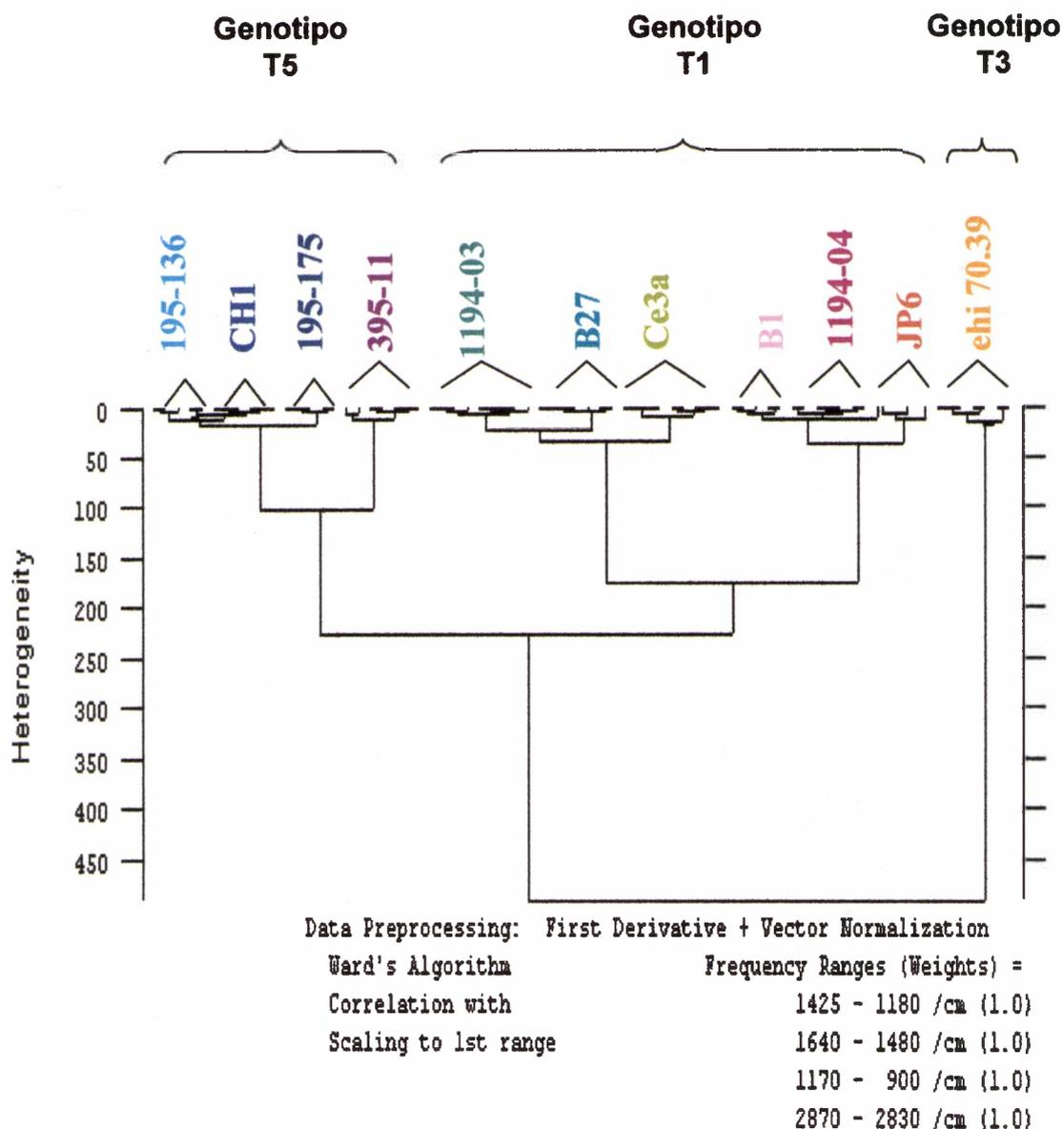


Fig. 13. Dendrograma de análisis jerárquico de cluster en medidas de 11 aislamientos diferentes de *M. bovis* (110 espectros en total). El análisis de cluster fue realizado utilizando las derivadas primeras, considerando los rangos espectrales 2870-2830, 1640-1480, 1425-1180 y 1170-900 cm^{-1} . Se aplicó el logaritmo de Ward y se usó el coeficiente de correlación de Pearson para el cálculo de la matriz de distancias. En el extremo superior se detallan los genotipos de los aislamientos determinados por PCR.

La Fig. 13 revela una buena discriminación a nivel intraespecie, lo que prueba que los aislamientos de *M. bovis* pueden ser clasificados a este nivel por FTIR. Además, la clasificación obtenida por FTIR se correlaciona con el

agrupamiento genético obtenido por PCR. En el extremo superior de la Fig. 13 se señala el genotipo de los aislamientos de *M. bovis* (como se observa en el capítulo 2). Se observa que la técnica espectroscópica vibracional tiene a su vez, mayor capacidad discriminatoria que la técnica genética, ya que aislamientos que tienen el mismo genotipo son agrupados en clusters separados por FTIR.

Para comparar la heterogeneidad obtenida entre los distintos aislamientos de *M. bovis* (intraespecie) con la heterogeneidad que se obtiene si se procesan distintas bacterias Gram (-) (de distinto género), realizamos un análisis de cluster para bacterias Gram (-) pertenecientes a 4 géneros distintos: *Bordetella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* y *Moraxella bovis*. Este análisis de cluster fue procesado en las mismas condiciones que para los aislamientos de *M. bovis*. En la Fig. 14 se muestran los espectros IR de los distintos géneros bacterianos en los rangos espectrales donde se observan las mayores diferencias espectrales, y en la Fig. 15 se muestra el dendrograma generado por el análisis de cluster realizado a estos espectros. Se observa que la heterogeneidad debido a género es mucho mayor que la encontrada en la variación intraespecie de *M. bovis*, siendo de 1600 en el primer caso y de 200 a 450 en el segundo caso.

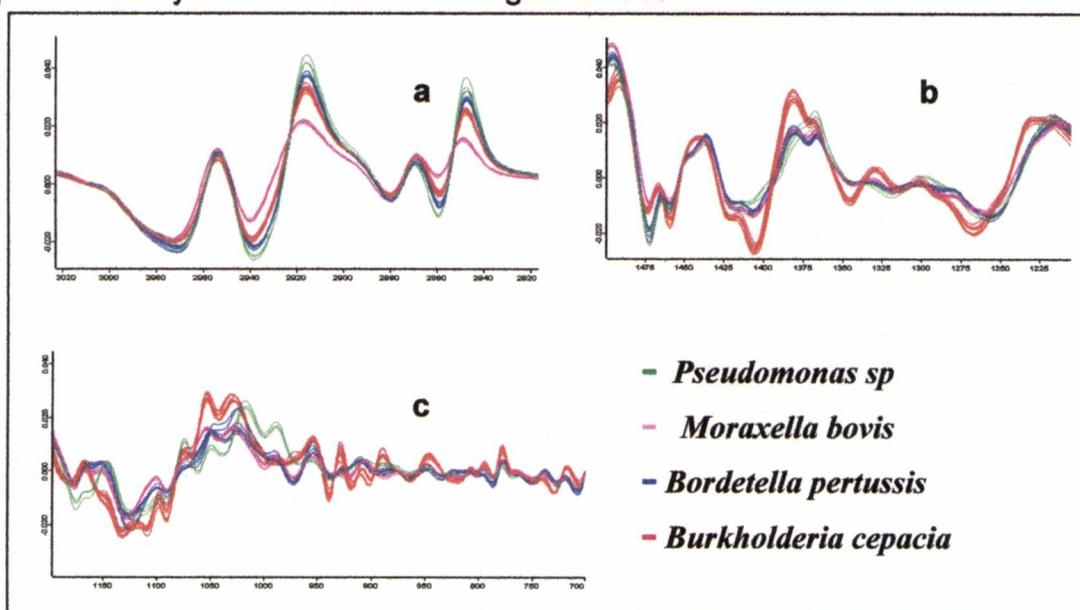


Fig. 14. Espectros IR de distintas bacterias Gram (-) en las ventanas espectrales más discriminadoras: a) 3000-2800 cm^{-1} , b) 1500-1250 cm^{-1} y c) 1200-700 cm^{-1} .

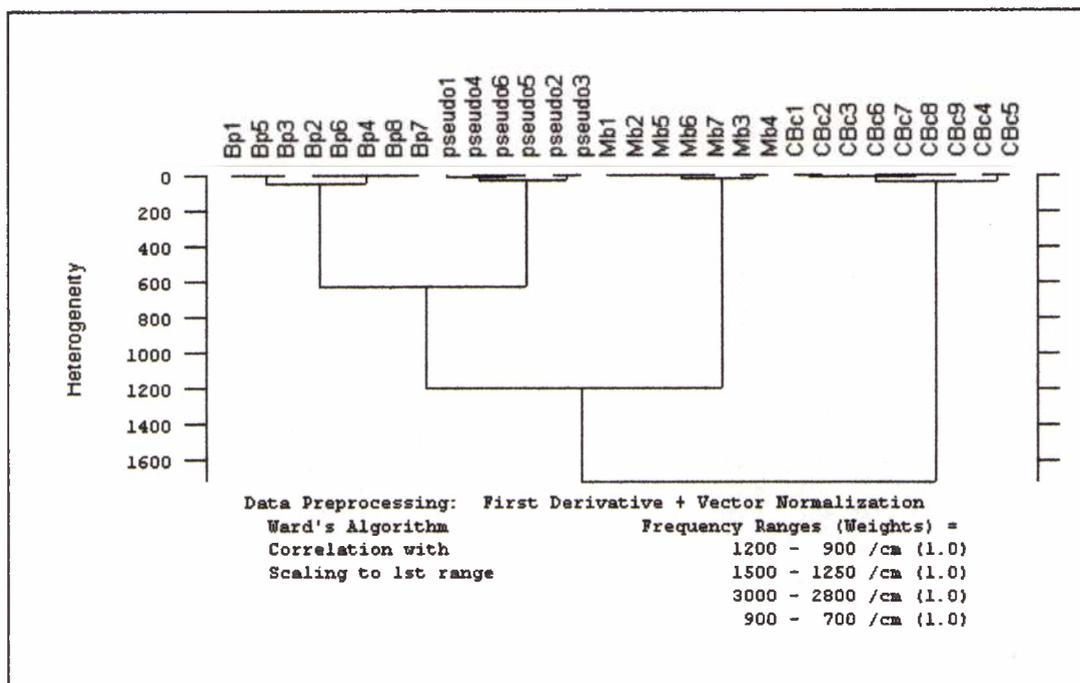


Fig. 15. Dendrograma de análisis jerárquico de cluster de distintas bacterias Gram (-).

Una vez clasificadas las bacterias se puede construir una librería o banco de datos espectrales para un microorganismo determinado, para lo cual se necesita una gran cantidad de espectros. Se necesitan no menos de 10 cepas, cada una de las cuales debe tener como mínimo 20 espectros replicados tomados durante un lapso de 6 meses a 1 año. Es pertinente que estos sets de datos de referencia contengan un número representativo de espectros que cubran todos los tipos espectrales posibles para ser identificados. La identificación de una cepa bacteriana desconocida, entonces, se realiza comparando el espectro IR de un microorganismo desconocido con los datos de referencia. Primero el espectro se subdivide en varias ventanas espectrales, seleccionadas como aquellas que contienen la información espectral más discriminativa. Luego se usa la combinación de estas ventanas espectrales en un procedimiento siguiente de correlación que determina el espectro más similar contenido en el banco de datos. Finalmente, el programa da una lista de los resultados más probables.

Estos resultados confirman que FT-IR es una herramienta de gran poder discriminatorio y apropiada para diferenciar aislamientos de *M. bovis*.

BIBLIOGRAFÍA

- Butler, W. R., Jost Jr., K. C. And Kilburn, J. O. (1991). Identification of mycobacteria by high-performance liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 29: 2468-2472.
- Curk, M.C., Peladan, F. and Hubert, J.C. 1994. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy for Identifying Lactobacillus Species. *FEMS Microbiol. Lett.*, 123: 241-248.
- Eisenach, K. D., Crawford, J. T. and Bates, J. H. (1988). Repetitive DNA sequences as probes for Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 26: 2240-2245.
- Goodacre, R., E. Timmins, M., Rooney, P. J., Rowland J. J. and Kell, D. B. (1996). Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol. Lett.* 140: 233-239.
- Helm, D. & Naumann, D. (1995). Identification of some bacterial cell components by FT-IR spectroscopy. *FEMS Microbiol Lett* 126: 75-80.
- Helm, D., Labischinski, H. and Naumann D. (1991) (a). Elaboration of a procedure for identification of bacteria using Fourier- transform infrared spectral libraries: A stepwise correlation approach. *J Microbiol Meth* 14: 127-142.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G & Naumann, D. (1991) (b). Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J Gen Microbiol* 137: 69-79.
- Hughes, M. S., Skuce, R. A., Beck, L. A. and Neil, S. D. (1993). Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. *J Clin Microbiol* 31: 3216-3222.
- Kacuráková, M., Capek, P., Sasinková, V., Wellner, N. & Ebringerová, A. (2000). FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydr Polym* 43: 195-203.

- Lasch, P., Haensch, W., Lewis, E. N., Kidder, L. H. and Naumann D. (2002). Characterization of Colorectal Adenocarcinoma Section by spatially Resolved FT-IR Microspectroscopy. *Appl Spectroscopy* 56: 1
- Maquelin, K., Choo-Smith, L.P., Krischner, C., Ngo-Thi, N. A., Naumann, D. and Pupples G. P. (2002). Vibrational Spectroscopic Studies fo Microorganisms, in Handbook of Vibrational Spectroscopy, ed J. M Chalmers and P. R. Griffiths.
- Naumann, D, D. Helm, and H. Labischinski . (1991) (a). *Nature* (London). 351: 81-82.
- Naumann, D. (2000). Infrared spectroscopy in microbiology. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 102-131. Edited by R. A. Meyers. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.
- Naumann, D., C. P. Shultz and D. Helm. (1996). What can infrared spectroscopy tell us about the structure and composition of intact bacterial cells? *In: Infrared Spectroscopy of Biomolecules*, D. Chapman (eds.) pp 279-310. New York.
- Naumann. D, Labischinski, H. and Giesbrecht, P. (1991) (b). The Characterization of microorganisms by Fourier-transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), *in* "Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis", ed. W.H. Nelson, VCH, New York, 97-143.
- Tintelnot, K., Haase, G., Seibold, M., Bergmann, F., Staemmler, M., Franz, T. and Naumann, D. (2000). Evaluation of penotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *J Clin Microbiol* 38: 4, 599-1608.

Capítulo 4

*Desarrollo de una técnica de
enzimo-inmunoensayo para
la cuantificación de
piliación en M. bovis*

Enzimoimmunoensayo (ELISA) para detección de piliación en células enteras de *M. bovis* (bact-ELISA)

Introducción

M. bovis expresa varios factores de virulencia, incluyendo pili, hemolisina, leucotoxina y proteasas. Entre estos factores los pilis son considerados uno de los más importantes debido a su rol en el establecimiento de la infección (Ruehl et al., 1988; Wilcox, 1968). Mientras que la inoculación experimental en ojos de vacunos con organismos piliados causa infección ocular persistente y enfermedad en terneros, la inoculación con variantes no piliadas de las mismas cepas no la produce. (Pedersen et al., 1972; Pugh et al., 1976). Ha sido ampliamente descrito que los pilis son antigénicos, motivo por el cual los mismos son actualmente recomendados como componentes esenciales de vacunas, sean estas en base a formulaciones celulares o acelulares (Moore and Lepper, 1991; Lepper et al., 1993; Lepper et al., 1995). La expresión de pili está sujeta, como se expresó en el Capítulo 1, a variación de fase e influenciada por condiciones ambientales (Bovre and Froholm, 1972; Jayappa and Lehr, 1986; McMichael, 1992). *M. bovis* generalmente expresa el fenotipo piliado cuando crece en medio sólido, mientras que estas bacterias cuando son cultivadas en medio líquido (la forma habitualmente utilizada para la producción de vacunas), tienden a expresar el fenotipo no piliado (Lepper et al., 1993). Esta pérdida de piliación puede ser debida a una variación de fase y/o consecuencia del stress hidrodinámico generado en cultivos agitados por la aereación y agitación, como ha sido reportado para otros antígenos bacterianos de tipo filamentoso (Rodríguez et al., 1993; Rodríguez et al., 1996).

Como la calidad de las vacunas contra QIB, depende principalmente de la presencia de pilis, el control de la expresión de los mismos, durante la producción de células de *M. bovis* en distintos sistemas de cultivo requiere disponer de una técnica de alta especificidad y sensibilidad para la evaluación del nivel de piliación. Además esta metodología podría utilizarse en pruebas de control de vacunas.

Existía al momento de la realización de estos trabajos una técnica de ELISA sándwich doble anticuerpo propuesta por Lepper y Hermans (1986) para determinar piliación. La técnica era una de las pocas metodologías descritas que podría ser usada para la determinación de pili unido a célula. Esta metodología tiene el inconveniente que los pili tienen que ser separados de las células antes de su cuantificación. Este requerimiento experimental consume tiempo y es difícil de estandarizar por lo cual no resulta recomendada para fines de análisis de gran número de muestras.

Estudios previos en otros organismos han reportado la determinación de antígenos fimbriales por evaluación directa de los mismos en células bacterianas enteras usando técnicas de enzimo-inmunoensayo (ELISA) (Elder et al., 1982; Gómez-Duarte et al., 1999).

En Argentina no existía una metodología desarrollada para evaluar piliación en *M. bovis*, no sólo en vacunas formuladas sino también como forma de monitoreo de procesos. En este sentido, hasta donde nosotros conocemos, tanto el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA), que es el organismo encargado de analizar las vacunas de uso veterinario que se emplean en nuestro País, como empresas privadas que fabrican este tipo de vacunas, no disponían de ninguna metodología para evaluar piliación.

Teniendo en cuenta esta situación y la necesidad de poder disponer de una técnica que nos permitiera evaluar la presencia de este antígeno durante nuestros trabajos de producción en biorreactores, es que decidimos desarrollar un ELISA competitivo secuencial de células bacterianas enteras (bact-ELISA) que permitiera la determinación rápida y precisa de antígenos de pili unidos a células de *M. bovis*.

Materiales y métodos

Microorganismos y condiciones de cultivo

En el presente estudio se emplearon células piliadas y no piliadas del aislamiento de *M. bovis* 1194-03 (Prieto et al., 1999). Se seleccionaron colonias piliadas y no piliadas de medio sólido y ambas formas se mantuvieron a -70°C en caldo tripticasa de soja (TSB) con 20% de glicerol. Las bacterias fueron cultivadas por 24 h a 37°C en agar tripticasa de soja (TSA, Merck, Germany)

suplementado con sangre de caballo desfibrinada al 7% (TSAB). Para los cultivos en sistema batch, para iniciar cada proceso se seleccionaron colonias piliadas de placas de agar, las cuales fueron resuspendidas en 100 ml de caldo cerebro-corazón (BHB, Merck, Germany) y usadas para inocular un biorreactor de 6 l (LKB 1601 Ultroferm, LKB, Bromma, Sweden) con 4 l del medio BHB. La densidad óptica inicial fue ajustada a 0,20. El aire fue suministrado a $0,5 \text{ l l}^{-1} \text{ min}^{-1}$ y la concentración de oxígeno disuelto fue mantenido a un valor de 30% de saturación cambiando la velocidad de agitación. La temperatura fue controlada a 37°C . El crecimiento celular fue seguido por densidad óptica a 650 nm (1 unidad $\text{DO}_{650}=3,2 \times 10^8$ organismos ml^{-1}). Muestras del cultivo fueron asépticamente tomadas a intervalos regulares y se analizó la presencia de pilis en células y sobrenadantes. Los procesos se realizaron por cuatuplicado.

Purificación de pilis

Los pilis fueron purificados en base a un procedimiento descrito previamente por Lepper and Hermans (1986) con modificaciones. Se partió de un liofilizado el cual fue resuspendido en solución fisiológica estéril. Se sembró una caja de TSAB la cual se incubó a 37°C durante 24 h. Se seleccionaron colonias rugosas, planas, secas, firmes correspondientes al fenotipo piliado de *M. bovis*. Se subcultivaron las colonias en hasta 30 placas de TSAB (24 h a 37°C) a fin de obtener una biomasa importante sobre la cual se llevarían a cabo los procedimientos de extracción de pilis. Se levantaron de la superficie de las placas colonias uniformes morfológicamente y se suspendieron en PBS (pH 7,4). Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a $6000 \times g$ durante 5 min a 4°C . Todos los pasos subsiguientes fueron llevados a cabo a 4°C . El pellet bacteriano fue lavado y resuspendido en 10ml de PBS. Posteriormente los pilis fueron mecánicamente removidos (shereados) de las bacterias usando un agitador tipo vortex (MS2 Minishaker, IKA Works, Wilmington, NC, USA) operado a máxima potencia, empleando 3 pulsos de 5 min cada uno. Las células bacterianas fueron removidas por centrifugación a $10000 \times g$ por 10 min. La liberación de pilis de las células fue monitoreada por microscopía electrónica de las células shereadas. El sobrenadante resultante fue filtrado a través de una membrana de policarbonato de tamaño de poro de $0,22 \mu\text{m}$ (MSI,

Westboro, MA, USA) y luego sujeto a ultracentrifugación durante 2 h a 100.000 x g (40 K). Después de 3 pasos secuenciales de ultracentrifugación el pellet fue resuspendido en 0,5 ml de agua destilada estéril y la concentración final de proteína evaluada mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). La pureza de la suspensión de pili fue determinada durante cada etapa del proceso de purificación por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 15% (p/v) (Laemmli, 1970) y tinción con plata (Wray et al., 1981). Además la suspensión final se evaluó por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la observación de las muestras se utilizó una grilla para microscopía electrónica la cual se cubrió con una película de colodión y se le depositó carbón por evaporación del mismo al vacío. Células de *M. bovis* y la suspensión de pili de cada una de las etapas de ultracentrifugación fueron resuspendidas en agua destilada estéril. Una gota de cada suspensión se colocó sobre la grilla. Treinta segundos más tarde, el fluido fue removido absorbiéndolo con papel de filtro y las grillas se tñeron durante 20 segundos con ácido fosfotúngstico (pH 5,2) al 2% (p/v). Las preparaciones se examinaron en un microscopio JEM 1200 EX JEOL (Servicio Central de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP).

Producción de suero anti-pili

Conejos blancos (Nueva Zelanda), hembras, libres de patógenos, fueron inyectados subcutáneamente con 1 ml de la suspensión de pili purificado (100 µg/ml) en adyuvante de Freund completo para la primera inoculación y adyuvante de Freund incompleto para el resto del plan de inmunización (1 dosis cada 15 días durante 3 meses). Siete días después de la última inmunización se sangraron los conejos y se separó el suero. El suero obtenido posteriormente fue adsorbido con células no piliadas de *M. bovis* para evitar reacciones inespecíficas. Para esto 1 ml de células no piliadas de $DO_{650}=10$ se lavaron con PBS y se pusieron en contacto con 500 µl de suero anti-pili. La

suspensión se vortexeó y se incubó a 37°C durante 2 h. Luego se centrifugó 5 min a 16000 rpm y se descartó el precipitado. EL sobrenadante se filtró con una membrana de policarbonato de 0.22 μm de diámetro de poro, obteniéndose de esta manera suero anti-pili libre de inespecificidades.

Inmunobloting

Muestras de pili purificado y lisados de células de *M. bovis* piliadas y no piliadas fueron tratadas con buffer de Laemmli y corridas en un gel de SDS-PAGE al 15%. Las bandas de proteína fueron transferidas del gel de poliacrilamida a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF, Immobilon, Millipore), aplicando 100 mA durante 1 h y usando como buffer de transferencia Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (pH 8,3). La membrana de PVDF se incubó con Tris-HCl 0,050 M, NaCl 0,150 M, pH 7,4 (TBS) conteniendo solución de leche descremada al 10% (p/v), durante 1 h a 37°C, para bloquear reacciones inespecíficas. Después de 3 lavados en TBS conteniendo Tween 20 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) (TBS-T) al 0,05% (v/v), la membrana fue incubada con una dilución 1:100 de suero de conejo anti-pili (1h, 37°C). Después de 3 lavados más con TBS-T, la membrana fue adicionalmente incubada (1 h, 37°C) con IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa (dilución 1:1500) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). El color de la reacción fue desarrollado usando 4-cloro-1-naftol (Sigma), dejándolo 30 minutos en oscuridad. Luego se lavó la membrana con agua bidestilada y se dejó secar.

Procedimiento analítico: ELISA para la cuantificación de pili unido a célula (bact-ELISA)

El nivel de piliación de poblaciones de células enteras de *M. bovis* fue determinado usando un bact-ELISA competitivo secuencial, formato que permite obtener alta detectabilidad (Chirido et al., 1995). Células altamente piliadas de *M. bovis* (crecidas en placas de TSAB) fueron lavadas en PBS, resuspendidas en formalina al 5% en PBS e incubadas toda la noche a 4°C. Las bacterias fueron lavadas tres veces con PBS, alicuotadas y mantenidas a -70°C hasta el momento de ser usadas para sensibilizar las placas de ELISA o

para preparar la curva de referencia. Para propósitos de sensibilización de placas, se ensayaron tres densidades ópticas ($DO_{650}=0,01$; 0,50 y 1,00) de esta suspensión. En los experimentos descritos en este estudio se usó una $DO_{650}=0,50$. Se sensibilizaron placas de poliestireno Maxisorp (Nunc, Denmark) con 100 μ l/fosa de suspensión bacteriana, incubando toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con PBS conteniendo 0,05% (p/v) de Tween 20 (PBS-T), los sitios de unión no específica en las placas fueron bloqueados por incubación, durante 1 h a 37°C, con 400 μ l/fosa de solución de bloqueo PBS conteniendo leche descremada en polvo al 10% (p/v). Luego se lavó tres veces con PBS-T. Paralelamente, se formaron inmunocomplejos en fase fluida durante un paso de preincubación, mezclando volúmenes iguales de suero anti-pili (dilución 1:10.000) y de suspensión bacteriana de muestras o suspensión celular de referencia, en PBS-T conteniendo leche descremada al 1% (p/v) (PBS-TS), y se incubaron 2 h a 37°C. Luego, sobre la placa previamente sensibilizada y bloqueada se realizó la etapa de competición con el antígeno en fase sólida. Para esto, se incubaron sobre la placa, durante 30 min a 37°C, 100 μ l/fosa de cada una de las muestras provenientes de la etapa de preincubación. Después de tres lavados, se agregaron 100 μ l/fosa de IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugada con peroxidasa (Sigma), diluida 1:5000 en PBS-TS y se incubó durante 1 h a 37°C. Después de tres lavados más, se agregaron 100 μ l/fosa de sustrato, consistente en dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD, 1 mg/ml, Sigma) y H_2O_2 al 30% (1 μ l/ml) en buffer de ácido cítrico 0,1 M-fosfato de sodio 0,1 M, pH 5,0. La reacción fue detenida luego de 15-20 min con el agregado de 50 μ l/fosa de ácido sulfúrico 4 N. Se determinó la absorbancia a 492 nm con un lector de placas (SLT Rainbow). En cada ensayo se incluyó una curva de referencia consistente en diluciones seriadas de la suspensión de referencia, ya mencionada, de células altamente piliadas de *M. bovis* (el nivel de piliación de estas células fue arbitrariamente fijado como de 100%). Los valores de absorbancia fueron transformados por la función logit (Tjssen, 1985) y se graficó Logit p vs Log 1/dilución

$$\text{Logit } p = \ln(p/1-p)$$

$$\text{Donde, } p = (A - A_0) / (A_M - A_0)$$

A: es el valor de absorbancia a 492 nm ($DO_{492 \text{ nm}}$) de los pocillos con las muestras o la referencia

A_0 : es la $DO_{492 \text{ nm}}$ de los pocillos sin solución de anticuerpo

A_M : es la $DO_{492 \text{ nm}}$ de los pocillos sin antígeno competidor.

El nivel de piliación celular se determinó comparando el título de las muestras (la inversa de la dilución de la muestra celular que da el 50% de inhibición) y el título de la suspensión celular de referencia (la inversa de la dilución de la suspensión celular de referencia que da el 50% de inhibición):

$$P = 100 \times \left(\frac{S}{R} \right)$$

donde P es el porcentaje de piliación celular en la muestra, S el título de la muestra y R el título de referencia.

Se corrieron los siguientes controles en paralelo: (i) pocillos sin bacterias y con PBS-TS, (ii) pocillos con PBS-TS en lugar de antisuero, (iii) pocillos sin IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa, y (iv) pocillos con suero normal de conejo en lugar de suero anti-pili.

Procedimiento analítico para la cuantificación de pili soluble (sol-ELISA)

Se cuantificó la concentración de pili soluble tomando como base un método previamente descrito por Chirido et al. el cual fue parcialmente modificado (1995). Para ello, se sensibilizaron placas de poliestireno Maxisorp (Nunc, Denmark) con 100 μl /fosa de una suspensión de pili purificado en PBS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), incubando durante toda la noche a 4°C. Después de tres lavados en PBS-T, los sitios de unión remanentes en las placas fueron bloqueados con PBS conteniendo leche descremada al 10% (p/v) (1 h, 37°C). Luego, se lavó tres veces con PBS-T. Volúmenes iguales de suero anti-pili de conejo adsorbido (1:10.000 en PBS-TS) y de una suspensión de pili (rango: 39 ng/ml-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS-TS) o de la muestra a ser analizada (pili libre de células de *M. bovis*), fueron incubados 2 h a 37°C, en tubos eppendorf, durante una etapa de

preincubación. Luego, 100 μ l de esta mezcla se agregaron a cada fosa de la placa y se incubaron durante 30 min a 37°C (etapa de competición). Después de otros tres lavados, se agregó 100 μ l/fosa de IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma), diluido 1:5000 en PBS-TS y se incubó 1 h a 37°C. El color de la reacción se desarrolló por el agregado de una solución que contiene o-fenilendiamina (1 mg/ml, Sigma) y H₂O₂ al 30% (1 μ l/ml) en buffer de ác. cítrico 0,1 M-fosfato de sodio 0,1 M, pH 5,0. La reacción enzimática se frenó con 50 μ l/fosa de ácido sulfúrico 4 N. Se determinó la absorbancia a 492 nm y sus valores se transformaron por la función logit.

Estadística

Todos los ensayos fueron repetidos al menos tres veces, de manera independiente. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) utilizando para la comparación de medias el test de Menor Diferencia Significativa (LSD) con un grado de significación de $\alpha < 0.05$. El coeficiente de variación (cv) se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$CV = \left(\frac{\text{desviación estándar}}{\text{media}} \right) \times 100$$

Resultados

En primer lugar se purificaron pilis a partir de colonias piliadas de *M. bovis* crecidas en placas de TSAB. Las mismas fueron levantadas de la superficie, resuspendidas en PBS y shereadas para obtener pili no adherido a células. La liberación de pilis fue confirmada por microscopía electrónica de las células. Las Fig. 1A y 1B muestran las células de *M. bovis* antes y después del proceso de shereado. Los pilis fueron posteriormente recuperados del sobrenadante filtrado al cabo de tres etapas de ultracentrifugación. La pureza de la suspensión de pilis obtenida al final de cada etapa de ultracentrifugación fue monitoreada en geles de SDS-PAGE teñidos con plata. Se empleó TEM para chequear la suspensión de pili de la etapa final (Fig. 1C).

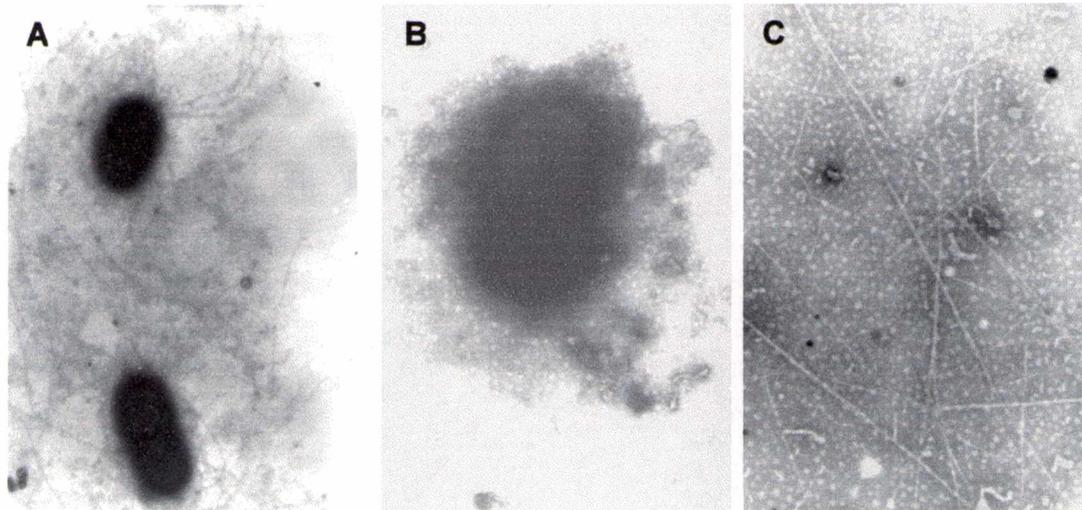


Fig. 1. Micrografía electrónica de transmisión de: (A) células de *M. bovis* 1194-03 piliadas, 10.000 x; (B) células de *M. bovis* no piliadas resultantes de un proceso de shereado mecánico, 15.000 x y (C) pili purificado de *M. bovis*, 30.000 x. Se muestran fotos representativas de uno de cuatro experimentos independientes.

Al cabo de tres etapas de ultracentrifugación se pudo obtener una sola banda de proteína la cual presentaba un PM de 19 kDa (Fig. 2), tal lo esperado para el pili tipo IV de *M. bovis* (Lepper and Hermans, 1986).

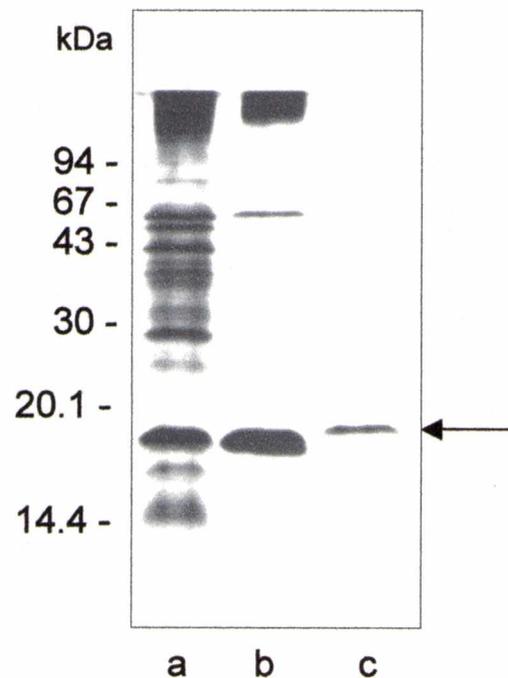


Fig. 2. Análisis por SDS-PAGE (15% p/v) del pellet obtenido después de uno (línea a), dos (línea b), y tres (línea c) pasos de ultracentrifugación durante la purificación de pili de *M. bovis*. En el extremo izquierdo se encuentran los marcadores de peso molecular. La flecha muestra la pilina.

Como se explicó, a partir de la suspensión de pili purificado se inocularon conejos para obtención de suero. El suero anti-pili obtenido fue adsorbido con células de *M. bovis* no piliadas y luego evaluado por inmunobloting con lisados de células de *M. bovis* piliadas y no piliadas, mostrando un reconocimiento específico (Fig. 3). Para los ensayos de Western blot se probaron tres diluciones del suero anti-pili adsorbido: 1/50, 1/100 y 1/500, obteniéndose óptimos resultados con la dilución 1/100. Consecuentemente esta fue la dilución de trabajo elegida para el inmunobloting.

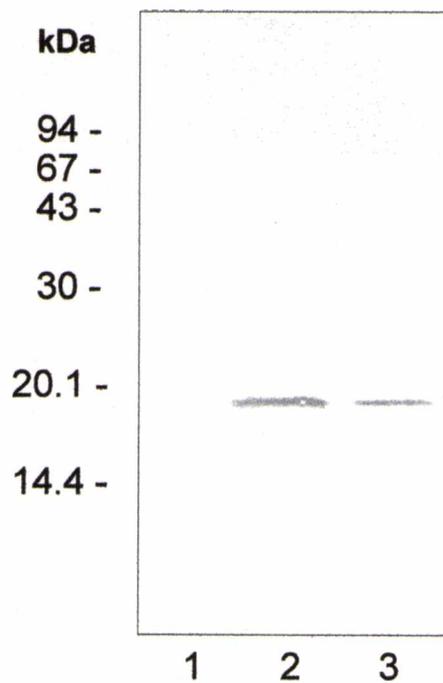


Fig. 3. Reactividad del suero anti-pili por western blot con lisados de células enteras de *M. bovis* no piliadas (línea 1), lisados de células piliadas (línea 2), y pili de *M. bovis* purificado (línea 3).

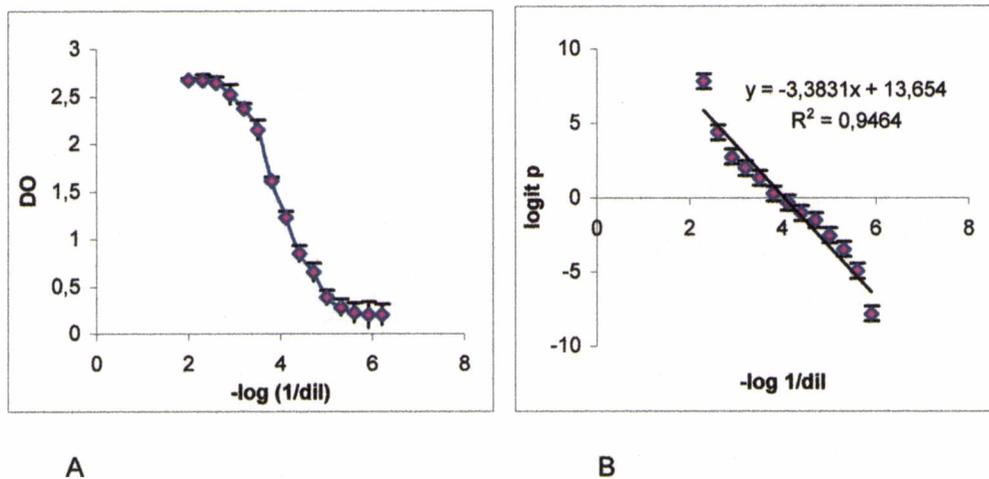


Fig. 4. Titulación del suero anti-pili de conejo, mostrando la curva sigmoidea (A) y la linealización por transformación a la función $\text{logit } p$ (B). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm los errores estándar de la media.

Se realizó la titulación del suero anti-pili de conejo por ELISA indirecto. Se analizó el mismo utilizando una dilución inicial 1/100 y diluciones seriadas factor 2. Estas diluciones de suero ensayadas demostraron ser adecuadas en lo que se refiere a la curva de respuesta obtenida. Las mismas permitieron alcanzar la saturación en niveles altos de concentración de suero, en tanto que en baja concentración se obtuvieron niveles de absorción del orden de magnitud de los blancos de reactivos. Esto permitió la definición de un rango de concentraciones en el que la respuesta fue lineal y a partir del cual se pudo estimar el título (Fig. 4A y 4B). El título de anticuerpo anti-pili es la dilución a la cual el $\text{logit } p=0$ (punto medio de la curva de titulación). De esta manera se obtuvo la dilución óptima de trabajo, que resultó ser 1:10.000. En consecuencia, esta dilución fue la que se usó a través de este estudio para los ensayos de ELISA.

Para la sensibilización de la placa para bact-ELISA, se testearon tres densidades ópticas de suspensiones celulares fijadas con formalina (DO_{650} : 0,01; 0,50 y 1,00). Por examen microscópico se confirmó un recubrimiento confluyente de los pocillos a una densidad óptima mínima de 0,50, concentración a la cual se alcanzó la mayor detectabilidad (Fig. 5). En el diseño de ELISA empleado, denominado competitivo secuencial, existe una etapa previa de formación de complejos inmunes antes de la competición

propia mente dicha (etapa de pre-incubación). Teniendo en cuenta datos de optimización bibliográficos previos (Chirido et al., 1995) de este formato específico de ELISA, se evaluó la duración de los pasos de preincubación y competición analizando distintos tiempos (30 min, 60 min y 120 min a 37°C) para ambas etapas, hallándose como óptimo 2 h y 30 min, respectivamente (Fig. 6A y 6B). Las curvas desplazadas hacia la izquierda indican una mayor detectabilidad.

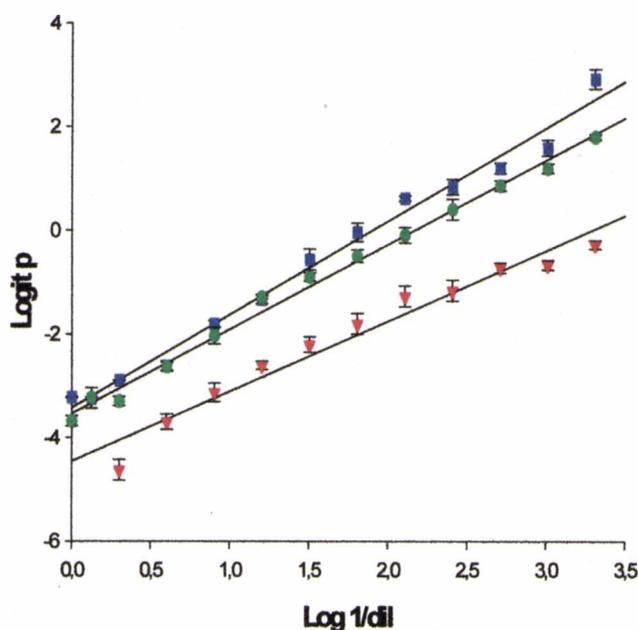


Fig. 5. Efecto de la concentración bacteriana empleada en la etapa de sensibilización en la performance del bact-ELISA. Se testearon diferentes densidades ópticas. (▼) $DO_{650}=0,01$; (■) $DO_{650}=0,50$ y (●) $DO_{650}=1,00$. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm los errores estándar de la media.

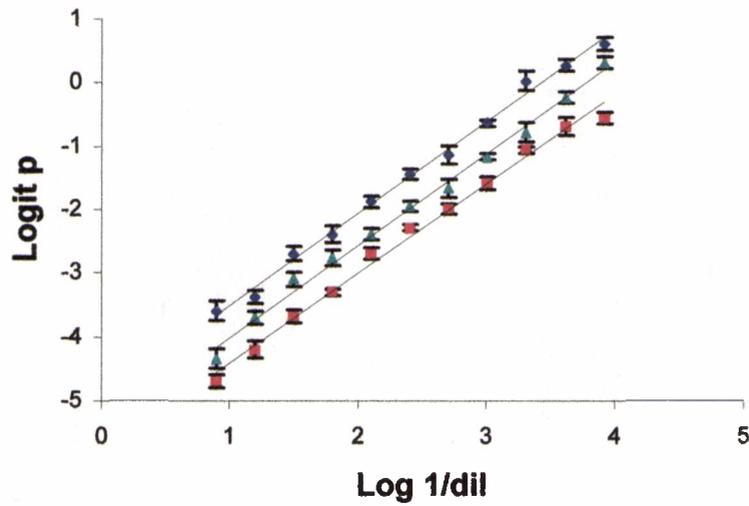


Fig. 6A. Influencia de las condiciones de preincubación en el ELISA. (■)30 min, (▲) 60 min y (◆) 120 min de preincubación a 37°C, sensibilización con $DO_{650}=0,50$ y tiempo de competición de 30 min a 37°C. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm los errores estándar de la media.

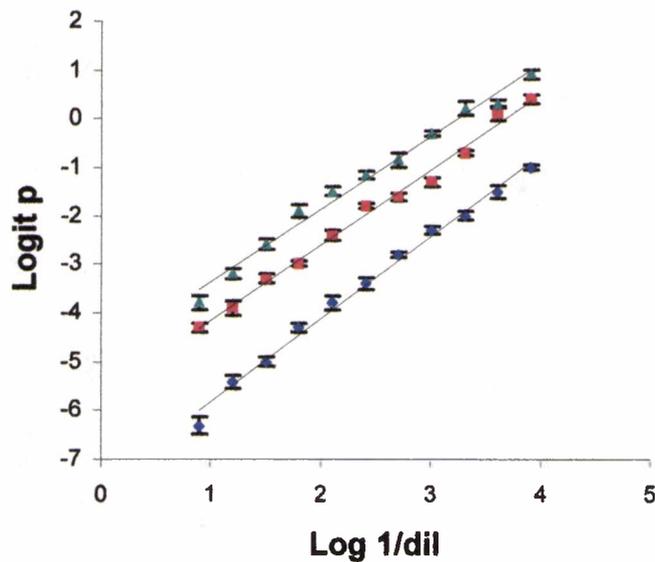


Fig. 6B. Influencia de las condiciones de competición en el bact-ELISA. (▲)30 min, (■)60 min y (◆) 120 min de competición a 37°C, sensibilización con $DO_{650}=0,50$ y tiempo de preincubación de 120 min a 37°C. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes \pm los errores estándar de la media.

La reproducibilidad de las pruebas está dada por el coeficiente de variación % (cv%). La variación intra-ensayo, definida como diferencias en las lecturas de experimentos por triplicado, demostraron ser menores del 10%, lo mismo que la variación inter-ensayo, día a día, la cual nunca excedió el 10% (Fig. 7A y 7B). El cv% da una idea de la precisión del experimento. Los valores de cv % por encima del 10% no son aceptables; se consideran bajos cuando son inferiores al 10%, medios cuando oscilan entre el 10% y el 20%, altos cuando varían entre el 20% y el 30% y muy altos cuando superan al 30%.

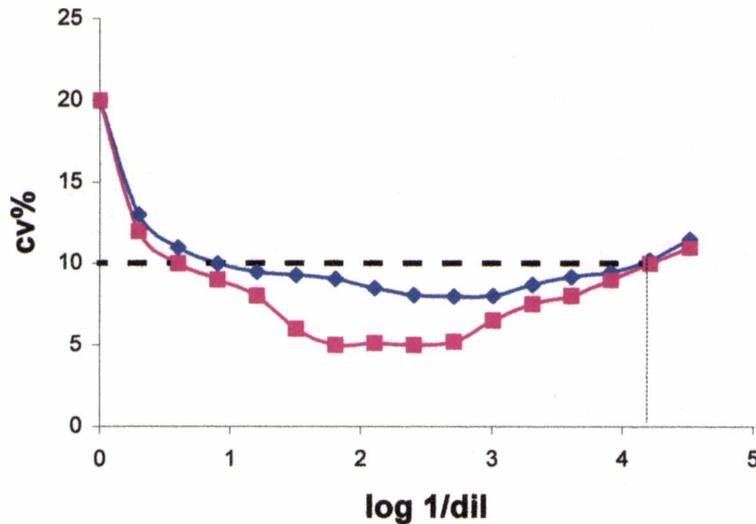


Fig. 7A. Análisis del coeficiente de variación % (■) intraensayo e (◆) interensayo en el bacteriophage ELISA.

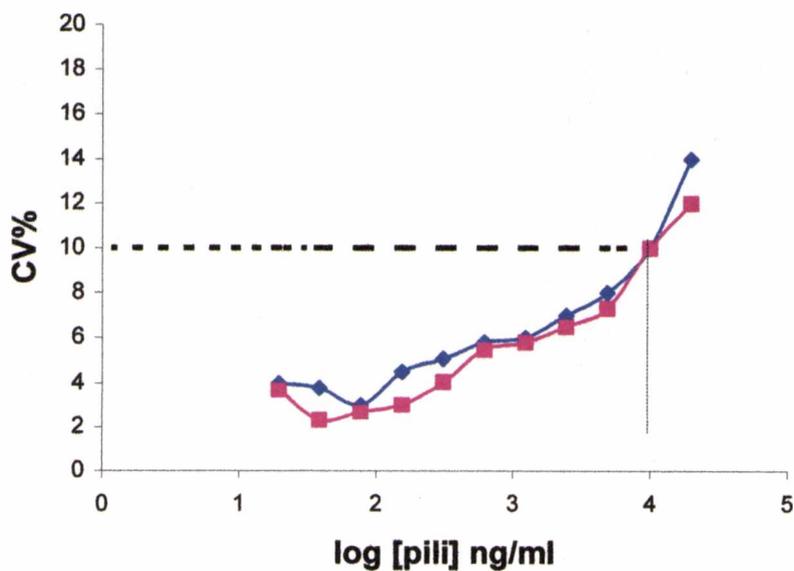


Fig. 7B. Análisis del coeficiente de variación % (■) intraensayo e (◆) interensayo en el soluble ELISA.

El rango de aplicación del ensayo se considera dentro del 10% de cv. En el caso del sol-ELISA es de 5 µg/ml a 19.5 ng/ml de pili. Para el sol-ELISA los valores obtenidos de los parámetros de detectabilidad son: límite de detección (calculado con test t con 99% de confianza) de 0.24 µg/ml y 50 % de inhibición (logit p = 0) igual a 0.44 µg/ml

Aplicación de las metodologías desarrolladas en el análisis de piliación durante procesos en reactores agitados

Teniendo en cuenta la pérdida de piliación celular descrita para *M. bovis* durante el cultivo en medio líquido (Lepper et al., 1993), se investigó si el método empleado era suficientemente sensible como para detectar la misma. Se tomaron muestras de células y sobrenadantes a distintas horas durante el cultivo bacteriano en un biorreactor agitado y se analizó la presencia de pili en las mismas. La Fig. 8 muestra diferencias significativas en el nivel de piliación celular ($P < 0,05$) a lo largo del tiempo hasta las 8 h de cultivo, en el cual se alcanzó un mínimo de piliación celular. Simultáneamente, se detectó en el sobrenadante de cultivo un incremento significativo ($P < 0.05$) en el nivel de pili libre de células, hasta las 10 h de cultivo, cuando se alcanzó un máximo. Analizando estos resultados podemos decir que tanto nuestro bact-ELISA como sol-ELISA se muestran apropiados para monitorear el nivel de piliación celular y extracelular durante el cultivo de *M. bovis* en medio líquido.

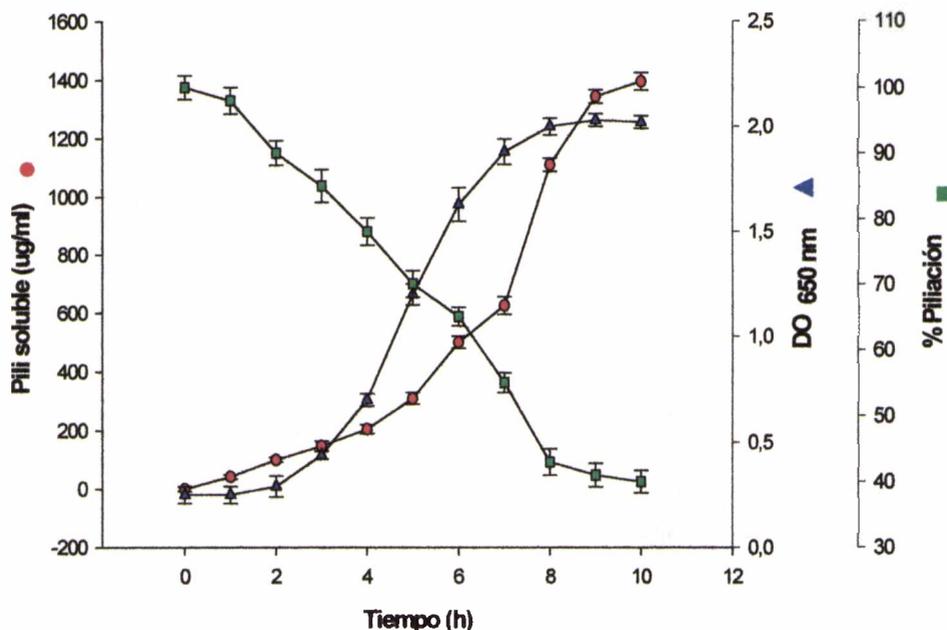


Fig. 8. Concentración de pili en sobrenadante (●) y nivel de piliación celular (■), durante el crecimiento de *M. bovis* (▲) en biorreactor agitado. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes ± los errores estándar de la media.

Con el objetivo de comparar nuestra metodología de cuantificación directa de pili unido a células con la metodología de cuantificación de piliación celular previa remoción de los pilis de la célula bacteriana, la cual incluye un paso extra de liberación de pili de las células, se sherearon muestras de células de *M. bovis* altamente piliadas durante distintos períodos de tiempo y se evaluó el nivel de pili residual unido a células por ambas técnicas, bact-ELISA y sol-ELISA. Para esta última metodología, las células tienen que ser sometidas a un paso extra de shear para remover los pili completamente. Esta estrategia de separar los pilis de las células bacterianas para medir la piliación de las células por los pili libres, fue previamente utilizada por Lepper y Hermans (1986), quienes desarrollaron un test de ELISA sándwich doble anticuerpo el cual puede ser utilizado para este fin.

Necesitábamos saber cuál era el tiempo mínimo de shereado de las células piliadas para separar todos los pilis de las mismas. Para responder esto, se realizó una curva (o cinética) de shear. Se procedió de la siguiente manera: se shereó una suspensión de células de *M. bovis* en PBS (8 ml, $DO_{650}=2,00$) en un agitador tipo vortex, a máxima potencia (2600 rpm/min). Se

tomaron muestras a lo largo del tiempo, mientras se seguía shereando durante un lapso de 30 minutos. Las muestras a cada tiempo fueron centrifugadas y se analizó en el sobrenadante la concentración de pili por sol-ELISA. Como se observa en la Fig. 9 la cantidad de pili en el sobrenadante fue aumentando con el tiempo (hay diferencias significativas entre las medias, $P < 0.05$), hasta alcanzar un máximo a los 15 minutos de shereado. No se observan diferencias significativas entre las medias entre los 15 min y los 30 min de shereado ($P > 0.05$), determinado por el test de LSD de Fisher. Por lo tanto, si se quieren extraer todos los pilis presentes en las células para cuantificarlos, se debe sherear la suspensión de las mismas 15 minutos como mínimo. De ahí en más no aumenta la cantidad de pili liberado.

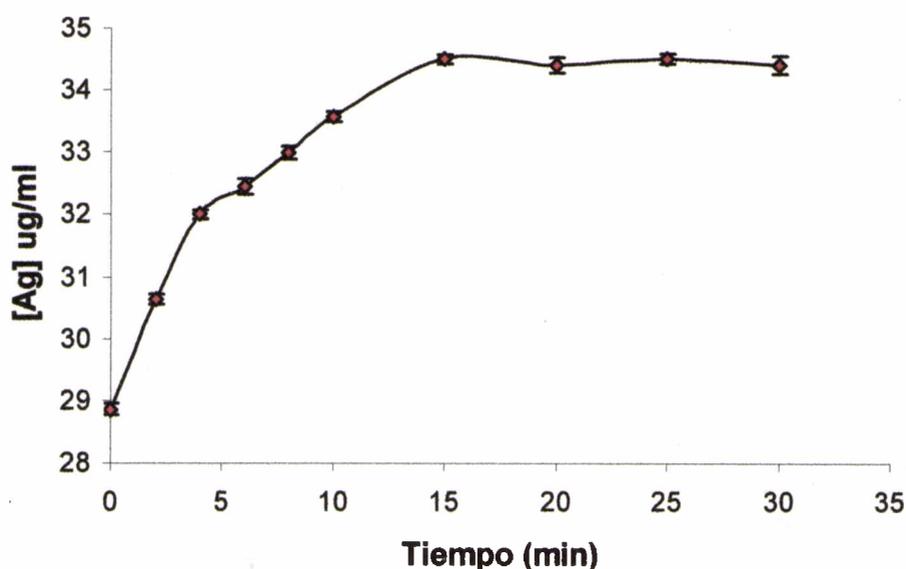


Fig. 9. Efecto del tiempo de shereado en la liberación de pilis. La concentración de pili en sobrenadante (♦) fue evaluada por la técnica de sol-ELISA. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes \pm los errores estándar de la media.

Nuestro experimento se llevó a cabo de la siguiente manera : se shereó una suspensión de células de *M. bovis* ($DO_{650}=8,00$) en un agitador tipo vortex (MS2 Minishaker, IKA Works, Wilmington, NC, USA) a máximo poder (2600 min^{-1}). Se tomaron muestras cada 5 minutos (durante 30 minutos) y se dividieron en 2 tubos. Se uso el bact-ELISA para determinar el pili unido a

células en una de las alícuotas. La otra alícuota se centrifugó y se realizaron dos lavados, luego de lo cual las células se sherearon durante 30 minutos a 2600 rpm y se analizó el pili liberado en el sobrenadante por la técnica de sol-ELISA. Previamente habíamos encontrado que en nuestras condiciones experimentales no ocurre más liberación de pili después de los 15 minutos de agitación. Como se puede ver en la Fig. 10, se obtuvieron similares resultados por ambas metodologías, no hay diferencias significativas entre ambos métodos a lo largo del tiempo.

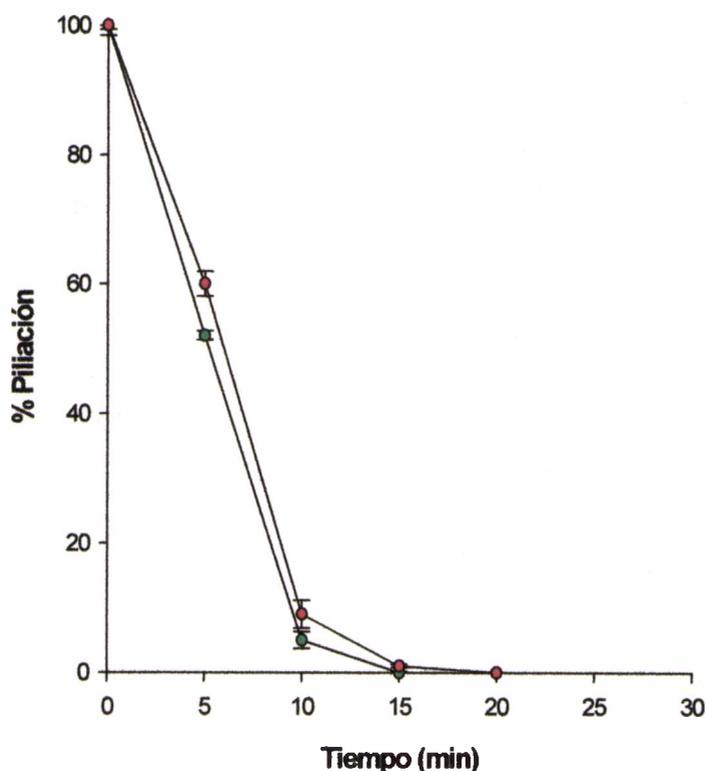


Fig. 10. Porcentaje de piliación celular, obtenido a distintos tiempos de shereado empleando las técnicas de sol-ELISA (●) y bact-ELISA (●). Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes \pm los errores estándar de la media. La significancia de las diferencias entre las medias de ambos métodos a cada tiempo fue analizada usando el test de LSD de Fisher con un nivel de confianza del 95%.

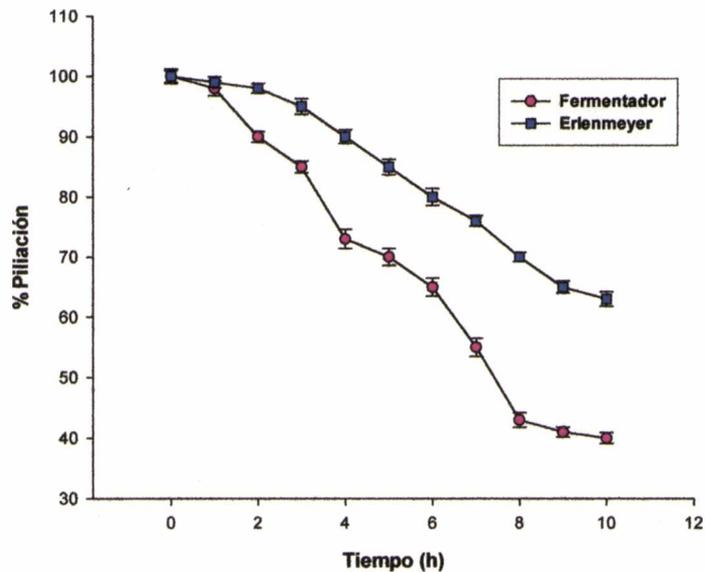


Fig. 11 . Nivel de piliación celular a lo largo de un cultivo en fermentador (●) y en erlenmeyer (■). Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes \pm los errores estándar de la media.

En la Fig. 11 se observa comparativamente el nivel de piliación celular que se obtiene cuando se cultiva *M. bovis* en medio líquido BHI en erlenmeyer y en fermentador. En ambos casos hay pérdida de piliación, analizado por bact-ELISA a lo largo del cultivo. En el caso del erlenmeyer el porcentaje de piliación disminuye hasta el 70 % a las 8 h de cultivo, mientras que en el fermentador la disminución es hasta el 40%. Las diferencias en los niveles de piliación detectados en cada caso son asignadas a un efecto de shear mecánico más pronunciado en el fermentador. Ambos cultivos fueron inoculados con células provenientes de un mismo origen (pool en medio sólido con 100 % de piliación).

Efectos del pasaje seriado en reactores de laboratorio sobre el nivel de piliación celular de *M. bovis*. Proyección de resultados en escala industrial

Teniendo en cuenta los resultados anteriores obtenidos, y considerando el hecho que la producción de vacunas a escala industrial se realiza en reactores agitados, estudiamos la influencia del pasaje seriado en el

mantenimiento del fenotipo piliado. Hemos observado que cuando se resuspende un stock liofilizado de microorganismos en medio sólido las células crecen con fenotipo piliado (previa selección de colonias) y mantienen un nivel de piliación elevado (cercano al 100%). Sembrando células de medio sólido altamente piliadas en otra placa de agar sangre vemos que se mantiene el porcentaje de piliación. A partir de esta biomasa, si se hacen pasajes seriados en medio líquido, se observa que en un primer pasaje en erlenmeyer, el % de piliación disminuye hasta el 60-70%, medido al final del cultivo (8 h). Cuando una alícuota de ese cultivo se siembra en un segundo erlenmeyer, el % de piliación decae hasta el 30-40%. Ya en un tercer pasaje a otro erlenmeyer se observa una caída del % de piliación hasta el 10-20 % (Figs. 12 y 13)

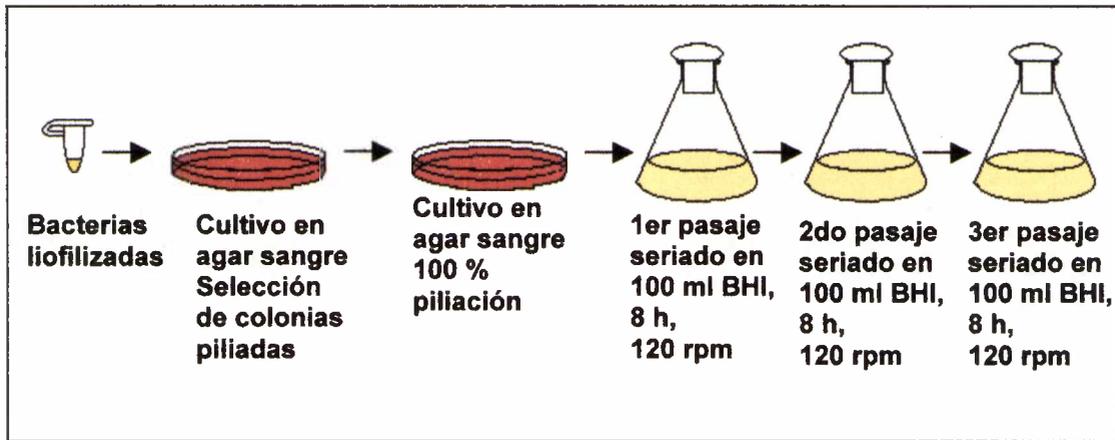


Fig. 12. Esquema 1 de análisis seriado de cultivo.

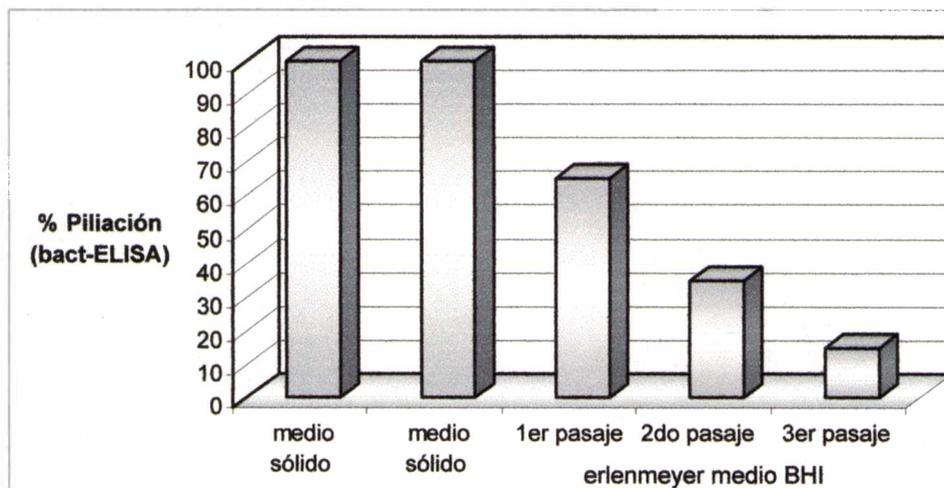


Fig. 13. Nivel de piliación celular medido por bact-ELISA durante el repique seriado (ver esquema 1). Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes.

Teniendo en cuenta la pérdida de piliación en medios líquidos descripta, se trató de reproducir en el laboratorio el escalado a nivel industrial para la producción de vacunas. Se ensayaron dos posibles opciones de escalado, que simulan a las empleadas por dos empresas nacionales productoras de vacunas contra Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (comunicaciones personales). Se partió de células de *M. bovis* altamente piliadas, provenientes de medio sólido con las cuales se sembraron 2 erlenmeyers conteniendo 100 ml de BHI cada uno. Las células fueron cultivadas durante 8 h, a 37°C y al cabo de ese tiempo la biomasa obtenida fue utilizada para inocular un reactor agitado de 2 L. Este reactor a su vez se usó como inóculo de un segundo reactor de 4 L. De esta forma se trató de simular el escalado industrial que se muestra a continuación.

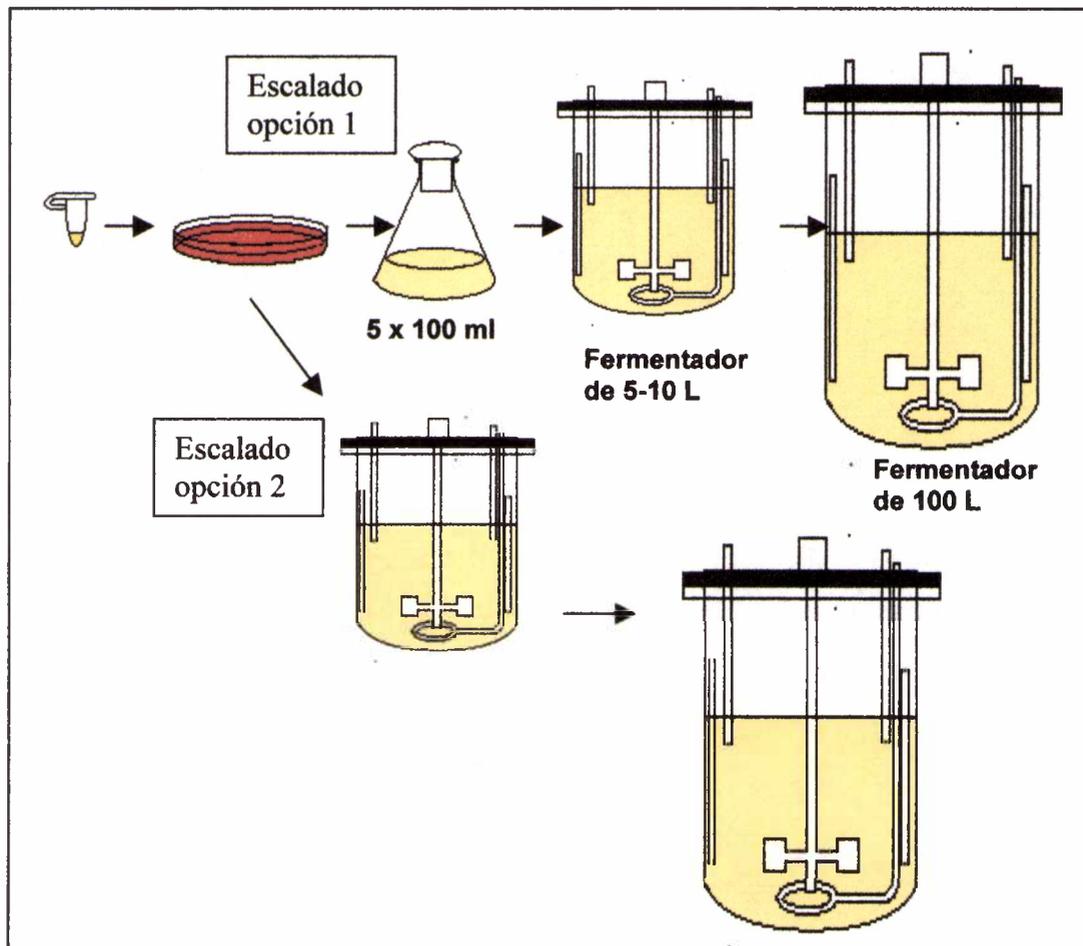


Fig.14. Esquema de escalado a nivel industrial, mostrando dos opciones utilizadas por la industria.

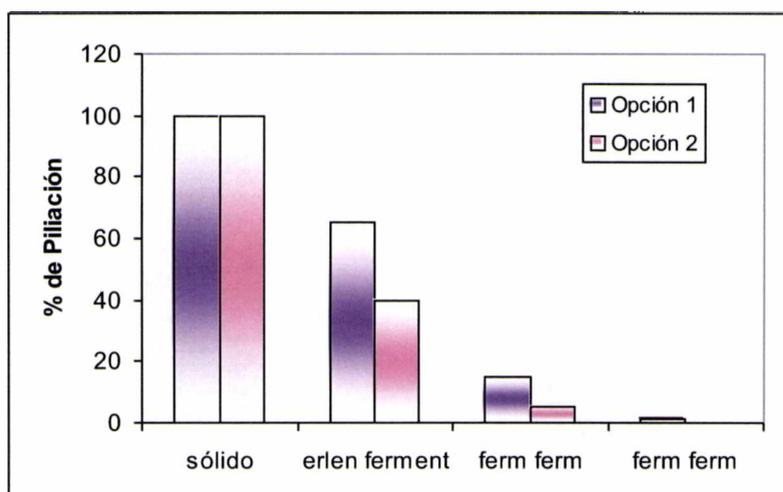


Fig. 15. Nivel de piliación celular observado durante el escalado a nivel industrial, medido por bact-ELISA. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes.

En la Fig. 14 se observa un esquema de cómo la industria trabaja en el escalado de esta vacuna. En la Fig. 15 se observa que cuanto mayor es el número de pasajes seriados, mayor es la pérdida de piliación, y más aún cuando se utilizan reactores agitados mecánicamente con impeller de paleta plana y altas rpm. En esto se pone de manifiesto el efecto de shear, el cual es mayor en el fermentador agitado que en sistemas erlenmeyer. En la Fig. 15 se ve que en los reactores de 100 L, que son los de producción, las células llegan con un nivel de piliación muy bajo, casi nulo, lo que se contrapone con la necesidad de mantener el fenotipo piliado en la formulación de las vacunas contra QIB.

Discusión

Como ya se indicó, varias publicaciones han informado que los pilis de *M. bovis* juegan un rol muy importante en la patogénesis de la QIB, promoviendo la adhesión bacteriana a las células epiteliales de los ojos del ganado vacuno. Sólo las células piliadas de *M. bovis* pueden adherirse a la córnea bovina, colonizar la mucosa conjuntival y establecer infección (Moore y Rutter, 1989). Los anticuerpos anti-pili han probado ser efectivos en la prevención de la adhesión bacteriana a células epiteliales in vitro (Moore y Rutter, 1989) y mostraron una fuerte correlación con la protección contra *M.*

bovis (Jayappa y Leer, 1986; Lepper et al., 1995), llevando a la conclusión que la proteína del pili debería ser incluida en cualquier formulación de vacuna contra QIB.

Se considera que el cultivo de *M. bovis* en medios líquidos agitados mecánicamente puede ser perjudicial para mantener el nivel de piliación celular de *M. bovis*. Esto a su vez determina, como consecuencia, una disminución en la eficacia de las vacunas formuladas con estas células. A pesar de la importancia de la cuantificación de los pilis unidos a células de *M. bovis* durante el proceso de producción de vacunas, antes de iniciar este trabajo no se hallaba disponible en bibliografía internacional un test que resulte rápido y directo para la evaluación de piliación. Por otra parte, el grado de pérdida de piliación durante el crecimiento de *M. bovis* en medio líquido no había sido investigado en forma sistemática. El presente trabajo estuvo dirigido al desarrollo de una metodología para la apropiada determinación del nivel de piliación celular, para ser aplicado en el control de producción de vacunas y eventualmente para estudios adicionales sobre variación de fase de *M. bovis*.

La técnica de bact-ELISA aplicada a la investigación de antígenos en células enteras demostró ser, en otros microorganismos, útil para la determinación de varias moléculas que se expresan en la superficie bacteriana, tales como hemaglutinina filamentosa en células de *Bordetella pertussis* (Aricó et al., 1993) o antígeno fimbrial en *Streptococcus sanguis* (Elder et al., 1982) y células de *Escherichia coli* (Gómez-Duarte et al., 1999). En este trabajo se describe un ELISA de células enteras que permite la cuantificación directa de pili en la superficie de las células de *M. bovis*. En contraste con el ELISA sandwich doble anticuerpo propuesto por Lepper y Hermans (1986), nuestro método no requiere el aislamiento de pilis previo a su determinación. La preparación de las muestras implica una simple fijación de las células con formalina en lugar de laboriosos procedimientos de purificación usados cuando los antígenos a ser analizados necesitan ser aislados de otros componentes celulares. Además, nuestro método cumple con las ventajas descriptas para otros ELISA, tales como sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y la posibilidad de analizar un gran número de muestras en poco tiempo.

Este estudio ha mostrado que tres pasos de ultracentrifugación resultan suficientes para la purificación del pili. Bajo estas condiciones el suero anti-pili

de conejo obtenido probó ser altamente específico y pudo ser usado para ensayos competitivos.

La sensibilización de los pocillos usando células bacterianas enteras probó ser tan simple y rápido como la sensibilización con antígenos solubles purificados. En concordancia con estudios previos (Elder et al., 1982) una suspensión bacteriana equivalente a $1,6 \times 10^7$ bacterias por pocillo probó ser apropiada para cubrir los pocillos en forma homogénea, dando densidades ópticas reproducibles de pocillo a pocillo. Sin embargo, el éxito de esta metodología depende críticamente de: i) la disponibilidad de una suspensión estandarizada de células piliadas para ser usada en la sensibilización de la placa y para la preparación de la curva estándar en cada ensayo, y ii) el uso del suero anti-pili específico del serotipo de las células de *M.bovis* a ser analizadas.

Este ensayo probó ser suficientemente sensible para detectar la disminución del pili unido a células durante el crecimiento de *M. bovis* en biorreactores agitados. La pérdida de piliación de *M. bovis* en medio líquido fue sugerida previamente por Lepper et al. (1993) pero esta es la primera vez que es documentada una cinética de tal disminución. Esta disminución en el nivel de piliación celular evaluada por el bact-ELISA mostró estar relacionada a un incremento en el pili libre de células en sobrenadantes de cultivo (Fig. 8). El incremento del pili en sobrenadante de cultivo podría ser debido al shear stress generado en el biorreactor, como previamente se ha descrito para otras proteínas filamentosas bacterianas (Rodríguez et al., 1993, 1996). Sin embargo, nuestros resultados no descartan una posible variación de fase a lo largo del tiempo en el crecimiento bacteriano. Cuando se cultiva en medio sólido células provenientes de un biorreactor se observa que estas no recuperan la piliación perdida durante el cultivo en medio líquido. En un ambiente sin shear no expresan pilis, como es lo esperado, lo que apoya la hipótesis de la pérdida de pili también por un cambio de fase. No obstante, tal variación de fase podría tomar las características sugeridas por Marrs y colaboradores (1988) de un posible tipo de variante no piliada, es decir, un tipo de *M. bovis* fenotípicamente no piliada que aún es capaz de producir proteína de pili pero es incapaz de ensamblar el pili en la superficie celular. A pesar de las razones de la pérdida de piliación celular en cultivos en medio líquido, este

estudio muestra claramente que la producción de células de *M. bovis* en biorreactores para la formulación de vacunas debe incluir el control del nivel de piliación celular. Con respecto a esto, la metodología descrita en este estudio probó ser rápida, reproducible y fácil de estandarizar, lo que la hace apropiada para la comparación entre laboratorios, constituyendo una herramienta útil para el control de producción de vacunas.

Con los resultados obtenidos en los ensayos de cultivos seriados en medios líquidos, intentamos demostrar la baja estabilidad de los pilis celulares, poniendo en evidencia la pérdida de piliación de las células de *M. bovis* ante los cultivos seriados en reactores agitados, que son los usados a escala industrial. Si bien nuestros ensayos fueron realizados a escala de laboratorio con fermentadores de 2 y 4 L, consideramos que los resultados pueden ser extrapolados a reactores de mayor volumen. Por esta razón, nuestra intención es alertar a las empresas productoras de vacunas en el empleo de sistemas de cultivo alternativos para evitar esta pérdida de piliación. En este sentido, una alternativa sería el empleo de reactores tipo air-lift de bajo efecto de shear y otra opción sería el uso del sistema de cultivo en biofilm, en el cual los microorganismos crecen adheridos a un soporte, lo que se asemeja a lo que ocurre en la naturaleza.

Bibliografía

- Aricó, B., Nuti, S., Scarlato, V., and Rappuoli, R. 1993. Adhesion of *Bordetella pertussis* to eukaryotic cells requires a time-dependent export and maturation of filamentous hemagglutinin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9204-9208.
- Bovre, K. and Froholm, L.D., 1972. Variation of colony morphology reflecting fimbriation in *Moraxella bovis* and two reference strains of *M. nonliquefaciens*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. [B] 80, 629-640.
- Chirido, F.G., Añón, M.C. and Fossati, C.A., 1995. Optimization of a competitive ELISA with polyclonal antibodies for quantification of prolamins in foods. Food & Agric. Immunol. 7, 333-343.
- Elder, B.L., Boraker, D.K. and Fives-Taylor, P.M., 1982. Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for *Streptococcus sanguis* fimbrial antigens. J. Clin. Microbiol. 16, 141-144.
- Gómez-Duarte, O.G., Ruiz-Tagle, A., Gómez, D.C., Viboud, G.I., Jarvis, K.G., Kaper, J.G. and Girón, J.A., 1999. Identification of IngA, the structural gene of longus type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Microbiology 145, 1809-1816.
- Jayappa, H.G. and Lehr, C., 1986. Pathogenicity and immunogenicity of piliated and nonpiliated phases of *Moraxella bovis* in calves. Am. J. Vet. Res. 47, 2217-2221.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Condón) 117, 680-685.
- Lepper, A.W.D. and Hermans, L.R., 1986. Characterization and quantitation of pilus antigens of *Moraxella bovis* by ELISA. Austr. Vet. J. 63, 401-405.
- Lepper, A.W.D., Atwell, J.L., Lehrbach, P.R., Schwartzkoff, C.L., Egerton, J.R. and Tennent, J.M., 1995. The protective efficacy of cloned *Moraxella bovis* pili in monovalent and multivalent vaccine formulations against experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). Vet. Microbiol. 45, 129-138.
- Lepper, A.W.D., Elleman, T.C., Hoyne, P.A., Lehrbach, P.R., Atwell, J.L., Schwartzkoff, C.L., Egerton, J.R. and Tennent, J.M., 1993. A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the

- prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Vet. Microbiol.* 36, 175-183.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Marrs, C.F., Ruehl, W.W., Schoolnik, G.K. and Falkow, S. 1988. Pilin gene phase variation of *Moraxella bovis* is caused by an inversion of the pilin genes. *J. Bacteriol.* 170, 3032-3039.
- McMichael, J.C., 1992. Bacterial differentiation within *Moraxella bovis* colonies growing at the interface of the agar medium with the Petri dish. *J. Gen. Microbiol.* 138, 2687-2695.
- Moore, L.J., Lepper, A.W.D., 1991. A unified serotyping scheme for *Moraxella bovis*. *Vet. Microbiol.* 29, 75-83.
- Moore, L.J. and Rutter, J.M. 1989. Attachment of *Moraxella bovis* to calf corneal cells and inhibition by antiserum. *Aust. Vet. J.* 66, 39-42.
- Pedersen, K.B., Froholm, L.O., Bovre, K., 1972. Fimbriation and colony type of *Moraxella bovis* in relation to conjunctival colonization and development of keratoconjunctivitis in cattle. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 80, 911-918.
- Prieto, C.I., Aguilar, O.M. and Yantorno, O.M., 1999. Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in *Moraxella bovis* isolated in Argentina. *Vet. Microbiol.* 70, 213-223.
- Pugh, G.H., Hughes, D:E., Schultz, V:D., Graham, C:K., 1976. Experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis: resistance of vaccinated cattle to homologous and heterologous strains of *Moraxella bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 37, 57-60.
- Rodriguez M.E., Samo, A.L., Hozbor, D.F. and Yantorno, O.M., 1993. Effect of hydromechanical forces on the production of filamentous haemagglutinin and pertussis toxin of *Bordetella pertussis*. *J. Ind. Microbiol.* 12, 103-108.
- Rodriguez, M.E., Hozbor, D.F. and Yantorno, O.M., 1996. Effect of hydromechanical stress on cellular antigens of *Bordetella pertussis*. *J. Ind. Microbiol.* 17, 53-55.
- Ruehl, W.W., Marrs, C.F., Fernandez, R., 1988. Purification, characterization and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. *J. Exp. Med.* 168, 983-1002.

Wilcox, G.E., 1968. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *Vet. Bull.* 38, 349-360.

Wray, W., Boulikas, T. Wray, V. & Hancock, R., 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 118, p. 197-203.

Capítulo 5

*Rol del pili en la adhesión
de Moraxella bovis a
células eucariotas*

Introducción

M. bovis presenta adhesinas, que actúan como factores primarios de infección, y toxinas, que afectan las células de córnea y conjuntiva, sus tejidos blanco (Franco, 1994). Ha sido demostrado que después de adherirse a los estratos externos de la córnea, *M. bovis* invade el estroma, modificando la disposición regular de las fibrillas de colágeno, necrotizando las células y produciendo una úlcera (Chandler, 1983). La adhesión de *M. bovis* a la superficie del epitelio corneal bovino es el primer evento que lleva a la colonización, propiciando la infección y enfermedad clínica. La adhesión a células es un pre-requisito esencial en la patogénesis de muchas enfermedades bacterianas. Las bacterias se adhieren a las superficies de células epiteliales por medio de diferentes estructuras que funcionan como adhesinas. En *M. bovis* el proceso de adhesión estaría mediado fundamentalmente por el pili que es una estructura proteica anclada a la superficie de la célula bacteriana.

Se ha reportado que sólo las cepas piliadas de *M. bovis* son capaces de colonizar la mucosa conjuntival y producir queratoconjuntivitis en ganado vacuno (Wilcox, 1968; Pugh and Hughes, 1971; Pedersen et al, 1972; Chandler et al, 1979; Chandler et al, 1980). La adhesión de organismos no piliados de *M. bovis* a células de córnea bovina es significativamente menor, lo que enfatiza el rol central del pili en la adhesión (Annear and Wilcox, 1985). Paralelamente, se ha descrito que anticuerpos anti-pili son capaces de disminuir el grado de adhesión (Moore and Rutter, 1989). Sin embargo aún no se ha evaluado el rol de la inmunidad inducida por vacunación y/o infección en el bloqueo del primer estadio de colonización.

En base a estos antecedentes se decidió evaluar si la adhesión de *M. bovis* a células de córnea bovina era inhibida por sueros bovinos obtenidos de animales vacunados y/o infectados naturalmente, empleando para los ensayos de adhesión un aislamiento de *M. bovis* (1194-03) que proviene de la misma región de la que fueron obtenidos los sueros.

Materiales y métodos

Sueros

Los sueros provenientes de bovinos vacunados y/o infectados utilizados en este ensayo se detallan en la Tabla 1. Los mismos fueron cedidos por la empresa San Jorge-BAGÓ. Los sueros fueron conservados alicuotados en tubos Eppendorf a -20°C .

Tabla 1. Tipos de sueros utilizados en pruebas de adhesión.

Tipo de suero	Designación
Suero normal de conejo	SNC
Suero policlonal de conejo anti-pili	SCAP
Suero de bovino sin vacunar, con lesión ocular	SBSVCL
Suero de bovino vacunado, con lesión ocular	SBVCL
Suero de bovino sin vacunar, sin lesión ocular	SBSVSL
Suero de bovino vacunado, sin lesión ocular	SBVSL

Línea celular y condiciones de cultivo

Se emplearon células de un cultivo primario de córnea bovina (cedidas por INTA, Castelar). Este tipo de células han sido descritas como de probada capacidad de interacción con el microorganismo en estudio (Annuar and Wilcox, 1985). Las células fueron cultivadas en botellas Falcon 3002 (Becton Dickinson, San Jose, CA) en medio simple modificado de Dulbecco (DMEM) (Gibco BRL, Gran Island, NY), esterilizado por filtración con membranas de $0.22\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro. El medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Cansera, Rexdale, ON, Canada), 100 unidades/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina (Pen/Strep) (Bio Whittaker, Walkersville, MD). Las células fueron incubadas en estufa a 37°C (Jouan, TGO 150), con 5% de CO_2 y 100% de humedad. Cuando el cultivo

alcanzó un 80% de confluencia, las células fueron removidas con tripsina (0.25%)-EDTA (0.1%) (KuraboCo., Ltd., Osaka, Japón) y cultivadas en placas de 24 pocillos hasta lograr un 70% de confluencia. El cultivo se controló por observación microscópica, empleando un microscopio invertido (Olympus, Tokio).

Ensayo de adhesión

La adhesión bacteriana a células de córnea bovina se llevó a cabo según lo descrito por Sisti y col. (2001) con algunas modificaciones. Aproximadamente 5×10^3 células de córnea por pocillo fueron cultivadas en medio DMEM adicionado con SFB y Pen/Strep (ver Línea celular y condiciones de cultivo), en placas de 24 pocillos, sobre un cubreobjeto circular de vidrio de 12 mm de diámetro, hasta alcanzar una confluencia del 70%. Bacterias piliadas (P^+) y no piliadas (P^-) de *M. bovis* 1194 03 se agregaron en cada pocillo (proporción bact/cél: 100) en presencia o ausencia de anticuerpos (ver sueros en Tabla 1). Para mejorar el contacto célula-bacteria las placas se centrifugaron 5 min a $1000 \times g$. Células y bacterias fueron luego incubadas durante 15 min a $25^\circ C$. Los cubreobjetos con las células y bacterias adheridas fueron removidos de los pocillos, lavados con PBS, fijados con metanol (30 min a $4^\circ C$), teñidos con cristal violeta al 0.007% en PBS, 10 min, y observados en microscopio óptico (1000x). Se examinaron aproximadamente 100 células y se determinó el número de bacterias adheridas por célula (Rb/cel). El número de bacterias adheridas por célula en ausencia de anticuerpos anti-pili (control negativo) se fijó arbitrariamente como el 100 %. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y se expresaron como porcentaje del control.

El control del inóculo bacteriano inicial se llevó a cabo por recuento de organismos viables en ATSS. El control de células se realizó mediante recuento de células viables por exclusión con tripán blue en cámara de Neubauer.

Determinación de invasión y sobrevida

La primera etapa de este experimento se desarrolla según lo descrito para el ensayo de adhesión. Luego se dejan incubar las bacterias con las células de córnea durante 5 h, después de lo cual las células se lavan para remover las bacterias no adheridas ni internalizadas y se incuban 2 h con medio DMEM suplementado con SFB y Polimixina B (200 μ /ml) para inactivar aquellas bacterias que aún permanecieran adheridas a la superficie celular. En los tiempos utilizados en este ensayo este antibiótico no penetra la membrana de las células eucariotas y por lo tanto sólo mata las bacterias extracelulares adheridas pero no las internalizadas. Luego de la incubación la Polimixina B es removida por lavado y se agrega DMEM con SFB y Pen/Strep a cada pocillo. Para la determinación de la invasión y/o persistencia de *M. bovis* se remueven las células de los pocillos con 50 μ l de una solución Tripsina/EDTA y se suspenden en PBS. Un volumen de esta suspensión se utiliza para realizar el recuento de células viables por exclusión con Tripán blue en cámara de Neubauer y otra alícuota se utiliza para determinar bacterias viables en placas. Los resultados se expresan como: número de bacterias/número de células en el mismo volumen. La invasión se calcula como el número de bacterias viables por célula a las 8 h del contacto inicial bacteria/célula y después del tratamiento con polimixina B. La persistencia se evalúa como número de bacterias/número de células viables a los distintos días post invasión.

Determinación de anticuerpos anti-pili por ELISA indirecto

Para el desarrollo de este ensayo se utilizó pili purificado. Se sensibilizó una placa para ELISA (Maxisorp, Nunc, Denmark) con 100 μ l por pocillo de una suspensión de pili en PBS, en concentración 10 μ g/ml. La sensibilización se llevó a cabo durante toda una noche a 4°C. Luego de 3 lavados con PBS-Tween 0.05% (PBS-T), se realizó un bloqueo de los sitios remanentes con 400 μ l por pocillo de PBS-suero equino 3% (PBS-SE) durante 1 h a 37°C. Después del bloqueo se lavó 3 veces con PBS-T y se agregaron 100 μ l de los sueros a ensayar en las concentraciones que se indican en los resultados. Las

diluciones de los sueros se hicieron en PBS-SE. La incubación se realizó durante 1 h a 37°C. Luego se lavó 3 veces con PBS-T y se agregaron 100 µl por pocillo del anticuerpo anti-IgG bovino conjugado con peroxidasa (Sigma) en una dilución 1:5000 en PBS-SE y se incubó por 1 h a 37°C. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS-T y se agregaron 100 µl por pocillo del sustrato de peroxidasa, consistente en dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD, 1 mg/ml, Sigma) y H₂O₂ al 30% (1 µl/ml) en buffer de ácido cítrico 0,1 M-fosfato de sodio 0,1 M, pH 5,0. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 10 minutos, luego de lo cual la reacción se detuvo por agregado de 50 µl por pocillo de ácido sulfúrico 4 N. Se determinó la absorbancia a 492 nm en un lector de ELISA (Tectan, Spectra Rainbow). Los valores de A_{492 nm} fueron transformados a la función Logit p (Tjssen, 1985). El título de anticuerpo presente en la muestra es la dilución a la cual el Logit p=0.

$$\text{Logit } p = \ln(p/(1-p))$$

$$p = (A - A_0) / (A_M - A_0)$$

donde A es el valor de A_{492 nm} de la muestra, A₀ es el valor de A_{492 nm} de la mayor dilución y A_M es el valor de A_{492 nm} de la menor dilución (dilución inicial del suero).

Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron repetidos al menos tres veces, de manera independiente. Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el análisis de varianza (ANOVA) utilizando para la comparación de las medias el test de Menor Diferencias Significativa (LSD) con un grado de significación de $\alpha < 0,05$.

Resultados

La primera etapa de este trabajo consistió en determinar el título de anticuerpos anti-pili en los sueros bovinos empleados. Para este estudio se empleó la técnica de ELISA desarrollada previamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Títulos de anticuerpos anti-pili en las muestras de sueros de bovinos empleadas en este estudio

Sueros	Título (*)
SCAP	3981 (a)
SBVCL	631 (b)
SBVSL	398 (c)
SBSVCL	316 (d)
SBSVSL	199 (e)
SNC	0 (f)

* Los títulos mostrados fueron determinados por ELISA y expresados como valores medios. Las medias fueron comparadas por test de LSD con un nivel de confianza del 95%. (Letras distintas indican diferencias significativas)

Para aclaraciones sobre tipo de suero ver Tabla 1.

$LSD_{0.05}=27.4$

Se estudió posteriormente el efecto de la presencia de anticuerpos anti-pili, presentes en sueros de bovinos inmunes por vacunación y/o infección natural, en la adhesión de bacterias piliadas y no piliadas a células de córnea. Se utilizó suero normal de conejo (SNC) y PBS como controles negativos y suero policlonal de conejo anti-pili (SCAP), como control positivo.

Los estudios de adhesión se llevaron a cabo a 25°C, ya que estudios previos (Moore and Rutter, 1989) han demostrado que a 37°C *M. bovis* es citotóxica para las células de córnea bovina. Asimismo se seleccionó como tiempo de incubación 15 minutos, debido a los problemas de citotoxicidad de *M. bovis*.

En la Tabla 3 se muestran los resultados obtenidos a partir de células piliadas en tanto que en la Tabla 4 se muestran los correspondientes a las células no piliadas.

Tabla 3. Adhesión de organismos piliados de *M. bovis* 1194-03 a células de córnea bovina en presencia de distintos tipos de antisueros. Los valores de Rb/cél representan las medias de 3 ensayos independientes. Las medias fueron comparadas por el test de LSD con un nivel de confianza del 95 %.

Sueros	Rb P ⁺ /cel (*)	% de adhesión de <i>M. bovis</i> piliada	% de inhibición de la adhesión de <i>M. bovis</i> piliada**
SNC	203 (A)	100	0
SBSVSL	53 (C)	26	73
SBSVCL	46 (CD)	23	77
SBVSL	19 (EFG)	9	90
SBVCL	6 (FG)	3	97
SCAP	0 (G)	0	100

LSD_{0.05} = 26.12

*Las medias designadas con la misma letra no tienen diferencias significativas (p>0.05).

** 100 – $\frac{\text{media de bacterias adheridas por célula en presencia de SNC o antisuero}}{\text{media de bacterias adheridas por célula en ausencia de antisuero}} \times 100$

Tabla 4. Adhesión de organismos no piliados de *M. bovis* 1194-03 a células de córnea bovina en presencia de distintos tipos de antisueros. Los valores de Rb/cél representan las medias de 3 ensayos independientes. Las medias fueron comparadas por el test de LSD con un nivel de confianza del 95 %.

Sueros	Rb P/cel (*)	% de adhesión de <i>M. bovis</i> no piliada	% de inhibición de la adhesión de <i>M. bovis</i> no piliada**
SNC	80 (B)	100	0
SBSVSL	14 (EFG)	18	82
SBSVCL	27 (DEF)	34	66
SBVSL	15 (EFG)	19	81
SBVCL	40 (DE)	50	50
SCAP	18 (EFG)	23	77

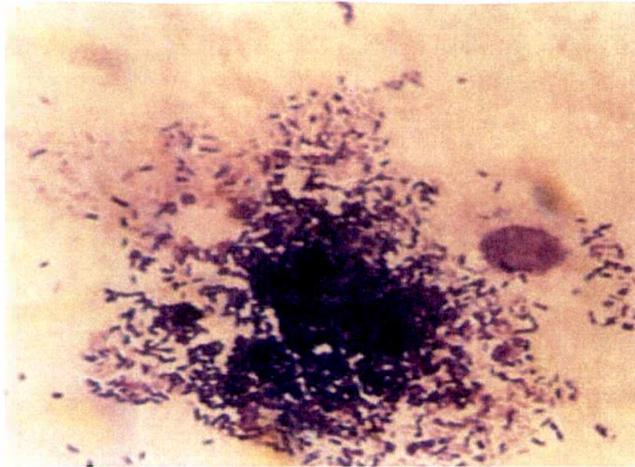
LSD_{0.05} = 26.12

*Las medias designadas con la misma letra no tienen diferencias significativas ($p > 0.05$).

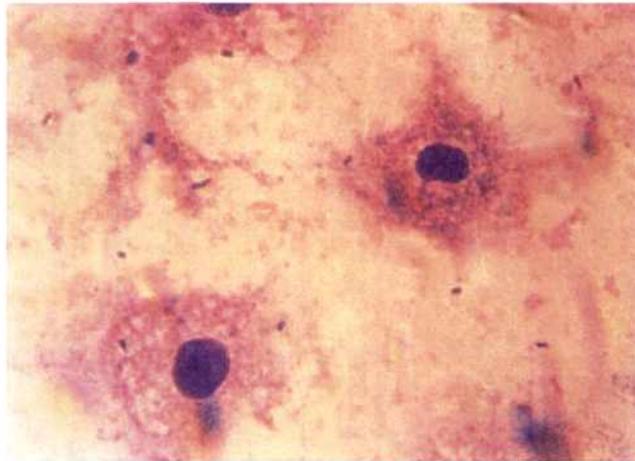
** $100 - \frac{\text{media de bacterias adheridas por célula en presencia de SNC o antisuero} \times 100}{\text{media de bacterias adheridas por célula en ausencia de antisuero}}$

En la Fig. 1 se muestran fotografías representativas de los resultados obtenidos en las distintas condiciones ensayadas. En ella se observa la adhesión de *M. bovis* 1194-03 piliada a células epiteliales de córnea bovina. La incubación se realizó en presencia de suero normal de conejo SNC (Fig. 1a), suero bovino vacunado con lesión (Fig. 1b), o suero de conejo anti-pili (Fig. 1c).

(a)



(b)



(c)

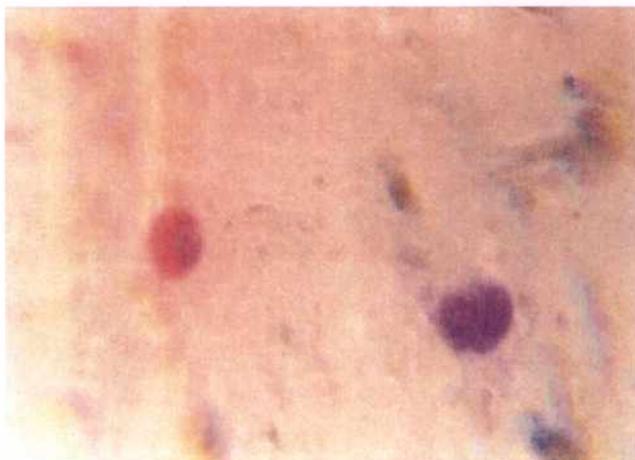


Fig. 1. Adhesión de *M. bovis* 1194 03 (piliada) a células de córnea bovina. *M. bovis* se incubó por 15 min a 25°C en presencia de suero normal de conejo SNC (a), suero bovino S2 (b), o suero anti-pili de conejo SC (c). Las fotos son representativas de tres experimentos independientes.

A partir de los datos anteriores se calcularon los valores de inhibición de la adhesión para cada suero en estudio. El porcentaje de inhibición de la adhesión de organismos piliados que presentó el suero policlonal anti-pili de conejo (SCAP) fue del 100%, mientras que el suero normal de conejo no interfirió en la adhesión (0% de inhibición). Con PBS se obtuvo el mismo resultado que con SNC. En la Tabla 3 puede observarse que los anticuerpos anti-pili inhiben significativamente la adhesión de las bacterias piliadas a las células de córnea bovina. Sorprendentemente, la adhesión de las bacterias no piliadas también es inhibida por el suero anti-pili. En tanto el resto de los antisueros ensayados también inhiben la adhesión aunque en menor proporción que lo que exhibe la fase piliada, lo cual es coincidente con lo hallado por otros autores en estudios previos (Annear and Wilcox, 1985).

Existe una relación entre la inhibición de adhesión y la historia de los sueros, más precisamente si provienen de un bovino vacunado, no vacunado, y/o infectado. En la Tabla 3 se observan diferencias significativas en el porcentaje de inhibición en la adhesión de *M. bovis* 1194-03 piliada entre los sueros de animales vacunados y los provenientes de bovinos no vacunados. Si bien la presencia de lesión también se correlaciona con un aumento en el porcentaje de inhibición, las diferencias no son significativas.

Paralelamente se realizó el ensayo de invasión, según lo descrito por Sisti y col. (2001), para lo cual bacterias piliadas y no piliadas se incuban con células de córnea durante 5 h. La primera etapa de este experimento se desarrolló según lo descrito en materiales y métodos para el ensayo de adhesión, dejando luego incubar las bacterias con las células de córnea para permitir la invasión. Las incubaciones se realizaron a 37°C y a 25° C pero en ambos casos las bacterias presentaron alta citotoxicidad para las células. Al cabo de 30 min se observó que todas las células se levantaron del cubreobjeto, no quedando ninguna célula viable, con lo cual no se pudo concluir con el ensayo de invasión en nuestras condiciones experimentales.

Discusión

En la Tabla 3 se puede observar en primer lugar que las células de córnea empleadas para evaluar propiedades de adhesión de *M. bovis*, así como las condiciones del ensayo utilizadas resultan apropiadas a nuestros fines, ya que se detectó la presencia de un promedio de 203 bacterias adheridas por célula de córnea, número importante para este tipo de estudios. Los resultados indican que la presencia de pili tiene un rol esencial en la adhesión, ya que en las mismas condiciones experimentales células no piliadas presentan un porcentaje de adhesión inferior al 40 % en relación a células piliadas (80 bacterias no piliadas adheridas por célula, Tabla 4). Este 60 % de reducción en el nivel de adhesión es un claro indicador de la importancia que tiene este factor de virulencia en la primera etapa del proceso infeccioso. La adhesión de organismos de *M. bovis* que expresan el fenotipo no piliado a células de córnea sugiere que otras adhesinas, distintas a los pilis, pueden también participar en la interacción con la célula blanco.

Al igual que otros estudios previos, que han demostrado que la adhesión mediada por pilis puede ser inhibida por antisueros homólogos (Annular and Wilcox, 1985; Moore and Rutter, 1989), este trabajo también ha demostrado que anticuerpos anti-pili inhiben la adhesión de *M. bovis* piliada a células epiteliales de córnea bovina. La inhibición de la adhesión por anticuerpos anti-pili también ha sido demostrado en otros microorganismos como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *N. gonorrhoeae* (Jackman and Rosenbusch, 1984).

En nuestro caso el suero de conejo anti-pili inhibe totalmente la adhesión de la forma piliada de *M. bovis* a las células de córnea bovina.

Nuestros resultados muestran también un cierto grado de reducción en la adhesión de las bacterias no piliadas a las células de córnea, en presencia de suero de conejo anti-pili. Este efecto podría deberse a la presencia, en el suero empleado, de anticuerpos contra otros componentes de cubierta celular debido a contaminantes no detectados en la preparación de pili purificado. Otra posibilidad podría resultar de la presencia de organismos piliados, dentro de lo que consideramos poblaciones no piliadas, provenientes de colonias seleccionadas en cultivos en medio sólido. En este sentido se debe recordar

que el suero anti-pili empleado en estos estudios fue previamente adsorbido sobre una suspensión de células no piliadas, con la cual la primera posibilidad quedaría excluida.

En la Fig. 2 se muestra la relación entre el % de adhesión de células piliadas y el título de anticuerpos a-pili, observándose en la misma la disminución de la adhesión a medida que aumenta el título de anticuerpos.

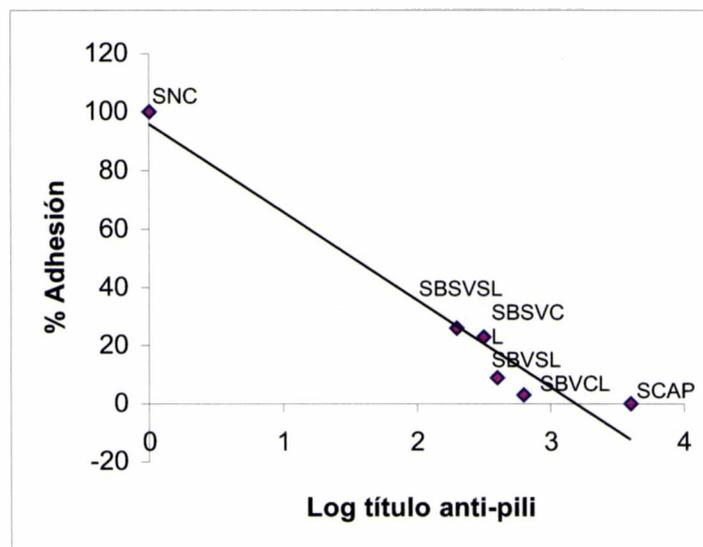


Fig. 2. Efecto del título de anticuerpos anti-pili de los sueros ensayados en el nivel de adhesión de células piliadas.

El empleo de sueros provenientes de animales vacunados de la misma región de donde se aisló la cepa 1194-03, en la pruebas de adhesión, demuestra que estos antisueros son homólogos para esta cepa, de lo contrario no deberían haber producido inhibición en la adhesión bacteriana. Moore and Rutter (1989) reportan porcentajes de inhibición de la adhesión por sueros heterólogos con valores muy bajos que oscilan entre un 0 y 10%. En nuestro caso la inhibición no fue menor al 90% para células piliadas, valor que está en el orden de la inhibición de sueros homólogos.

Se decidió emplear en las pruebas de adhesión, sueros provenientes de animales sin vacunar con o sin lesiones oculares. Previo a su empleo se había llevado a cabo una prueba de ELISA contra pili donde se constató en los sueros empleados un título de anticuerpos contra este factor de adhesión

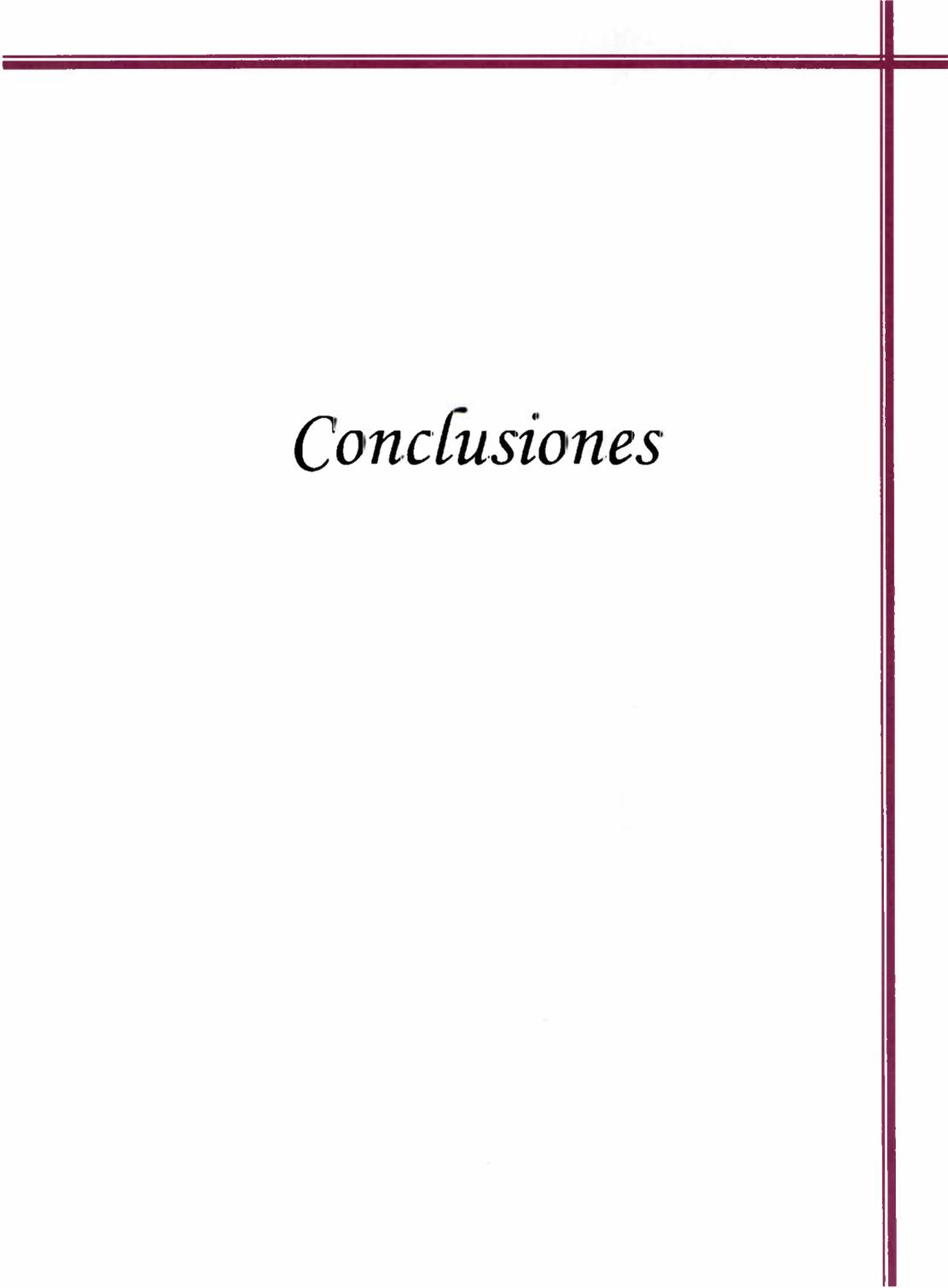
(Tabla 2). Esto demuestra que de alguna manera aún en el caso de animales sin vacunar y evaluados como sin lesión (SBSVSL) al momento de tomar las muestras de suero, los animales habían tenido un contacto previo con la bacteria. Estos sueros reaccionan tanto con organismos piliados como no piliados inhibiendo la adhesión en valores que oscilan entre 73 y 77% para células piliadas (Tabla 3) y 66 y 82% para organismos no piliados (Tabla 4).

Los estudios de adhesión demostraron cierta correlación entre el nivel de adhesión y el título de anticuerpo anti-pili (vacunados con o sin lesión). La correlación observada entre los títulos de anticuerpos anti-pili hallados en los sueros ensayados y el nivel de inhibición de la adhesión bacteriana sugiere un rol importante de anticuerpos anti-pili en la inmuno protección, y la importancia del pili en la patogenia de la QIB.

El análisis de los sueros recibidos demuestra que las vacunas empleadas para el control de esta enfermedad no son efectivas, ya que animales vacunados presentan lesiones. Por otra parte, la existencia de sueros de animales sin vacunar y sin lesiones oculares con título de anticuerpos anti-pili demuestra la existencia de infecciones asintomáticas o no detectadas. No es posible establecer dada la escasa cantidad de muestras procesadas si se requieren valores de anticuerpos circulantes anti-pili mínimos que permitan asegurar un estado de no adhesión y/o colonización de la córnea. Esto será motivo de posteriores estudios.

Bibliografía

- Annular, B.O. and Wilcox, G.E. 1985. Adherence of *Moraxella bovis* to cell cultures of bovine origin. Res. Vet. Sci., 39: 241-246.
- Chandler, R.L., Baptista, P.J.H.P. and Turfrey, B. 1979. Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation to infectious bovine keratoconjunctivitis. J. Comp. Pathol. 89: 441-448.
- Chandler, R.L., Turfrey, B.A., Smith, K. and Gourlay, R.N. 1980. Virulence of *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. Vet. Rec. 106: 364-365.
- Chandler, R.L., Bird, R.G., Smith, M.D., Anger, H.S. and Turfrey, B.A. 1983. Scanning electron microscope studies on preparations of bovine cornea exposed to *Moraxella bovis*. J. Comp. Pathol. 93: 1-8.
- Franco, M.A., Gil-Turnes, C. 1994. Toxins of *Moraxella bovis*: effect on substrates and cells. Rev. Microbiol., 25 (4): 235-238.
- Jackman, S.H. and Rosenbusch, R.F. 1984. In vitro adherence of *Moraxella bovis* to intact corneal epithelium. Curr. Eye Res. 3: 1107-1112.
- Moore, L.J. and Rutter, J.M. 1989. Attachment of *Moraxella bovis* to calf corneal cells and inhibition by antiserum. Aust. Vet. J. 66: 39-42.
- Pedersen, K.B., Froholm, L.O. and Bovre, K. 1972. Fimbriation and colony type of *Moraxella bovis* in relation to conjunctival colonization and development of keratoconjunctivitis in cattle. Acta Pathol. Microbiol. Scand. B 80: 911-918.
- Pugh, G.W. and Hughes, D.E. 1971. Infectious bovine keratoconjunctivitis induced by different experimental methods. Cornell Vet. 61: 23-45.
- Sisti, F., Fernández, J., Rodríguez, M.E., Lagares, A., Guiso, N. and Hozbor, D. 2002. In vitro and in vivo characterization of a *Bordetella bronchiseptica* mutant strain with a deep rough lipopolysaccharide structure. Infect. Immun. 70 (4): 1791-1798.
- Tjssen, P. 1985. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays. In: Burdon R.H. and Knippenberg P.H. (Eds.), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier, Amsterdam 15: 385-421.
- Wilcox, G.W. 1968. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: a review. Vet. Bull. 38: 349-360.

A decorative L-shaped line in a dark red color, consisting of a horizontal line extending from the left edge and a vertical line extending downwards from the right end of the horizontal line.

Conclusiones

El conocimiento del cuadro de situación de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina, a partir de contactos con el sector industrial, fue lo que dio la base para el desarrollo de este trabajo de Tesis en el tema de *Moraxella bovis*. Esta enfermedad altamente contagiosa del ganado bovino, con un nivel de incidencia muy alto en nuestro País, está considerada uno de los temas prioritarios a resolver en el área de Sanidad Animal.

Para controlar cualquier enfermedad infecciosa se necesita una vacunación sistemática, que se mantenga en el tiempo y que asegure una alta tasa de cobertura y que otorgue protección a la población. Para esto las vacunas tienen que ser obligatorias. En nuestro País, la vacunación contra Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina no lo es. En ganado bovino, solamente aftosa y brucelosis son obligatorias. Otro punto clave es contar con una vacuna que sea efectiva, y estas vacunas, hasta el presente, tanto a nivel mundial como local no son efectivas. Hay varias causas de esto. Evidentemente, la vacunación no logra generar un estado inmunológico apropiado y duradero. Asociado a esto, aparecen los siguientes elementos que resultan claves para disponer de una vacuna efectiva: primero, conocer el cuadro epidemiológico local y regional, y segundo, que la vacuna contenga los principales factores de virulencia del agente patógeno.

Cuando se empezó a trabajar en esta Tesis, la situación epidemiológica en Argentina no era conocida. Esto ha llevado a la elaboración de vacunas locales celulares en las cuales se incluye por precaución un elevado número de organismos ignorando si los mismos son iguales o no. Por otro lado, si bien se conocía por bibliografía que el principal factor de virulencia, el pili, era muy poco estable en medios de cultivo, el mismo no era evaluado en las vacunas al no disponerse de ninguna metodología de detección cuali y cuantitativa.

El objetivo de esta Tesis fue avanzar en el esclarecimiento y resolución de estas problemáticas. Esta Tesis expone los resultados orientados a cumplimentar los objetivos.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

-La aplicación de métodos de análisis de fingerprinting de ADN por técnicas de PCR con los primers ERIC y Rep permitió agrupar a una población de *M. bovis* constituida por 57 aislamientos locales 1 de Alemania y 2 cepas de referencia dentro de 5 grupos. Mediante análisis de perfiles de proteínas de membrana externa y lipopolisacáridos se pudo constatar la presencia de tres tipos diferentes de perfiles tanto para PME como para LPS. Tomadas las tres metodologías en conjunto, los 60 aislamientos se pudieron dividir en 15 subgrupos. La caracterización de estos aislamientos resulta de gran interés epidemiológico teniendo en cuenta que era la primera vez que se hacía en el País un estudio sistemático de caracterización en *M. bovis*. Los resultados constituyen la base para la selección de los organismos que deberían integrar las futuras formulaciones de vacunas.

-La aplicación de técnicas espectroscópicas vibracionales (FT-IR), en una población de 11 aislamientos, permitió diferenciar los integrantes de la población de *M. bovis*, con un grado de biodiversidad mayor al obtenido en la diferenciación por técnicas de PCR. Se pudo constatar que la presencia de pili celular contribuye a aumentar la heterogeneidad de la respuesta espectral de la población, por lo cual se requiere trabajar con organismos no piliados para evitar que células de un mismo aislado pero con distinto grado de piliación generen espectros con un nivel de disimilitud mayor a 10.

-Tanto el bact-ELISA como el sol-ELISA desarrollados, demostraron ser técnicas específicas, reproducibles y sensibles para la evaluación del nivel de piliación en células de *M. bovis* y de la concentración de pili soluble, respectivamente. Ambos ensayos de ELISA se mostraron apropiados para monitorear el nivel de piliación celular y extracelular durante el cultivo de *M. bovis* en medio líquido.

-Se demostró la presencia de anticuerpos anti-pili en sueros de bovinos vacunados y/o infectados naturalmente, sanos y enfermos, lo que condice con el estado de infectado portador (sano) e infectado con sintomatología de la enfermedad. La infección de los animales con *M. bovis* genera anticuerpos anti-

pili, al igual que ocurre con la vacunación. Si bien el número de muestras analizadas no fue elevado, en el grupo de animales estudiados se constató la presencia de anticuerpos anti-pili en títulos crecientes, en todo el espectro de los sueros, desde bovinos que no presentaban lesiones y no habían sido vacunados hasta bovinos vacunados con lesiones oculares.

-La presencia de anticuerpos dirigidos contra pili modifica la capacidad de adhesión de *M. bovis* a células epiteliales de córnea bovina, produciéndose inhibición de la adhesión. Esto muestra la importancia de contar con anticuerpos anti-pili durante la interacción inicial bacteria-célula del hospedador para evitar la adhesión, primer evento que lleva a la colonización y desarrollo de la enfermedad.

-Se pudo cuantificar el nivel de piliación celular durante el cultivo de *M. bovis* en medios líquidos. Estudios realizados en escala de frascos agitados y reactores de laboratorio mostraron que la pérdida de piliación puede estar asociada a condiciones de shear hidrodinámico, que son más importantes en fermentadores agitados mecánicamente en relación a erlenmeyer agitados

-El pasaje seriado de poblaciones de *M. bovis* en medios líquidos lleva a una sistemática y progresiva pérdida en el nivel de piliación celular. Este resultados adquieren gran significación teniendo en cuenta que la producción industrial de vacunas en el País se lleva a cabo en reactores agitados en escalas de 100 L, aproximadamente. Inocular estos reactores implica etapas de aumento de poblaciones bacterianas desde placas de medio sólido hasta reactores de 10 L. Este trabajo presenta dos estrategias alternativas para el escalado, demostrándose la imposibilidad de lograr, con los métodos tradicionales de producción, la obtención de bacterias piliadas al final del proceso. Se concluye entonces que se debería estudiar nuevas formas de producción de vacuna contra QIB que podrían incluir cultivos en fermentadores tipo air-lift y/o cultivos de organismos adheridos a superficies (biofilm).



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P

DONACION.....
A.....
Fecha. 07-09-05
Inv. N..... Inv..... B. 57388 185