



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

"Estudio de los efectores externos que modifican el crecimiento y la expresión antigénica de Bordetella pertussis"



TESIS DOCTORAL

924

María Eugenia Rodríguez

924

1995

DONACION.....
A.....
Fecha 04 MAR. 1997
Inv. B..... INV..... B. 545501



Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

"Estudio de los efectores externos que modifican el crecimiento y la expresión antigénica de Bordetella pertussis"

TESIS DOCTORAL

María Eugenia Rodríguez

1995

11/8 9124

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

a mi familia

Mi reconocimiento al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC) y a la Universidad Nacional de La Plata por haber hecho posible la realización del presente trabajo

Mi agradecimiento:

-al Dr. Osvaldo Yantorno por haberme brindado esta oportunidad y haber dirigido este trabajo de tesis.

-al Dr. Rodolfo Ertola por su estímulo y colaboración en el análisis de resultados.

-a mis compañeros del CINDEFI, muchos de los cuales hicieron posible gran parte de este trabajo.

-a Julio Figari y a Catalina López , por su excelente predisposición para ayudarme, su eficiencia y su responsabilidad en el trabajo.

-a Carlos Castro por su ayuda técnica y su compañerismo.

-a mis amigas y compañeras Analía Samo, Daniela Hozbor y Alejandra Bosch, quienes me ayudaron en todo momento con su cariño y comprensión.

-a Julio Arias por todo.

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis han sido incluidos en las siguientes publicaciones:

-Effect of hydromechanical forces on the production of filamentous haemagglutinin and pertussis toxin of *Bordetella pertussis*.

M.E. Rodriguez, A.L. Samo, D.F. Hozbor and O.M. Yantorno
Journal of Industrial Microbiology (1993) 12:103-108.

-Effect of dilution rate on the release of pertussis toxin and lipopolisaccharide of *Bordetella pertussis*.

M.E. Rodriguez,, D.F. Hozbor, A.L. Samo, R. Ertola and O.M. Yantorno
Journal of Industrial Microbiology (1994) 13:273-278.

-Effect of hydromechanical stress on cellular antigens of *Bordetella pertussis*.

M.E. Rodriguez,, D.F. Hozbor and O.M. Yantorno
Enviado para su publicación al Process Biochemistry.

INDICE

Capítulo 1: Introducción

TOS CONVULSA o COQUELUCHE.....	2
1.1. Incidencia y epidemiología.....	2
1.2. Manifestaciones clínicas.....	3
1.3. Diagnóstico.....	4
1.4. Descripción del agente etiológico.....	5
1.4.a. Factores de virulencia y demás inmunógenos de <i>B. pertussis</i>	6
1.4.a.I. Hemaglutinina Filamentosa (FHA).....	6
1.4.a.II Fimbrias y aglutinógenos.....	8
1.4.a.III. Pertactina (PRN) y demás proteínas de membrana externa asociadas a la virulencia.....	9
1.4.a.IV. Toxina Pertussis (PT).....	9
1.4.a.V. Adenilato ciclasa (AC).....	11
1.4.a.VI. Toxina Citotraqueal (TCT).....	11
1.4.a.VII. Toxina dermonecrótica o termolábil (DNT o HLT).....	12
1.4.a.VIII. Lipopolisacárido (LPS).....	12
1.4.b. Influencia de los factores de virulencia en la fisiopatología.....	13
1.4.c. Variación antigénica de <i>B. pertussis</i>	15
1.5. Modulación antigénica y variación de fase <i>in vivo</i>	17
1.6. Control de la enfermedad.....	18
1.7. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>B. pertussis</i> : Características e Influencia sobre la producción de antígenos.....	20
OBJETIVOS del Trabajo de Tesis.....	23

Capítulo 2: Materiales y métodos

2.1. Cepas bacterianas utilizadas.....	25
2.2. Medios de cultivo empleados.....	25
2.3. Cultivo de microorganismos.....	26
2.3.a. Preparación de inóculos.....	26
2.3.b. Cultivo batch en frascos agitados.....	26
2.3.c. Cultivo batch en tanques agitados.....	27
2.3.d. Cultivo continuo en tanques agitados.....	27
2.4. Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono durante el cultivo.....	28
2.5. Ensayo respirométrico.....	29
2.6. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($K_L a$).....	30
2.6.a. Método del sulfito (en ausencia de microorganismos).....	30
2.6.b. Medida directa en línea.....	30
2.7. Determinación de la viscosidad del cultivo.....	30
2.8. Determinación de adhesinas celulares.....	30
2.9. Determinación de la capacidad protectora de células.....	31
2.10. Determinación de la actividad hemaglutinante en sobrenadante de medio de cultivo.....	31

2.11. Determinación de la actividad hemaglutinante de células.....	31
2.12. Determinación de la actividad hemolítica.....	32
2.13. Determinación de toxina pertussis extracelular.....	32
2.14. Determinación de proteínas.....	32
2.15. Preparación de muestras de proteína total de células para electroforesis.....	32
2.16. Obtención de polipéptidos de membrana externa.....	33
2.17. Obtención de lipopolisacárido de células.....	33
2.18. Electroforesis de proteínas y lipopolisacáridos.....	34
2.18.a. Tinción de polipéptidos y LPS.....	34
2.19. Inmunodetección (Western blot) de FHA celular y extracelular, y P.69.....	34
2.20. Determinación del ácido 2-ceto-3-deoxi-octulosónico en LPS proveniente de células y sobrenadante de cultivo.....	34
2.21. Determinación de glutamato en el medio de cultivo.....	35
2.22. Determinación de amonio en el medio de cultivo.....	35
2.23. Determinación de fósforo en el medio de cultivo.....	35
2.24. Determinación de hierro en el medio de cultivo.....	36
2.25. Determinación de cisteína y prolina en el medio de cultivo.....	36
2.26. Determinación de NAD ⁺ y de NADH intracelular.....	36
2.27. Determinación de sideróforos en sobrenadante de medio de cultivo.....	36
2.28. Análisis estadístico.....	37

Capítulo 3: Estudio del crecimiento y la expresión antigénica en sistema de cultivo batch

Resultados	38
3.1. Estudios preliminares de medio de cultivo y condiciones de operación. Escala de frascos agitados.....	38
3.1.a. Ajuste de medio de cultivo y empleo de agentes antiespumantes.....	38
3.1.b. Ajuste de las condiciones de operación del biorreactor en función de la demanda de oxígeno de <i>B. pertussis</i>	42
3.2 Estudio de la influencia de la agitación y aireación sobre el $K_L a$ del tanque agitado a emplearse en el estudio cinético y estequiométrico.....	44
3.3. Descripción cinética y estequiométrica del crecimiento de <i>B. pertussis</i> en sistema de cultivo batch.....	45
3.3.a. Estequiometría del crecimiento de <i>B. pertussis</i>	45
3.3.b. Cinética del crecimiento de <i>B. pertussis</i>	50
Discusión	54

Capítulo 4: Influencia de la fluidodinámica del cultivo sobre los principales antígenos celulares y extracelulares

Breve reseña teórica de la fluidodinámica y esfuerzo de corte en biorreactores.....	56
Resultados	59
4.1. Estudio del origen de la pérdida de HA en el medio extracelular de cultivos agitados de <i>B. pertussis</i>	59
4.2 Efecto de las fuerzas de corte sobre los antígenos celulares de <i>B. pertussis</i>	65
Discusión	68

Capítulo 5: Estudios fisiológicos en sistema de cultivo continuo

Breve reseña teórica del cultivo continuo.....	71
Resultados	74
5.1 Cálculo de parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de <i>B. pertussis</i> en medio SS.....	74
5.2. Efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre el desarrollo celular y expresión antigénica.....	79
5.3. Efecto de la tensión de oxígeno disuelto en el medio de cultivo sobre la producción de células y antígenos.....	85
5.4 Estudio de la respuesta adaptativa de <i>B. pertussis</i> a la baja disponibilidad de nutrientes.....	91
5.4.a. Influencia del sustrato limitante del crecimiento sobre las características de membranas externa de <i>B. pertussis</i>	94
5.4.a.I. Comparación de los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana externa.....	94
5.4.a.II. Comparación de los perfiles electroforéticos de LPS celular.....	97
5.4.b Influencia del sustrato limitante del crecimiento sobre los parámetros estequiométricos de la producción de células y antígenos de <i>B. pertussis</i>	98
5.5. Otros aspectos relacionados con el estudio de medio de cultivo.....	102
Discusión	104
Conclusiones	110
Referencias	113

NOMENCLATURA

A_{650}	densidad óptica a 650 nm.
ABGs	agar Bordet-Gengou/sangre
AC	adenilato ciclasa
AGG	aglutinógenos
AMPc	adenosin monofosfato ciclico
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
C*	concentración saturante de oxígeno disuelto a la temperatura de trabajo
C_1	concentración de oxígeno disuelto
D	velocidad de dilución
\bar{E}	potencia media transmitida por el agitador y el aireador por unidad de volumen
Ae	antiespumante
E.l.	extracto de levadura
EDTA	etilendiaminotetracetato de sodio
ELISA	enzimoinmunoanálisis
expt.	experimento
FHA	hemaglutinina filamentosa
HA	actividad hemaglutinante
HAc	actividad hemaglutinante de células
HLT	toxina termolábil
Hly	hemolisina
Ig	inmunoglobulina
kDa	kilodalton
KDO	ácido 2-ceto-3-deoxi octulosónico
$K_L a$	coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno
K_s	constante de afinidad aparente por el sustrato
LPS	lipopolisacárido
m_s	coeficiente de mantenimiento celular
N	velocidad del agitador
NAD	nicotinamida dinucleótido
NADH	nicotinamida dinucleótido reducido
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
PBS	solución fisiológica isotónica tamponada con fosfatos
PBST	PBS suplementado con Tween 20 al 0.05%
PCO_2	porcentaje de dióxido de carbono en la fase gaseosa

P_g	potencia transmitida al sistema gaseado
PME	polipéptidos de membrana externa
PIF	proteínas de membrana externa inducidas por altas concentraciones de Fe
PRF	proteínas de membrana externa reprimidas por altas concentraciones de Fe
PRN o P69	pertactina
PO_2	porcentaje de oxígeno en la fase gaseosa
PO_{2d}	porcentaje de oxígeno disuelto en el medio de cultivo
PT	toxina pertussis
q_{CO_2}	velocidad específica de producción de dióxido de carbono
q_{KDO}	velocidad específica de excreción de KDO extracelular.
q_{O_2}	velocidad específica de consumo de oxígeno
q_{PT}	velocidad específica de producción de PT extracelular
q_s	velocidad específica de consumo de sustrato
r_{CO_2}	velocidad volumétrica de producción de dióxido de carbono
Re	Nº de Reynolds
r_{O_2}	velocidad volumétrica de consumo de oxígeno
SDS	dodecil sulfato de sodio
SS	medio Stainer-Scholte
SSE	medio SS suplementado con 0.75 g/l de extracto de levadura
TCT	toxina citotraqueal
TDN	toxina dermonecrótica
UPI/ml	unidades internacionales de potencia por mililitro
VME	vesículas de membrana externa
VVM	volumen de aire por volumen de medio por minuto
X	concentración de biomasa
$y'_{x/s}$	rendimiento celular verdadero en base al glutamato
$y_{CO_2/s}$	producción de CO_2 en función del glutamato consumido
$y_{CO_2/x}$	producción específica de CO_2
$y_{KDO/s}$	rendimiento de KDO extracelular en función del glutamato consumido
$y_{KDO/x}$	excreción específica de KDO extracelular
$y_{O_2/s}$	consumo de O_2 en función del glutamato consumido
$y_{O_2/x}$	consumo específico de O_2
$y_{P/s}$	rendimiento de proteína extracelular en función del glutamato consumido
$y_{PT/s}$	rendimiento de PT extracelular en función del glutamato consumido
$y_{PT/x}$	producción específica de PT extracelular
$y_{x/O}$	producción de biomasa por mol de oxígeno consumido
$y_{x/s}$	rendimiento de biomasa en función del glutamato consumido

γ grado de reducción
 μ velocidad específica de crecimiento

Capítulo 1

Introducción

Capítulo1: *Introducción*

TOS CONVULSA o COQUELUCHE.....	2
1.1. Incidencia y epidemiología.....	2
1.2. Manifestaciones clínicas.....	3
1.3. Diagnóstico.....	4
1.4. Descripción del agente etiológico.....	5
1.4.a. Factores de virulencia y demás inmunógenos de <i>B. pertussis</i>	6
1.4.a.I. Hemaglutinina Filamentosa (FHA).....	6
1.4.a.II Fimbrias y aglutinógenos.....	8
1.4.a.III. Pertactina (PRN) y demás proteínas de membrana externa asociadas a la virulencia.....	9
1.4.a.IV. Toxina Pertussis (PT).....	9
1.4.a.V. Adenilato ciclasa (AC).....	11
1.4.a.VI. Toxina Citotraqueal (TCT).....	11
1.4.a.VII. Toxina dermonecrótica o termolábil (DNT o HLT).....	12
1.4.a.VIII. Lipopolisacárido (LPS).....	12
1.4.b. Influencia de los factores de virulencia en la fisiopatología.....	13
1.4.c. Variación antigénica de <i>B. pertussis</i>	15
1.5. Modulación antigénica y variación de fase <i>in vivo</i>	17
1.6. Control de la enfermedad.....	18
1.7. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>B. pertussis</i> : Características e Influencia sobre la producción de antígenos.....	20
OBJETIVOS del Trabajo de Tesis.....	23

La tos convulsa es una enfermedad infecciosa de las vías respiratorias superiores que se manifiesta como un síndrome de tos paroxística sin fiebre. Esta enfermedad se puede definir como la asociación de un síndrome infeccioso y un síndrome tóxico local y generalizado. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), 60 millones de personas contraen la enfermedad anualmente, con una mortalidad estimada en 600.000 decesos por año. Este último grupo está constituido principalmente por recién nacidos y niños menores de cuatro años.

El agente causal de esta enfermedad, *Bordetella pertussis*, es un patógeno estrictamente humano. El reservorio natural de este microorganismo es el hombre y es incapaz de sobrevivir en el medio exterior. La principal fuente de contaminación son las gotas de saliva expulsadas en el episodio de tos. El contagio se produce al entrar en contacto directo con un portador sano o enfermo, y la penetración es por vía aérea. Después de la infección se observa una inmunidad local, sérica y celular. Aparentemente, no sólo los anticuerpos circulantes sanguíneos de sujetos convalecientes juegan un papel importante en la protección, sino que la respuesta protectora involucra además la secreción de anticuerpos a nivel del epitelio respiratorio. En relación a esto último se ha visto que, si bien aquellos individuos que han padecido la enfermedad conservan un nivel elevado de anticuerpos circulantes por largo tiempo, ha habido casos en los que han sido recolonizados transitoriamente o se han transformado en portadores sanos, en razón tal vez de la desaparición de su inmunidad local¹.

Para la prevención de esta enfermedad muchos países, incluyendo la Argentina, emplean vacunas compuestas por suspensiones bacterianas inactivadas por calor a 56°C o por la acción combinada de temperatura y formol. Esta vacuna, aunque bastante efectiva en cuanto a su actividad inmunoprotectora, presenta reacciones adversas que van desde moderadas (enrojecimiento de la piel, fiebre, irritabilidad) hasta daños neurológicos severos ocasionando incluso la muerte con una frecuencia de 1:310,000 vacunaciones. Este nivel de mortandad está muy por encima del máximo permitido por la OMS (1:10⁶), pero dicha organización acepta el empleo de esta vacuna ante la necesidad de controlar la situación desde el punto de vista epidemiológico y la falta de una formulación alternativa válida.

Las reacciones secundarias asociadas a la vacunación disminuyeron su aceptación a nivel mundial. La aparición de una epidemia alrededor del año 1979, obligó a reconsiderar la necesidad de vacunación. Así comenzaron las investigaciones tendientes a la formulación de una vacuna menos reactogénica pero igual o más efectiva que la clásica empleada. Desde 1981 la tendencia mundial ha sido la búsqueda de una vacuna celular modificada en lo que se refiere a sus componentes endotóxicos, o bien una vacuna acelular formulada a partir de antígenos purificados² y/o restos de membrana externa. Aún después de catorce años de investigación en este campo no se ha logrado aún definir exactamente qué componentes deberían ser incluidos en una formulación ideal. El tipo de respuesta inmune inducida por las vacunas acelulares ensayadas hasta el momento, no confiere la protección adecuada al vacunado³.

Recientemente se ha argumentado en apoyo de la vacuna celular, que este tipo de vacuna podría ser también más efectiva que las de tipo acelular ensayadas, en disminuir el número de portadores sanos y la colonización de otros microorganismos estrechamente relacionados con *B. pertussis*, tal como *Bordetella bronchiseptica*, que sin ser un patógeno humano se comporta como comensal o colonizador del tracto respiratorio^{4,5} y factor predisponente de enfermedades respiratorias⁶.

No es posible descartar que una vacuna acelular adecuadamente formulada presente las mismas características protectoras, pero los estudios relacionados con este aspecto aún se encuentran en una etapa inicial.

Actualmente, nuestro país emplea en sus programas de vacunación la vacuna celular clásica (a células enteras), que es importada en su totalidad debido a la falta de desarrollo tecnológico adecuado que permita su producción a gran escala.

El objetivo de este trabajo ha sido, en parte, desarrollar dicha tecnología definiendo las condiciones de producción en función obtener células bacterianas de alto poder inmunogénico y baja reatogenicidad. Establecer, asimismo, las condiciones de máxima productividad de inmunógenos considerados de fundamental importancia en la formulación vacunas acelulares.

Para llevar a cabo estos estudios resulta fundamental conocer los mecanismos de colonización y patogenicidad que deben ser bloqueados, qué componentes celulares de *Bordetella pertussis* son los responsables de la actividad endotóxica y cuáles de la actividad protectora conferida al huésped. El estado de conocimiento sobre estos y otros aspectos relacionados con la enfermedad y el microorganismo se resume a continuación.

TOS CONVULSA o COQUELUCHE

La tos convulsa es una infección aguda del aparato respiratorio causada por *Bordetella pertussis*. Se presenta en forma endémica por todo el mundo y en brotes epidémicos en la mayoría de las regiones de mayor densidad de población. La enfermedad consiste en una tos progresiva y paroxística de intensidad variable. Puede persistir durante varias semanas y ser especialmente grave e incluso letal en la primera infancia. Como complicaciones más graves se pueden señalar la neumonía intersticial y la afectación del sistema nervioso central.

1.1. Incidencia y epidemiología

Aproximadamente el 90% de los casos se observan por debajo de los 9 años y el 10% ocurren dentro del primer año de vida, cuando la mortalidad es más elevada. En niños menores de un año de edad, tanto la incidencia como la mortalidad son más elevadas en la raza negra.

A pesar de la importante reducción en el número de casos de tos convulsa desde la introducción de la vacunación, ésta continúa siendo una enfermedad de importancia mundial con 60,000,000 casos y 600,000 decesos anuales estimados⁷. En muchas poblaciones la tos convulsa es aún endémica, con ciclos epidémicos regulares que se producen en ciclos de 3 a 5 años, las cuales son atribuidas a la acumulación de sujetos susceptibles y portadores en la población.

El número real de microorganismos necesarios para la infección no se conoce, pero se considera a la tos convulsa como una enfermedad muy contagiosa. Las tasas de ataque entre individuos susceptibles varían entre el 50 y el 100%, dependiendo de la naturaleza de la exposición. Dado que el microorganismo se localiza en vías aéreas, se cree que la transmisión

ocurre predominantemente por gotitas aerosolizadas, produciéndose las tasas más altas de ataque en individuos expuestos a un paciente que tose hasta una distancia de 1,5 m.

La tos convulsa es original entre las infecciones de la infancia en lo que se refiere a que las tasas de ataque, morbilidad y mortalidad, que son significativamente más altas en mujeres. El motivo de esta diferencia no se conoce.

No hay reservorios animales y *B. pertussis* es incapaz de sobrevivir en el medio ambiente, en consecuencia la transmisión debe producirse de un individuo infectado a un huésped susceptible. Se han detectado portadores asintomáticos con cultivos positivos durante epidemias.

En la era prevacunación, la tos convulsa era una enfermedad que se presentaba fundamentalmente en niños de 1 a 5 años debido, al menos en parte, a la protección pasiva brindada por los anticuerpos maternos. Los adultos en general, habían estado enfermos cuando niños y en permanente contacto con el microorganismo durante toda su vida. De esta forma existía un alto nivel de inmunidad en los mismos. La vacunación ha sido, sin duda, la causa principal de reducción global de la incidencia de la enfermedad, pero también es probable que haya provocado un cambio en la edad pico de la aparición. Dado que la inmunidad de la vacuna tiene una duración limitada (en general menos de doce años) los niños inmunizados están bien protegidos, pero muchos adultos tienen poca o ninguna inmunidad para transferencia pasiva a lactantes. Así los lactantes, que tienen el mayor riesgo de morbilidad y mortalidad, son los menos protegidos. Con los casos presentados en niños pequeños, está claro que los adultos con tos convulsa atípica no diagnosticadas representan una de las mayores fuentes de transmisión. Por esta razón un diagnóstico preciso de esta patología aún en enfermedades subclínicas, como así también una vacuna y un plan de vacunación adecuados, constituyen los tres pilares fundamentales para la erradicación de la enfermedad.

1.2. Manifestaciones clínicas

Luego de un período de incubación que varía de menos de 1 semana a más de 3, comienza el desarrollo de la enfermedad, a la que se puede dividir en tres fases:

Período catarral. Comprende de 7 a 10 días. En su iniciación puede simular una leve coriza, indistinguible del resfriado común. Puede haber un ligero ascenso térmico y sospecharse un ataque de bronquitis corriente. Si no se conoce la exposición no se sospecha la enfermedad en este primer estadio. Después de 5 o 6 días, sin embargo, la tos en vez de ceder aumenta en intensidad e inicia su carácter espasmódico, tendiendo a presentarse en forma de paroxismos. Al principio estos paroxismos son leves, pero gradualmente van aumentando en frecuencia e intensidad, especialmente de noche, hasta que comienza el período convulsivo o paroxístico.

Período convulsivo o paroxístico. En este momento el enfermo presenta quintas de tos espasmódica, en número de 10 a 15, y en sucesión tan rápida que el niño no puede hacer una inspiración entre ellas. En el paroxismo la facies adquiere un color rojo, a veces purpúreo, las venas craneales se ingurgitan, y hay protrusión de los globos oculares; se sigue una larga inspiración a través de la glotis estrechada, produciéndose un sonido sibilante conocido como "gallo". Con el último paroxismo se expulsa una masa de moco espeso y adherente. Hay sudoración profusa. Después de un paroxismo intenso el paciente suele quedar en un estado de

completa confusión. En ocasiones suele llegarse a la asfixia, requiriendo la práctica de la respiración artificial. El número de paroxismos durante 24 hs. oscila de 6 a 40 ó 50.

En los casos más leves el tipo de paroxismo descrito puede no presentarse, e incluso puede faltar el "gallo". El diagnóstico, sin embargo, vendrá sugerido por la naturaleza quintosa de la tos que no cesa hasta la expulsión del tapón de moco.

El lugar de localización de la irritación que ocasiona la tos se encuentra en la tráquea y bronquios. Los exámenes laringoscópicos muestran inflamación catarral, ocasionalmente acompañada de hemorragias puntiformes en la laringe. Los hallazgos en tráquea son más característicos: pueden verse tapones de moco antes de los ataques de tos. En el análisis de elementos sanguíneos se observa una marcada leucocitosis con predominancia de linfocitos. Paradójicamente, el aislamiento del microorganismo resulta progresivamente más difícil después del primer ataque de tos de la fase paroxística. La incapacidad de cultivar el microorganismo durante la fase más severa de la enfermedad, indica que la mayoría de las manifestaciones clínicas se deben a la presencia de toxinas liberadas por el microorganismo y a su diseminación sistémica.

La duración del periodo paroxístico es de alrededor de un mes. Los espasmos aumentan de intensidad durante los primeros 15 días, permanecen estacionarios alrededor de una semana y a partir de este momento decrecen en intensidad.

Período de convalecencia. Se caracteriza por la disminución gradual y progresiva de los accesos de tos. Las aspiraciones forzadas disminuyen en número e intensidad. Paulatinamente se van interponiendo entre las crisis, otras de tos corriente. En algunos casos persisten accesos de forma aislada (tic coqueluchoide).

1.3. Diagnóstico

Se han desarrollado una variedad de métodos para la detección de *B. pertussis*, sus productos o la respuesta inmune que generan⁸. Sin embargo, todos tienen limitaciones en cuanto a la sensibilidad, especificidad o practicidad. El aislamiento del microorganismo por medio de cultivos en el contexto de la enfermedad clínica o de enfermos asintomáticos se considera el standard de oro. Los medios de cultivo generalmente usados para el aislamiento son: Agar Bordet-Gengou sangre (preparado en el día), Reagan-Lowe adicionado con carbón y sangre, o medio de Stainer-Scholte (SS) adicionado con ciclodextrina. En todos los casos se les agrega metilicina o cefalexina para evitar el crecimiento de la flora acompañante. El material para cultivo se obtiene de hisopados nasofaríngeos con alginato de sodio (el algodón inhibe el crecimiento del microorganismo) o por aspiración. La muestra cultivada debe examinarse a diario durante 5-7 días para identificar las diminutas colonias que crecen lentamente.

El prolongado lapso necesario para la lectura definitiva de los cultivos llevó al desarrollo de anticuerpos marcados con fluoresceína para detectar *B. pertussis* en frotis nasofaríngeo. El método de fluorescencia directa también se usa para identificar colonias en cultivos.

La serología se efectúa por técnicas de aglutinación, ELISA, o Western blot. Todas las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos son útiles epidemiológicamente, pero resultan poco adecuadas durante la fase aguda de la enfermedad. Dado que la capacidad para

aislar *B. pertussis* disminuye en forma progresiva durante la enfermedad, el uso de la combinación de un cultivo y un ensayo para anticuerpos antipertusis puede proporcionar la máxima sensibilidad diagnóstica durante el curso de la dolencia.

Otros métodos para la identificación del microorganismo o sus componentes por medio de hibridación de DNA, ensayo con enzimas o anticuerpos, son prometedores pero aún están en desarrollo. En este sentido, la técnica de amplificación de DNA por PCR es particularmente atractiva ya que su rapidez, sensibilidad y precisión haría posible un diagnóstico diferencial certero en las primeras etapas de la enfermedad.

1.4. Descripción del agente etiológico

El principal agente etiológico de la tos convulsa es *Bordetella pertussis*, pero también se han mencionado a *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* como posibles causantes de una coqueluche atípica⁵ El género *Bordetella* está constituido por cuatro especies: *B. pertussis* y *parapertussis* que son patógenos humanos, *B. bronchiseptica* que es patógeno animal pero últimamente se lo ha aislado en humano, y *B. avium* que infecta únicamente pájaros. Todas las especies del género *Bordetella* son cocobacilos Gram negativos que aparecen solos o en pares. *B. avium* y *bronchiseptica* son móviles por flagelos peritricos. Todas las especies tienen fimbrias, son aerobias y oxidan aminoácidos. Por otra parte, todas necesitan ác. nicotínico como factor de crecimiento y su temperatura óptima es 35-37°C. Evidentemente, *Bordetella pertussis*, *parapertussis* y *bronchiseptica* son las que revisten mayor importancia para el hombre. Las siguientes características bioquímicas distinguen las tres especies:

Características	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>
Movilidad	-	-	+
Nitrato reductasa	-	-	+
Ureasa	-	+	+
Oxidasa	+	-	+
Crecimiento en ABGs	3-4 días	2-3 días	1 día
Crecimiento en agar nutritivo	-	-	+
Metabolización de carbohidratos	-	-	-
Hemólisis	+	+	+

Las tres especies colonizan tracto respiratorio adheriéndose a cilias de la mucosa. Poseen antígenos de superficie comunes y producen sustancias tóxicas como la citotoxina traqueal⁹ y la

adcnilato ciclasa extracelular¹⁰. Las tres cepas cambian su estado de virulencia en respuesta a estímulos del entorno¹¹. Una diferencia muy importante entre estas especies es la capacidad de producción de toxina pertussis, solamente observada en cultivos de *B. pertussis*. Las otras dos especies tienen en su genoma el gen que codifica para esta toxina pero aparentemente sería transcripcionalmente inactivo.

Se ha sugerido¹² que estas tres especies de *Bordetella* no serían suficientemente diferentes genéticamente como para ser clasificadas como especies diversas. Pero en particular, *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica* están más estrechamente relacionadas entre sí que con *B. pertussis*.

1.4.a. Factores de virulencia y demás inmunógenos de *B. pertussis*

Los factores de virulencia son aquellos que permiten a un patógeno la colonización del organismo huésped. Se los puede definir como factores indispensables para el desarrollo de la enfermedad, pero no para el crecimiento *in vitro*. Estas sustancias son las responsables de promover la patogenicidad permitiendo la entrada del microorganismo infeccioso al hospedador, su interacción con el órgano blanco, la evasión de las defensas del huésped, la proliferación del patógeno, el desarrollo de daño local en el sitio de infección y los efectos sistémicos de la enfermedad.

B. pertussis produce cierto número de sustancias biológicamente activas que están involucradas en el desarrollo de la enfermedad. No obstante, si bien el empleo de microorganismos recombinantes¹³ redundó en un gran avance en el conocimiento de algunas de las funciones específicas de ciertos factores, la falta de un modelo animal que reproduzca la enfermedad en humanos representa un gran obstáculo para la definición precisa del rol de los distintos factores de virulencia de *B. pertussis* en la fisiopatología de la enfermedad.

El modelo de infección animal más empleado y mejor estudiado es el de la infección intranasal en ratones. En este contexto, se caracterizaron algunos de los factores de virulencia e inmunógenos más importantes de *B. pertussis*, según se detalla a continuación.

El primer paso en la patogénesis de pertussis es la adherencia de las bacterias a las células ciliadas del tracto respiratorio superior del huésped. Varias clases de proteínas están involucradas en la adhesión de *B. pertussis* a dichas células: una hemaglutinina filamentosa (FHA), las fimbrias, los aglutinógenos de membrana externa (AGG), una proteína de membrana externa: la pertactina (PRN) o P69, y la toxina pertussis (PT). El grado de participación de cada uno de estos factores en el proceso de adhesión continúa en estudio. Sin embargo, se sabe que estas proteínas están asociadas a la etapa temprana de la infección y dan lugar a lo que se conoce como **Síndrome infeccioso**.

1.4.a.I. Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

Es una proteína fibrilar, de 2-4 nm de diámetro por 100 nm de longitud, de localización periplásmica y también extracelular. Es una proteína básica (pI 8.1). El perfil electroforético de FHA purificada muestra cierta heterogeneidad, pero existen dos componentes mayoritarios de pesos moleculares 220 y 180 kDa. Se ha descrito la aparición de fragmentos más pequeños en

distintas condiciones de cultivo y operación, que serían producto de degradación de los dos componentes mayoritarios de esta proteína. Según la cepa de *B. pertussis* el peso molecular de los componentes mayoritarios puede variar ligeramente¹⁴

En lo que se refiere a su biogénesis, el locus de FHA está compuesto por tres genes: *shaA*, *shaB* y *shaC*. El gen *shaB* es el estructural y codifica para una proteína potencial de 367 kDa¹⁵, que es el precursor de FHA madura extracelular. FHA extracelular corresponde a las dos terceras partes N-terminal del producto del gen *shaB*, y su peso molecular es de 220 kDa. EL tercio restante C-terminal no está presente en FHA extracelular pero es crítico en la síntesis de esta proteína. Esta fracción C-terminal tiene una región rica en prolina que incluye una secuencia prolina-lisina repetida 5 veces (PK)₅. Se cree que, al igual que en *E. coli* y otros microorganismos, esta región podría ser el sitio de anclaje a la membrana celular, del precursor de la molécula de FHA periplásmica.

La activación y secreción de FHA al medio extracelular depende de un gen denominado *shaC* que se encuentra en dirección 3' y separado de *shaB* por tres genes: *fimB*, *fimC*, *fimD*. Estos tres genes y *shaC* forman un cluster que es común para la biogénesis de fimbrias y FHA. Una mutación en esta zona afecta la producción de ambos factores de virulencia.

En lo que se refiere al comportamiento de FHA como adhesina, se ha descubierto que esta proteína posee tres tipos de sitios de unión diferentes¹⁶. El sitio que media la interacción de FHA a las células epiteliales ciliadas es una región repetitiva en la zona N-terminal de la molécula de FHA que tiene afinidad por los carbohidratos, en particular por glicolípidos que contienen lactosa. Es un tipo de unión similar al que presentan las lectinas ("lectin-like"). El segundo tipo de sitio es una zona de la molécula de FHA caracterizada por la alta densidad de cargas positivas, que se encuentra en la región C-terminal¹⁷. El tipo de unión que se establece a través de este sitio es electrostático y, a través del mismo, FHA es capaz de unirse a células no ciliadas (como es el caso de células HeLa, Vero, WiDr, macrófagos, etc.), a heparina¹⁸ y otros sacáridos-SO₄⁻. Aparentemente, FHA es la única de las adhesinas de *B. pertussis* que presenta este sitio de unión. El tercer tipo de unión de FHA a células eucariotas es mediado por un sitio RGD (arginina-lisina-ác. aspártico) similar al que presenta la fibronectina, y a través del cual es capaz de unirse a glóbulos rojos (produciendo hemaglutinación, de donde deriva su nombre) y a macrófagos. En realidad, la molécula de FHA tiene dos sitios RGD, uno en el aminoácido 1097 y otro en el 2599. El primero, pero no el segundo, está expuesto en la superficie de FHA nativa¹⁹, ya que los aminoácidos que forman su entorno le dan características hidrofílicas (es un sitio muy parecido al que se encuentra en la fibronectina). Este sitio presenta características antigénicas. Esta es una de las razones por las cuales se asoció la actividad hemaglutinante (HA) de FHA con su inmunogenicidad²⁰.

La unión de *B. pertussis* a macrófagos a través de FHA se produce como consecuencia de la interacción de esta proteína con dos clases de moléculas en los macrófagos: glicoconjugados que contienen galactosa y la integrina CR3 ($\alpha_m\beta_2$, CD11b/CD18)²¹. Una vez adherida al macrófago *B. pertussis* es internalizada por un mecanismo diferente al de la fagocitosis. No se producen las reacciones de oxidación características de la fagocitosis y la bacteria sobrevive dentro del macrófago. De esta manera la bacteria es capaz de permanecer en el pulmón. Este mecanismo está siendo motivo de estudio, ya que se cree que es una de las formas en que *B. pertussis* permanece en el organismo y convierte al hospedador en un portador asintomático.

En vista que FHA es la adhesina más importante de *B. pertussis in vivo*, se la consideró entre los antígenos fundamentales para la formulación de una vacuna pertussis. Se ha reportado que, si bien FHA no genera una respuesta protectora contra el desafío intracerebral en ratones, lo protege, en cambio, de un desafío intranasal. De la misma forma, inmunizaciones pasivas con anticuerpos anti-FHA brindan protección contra la infección respiratoria letal²². Es evidente que el modelo intranasal es más adecuado por tener mayor semejanza con el proceso infeccioso que se produce en la tos convulsa.

En relación al tipo de respuesta que se induce en vacunados e infectados se reportó que, los niveles de IgG anti-FHA son iguales en vacunados que en infectados, pero los niveles de IgA anti FHA de vacunados son menores que los inducidos por la infección. Estas observaciones sugieren que la presentación de antígenos tales como FHA al sistema inmune de la mucosa puede ser de importancia para una inmunidad eficaz y duradera en el tiempo.

En lo que se refiere a los epitopes de la molécula de FHA, se han encontrado por lo menos cuatro en la región C-terminal, aunque también existirían epitopes en la región N-terminal. Por esta razón FHA pierde su capacidad inmunogénica por acción de proteasas o cualquier otro factor que rompa su estructura proteica²³

1.4.a.II Fimbrias y aglutinógenos

Son estructuras similares a pelos que se proyectan hacia afuera de la superficie de la bacteria. Las fimbrias son polímeros de proteína. Estas estructuras son importantes en la fijación de la bacteria a la célula epitelial o mucosa²⁴. *B. pertussis* produce dos tipos de fimbrias serológicamente diferentes, designadas serotipo 2 y serotipo 3.

La biogénesis de las fimbrias está regulada junto con la de los demás factores de virulencia. Las fimbrias están formadas por subunidades mayores que constituyen la estructura y cuyo gen codificante aún no se ha determinado; y subunidades menores, involucradas en la adhesión, localizadas en la parte exterior de la fimbria. Recientemente, se ha determinado que en el genoma de *B. pertussis* están presentes los genes *fim2* y *fim3*, que codifican para los dos serotipos de este microorganismo. La expresión fenotípica de uno u otro podría deberse a factores ambientales. Incluso, se ha comprobado que una misma cepa de *B. pertussis* puede cambiar su serotipo en el transcurso de la enfermedad²⁵. Los genes *fimB*, *fimC* y *fimD* son necesarios para la biogénesis de la fimbria pero aún no se ha determinado su función específica. En lo que se refiere al transporte de las fimbrias fuera de la célula, se ha reportado que depende de proteínas accesorias codificadas en genes distintos de los *fim* mencionados²⁶.

Así como los demás componentes de superficie, se considera que las fimbrias son un factor importante en la respuesta inmune ya que se comportan como inmunógenos efectivos en lo que se refiere a su capacidad para generar anticuerpos protectores. Actualmente, un grupo de investigación británico está desarrollando una vacuna acelular basada fundamentalmente en este componente.

Además de los aglutinógenos 2 y 3 fimbriales también se ha definido el aglutinógeno 1, que está presente en todas las cepas de *B. pertussis*, y cuya localización no está del todo clara. Existen reportes contradictorios en relación a su naturaleza y a su asociación con estructuras de

superficie. De todas formas estos tres aglutinógenos han dado lugar a la clasificación de este microorganismo según su serotipo: 1:2:3, 1:2, 1:3, y 1.

1.4.a.III. Pertactina (PRN) y demás proteínas de membrana externa asociadas a la virulencia.

Pertactina es una proteína de membrana externa. Su peso molecular, determinado por electroforesis en condiciones desnaturizantes, es de 69 kDa (por esta razón se la ha denominado P69). Sin embargo, se ha podido comprobar que su peso molecular real es significativamente menor pero la presencia de secuencias repetitivas ricas en prolina en su estructura primaria retarda su movilidad electroforética.

Su gen estructural codifica para proteína de 93 kDa²⁷.

La biosíntesis de esta proteína está regulada conjuntamente con los demás factores de virulencia (ver más adelante), por lo que su presencia en membrana externa es considerada marcador de fase virulenta.

Presenta dos sitios de fijación, de tipo RGD, con afinidad por las integrinas de células epiteliales. Los aminoácidos que circundan el triplete RGD de esta proteína son diferentes a los que circundan al sitio RGD de FHA. Se ha atribuido a esta diferencia en la conformación del entorno, el hecho de que el mismo triplete RGD presente afinidad por distintas células eucariotas²⁸.

El interés de esta proteína como potencial componente de vacuna se inició a partir del descubrimiento de una proteína de membrana externa de *B. bronchiseptica* de PM 68 kDa, muy relacionada con la PRN de *B. pertussis*, que genera respuesta inmune protectora en animales susceptibles²⁹.

En lo que se refiere a su actividad protectora, el estudio del suero de individuos vacunados con vacuna pertussis a células enteras y el de convalecientes mostró la presencia de altos títulos de anticuerpos contra PRN. En este mismo sentido se ha descubierto que la vacuna acelular japonesa cuyo poder protector se creía atribuible únicamente a PT y FHA, tiene una cantidad significativa de PRN a la cual debe parte de su capacidad protectora³⁰. Mas aún, se ha informado que PRN es capaz de generar una buena respuesta inmune en muy pequeñas dosis. Actualmente se están empleando mutantes para precisar su potencial como antígeno protector³¹.

En lo que se refiere a las demás proteínas de la membrana externa, se han definido seis que sólo estarían presentes en la forma virulenta de *B. pertussis*³². Estas proteínas han sido caracterizadas por sus pesos moleculares en electroforesis en condiciones desnaturizantes. Sus pesos moleculares son: 90, 86, 62.5, 33, 31 y 30 kDa. Se desconoce el rol de estas proteínas en la virulencia, si es que tienen alguno, pero se las ha utilizado como marcadores de fase.

1.4.a.IV. Toxina Pertussis (PT)

Es el factor de virulencia más importante de *B. pertussis*. Es una toxina muy potente cuya toxicidad deriva de sus múltiples efectos biológicos³³: ADP ribosilante de proteínas, inductora de linfocitosis, histaminosensibilizante, hiperinsulinémica, hipoglucemiante, inductora de susceptibilidad al shock anafiláctico, e inductora de enfermedades autoinmunes.

Su localización es periplásmica y también extracelular. Posee conformación globular (6 nm de diámetro) y su peso molecular es de 117 kDa. Está compuesta por cinco subunidades diferentes: S1 (28 kDa), S2 (23 kDa), S3(22 kDa), S4(11.7 kDa) y S5(9.3 kDa). Tal como otras toxinas proteicas bacterianas, PT se puede dividir en dos dominios: A y B³⁴. El dominio A, formado por la subunidad S1, es la unidad catalítica. Une NAD y transfiere un grupo ADP-ribosa a proteínas del grupo de las unidoras de GTP (proteínas G), involucradas en la transmisión de señales a través de la membrana celular. La ADP ribosilación de la proteína G inhibidora de la adenilato ciclasa, altera la capacidad de las células para responder a hormonas que inhiben la producción de AMPc como así también la movilización de Ca⁺². El dominio B (compuesto por S2, S3, S4, y S5, en relación 1:1:2:1) es el responsable de la adhesión a los receptores de superficie de las células eucariotas y facilita la entrada de la subunidad tóxica S1 dentro de la célula.

Los genes que codifican para las cinco subunidades están organizados en un operón. Cada gen tiene su secuencia líder, por lo que se producen y secretan individualmente dentro del espacio periplásmico. Una vez allí, se ensamblan y secretan al medio extracelular³⁵. El ensamblaje parece ser necesario para la excreción de PT³⁶, como así también la presencia de la subunidad S3. El mecanismo por el cual la toxina ensamblada es capaz de atravesar la membrana no se conoce. Lo único que se ha podido demostrar es que la excreción de PT requiere del producto de genes accesorios localizados a cierta distancia de los genes estructurales de PT^{35,37}.

PT también se comporta como una adhesina menor y tiene cierta actividad hemaglutinante³⁸. La adherencia mediada por esta proteína se establece merced a un sólo tipo de sitio que tiene afinidad por la galactosa/lactosamina ("lectin-like")^{39,40}. Este es el único tipo de sitio de adhesión descrito para PT. Por esta razón se ha visto⁴¹, por ejemplo, que PT no actúa como adhesina entre *B. pertussis* y las células HeLa.

En lo que se refiere a su capacidad protectora, se la considera el antígeno más importante⁴². En este sentido, si bien al presente no están totalmente definidos los componentes de una vacuna acelular, existe consenso general acerca de la necesidad de incluir este antígeno. PT purificada y detoxificada es capaz de generar una respuesta protectora contra el desafío intracerebral, y también, aunque en menor medida, contra el desafío intranasal. De todas formas, a diferencia de FHA, los anticuerpos anti-PT deberán ser efectivos a nivel sistémico para cotrarrestar la entrada de dicha toxina en el organismo y no tanto a nivel de la mucosa, ya que esta proteína es una adhesina menor.

De las vacunas acelulares probadas hasta el momento una de las más efectivas resultó ser aquella compuesta por PT detoxificada y FHA. Aparentemente FHA potenciaría la respuesta inmune generada por PT.

Además de los factores de virulencia mencionados, que están asociados a la fase temprana de infección y dan lugar al síndrome infeccioso, están aquellos asociados al llamado: **síndrome tóxico** de la enfermedad. En él intervienen las toxinas producidas por *B. pertussis* : PT (las propiedades tóxicas de esta enzima ya fueron descriptas), Adenilato Ciclasa (AC), Toxina Dermonecrotica (TDN), y Toxina Citotraqueal (TCT).

A continuación se describen estas toxinas y otros componentes celulares que contribuyen al establecimiento de la enfermedad, sus síntomas clínicos y a la aparición de la respuesta inmune.

1.4.a.V. Adenilato ciclasa (AC)

Adenilato Ciclasa-Hemolisina es uno de los factores de virulencia importantes producidos por *B. pertussis*. Esta proteína se encuentra asociada a la célula y es también secretada al medio extracelular⁴³.

El clonado y secuenciamiento del gen reveló que se trata de una proteína simple bifuncional de 200 kDa⁴⁴ de peso molecular, con actividad adenil-ciclasa y hemolítica.

El dominio N-terminal corresponde a una región catalítica, activada por calmodulina (una proteína eucariota unidora de Ca^{+2}), que aumenta los niveles de AMPc de la célula blanco. La región C-terminal tiene actividad hemolítica⁴⁵.

El operón *Cya* está compuesto por cuatro genes: uno estructural (*CyaA*), y tres (*CyaB*, *CyaC* y *CyaD*) que están involucrados en la secreción y procesamiento del producto del gen estructural⁴⁶.

La actividad enzimática y tóxica de esta proteína ha sido estudiada por muchos investigadores, quienes han atribuido las diferentes actividades a distintas formas de la proteína⁴⁷. Aparentemente, AC asociada a la célula (AC celular) está en su forma tóxica y así se secreta al espacio extracelular. Se ha especulado que la actividad hemolítica le permitiría atravesar la cubierta bacteriana e ingresar en la célula blanco. La actividad hemolítica aparece como un paso distinto y disociado temporalmente de la producción de AMPc. Así la falta de Ca^{+2} no previene el pegado de la toxina ni la lisis celular, pero inhibe la producción de AMPc.

Un hecho sorprendente es que a pesar de que la tos convulsa es una enfermedad del hombre, la hemolisina de *B. pertussis* no parece afectar los eritrocitos humanos. Esta resistencia a la lisis parece ser producto de la degradación proteolítica de AC. La vida media de la toxina en la membrana de los eritrocitos humanos es muy corta como para permitir la formación de lesiones efectivas pero es lo suficientemente larga para aumentar los niveles de AMPc intracelular⁴⁸.

En lo que se refiere al poder protector, recientemente se ha demostrado que este antígeno protege a ratones de la infección intranasal con *B. pertussis* virulenta⁴⁹. Existen grupos de investigación que aseguran que AC es un componente que debe ser incluido en una formulación de vacuna. El principal cuestionamiento que se le ha hecho a la inclusión de esta proteína en una vacuna, es que podría inducir la formación de anticuerpos contra la adenilato ciclasa del huésped. Este aspecto continúa en estudio ya que no hay evidencias concluyentes ni en uno ni en otro sentido

1.4.a.VI. Toxina Citotraqueal (TCT)

Es la toxina de *B. pertussis* más recientemente descubierta. Se trata de un glicopéptido muy pequeño (921 Da), derivado del péptidoglicano, que se libera al espacio extracelular. Se compone de 15 aminoácidos, dos de ellos glicosilados⁵⁰. Tiene afinidad únicamente por las células ciliadas, las cuales presentan receptores específicos para esta toxina. Su actividad biológica se traduce en una inhibición de la síntesis de DNA⁵¹.

Esta toxina altera la primera barrera de defensa de los pulmones. Recientemente se ha sugerido que la TCT previene la reparación del mecanismo de clearance a través de la inhibición

de la regeneración de células epiteliales⁵². Algunos autores atribuyen a éste efecto sobre las células epiteliales, la continuación del síndrome pertussis después de la administración de antibióticos.

Aún no hay reportes en lo que se refiere a su capacidad inmunogénica.

1.4.a.VII. Toxina dermonecrótica o termolábil (DNT o HLT)

Pese a haber sido descrita a principios de siglo, es muy poco lo que se conoce de esta toxina en relación a su química, inmunología y rol en la patogénesis. Es letal para animales si es inyectada por vía endovenosa o intraperitoneal⁵³. En animales produce lesiones necróticas por inyección intradérmica debido a la contracción vascular en el músculo liso que conduce a una necrosis isquémica⁵⁴.

Su localización es preferentemente citoplasmática pero se supone que para ejercer su toxicidad *in vivo* debe expresarse en la superficie celular del microorganismo⁵⁵.

Es termolábil y se inactiva rápidamente a 56°C o por la presencia de formaldehído. Por esta razón DNT no está activa en la vacuna celular. El toxoide ha mostrado ser inmunogénico en conejos pero no en ratones.

1.4.a.VIII. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es el componente principal de la membrana externa de las bacterias Gram (-). La membrana externa está formada por proteínas estructurales mayores, proteínas estructurales menores y lipopolisacárido. El LPS es la única macromolécula cuya distribución en la célula se limita únicamente a la cara exterior de la membrana externa. El LPS de *B. pertussis* tiene características estructurales que lo distinguen del LPS de otras bacterias Gram(-)^{56,57}

Está constituido por estructuras químicas, biosintéticamente distintas: una parte lipídica anclada a la membrana externa y un núcleo oligosacárido. No posee lo que se conoce como antígeno O, que es una larga cadena polisacáridica característica del LPS de la mayoría de las Gram (-).

La parte lipídica, formada por el lípido A, está compuesta por una estructura de $\beta(1-6)$ -diglucosamina a la cual se unen, por grupos amida o éster, largas cadenas de ácidos grasos y grupos cargados como la fosfoetanolamina. La parte sacarídica está compuesta por dos cadenas diferentes de oligosacáridos: una tipo I de 12 monosacáridos y otra tipo II de 16 monosacáridos. Este núcleo sacarídico se encuentra unido al lípido A a través del ácido 2-deoxi-D-mano-octulosónico (KDO), considerado componente ubicuo del LPS.

En electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, el LPS de *B. pertussis* se resuelve en dos bandas: LPS_a y LPS_b. El LPS_a tiene menor movilidad electroforética que el LPS_b. La diferencia entre ambas formas se debe a que el LPS_a tiene en su núcleo sacarídico tres N-amino acetil azúcares adicionales respecto al LPS_b.

El LPS es pirogénico e histaminosensibilizante⁵⁸. El lípido A ha sido reconocido como la parte endotóxica principal del LPS. La toxicidad del LPS no resulta de efectos citotóxicos directos sobre la célula huésped sino de la interacción de dicho componente con receptores de

membrana de la célula blanco, lo cual resulta en la secreción de mediadores preinflamatorios que conducen a la toxicidad sistémica^{59,60}.

El LPS puede disociarse de la bacteria (o fragmento de membrana) e interactuar directamente con los receptores específicos en la célula blanco, o bien unirse a una proteína sérica (LPB) unidora de LPS, la cual lo transporta hasta transferirlo al CD14⁶¹. El CD14 es una proteína receptora de LPS que se encuentra en macrófagos y otras células sensibles al LPS. El resultado de la interacción del lípido A con CD14 induce la aparición de señales para la transcripción de mRNA codificante de citoquinas, interleukina 1. La producción excesiva de estas proteínas⁶² (y no el LPS por sí mismo) conducen al síndrome conocido como "shock inducido por endotoxinas"⁶³.

El lípido A tiene, además, actividad adyuvante y antiviral. La fracción oligosacáridica es mitogénica⁶⁴.

Se han descrito proteínas asociadas al LPS que tienen efectos inmunomoduladores en ratones endotoxina-resistente (C3H/HeJ). Estas proteínas han sido coextraídas con el lipopolisacárido y son tres polipéptidos de pesos moleculares: 68, 65 y 30 kDa. Este complejo puede estimular la diferenciación policlonal de linfocitos en ratones C3H/HeJ.

Finalmente, cabe destacar que los efectos secundarios adversos (desde reacciones neurológicas leves hasta severas) provocados por la vacuna celular de *B. pertussis*, han sido asociados con la presencia del LPS. La necesidad de disminuir el contenido de este componente de membrana externa en la formulación de vacunas ha sido uno de los objetivos de la investigación mundial en pertussis. Los intentos abarcan desde, la formulación de vacunas celulares con células a las que previamente se les ha extraído parte del LPS⁶⁵, hasta las múltiples formulaciones de vacunas acelulares libres de endotoxinas, reportadas en bibliografía. En ningún caso, sin embargo, se han alcanzado los niveles de protección logrados con la vacuna celular clásica. Se cree que estos resultados podrían estar en parte relacionados con la actividad adyuvante y mitogénica que tiene el LPS.

1.4.b. Influencia de los factores de virulencia en la fisiopatología.

La patogénesis de la tos convulsa involucra, en primer lugar, el estadio de adhesión del microorganismo. No se conoce de manera precisa cada paso de este estadio; no obstante, se reconoce su gran importancia en el desarrollo de la enfermedad. Se cree que las adhesinas mencionadas anteriormente actúan coordinadamente *in vivo*. Así, la ausencia de una puede ser reemplazada en parte por las demás. Se ha visto que aquellos microorganismos que por alguna razón no producen FHA, no son capaces de adherirse a las células del tracto respiratorio superior, razón por la cual no quedan adheridos a la mucosa traqueal, pero aparecen colonizando alvéolos pulmonares⁶⁶. A pesar de lo cual, al cabo de unos días es posible aislar *B. pertussis* del tracto respiratorio superior. No está del todo claro cuál es el mecanismo involucrado en esta recolonización de la tráquea. La citotoxina traqueal podría ser la responsable. Esta toxina daña las células ciliadas epiteliales, las cuales son entonces reemplazadas por células no ciliadas o membrana basal. Estas constituyen una nueva superficie de adhesión sobre las cuales pueden actuar otras adhesinas, distintas de FHA.

Este ejemplo resume de alguna manera, la complejidad de la interrelación entre los factores de virulencia y los mecanismos de supervivencia de *B. pertussis*. A la vez, advierte sobre la importancia de la definición precisa de los componentes de una vacuna, fundamentalmente si ésta es acelular, por la importancia relativa de los factores de virulencia a bloquear y la eventual aparición de fenómenos compensatorios.

Una vez adherido a la mucosa, el crecimiento del organismo es indudablemente favorecido por la producción de las toxinas mencionadas, que interfieren con los mecanismos de clearance del epitelio respiratorio, dañan células que entonces proveen nutrientes, y suprimen la inmunorespuesta del huésped.

La interferencia en los mecanismos de clearance y la captura de nutrientes está relacionada con el daño local que se produce en las cilias y en las células ciliadas. DNT y TCT contribuyen a la enfermedad por inducción de parálisis ciliar, necrosis localizada y daño tisular⁶⁷. Se ha estudiado dicho daño en traquea de hámster. En este modelo animal se ha visto que a las 24 hs. del establecimiento de *B. pertussis* las cilias pierden su movilidad, luego se mueren las células y el tejido comienza a necrosarse⁶⁸.

La citotoxina traqueal es específicamente tóxica para las células ciliadas. Aparentemente induce la producción de monóxido de nitrógeno que lleva a una serie de cambios patológicos incluyendo la muerte y estrusión de estas células de la mucosa⁶⁹. No está claro si es ésta la toxina responsable de la ciliostasis.

La supresión de las defensas del huésped comienza con la interrupción del clearance mucociliar, considerado la primera línea de protección del hospedador frente a cuerpos extraños. Además de este daño local, se ha observado que *B. pertussis* produce factores que alteran mecanismos endógenos de defensa. Así, los niños con pertussis han mostrado un deterioro reversible en la respuesta de hipersensibilidad retardada contra toda una batería de antígenos⁷⁰.

Varios componentes de *B. pertussis* exhiben actividades biológicas *in vitro*, que podrían explicar las alteraciones observadas en el sistema inmune de un hospedador de pertussis. AC, por ejemplo, inhibe la quimiotaxis, la fagocitosis, la generación de superóxido y la actividad antimicrobiana de los leucocitos polimorfonucleares⁷¹. Inhibe, además, la actividad oxidativa de los macrófagos alveolares y los monocitos. PT, por su parte, inhibe la migración de monocitos, la actividad oxidativa y la liberación de enzimas lisosomales de varios tipos de células fagocíticas⁷². Impide, también, los efectos citolíticos de los linfocitos asesinos. Se cree que la actividad biológica de estas dos toxinas (AC y PT) podría estar involucrada en la supervivencia de *B. pertussis* dentro de los macrófagos en la etapa inicial.

Por último, se ha sugerido que la endotoxina (LPS) podría estar implicada en la supresión de la respuesta inmune, pero no hay pruebas acabadas de ello.

En lo que se refiere a la parte sistémica de la enfermedad, los hallazgos a este nivel están relacionados directamente con las actividades biológicas de PT. En este sentido, se ha observado una leucocitosis con predominancia de linfocitos, defectos en la respuesta glicémica y encefalopatías por la presencia de tapones linfocíticos vasculares en el cerebro⁷³.

1.4.c. Variación antigénica de *B. pertussis*

B. pertussis tiene una notable capacidad para alternar entre la forma virulenta y avirulenta a través de cambios fenotípicos (modulación antigénica) o genotípicos (variación de fase)⁷⁴. Modulación antigénica es el término aplicado al cambio fenotípico reversible, descrito por primera vez por Lacey⁷⁵ en 1960, por el cual una población de células puede alterar la expresión de los determinantes de virulencia de una forma coordinada en respuestas a cambios ambientales. La presencia de moduladores como el SO₄Mg, el ác. nicotínico en altas concentraciones o las bajas temperaturas, producen la pérdida reversible de todos los factores de virulencia⁷⁶ (menos TCT porque es un producto de la síntesis del peptidoglicano) y, paralelamente, induce la expresión de otros antígenos, característicos de fase avirulenta. A estos cambios fenotípicos reversibles se los conoce como modulación antigénica.

La variación de fase, en cambio, es una modificación genotípica de la expresión de los factores de virulencia. La aparición de un microorganismo genotípicamente avirulento en una población tiene una frecuencia de 10⁻³ a 10⁻⁶. Aunque algunas veces esta variación ha mostrado ser reversible, la frecuencia reversión es muy baja⁷⁷.

La expresión de los AGGs 2 y 3 tiene dos mecanismos de regulación: la regulación general de los factores de virulencia y una regulación propia que da origen a lo que se denomina variación serotípica⁷⁸. La frecuencia de esta variación es de 10⁻³ a 10⁻⁴.

El concepto de un locus regulatorio central (denominado *vir* o *bvg*: *Bordetella virulence gene*) que regula coordinadamente los genes asociados a la virulencia de *B. pertussis* en respuesta a efectores ambientales, se describió por primera vez en 1984⁷⁹. Ciertas señales externas (mencionadas anteriormente) tienen un papel fundamental en esta regulación. En respuesta a dichos moduladores externos dos grupos de genes son afectados por el producto del gen *bvg*⁸⁰: los "vir-activated genes" (*vag*) cuya expresión es máxima en ausencia de moduladores (tal es el caso de los genes que codifican para los factores de virulencia), y los "vir-repressed genes", (*vrg*), cuya expresión es derreprimida en presencia de moduladores.

Se ha podido comprobar que, si por alguna razón el locus *bvg* no es activo, se expresan los genes *vrg*, y no aparece ningún transcripto de los genes *vag*. Es decir que ese microorganismo será fenotípicamente *vir*(-)⁸¹.

El locus *bvg* tiene dos marcos de lectura denominados *bvgA* y *bvgS*. Estos dos genes constituyen un operón y codifican para las proteínas: BvgA de 23 kDa y BvgS de 135 kDa. La secuencia de aminoácidos de estas dos proteínas presenta una gran homología con la familia de proteínas regulatorias, transmisoras de señales externas, que tienen secuencias altamente conservadas y forman un sistema de dos componentes sensor/regulador⁸². Estos sistemas consisten, generalmente, en una proteína sensora que se localiza en la membrana y tiene actividad quinasa, y una proteína citoplasmática que en su forma fosforilada es capaz de unirse al DNA y activar la expresión de genes. La región C-terminal de las proteínas sensoras es una zona conservada que interacciona con la proteína reguladora y la región N-terminal es una zona variable que interacciona con los moduladores externos. En las proteínas reguladoras, en cambio, la zona conservada es la N-terminal que interacciona con la proteína sensora, mientras que la zona C-terminal, que interacciona con el DNA, es muy variable. En *B. pertussis*, BvgS actúa como proteína sensora y está localizada en la membrana, con la región N-terminal en el espacio

periplásmico. Este dominio receptor sensa las señales externas y transmite la información a la proteína reguladora, BvgA, a través de una fosforilación-defosforilación, que permite a BvgA regular el loci específico (figura 1.1 A). Si en el medio externo hay moduladores tales como SO_4^- o ác. nicotínico (ambos en altas concentraciones), o bien la temperatura es inferior a los 35°C , entonces el dímero de BvgS se disocia y no es capaz de autofosforilarse ni de fosforilar la proteína BvgA, con lo cual los factores de virulencia no se expresan, y en cambio se transcriben los *vrg*. Se desconoce el mecanismo molecular por el cual actúan los distintos moduladores. Se ha sugerido que la carga negativa podría tener importancia ya que interaccionaría con el N-terminal de BvgS⁷⁶. También se ha sugerido que, en el caso del SO_4^- , la similitud con el fosfato podría ser la responsable de su efecto modulador. Si no están presentes los moduladores la proteína BvgS se dimeriza, fosforila a BvgA y ésta se une a los promotores de los genes de virulencia posibilitando su transcripción. Se ha comprobado que la activación de los genes de virulencia, que se produce en respuesta a la desaparición del modulador del medio externo, ocurre en dos etapas separadas en el tiempo⁸³. En la primera etapa, la proteína BvgA induce, por un lado, la transcripción del gen *bvg* (o sea que induce su propia síntesis) aumentando su propia concentración unas 50 veces. Paralelamente, se une al promotor de FHA e induce la síntesis de este antígeno, como así también induce la transcripción de las proteínas fimbriales y de una proteína denominada "act" (figura 1.1B). Todas las proteínas cuya síntesis se induce en esta primera etapa aparecen a los 10 min. de la desaparición del modulador negativo. La segunda etapa involucra la transcripción de los genes de PT y AC. Se ha podido comprobar que es la proteína "act" fosforilada la que se une a los promotores de estas toxinas y e induce su síntesis. Tanto PT como AC aparecen 2 horas después de la desaparición del modulador negativo. Indudablemente, la producción de factores de colonización antes que los factores involucrados en la evasión de las defensas del huésped y la intoxicación, sugiere que la activación diferencial de adhesinas y toxinas puede ser el resultado de una selección natural en la evolución de este microorganismo, ya que le brinda cierta ventaja competitiva.

Recientemente se ha reportado⁸⁴ que, en ausencia de moduladores, aparecería una tercera proteína, también codificada en el locus *bvg*, denominada BvgR, cuya función sería reprimir la síntesis de los genes *vrg*.

La modulación antigénica está directamente relacionada con la presencia de los mencionados moduladores en el medio extracelular, que se traduce en una acción directa sobre el nivel de expresión de los factores de virulencia. Es un proceso reversible y dinámico.

El mecanismo de la variación de fase no se conoce detalladamente. Aparentemente, se produciría por la presencia de secuencias de bases repetitivas en el genoma de *B. pertussis*. Esta repetición de bases causa duplicaciones o deleciones durante la duplicación del DNA. Un mecanismo similar se ha reportado en la variación de fase de otros patógenos⁸⁰. Stibitz y Yang⁸⁵ han detectado un cambio genotípico reversible en *B. pertussis* causado por la inserción o deleción de un residuo de citocina en una zona rica en estos residuos (formada por seis citocinas consecutivas) del gen *bvgS*. Por otra parte, se han descripto⁸⁶ variantes de fase estables, que tienen pequeñas deleciones o adiciones en otra zona del gen *bvgS*. También hay evidencia de cambios genotípicos en la variación serotípica⁸⁷. En este sentido se ha sugerido que, la regulación de la expresión de los AGGs 2 y 3 independiente de la regulación general de los factores de virulencia de *B. pertussis*, se produce a través de un mecanismo de inserción/deleción en una

zona rica en citocina localizada a 70 pb del comienzo transcripcional de los genes *fim*. Se encontró que el número de citocinas de esta zona, aunque se encuentra afuera de los genes que codifican para la producción de fimbrias, parece tener influencia en la habilidad del aparato transcripcional de los genes *fim*.

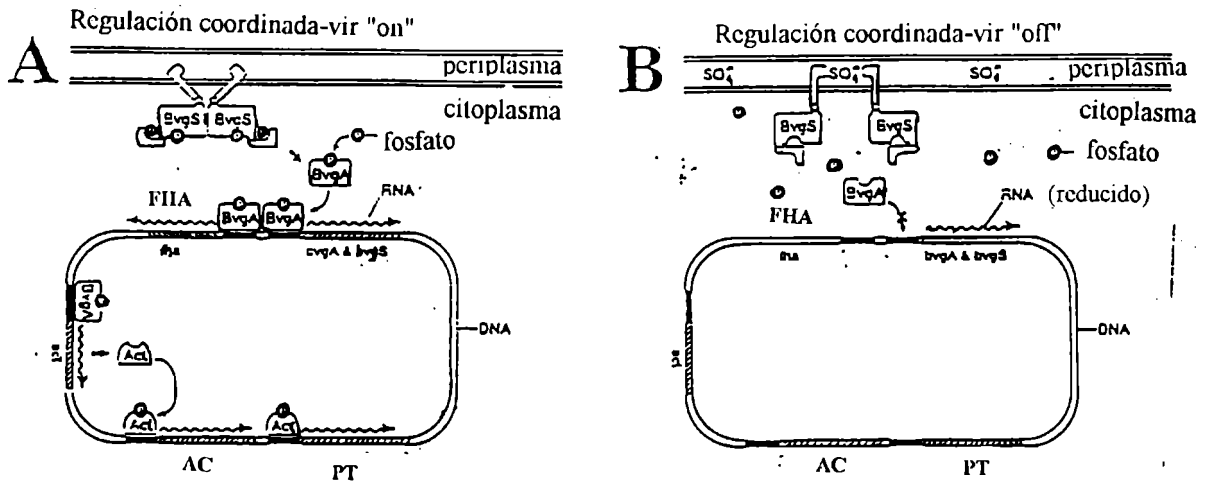


Figura 1.1 (A): Modelo de activación del sistema Bvg. Inducción de la expresión de los factores de virulencia. (B): Modelo de inactivación del sistema Bvg. Inhibición de la expresión de los factores de virulencia por la presencia de moduladores.

1.5. Modulación antigénica y variación de fase *in vivo*

No se conoce el rol del sistema sensor/regulatorio BvgAS *in vivo*. Sin embargo, es muy poco probable que un mecanismo así exista si no fuera importante para la adaptación del microorganismo a los cambios del entorno a través de la alteración de sus principales antígenos.

Se ha podido comprobar que tanto la variación de fase como la modulación antigénica tienen lugar *in vivo*. Se ha aislado *B. pertussis* en fase avirulenta de pacientes con tos convulsa en estadios tardíos de la enfermedad⁸⁸. No se sabe si las mutaciones reversibles en la zona rica en citocina del gen de BvgS representa un cambio genotípico programado para la adaptación de la bacteria, que se ha mantenido a través del proceso evolutivo.

La fase avirulenta podría representar un estado de patogenicidad latente asociado con los últimos estadios de la enfermedad, cuando el hospedador ya ha desarrollado su respuesta inmune, y podría ser una estrategia de inmunoevasión y persistencia dentro del huésped.

Los productos de los genes *vrg*, característicos de la fase avirulenta, son poco inmunogénicos. Se ha sugerido que el producto de estos genes le daría a la bacteria una superficie

relativamente poco antigénica lo que constituye una ventaja para la persistencia del microorganismo dentro del hospedador. Se han aislado *B. pertussis* en fase avirulenta en casos de tos convulsa subclínica⁸⁹.

Por otra parte, de las cinco proteínas descritas como productos de los genes *vrg*⁸⁴ se ha demostrado que, al menos la expresión de una de estas proteínas, la Vrg-6, es fundamental en el proceso de colonización e infección del huésped, ya que mutantes incapaces de producir esta proteína no provocan la enfermedad⁹⁰. Vrg-6 es una proteína de 105 aminoácidos con una secuencia Arg-Gly-Hys repetida cinco veces en el extremo C-terminal. Las características hidrofílicas de estas secuencias repetitivas hacen predecir que estará expuesta en la superficie celular. Se ha especulado que esta secuencia tiene una función similar a la del RGD de FHA y pertactina, y podría ser capaz de facilitar la unión de la bacteria a las integrinas y a las células del huésped. Vrg-6 tiene una zona central muy hidrofóbica que seguramente no está expuesta. La capacidad inmunogénica de esta proteína es baja.

El cambio de fase durante el desarrollo de la enfermedad es, actualmente, motivo de estudio. Por un lado se ha propuesto que, a lo largo de todo el ciclo infeccioso, este microorganismo pasa por estadios avirulentos. Tal podría ser el caso de la etapa inicial de la enfermedad teniendo en cuenta que la vía de contagio es aérea y la temperatura a la que están expuestas las bacterias, en el momento de entrada al organismo huésped, es menor que 35°C. En esta etapa el número de microorganismos es bajo y la expresión de antígenos altamente inmunoreactivos podría conducir al clearance prematuro por la inmunorespuesta del huésped. Así, en esta etapa los productos del *vrg* podrían funcionar como adhesinas alternativas cuando los otros factores tales como pertactina, FHA, etc. se subproducen. En la etapa tardía de la enfermedad⁸⁹, también podría haber modulación antigénica. La inmunorespuesta del huésped en esta fase de la enfermedad es máxima, y existe una presión selectiva favoreciendo la variante de fase que no exprese los factores de virulencia.

La otra posibilidad es que existan nichos específicos donde estén presentes las señales moduladoras y se expresen los genes *vrg*. Un nicho de estas características podría ser el citoplasma de las células del hospedador. Como ya se mencionó, *B. pertussis* es capaz de sobrevivir dentro de las células eucariotas, y las condiciones de entorno intracelular parecen ser moduladoras. Las proteínas Vrg podrían estar implicadas en la supervivencia de las bacterias en estas condiciones de entorno, posibilitando así la permanencia del microorganismo en el huésped.

De cualquier manera, la existencia de un sistema regulatorio que responde a señales ambientales y controla la expresión de los genes asociados a la virulencia, unido al hallazgo de la función crítica de Vrg-6 en la patogenicidad, hacen suponer que *B. pertussis* es capaz de regular de un modo preciso la producción de sus factores de virulencia y la expresión de las proteínas codificadas en los genes *vrg* durante el proceso infeccioso.

1.6. Control de la enfermedad

La estrategia de *B. pertussis* para colonizar al huésped, sobrevivir dentro del hospedador en un estado de virulencia latente y transmitirse de un huésped a otro, plantea un desafío muy grande en lo que se refiere al desarrollo de una vacuna efectiva.

Ante el modelo de infección descrito anteriormente, no resulta sorprendente que las sucesivas vacunas acelulares ensayadas hasta el momento, generalmente formuladas a partir de factores de virulencia purificados e inactivados, no hayan brindado una protección adecuada contra el desarrollo de la enfermedad⁹³. Existen al menos dos razones que justifican la falta de eficiencia observada en la vacuna acelular formulada a partir de antígenos purificados. En primer lugar, la capacidad de *B. pertussis* de cambiar de fase y de esta manera eludir las defensas que una vacuna de este tipo podría generar en el organismo huésped y, en segundo lugar, el tipo de respuesta inmune que es capaz de inducir la vacuna acelular. En lo que respecta a la inmunidad humoral, se ha reportado que las vacunas acelulares formuladas a partir de antígenos purificados sólo serían capaces de inducir IgG. De esta forma, el vacunado no estaría protegido contra la colonización pues para esto es necesario que se induzca producción de IgA a nivel del tracto respiratorio. Por otro lado, la inmunidad celular ha ido cobrando importancia en los últimos años ante el descubrimiento de que *B. pertussis* es capaz de vivir dentro de células de mamífero⁹⁴, en especial dentro de macrófagos. Así, mientras los anticuerpos juegan el rol de prevenir la colonización y combatir los síntomas tóxicos de la enfermedad, la eliminación definitiva de la bacteria requiere de la respuesta celular mediada por células Th1^{95,96}. Las células Th1 no sólo estimulan en los macrófagos las funciones de fagocitosis y destrucción intracelular de *B. pertussis*, sino que además tienen actividad citotóxica contra los macrófagos infectados. Esto contribuye a la eliminación de reservorios intracelulares de bacterias. Las vacunas acelulares ensayadas no generan este tipo de respuesta inmune. Aparentemente inducirían la producción de células Th2, que no otorgan buena protección al vacunado. La vacuna celular en cambio, al igual que la infección con *B. pertussis*, induce la proliferación de células Th1, lo cual constituye un argumento a favor de este tipo de vacuna que no se puede ignorar.

De todas formas, la respuesta inducida en individuos vacunados con vacuna celular no es suficiente para evitar la existencia de portadores asintomáticos. Se cree que esta es la razón de la aparición cíclica de episodios de pertussis cada 4 ó 5 años. Aparentemente la acumulación de huéspedes susceptibles (infantes) en contacto con portadores sanos (adultos) llevaría a esta aparición cíclica de tos convulsa. Incluso se han reportado casos en que los individuos vacunados padecen una forma de tos convulsa atenuada en lo que se refiere a la fase tóxica de la enfermedad. Se ha relacionado esta colonización en los vacunados, y la existencia de portadores asintomáticos con la mencionada reversión de fase *in vivo*, y la ineficacia de la vacuna celular clásica para generar una respuesta inmune capaz de reconocer los microorganismos en fase avirulenta de los periodos tempranos y tardíos de la enfermedad.

Esta hipótesis cobra mayor significación si se tiene en cuenta que la vacuna celular se formula a partir de células en fase virulenta. De esta forma, la respuesta inmune inducida en vacunados reconoce sólo una estructura antigénica propia de fase virulenta. A la luz de los recientes hallazgos en lo que se refiere a la estrategia de infección de *B. pertussis*, la condición de virulencia para las células destinadas a la formulación de vacuna pertussis es, por lo menos, insuficiente para determinar la erradicación definitiva de la enfermedad.

Evidentemente, la formulación de una vacuna más efectiva y menos reactogénica es compleja, y exige tener presente no sólo las reacciones adversas producidas por la vacuna celular (como consecuencia de su contenido de endotoxina), sino también la modulación fenotípica que es capaz de llevar a cabo el microorganismo durante el ciclo de la enfermedad. De manera que es

posible que sea necesario que la respuesta inmune generada por la vacuna esté también dirigida contra los organismos avirulentos.

Una vacuna acclular formulada a partir de factores de virulencia y proteínas inmunogénicas de membrana externa, presentes en el microorganismo infectante, podría ser una alternativa interesante. Este modelo de vacuna se está estudiando para el caso de otros organismos como *Vibrio cholerae* y *Neisseria meningitidis*.

1.7. Cultivo *in vitro* de *B. pertussis*: Características e Influencia sobre la producción de antígenos

B. pertussis es un microorganismo de crecimiento lento, y muy fastidioso para su cultivo. Bordet y Gengou lo aislaron por primera vez en 1906 en un medio agar-papa glicerado conteniendo el 15% de sangre⁹⁷. Desde entonces se han realizado muchos intentos para reemplazarlo, pero el medio de Bordet-Gengou (ABGs) sigue siendo el más efectivo para el aislamiento de esta bacteria. La mayor modificación que se le ha introducido en los últimos 70 años es la incorporación de penicilina para reducir el número de organismos Gram positivos contaminantes de las muestras.

La mayor dificultad que presenta el cultivo de *B. pertussis* es su sensibilidad a ciertas sustancias tóxicas, no identificadas totalmente, que se acumulan durante el crecimiento en batch. Imaizumi y col.⁹⁸ reportaron que podría tratarse de ácidos grasos producidos por el mismo microorganismo durante el desarrollo celular. Para evitar esta inhibición se han agregado al medio de cultivo sangre, albúmina, carbón activado e, incluso, almidón. Así se han desarrollado varios medios complejos para el subcultivo de *B. pertussis*. Tal es el caso del desarrollado por Cohen y Wheeler⁹⁹, que no contiene sangre pero sí almidón, hidrolizado de caseína, sales y extracto de levadura, o el medio desarrollado por Rowatt¹⁰⁰ con carbón activado.

La reversión de fase de *B. pertussis* ha representado un grave inconveniente para la producción de vacunas. Mas aún porque uno de los factores que inducen la reversión a fase avirulenta son los sucesivos repiques en medios artificiales. Esto se debe a que los microorganismos en fase avirulenta (fase IV) desarrollan, además de las diferencias de cubierta celular, una velocidad específica de crecimiento mayor que los organismos en fase virulenta (fase I) en estos medios, lo cual constituye una ventaja selectiva. Los microorganismos en fase IV no tienen capacidad protectora según el test de desafío intracerebral en ratones. En este punto hay que aclarar que este test de potencia está siendo revisado, fundamentalmente por dos razones: porque la vía de entrada intracerebral está muy lejos de ser la vía de entrada normal de este microorganismo al huésped (se está estudiando la posibilidad de reemplazarlo por el desafío intranasal¹⁰¹) y, por otro lado, porque la cepa con la que se desafía es una cepa virulenta (18323) y ya no es seguro que la respuesta inmune, que reconoce solamente cepas virulentas, asegure una protección total contra la enfermedad.

En 1971 Stainer y Scholte desarrollaron un medio de cultivo líquido químicamente definido (medio SS)¹⁰², en base al escaso conocimiento que había (y sigue habiendo), en lo que respecta al metabolismo y requerimientos nutricionales de este microorganismo. *B. pertussis* no es capaz de asimilar hidratos de carbono y su metabolismo está basado en la oxidación de aminoácidos que

son su principal fuente de carbono y energía. El glutamato, en particular, aparece como el aminoácido de preferencia¹⁰³. El medio SS está formulado de manera tal que el glutamato es la fuente de carbono y energía, y el sustrato limitante del crecimiento. Este medio también contiene prolina, aunque en muy baja concentración, y no está claro el propósito de su incorporación. Como factores de crecimiento están el glutatión reducido y el ácido ascórbico, que se cree que junto con el SO_4Fe podrían actuar como cofactores de oxigenasas involucradas en el metabolismo de aminoácidos¹⁰⁴. La fuente de azufre es la cistina y es, aparentemente, la única fuente de este elemento que es capaz de metabolizar *B. pertussis*¹⁰⁵.

El medio SS ha sido recomendado para la producción de vacuna pertussis porque posibilita varios subcultivos de *B. pertussis* sin que se verifique reversión a fase avirulenta. La razón de esto último se ha descubierto recientemente y parece ser atribuible a la alta concentración de ClNa ⁷⁶ que actúa como modulador positivo de la fase virulenta.

Si bien los requerimientos nutricionales parecen ser simples, la mayor complicación que se presenta con el cultivo en medio de SS, al igual que los anteriores, es la inhibición del crecimiento presumiblemente por acumulación de sustancias tóxicas durante el desarrollo celular⁹⁸. Así, se ha visto que en sistema de cultivo batch el crecimiento se detiene por la acumulación de inhibidores y no por agotamiento de nutrientes.

En 1983 un grupo de investigación de Japón logró un interesante avance con el agregado de β -metil-ciclodextrina al medio de cultivo^{106,107}. Ellos reportaron que el agregado de esta sustancia evita la inhibición del desarrollo celular e incrementa los rendimientos antigénicos. Si bien este agente ha sido ampliamente difundido, su mecanismo de acción no se ha podido determinar. Se ha postulado que, por tratarse de una molécula cíclica cuyo interior es hidrofóbico, podría capturar los ácidos grasos presentes en el medio de cultivo, evitando así su efecto inhibitorio. Por otro lado, se han publicado reportes donde se muestra que la presencia de este componente en el medio de cultivo favorecería la excreción de antígenos periplásmicos como PT, FHA y AC^{107,108,109}, lo cual sugiere cierta interacción con la membrana externa. A pesar del incremento en los rendimientos celulares y antigénicos, el alto costo de este producto hace que no sea posible su utilización a gran escala. Muchos esfuerzos se han realizado en función de determinar cuál es su mecanismo de acción con el fin de reemplazarlo por un producto más económico, pero hasta el momento no ha sido posible, por lo que actualmente su uso está restringido a ensayos de laboratorio.

A pesar de la importancia de las condiciones de cultivo sobre la expresión fenotípica de las bacterias en general, en virtud de su excepcional adaptabilidad, es muy poco lo que se conoce acerca de la influencia de los efectores ambientales sobre la producción antigénica y la respuesta metabólica de *B. pertussis*. Los datos bibliográficos existentes a este respecto se resumen a continuación.

En lo que se refiere a la composición del medio de cultivo se ha reportado que:

-Tanto el SO_4 en concentración por encima de los 40 mM, como el ácido nicotínico en concentración 10 mM, inducen la modulación a fase avirulenta. Así, en estas condiciones de cultivo no hay producción de ninguno de los antígenos regulados por el gen vir: AC, PT, FHA, fimbrias, P69 y HLT. El perfil proteico de membrana externa cambia, desaparecen los marcadores de la fase virulenta y aparecen las proteínas típicas de la fase IV.

-La presencia de Cl⁻ en altas concentraciones, en cambio, inhibe la modulación y favorece la producción de los antígenos característicos de la fase virulenta⁷⁶.

-La presencia de prolina en el medio de cultivo se ha asociado con el desarrollo de células de mayor título protector, evaluadas a través del test de potencia en animales recomendado por OMS¹¹⁰, pero no se ha reportado nada en relación a cada antígeno en particular.

-Según Sato y col.¹¹¹, la reducción de la concentración de buffer Tris de 6.52 g/l (en el medio SS original) a 1.52 g/l redundó en un aumento significativo en los niveles de PT y FHA extracelular.

-La incorporación de ciclodextrina al medio de cultivo induce el aumento de los niveles extracelulares de PT, FHA y AC^{107,108,109,112}. No está claro si este aumento en los niveles extracelulares de antígenos se debe a una inducción de la síntesis de los mismos, o simplemente a mayor liberación por cambios en las características de permeabilidad de la membrana externa. Esta última posibilidad parece la más probable.

-La presencia de algunos polivinilalcoholes ejerce un efecto similar al de la ciclodextrina¹¹³.

En lo que se refiere a los factores físicos y operacionales cabe decir que:

-La temperatura es un modulador de fase importante. Así, una temperatura por debajo de 35°C induce la modulación a fase avirulenta, con las características antigénicas y de membrana externa propias de esta fase⁷⁶

-El pH óptimo para la producción celular y antigénica está comprendido entre 7 y 8¹¹⁴

-En cultivos agitados la actividad hemaglutinante del sobrenadante cae rápidamente. Esta caída ha sido atribuida a algún efecto de la agitación y/o aireación sobre FHA^{115,116}. Sin llegar a determinarse exactamente la causa se ha recomendado el empleo de cultivos estáticos para la producción de FHA extracelular¹¹⁷

-En lo que se refiere al nivel de oxígeno disuelto en el cultivo, existen reportes donde se menciona la conveniencia de mantener el oxígeno disuelto en valores que oscilen entre el 20 y el 30% de saturación¹¹⁸, pero no se dan razones que respalden tal recomendación

No se ha reportado nada acerca del efecto que podrían tener las condiciones de cultivo sobre los niveles de endotoxina (LPS), a pesar de que es un componente de suma importancia en razón de su toxicidad.

OBJETIVOS del Trabajo de Tesis

A pesar de lo poco que se conoce acerca de la influencia de las condiciones de cultivo en las características fenotípicas de *B. pertussis*, éste es un aspecto fundamental para el diseño de la estrategia de producción de vacunas tanto celulares como acelulares.

Las bacterias, como los demás organismos, están en continua interacción con el medio. En un proceso infeccioso hay dos organismos que interaccionan, siendo uno el entorno del otro. En las bacterias, la membrana externa es la estructura crucial que media cualquier interacción. La situación *in vivo* es adversa en lo que se refiere al crecimiento microbiano ya sea por la escasez de nutrientes o por otros mecanismos de defensas desplegados por el organismo huésped. La falta de nutrientes redundará en cambios drásticos en la bioquímica general del microorganismo y, fundamentalmente, en las características de la cubierta celular. Esta situación lleva a la disminución de la velocidad específica de crecimiento del microorganismo y otros cambios generalmente asociados a la excreción de factores de virulencia y demás mecanismos de supervivencia del microorganismo frente a un entorno hostil.

En este contexto, el estudio de la respuesta fisiológica del microorganismo frente a la deficiencia de distintos nutrientes en condiciones de velocidad específica de crecimiento submáxima, resulta de suma utilidad cuando se trata de simular la respuesta adaptativa *in vivo*. La importancia de este tipo de estudio para la producción de vacunas es clara: si los microorganismos tienen tal plasticidad fenotípica, las células que se utilicen para la formulación de vacunas deberán presentar las mayores similitudes posibles con aquellas que infectarán al huésped en cuestión. Por otra parte, cabe esperar una producción máxima de antígenos y factores de virulencia en aquellas bacterias crecidas en condiciones similares a las condiciones *in vivo*.

En la Argentina los escasos intentos de producción de vacuna pertussis se han realizado a partir del crecimiento de *Bordetella pertussis* en medio sólido. Esta metodología, además de inadecuada para llevar adelante una producción a gran escala, resulta muy poco recomendable desde el punto de vista del control del proceso en su conjunto. El cultivo en medio sólido tiene como principales desventajas frente a los medios líquidos: un menor rendimiento por litro de medio de cultivo; necesidad de mayor mano de obra, por lo tanto mayores costos; y menores (o ninguna) posibilidades de control.

Cuando se requiere una producción masiva de células de *B. pertussis* en algún estado fisiológico en particular, resulta fundamental el conocimiento de la influencia de las condiciones de cultivo sobre la fisiología microbiana y un estricto control de las mismas. Tanto para estudiar la respuesta de *B. pertussis* frente a efectores ambientales como para la producción antigénica a gran escala, es indispensable que el cultivo se lleve a cabo en medios líquidos, los cuales posibilitan el empleo de biorreactores y sistemas de cultivo adecuados para tal fin.

El medio SS es el medio líquido recomendado para el cultivo de este microorganismo en fase virulenta. Este es un medio químicamente definido que ha sido formulado en 1970 y ha sido utilizado desde entonces sin modificaciones en su formulación. A pesar de haber sido recomendado para el cultivo de *Bordetella pertussis* tendiente a la producción de vacunas, no hay datos acerca de estudios cinéticos ni estequiométricos que caractericen el crecimiento de este microorganismo en dicho medio de cultivo y permitan el modelado del mismo. Sin embargo, un

estudio de este tipo es fundamental para el desarrollo racional de cualquier estrategia de producción y/o optimización.

Tampoco ha sido estudiada la causa de la pérdida de actividad hemaglutinante en sobrenadante de cultivos sometidos a agitación. Ni si dicha pérdida está relacionada con alguna alteración de las hemaglutininas presentes en el medio de cultivo, PT y FHA, que pueda significar la pérdida de la capacidad inmunogénica de los dos antígenos más importantes *B. pertussis*. La importancia del adecuado mezclado del cultivo para el control de las variables fisicoquímicas y para la transferencia de materia y calor dentro del biorreactor, hace indispensable el esclarecimiento del efecto de la agitación sobre estas hemaglutininas.

En este contexto el presente trabajo de Tesis tiene por objeto:

1- Caracterizar, desde el punto de vista cinético y estequiométrico, el crecimiento y la producción de antígenos de *B. pertussis* en medio líquido.

2- Determinar las razones que conducen a la pérdida de actividad hemaglutinante en sobrenadantes de cultivos sometidos a agitación. Establecer si dicha pérdida de actividad está relacionada con hemaglutinina filamentosa, toxina pertussis o ambas, y si los antígenos celulares se ven afectados de alguna manera por las características fluidodinámicas del cultivo.

3- Estudiar cómo influye la velocidad específica de crecimiento sobre la estructura de la membrana externa, la producción de células y antígenos, y los niveles endotóxicos

4- Evaluar la respuesta fisiológica de *B. pertussis* frente a cambios en el nivel de oxígeno del entorno y en la disponibilidad de determinados nutrientes que podrían ser sustratos limitantes del crecimiento *in vivo*. Comparar estos últimos resultados con los obtenidos en medio SS, en el cual la limitación del crecimiento es de tipo energética.

A partir de estos estudios, se pretende estar en condiciones de determinar si el manejo del medio de cultivo y condiciones de operación puede constituir una estrategia válida para mejorar la calidad y cantidad de antígenos obtenidos a partir del cultivo de *B. pertussis*. Paralelamente, se espera que los resultados obtenidos contribuyan al esclarecimiento de algunos aspectos de la fisiología de este microorganismo.

Capítulo 2

Materiales y Métodos

Capítulo 2: *Materiales y métodos*

2.1. Cepas bacterianas utilizadas	25
2.2. Medios de cultivo empleados	25
2.3. Cultivo de microorganismos	26
2.3.a. Preparación de inóculos	26
2.3.b. Cultivo batch en frascos agitados	26
2.3.c. Cultivo batch en tanques agitados	27
2.3.d. Cultivo continuo en tanques agitados	27
2.4. Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono durante el cultivo	28
2.5. Ensayo respirométrico	29
2.6. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($K_L a$)	30
2.6.a. Método del sulfito (en ausencia de microorganismos)	30
2.6.b. Medida directa en línea	30
2.7. Determinación de la viscosidad del cultivo	30
2.8. Determinación de adhesinas celulares	30
2.9. Determinación de la capacidad protectora de células	31
2.10. Determinación de la actividad hemaglutinante en sobrenadante de medio de cultivo	31
2.11. Determinación de la actividad hemaglutinante de células	31
2.12. Determinación de la actividad hemolítica	32
2.13. Determinación de toxina pertussis extracelular	32
2.14. Determinación de proteínas	32
2.15. Preparación de muestras de proteína total de células para electroforesis	32
2.16. Obtención de polipéptidos de membrana externa	33
2.17. Obtención de lipopolisacárido de células	33
2.18. Electroforesis de proteínas y lipopolisacáridos	34
2.18.a. Tinción de polipéptidos y LPS	34
2.19. Inmunodetección (Western blot) de FHA celular y extracelular, y P.69	34
2.20. Determinación del ácido 2-ceto-3-deoxi-octulosónico en LPS proveniente de células y sobrenadante de cultivo	34
2.21. Determinación de glutamato en el medio de cultivo	35
2.22. Determinación de amonio en el medio de cultivo	35
2.23. Determinación de fósforo en el medio de cultivo	35
2.24. Determinación de hierro en el medio de cultivo	36
2.25. Determinación de cisteína y prolina en el medio de cultivo	36
2.26. Determinación de NAD^+ y de NADH intracelular	36
2.27. Determinación de sideróforos en sobrenadante de medio de cultivo	36
2.28. Análisis estadístico	37

2.1. Cepas bacterianas utilizadas

B. pertussis Tohama (Pasteur Institute Collection N°8132) fase I, virulenta, y *B. pertussis* 18323 virulenta (Cepa de desafío). Los stocks bacterianos se conservan liofilizados y a -70°C como una densa suspensión en el medio SS conteniendo 15% de glicérol.

2.2. Medios de cultivo empleados

Se utiliza el medio base de Stainer-Scholte, cuya composición se detalla a continuación:

A-Lista de componentes que se esterilizan por calor

Componente	Concentración
Glutamato monosódico	10.70 g/l
L- Prolina	0.24 g/l
KH ₂ PO ₄	0.50 g/l
KCl	0.20 g/l
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.10 g/l
CaCl ₂ (solución al 1%)	2.00 ml
Tris-HCl	1.52 g/l
NaCl	2.50 g/l

Se lleva a pH 7.2 con una solución concentrada de HCl y se esteriliza 15 min. en autoclave. A este medio se le adicionan los siguientes componentes esterilizados por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

B-Lista de componentes que se esterilizan por filtración

Componente	Concentración
SO ₄ Fe.7H ₂ O	10 mg/l
L-Cistina	40 mg/l
HCl	0.1 ml/l
ác. ascórbico	20 mg/l
ác. nicotínico	4 mg/l
glutación reducido	100 mg/l

También se utiliza el medio SS, con el agregado de componentes y con modificaciones en la concentración de algunos constituyentes, según se detalla a continuación:

-Agregado de antiespumante siliconado (1520 Dow Corning, Siliar), en concentraciones en el rango de 0.0 a 1.0 g/l.

-Agregado de extracto de levadura (DIFCO Laboratories, USA) en concentraciones: 0.5; 0.75; 1.00; y 1.25 g/l.

-Variación en las concentraciones de nutrientes. La modificación alcanza a un nutriente por vez mientras las concentraciones de los demás se mantienen invariables respecto a la formulación del medio SS. Las concentraciones modificadas son:

SO ₄ Fe.7H ₂ O	1.60 mg/l
Cistina	10.08 mg/l
KH ₂ PO ₄	0.11 g/l
L-Prolina	0 g/l (medio SS sin agregado de prolina).

2.3. Cultivo de microorganismos

2.3.a. Preparación de inóculos

El liofilizado se resuspende en una solución con casaminoácidos (15%) y se siembra en placas de agar Bordet Gengou (DIFCO Laboratories, USA), suplementadas con 15 % de sangre desfibrinada de carnero (ABGs). Las placas se incuban 72 hs. a 36°C, al cabo de lo cual se replica el cultivo en agar inclinado (ABGs) y se mantiene a 36°C durante 30 hs. Desde los tubos de agar inclinado, las células se transfieren a un erlenmeyer de 1 litro de capacidad conteniendo 250 ml del mismo medio de cultivo que se empleará en el proceso a inocular. Se incuba en un agitador orbital a 36°C durante 30 hs. El volumen de inóculo utilizado en los cultivos llevados a cabo en frascos o tanques agitados es, aproximadamente, el 10% del volumen final del cultivo. De esta manera la densidad óptica inicial de todos los cultivos se mantiene en el rango de 0.1-0.2. La densidad óptica se mide a 650 nm (A_{650}), en un espectrofotómetro visible Pye Unicam SP6-250 (una unidad de $A_{650} = 3.0 \times 10^9$ organismos/ml)

2.3.b. Cultivo batch en frascos agitados

El cultivo se inicia en el momento de la inoculación, según se indica en el punto 2.3.a. Se toman muestra de forma regular cada 3 hs. hasta alcanzar las 48 hs. de cultivo. A cada muestra se le determina densidad óptica a 650 nm, pH, y peso seco. Luego, cada muestra líquida se separa en fracción celular y sobrenadante de cultivo. Ambas fracciones son analizadas por separado.

2.3.c. Cultivo batch en tanques agitados

El biorreactor tipo tanque agitado que se emplea en estos estudios es una unidad LKB 1601 (ULTROFERM, LKB, Bromma, Sweden) de 6 L de capacidad, equipada con cuatro cortacorrientes, aireador en profundidad, electrodos esterilizables de espuma, oxígeno disuelto (galvánico), y pH. El volumen de trabajo es de 2.5 L de medio de cultivo. La inoculación se lleva a cabo según está referido en el punto 2.3.a. En todos los experimentos el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($k_L a$) se mantiene constante en 100 h^{-1} , a través del control de la velocidad de agitación y aireación. La espuma se controla a través del agregado automático de antiespumante. La temperatura se mantiene a 36°C . Se sigue el cultivo durante 48 hs. Durante el desarrollo celular se toman muestras cada 1.5 hs. En las muestras líquidas se determina la densidad óptica a 650 nm, el peso seco, y el pH. Luego, se separa la fracción celular y el sobrenadante de cultivo para su análisis. En los gases de entrada y salida del fermentador se determina la concentración de oxígeno (analizador paramagnético de oxígeno gaseoso Servomex, Serie 1100, Crowborough, Sussex) y de dióxido de carbono (analizador de dióxido de carbono gaseoso Horiba PIR-200, Instrumentalia).

2.3.d. Cultivo continuo en tanques agitados

El biorreactor tipo tanque agitado que se emplea en este estudio es una unidad de fermentación LH serie 210, de 2 L de capacidad, equipada con electrodos de oxígeno disuelto (polarográfico) y de pH. El volumen de trabajo empleado es de 700 ml de medio de cultivo. Después de 12 hs. de cultivo batch comienza el agregado de medio fresco para iniciar la operación en continuo. El reservorio con el medio de cultivo se recambia diariamente. El pH del cultivo se mantiene en 7.4 por la adición de medio de cultivo fresco a pH 4 (este dato fue calculado teniendo en cuenta que el aumento de pH observado durante el desarrollo celular se debe al amonio excretado al medio de cultivo como consecuencia de la desaminación del glutamato durante su utilización como fuente de energía). Hay que señalar que previamente se realizó un estudio de la estabilidad del medio de cultivo a pH 4. La temperatura del proceso se mantiene en 36°C . La aireación se lleva a cabo en superficie. No se agregan cortacorrientes para favorecer la formación de vórtice. El medio de cultivo empleado en estos procesos es el medio SS o alguna modificación del mismo que se detalla en cada caso. Los cultivos son llevados a cabo en condiciones estrictamente definidas de:

1-Velocidad de dilución (0.03, 0.04, 0.05 y 0.06 h^{-1}) a través de la variación del caudal de alimentación y manteniendo invariables las demás condiciones de cultivo.

2-Oxígeno disuelto (5%, 30%, 60% y 90%) variando los niveles de agitación y aireación, manteniendo invariables los demás parámetros de cultivo.

3-Sustratos limitantes del crecimiento. Sobre la base de la formulación del medio de Stainer-Scholte se modifica en las cantidades indicadas anteriormente, el contenido de hierro, prolina, cistina y fósforo, de a uno por vez. Las demás condiciones de cultivo se mantienen invariables.

En cada condición analizada, se toman muestras en el estado estacionario. Se esperan diez generaciones antes de comenzar el muestreo. El estado estacionario se verifica por constancia de

parámetros tales como: concentración de biomasa, concentración de sustrato limitante, niveles antigénicos, etc. Teniendo en cuenta que la hemolisina es el primer antígeno que se pierde por modulación antigénica, en cada estado estacionario se comprueba el estado de virulencia de la cepa a través del nivel de hemolisina que presentan los microorganismos. Una vez alcanzado el estado estacionario se toman dos tipos de muestra: líquida y gaseosa. En la muestra gaseosa se determina el contenido de oxígeno y dióxido de carbono, de manera similar a lo detallado anteriormente. En la muestra líquida, se determina pH, peso seco, y densidad óptica a 650 nm. Por otra parte, la muestra líquida se separa en fracción celular y sobrenadante de cultivo para su análisis

En todos los casos donde se calcularon rendimientos (biomasa, antígenos, etc.) se toma muestra adecuadamente para la determinación exacta de las concentraciones iniciales y finales de productos y reactivos.

Durante los cultivos llevados a cabo en tanques agitados se realizan medidas en línea y medidas intermitentes. Las determinaciones que se realizan en línea son: temperatura, pH, oxígeno disuelto, porcentaje de dióxido de carbono y de oxígeno en la fase gaseosa, nivel de espuma, volumen de medio. Los demás ensayos, que se llevan a cabo en forma intermitente, se detallan a continuación

2.4. Determinación de la velocidad de consumo de oxígeno y producción de dióxido de carbono durante el cultivo.

La velocidad de consumo de O_2 (rO_2) y producción de CO_2 (rCO_2), se determina por balance de materia de ambos compuestos en los gases de entrada y salida del fermentador:

$$rO_2 = -\frac{0.79 F}{V} \left[\frac{(PO_2)_2}{100 - (PO_2)_2 - (PCO_2)_2} - \frac{(PO_2)_1}{100 - (PO_2)_1 - (PCO_2)_1} \right]$$

$$rCO_2 = \frac{0.79 F}{V} \left[\frac{(PCO_2)_2}{100 - (PO_2)_2 - (PCO_2)_2} - \frac{(PCO_2)_1}{100 - (PO_2)_1 - (PCO_2)_1} \right]$$

Donde:

- $(PO_2)_1$: Porcentaje de O_2 en los gases de entrada del fermentador
- $(PO_2)_2$: Porcentaje de O_2 en los gases de salida del fermentador
- $(PCO_2)_1$: Porcentaje de CO_2 en los gases de entrada del fermentador
- $(PCO_2)_2$: Porcentaje de CO_2 en los gases de salida del fermentador
- V: Volumen de medio de cultivo en el momento de la toma de muestra (l)
- F: Caudal de aire (l/h)

2.5. Ensayo respirométrico

Este ensayo se lleva a cabo en un respirómetro diferencial tipo Gilson¹¹⁹, de válvula simple, termostatzado, que opera a presión constante en equilibrio con la presión atmosférica. De esta manera una producción o consumo de gas del cultivo se traduce en una variación de volumen que se mide con un micrómetro digital. Cuando solo quiere medirse O₂ consumido, se coloca en la cámara central un papel de filtro embebido en hidróxido de potasio al 10%, que retiene el CO₂ producido. De esta manera la variación de volumen observada se debe únicamente al O₂ consumido.

Una dificultad general con los respirómetros que operan a presión constante, es la modificación en la composición del gas debido a la presencia de gases que desaparecen por consumo y gases que son producidos. De manera tal que, no solo cambia la presión parcial de los gases metabolizados, sino también la de aquellos que no son metabolizados. Como las solubilidades de los gases son diferentes, la distribución de los mismos en la fase líquida y gaseosa cambia con el cambio del volumen total del sistema. El error que se comete si se desprecia este efecto cuando se calcula el O₂ consumido no es importante y puede despreciarse. Entonces, el volumen de oxígeno consumido (VO₂) se calcula directamente a partir de la fórmula:

$$VO_2 = 273 (P - P_w) \Delta V_g / 760 T$$

Donde

P presión barométrica en las condiciones de trabajo (mm de Hg).

P_w presión de vapor de agua a la temperatura de trabajo (mm de Hg)

ΔV_g variación del volumen total del gas por unidad de tiempo (μl/h).

T temperatura de trabajo (°K).

VO₂ volumen de oxígeno consumido por unidad de tiempo (μl/h).

Así, a partir VO₂ que es el volumen de O₂ consumido, por hora y por cada 2.5 ml de medio de cultivo (volumen de cultivo que se pone en la cámara) se calcula la velocidad volumétrica de consumo de O₂ (rO₂). Con este parámetro y la concentración de biomasa en el momento de la toma de muestra (X), se calcula la velocidad específica máxima (por tratarse de un cultivo en fase exponencial) de consumo de oxígeno (qO_{2m}), según:

$$qO_{2m} = rO_2 / X$$

NOTA: para que la velocidad específica sea realmente máxima es necesario que no haya limitación de nutrientes de ningún tipo incluido el oxígeno. Para tal fin se diluye la muestra de cultivo de manera tal que el suministro de oxígeno del equipo sea suficiente con respecto a la demanda del microorganismo.

2.6. Determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno ($K_L a$).

2.6.a. Método del sulfito (en ausencia de microorganismos)

El $k_L a$ del reactor se determina en las condiciones de temperatura y volumen de trabajo a emplearse en el cultivo, según el método desarrollado por Cooper¹²⁰. El medio de cultivo es reemplazado por el mismo volumen de una solución de SO_3Na_2 0.5 N, a la cuál se le agrega 1 ml/l de una solución de SO_4Cu 1M como catalizador de la reacción de oxidación del sulfito a sulfato. En estas condiciones la velocidad de oxidación del sulfito está determinada por la velocidad de transferencia del oxígeno. La velocidad de oxidación del sulfito ($\Delta C/\Delta t$) se determina por yodometría, empleando titulación por retorno con tiosulfato de sodio 0.05 N. Este valor es numéricamente igual a la velocidad de transferencia de oxígeno. Con este dato y la solubilidad de dicho gas a la temperatura de trabajo (C^*), se calcula el $k_L a$, según la fórmula:

$$\Delta C/\Delta t = k_L a C^*$$

2.6.b. Medida directa en línea

En este caso el $k_L a$ del biorreactor se determina durante el cultivo. Se calcula la velocidad de consumo de oxígeno instantánea, según se indicó en el punto 2.4, y, conociendo el porcentaje de oxígeno disuelto en el cultivo en ese momento, se estima el $k_L a$ según:

$$k_L a = r_{\text{O}_2} / C^* - C_l$$

2.7. Determinación de la viscosidad del cultivo

Para la determinación de la viscosidad del cultivo se emplea un Rotovisco HAAKE RV2. Se determina la velocidad de corte en función del esfuerzo de corte. Un perfil lineal de aumento de dicha velocidad con respecto al esfuerzo de corte implica un comportamiento newtoniano de la muestra y la pendiente de la recta que representa el esfuerzo de corte vs. la velocidad de corte es numéricamente igual a la viscosidad del cultivo.

2.8. Determinación de adhesinas celulares.

El nivel de adhesión de *B. pertussis* a células eucariotas de la línea celular HeLa 229 (Human-epithelium-like ATCC CCL2.1), se determina de acuerdo a lo reportado por Sato y col.²³. Brevemente, se agrega una suspensión de 10^{10} bacterias por ml de medio Eagle's Minimal Essential Medium (MEM), a una monocapa de células HeLa de 24 hs de crecimiento al 50% de confluencia. Se agita y se incuba por 2 horas, a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 . Se lava con MEM y se fija con etanol-acético (en relación 3:1), durante 10 min., luego de lo cuál se le agrega

solución de Hoeschst N° 33258: 2'-(4-hidroxifenil)-5-(4-metil-1-piperazil)-2,5'-bi-1H-bencilimidazol (SIGMA, Chemical Co., USA). Se lava con agua destilada y se coloca sobre un portaobjetos con ác. cítrico como medio de montaje. Se cuenta el número de bacterias adheridas a cada célula de línea. De cada preparado se observan 10 campos tomados al azar, que contengan entre tres y diez células de línea. El valor presentado para cada ensayo en la sección de Resultados y Discusión es la media \pm la desviación estandard de 7 ensayos.

2.9. Determinación de la capacidad protectora de células

Para analizar la capacidad protectora de células de *B. pertussis* se llevó a cabo el test de protección en ratón recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS)^{110,121}. Grupos de 16 ratones N:NIH se inmunizan intraperitonealmente con 0.5 ml de vacuna pertussis standard internacional (8 unidades protectoras internacionales/ml: UPI/ml) o de vacuna experimental (preparadas a partir de las células a ensayar, A_{650} : 1.0), diluidas en NaCl 0.15M en proporción: 1/5, 1/25 y 1/125. Cinco grupos de 10 ratones no inmunizados se usan como control de virulencia. Cuarenta días después de la inmunización, los ratones se desafían intracerebralmente con 0.03 ml de una suspensión de *B. pertussis* 18323, con aproximadamente 200 LDS50 (dosis letal 50), lo cuál corresponde a 100,000 células de *B. pertussis*. Los ratones control se inyectan con la dosis desafío y una dosis cinco veces diluida. Los animales se observan diariamente durante los 28 días posteriores a la inmunización. Se toma nota de las muertes ocurridas entre los días 17 y 28. La dosis efectiva 50 (ED50) y la potencia de las vacunas experimentales se estima estadísticamente según el método de Worcester y Wilson.¹²² Se aplican las condiciones de validez requeridas por el Code of Federal Regulations¹²³ Los resultados se expresan en UPI/ml con un límite de confianza del 95%.

2.10. Determinación de la actividad hemaglutinante en sobrenadante de medio de cultivo

Para determinar la actividad hemaglutinante de sobrenadante de cultivo (HA), se realizan diluciones seriadas en base dos, de 100 μ l de sobrenadante de cultivo en solución fisiológica. Se adicionan 50 μ l de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 0.07% en PBS, pH 7.2, a cada dilución. La mezcla se agita durante 15 min. y luego se incuba durante 2 hs. a 37°C, en cámara húmeda.

Las unidades de hemaglutinación se expresan como la recíproca de la máxima dilución en la cual, después de adicionar la suspensión de eritrocitos, aparece una aglutinación completa¹²⁴.

2.11. Determinación de la actividad hemaglutinante de células.

El dosaje de la actividad hemaglutinante de células (HAc) de *B. pertussis* se lleva a cabo según el método de Brown y Parker¹²⁵. Las células se suspenden en PBS y su concentración se ajusta a 200 unidades Klet (3×10^6 CFU/ml). Se realizan diluciones seriadas en base dos, de 50 μ l de la suspensión celular. Se adicionan 50 μ l de glóbulos rojos de carnero al 0.05% en buffer

fosfato, se agita durante 2 min. y se incuba a temperatura ambiente durante 3 horas. Las unidades de hemaglutinación se expresan como la recíproca de la máxima dilución que presenta hemaglutinación completa.

2.12. Determinación de la actividad hemolítica

La actividad hemolítica se informa positiva o negativa de acuerdo a la presencia o no de halo de hemólisis en placas de ABGs.

2.13. Determinación de toxina pertussis extracelular.

El dosaje de toxina pertussis (PT) se realiza por ELISA de manera similar a lo descrito por Wong & Skelton¹²⁶. Las placas para el test se sensibilizan con fetuina disuelta en buffer $\text{CO}_3^{2-}/\text{CO}_3\text{H}^-$ y se conservan a -20°C hasta el momento de su uso.

Para realizar las determinaciones se colocan 100 μl de muestra en cada pocillo. La curva patrón se realiza agregando 100 μl de PT patrón (SIGMA, Chemical Co., USA), en concentraciones: 0.25, 0.50, 1.00 y 2.00 mg/ml en PBS-Tween(0.05% v/v) (PBST). Se incuban 12 hs. a 4°C . Se lavan 6 veces con PBST-CINa(0.15M). Se agrega, en cada pocillo, 100 μl de suero de cabra anti-Bp, diluido en PBST-leche descremada en polvo(10% p/v). Se incuba 60 min. a 37°C . Se lava nuevamente con PBST y se agrega, en cada pocillo, 100 μl de suero de conejo anti-IgG de cabra marcado con peroxidasa, diluido en PBST-leche (al 10% p/v). Se incuba 60 min. a 37°C . Finalmente, se revela con O-fenilendiamina en buffer fosfato-citrato y H_2O_2 ; luego de 15 min. se detiene la reacción con H_2SO_4 4N. Se lee la absorbancia en cada pocillo con un lector de ELISA con filtro 492nm.

2.14. Determinación de proteínas

El dosaje de proteínas se realiza de acuerdo al método desarrollado por Lowry¹²⁷ empleando seroalbúmina bovina (SIGMA, Chemical Co., USA) como proteína patrón.

2.15. Preparación de muestras de proteína total de células para electroforesis

Las muestras de células se lavan con buffer fosfato y luego se solubilizan con buffer de carga: 125 mM de Tris/ClH, pH 6.8; 4% (p/v) SDS; 10% (v/v) de β -mercaptoetanol; 20% (v/v) de glicerol y 0.002% de azul de bromofenol. Se mantienen a 100°C durante 10 min.. Se las incuba con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de desoxirribonucleasa, a temperatura ambiente durante 30 min.. Estas muestras son luego aplicadas al gel de poliacrilamida para ser sometidas a electroforesis.

2.16. Obtención de polipéptidos de membrana externa

Las células se lavan con buffer fosfato y se someten a un tratamiento combinado de lisozima y shock térmico según Maagd y Lugtenberg¹²⁸. Brevemente la técnica consiste en resuspender las células en 10 mM de tris/HCl, pH 7.8 (1:40 p/v), adicionarles EDTA y lisozima en concentración final 10 mM y 100 µg/ml, respectivamente. Se las incuba a 23°C. La mezcla se congela y se descongela una vez. Luego se las incuba 3 min. a 35°C y 15 min. a 23°C. Se les adiciona 20 mM de Cl₂Mg y 10 µg/ml de desoxirribonucleasa. Las células enteras y grandes fragmentos se remueven por centrifugación (8,000 × g, durante 10 min. a 4°C). El sobrenadante se centrifuga a 16,000 × g durante 1 hora. Se separa el sobrenadante. El pellet es resuspendido en HEPES 10 mM con 2% de Tritón y se incuba a temperatura ambiente durante 15 min. El material insoluble que queda se pelletea por centrifugación (16,000 × g, 60 min. a 4°C) y se repite la extracción con Triton. El pellet final, conteniendo las proteínas de membrana externa se trata con buffer de carga: 0.065 M de Tris/ Cl (pH 6.8), SDS (2% p/v), glicerol (10% p/v), EDTA sódico (2 mM), azul de bromofenol (0.001% p/v) y β-mercaptoetanol (5% p/v). Estas muestra son luego aplicadas al gel de poliacrilamida para ser sometidas a electroforesis.

2.17. Obtención de lipopolisacárido de células

Para aislar lipopolisacáridos (LPS) de células de *B. pertussis*, el procedimiento que se emplea es el descrito por Westphal y Jann¹²⁹. Las células se separan del sobrenadante por centrifugación a 8,000 × g durante 10 min. El pellet celular es resuspendido en agua y se le agrega fenol, previamente calentado a 75°C en baño de agua, hasta una concentración final de 50% v/v. La mezcla se incuba durante 5 min. a 68-70°C con agitación constante. La mezcla se coloca en un baño de agua-hielo y se enfría hasta 10°C, agitando. La emulsión se centrifuga 15 min. a 12,000 × 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 separa y se deja a 0-4°C. La fase fenólica y el material de interfase son sometidos a una segunda extracción con un volumen de agua igual al utilizado en la primera extracción. El agua es precalentada a 70°C y la mezcla también se calienta a esta temperatura durante 5 min. Luego se enfría y se centrifuga. Las capas acuosas de ambas extracciones se juntan y se dializan contra cuatro litros de agua a 4°C durante toda la noche. Luego se centrifuga a 30,000 × g durante 20 min. El pellet contiene la muestra de LPS.

Para llevar a cabo las electroforesis, las muestras de LPS se solubilizan 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 incuba a 100°C durante 10 min. Luego por cada 50 µl de suspensión de LPS, se agregan 25 µg de Proteinasa K, disuelta en 10 µl de buffer de carga. Las mezclas se incuban durante 1 h a 60°C, con agitación. Estas muestra son luego aplicadas al gel de poliacrilamida para ser analizadas por electroforesis.

2.18. Electroforesis de proteínas y lipopolisacáridos

Las electroforesis de proteínas y LPS se llevan a cabo en SDS-PAGE. Se preparan geles de 1 y 1.5 mm de espesor conteniendo 10, 12.5, 14, 15 y 16% de poliacrilamida según la técnica Laemmly¹³⁰. La electroforesis se lleva a cabo a pH 8.6 y a un voltaje constante de 130 volts.

2.18.a. Tinción de polipéptidos y LPS

Los geles donde se llevan a cabo las electroforesis de proteínas se someten a tinción con Coomassie blue o nitrato de plata. Para llevar a cabo la tinción con nitrato de plata según la técnica de Wray y col¹³¹, las proteínas deben fijarse previamente con una solución de metanol/ác. acético/formaldehído/agua en proporción 50:12:0.18:37.82.

Los lipopolisacáridos se tiñen con nitrato de plata según la técnica de Hitchcock y Brown¹³². Previamente a la tinción los lipopolisacáridos también deben fijarse con una solución que contiene 25% v/v de isopropanol en una solución al 7% de ácido acético.

2.19. Inmunodetección (Western blot) de FHA celular y extracelular, y P.69

La Inmunodetección de FHA celular, FHA de sobrenadante de cultivo y P69, se lleva a cabo a partir de electroforesis de proteínas totales de células, proteínas de sobrenadante de cultivo y proteínas de membrana externa, respectivamente. En todos los casos, luego de ser sometidas a una corrida electroforética en SDS-PAGE, las proteínas transfieren desde el gel de poliacrilamida a membranas de polivinildifluoruro (PVDF), según el método de Towbin y col.¹³³ La eficiencia de este proceso se comprueba por tinción con plata del gel transferido. Posteriormente la membrana de PVDF con las proteínas transferidas se bloquea para uniones inespecíficas con buffer TBS (50 mM Tris/ClH, 150 mM Na Cl, pH 8.0) conteniendo 5% de leche descremada en polvo (DIFCO Laboratories, USA). Las proteínas inmovilizadas se ensayan con anticuerpos mono-específicos de ratón anti-FHA, y anti-P69 (provistos por el Instituto Pasteur, París, Francia). El revelado se lleva a cabo con anticuerpos de cabra anti-ratón, marcados con fosfatasa alcalina. Entre cada uno de estos pasos se realizan lavados con TBS conteniendo 0.1% de Tween.

El revelado final se lleva a cabo con nitroblue tetrazolium chloride y 5-bromo-4-cloro-3-indolylphosphate en buffer PA (100 mM Tris-ClH, 100 mM Na Cl y 5 mM de Mg Cl₂, pH 9.5).

2.20. Determinación del ácido 2-ceto-3-deoxi-octulosónico en LPS proveniente de células y sobrenadante de cultivo.

La determinación del ácido 2-ceto-3-deoxi-octulosónico (KDO), se lleva a cabo empleando el método desarrollado por Karkhanis y col.¹³⁴. Brevemente, dicho ensayo consiste en el tratamiento del lipopolisacárido con H₂SO₄ 0.2 N, a 100°C por 30 min., seguido de una reacción con HIO₄, NaAsO₂ y ácido tiobarbitúrico. El cromóforo formado se estabiliza mediante el agregado de dimetilsulfóxido a la mezcla de reacción. El color final es estable durante varios días. La lectura se realiza a 548 nm. La concentración de KDO se determina por comparación con una

curva patrón de KDO (SIGMA, Chemical CO., USA) ensayada en forma paralela a la muestra problema, que cubre un rango de concentraciones entre 0 y 20 µg/ml.

2.21. Determinación de glutamato en el medio de cultivo.

La determinación de la concentración de glutamato se lleva a cabo empleando un kit enzimático de análisis de Boehringer Mannheim, Germany, previa desproteización de la muestra. Esta determinación se basa en la desaminación oxidativa del glutamato por la glutamato deshidrogenasa. Los electrones del glutamato reducen el NAD presente en la mezcla de reacción dando lugar a la formación de NADH, el cuál a su vez, en presencia de diaforasa, reduce el iodonitro tetrazolio transformándolo en formazan. Este último es un compuesto coloreado y presenta un máximo de absorción en 492 nm. En las condiciones empleadas en el ensayo (exceso estequiométrico de los demás reactivos) la intensidad de color desarrollado es directamente proporcional a la concentración de glutamato en la muestra problema. La concentración se determina por comparación con una curva patrón de glutamato, ensayada en forma paralela con la muestra, que cubre un rango de concentraciones entre 0 a 30 mg/l. El límite de sensibilidad de esta determinación es de 0.5 mg/l. Las muestras en las que se determina glutamato son previamente desproteinizadas.

2.22. Determinación de amonio en el medio de cultivo.

La determinación de la concentración de NH_4^+ se lleva a cabo empleando un kit enzimático de análisis para la determinación de uremia desarrollado por Wiener Lab. La determinación de amonio con este kit se realiza sin el agregado inicial de ureasa. La técnica se basa en que el amonio reacciona con hipoclorito y fenol en medio alcalino produciendo azul de indofenol que se determina colorimétricamente a 540 nm. La concentración de amonio se determina por comparación con una curva patrón que cubre un rango de concentración de amonio entre 0 y 36 mM. El límite de sensibilidad del método a sido determinado en 3 mM.

2.23. Determinación de fósforo en el medio de cultivo.

La determinación de fósforo inorgánico se lleva a cabo, previa desproteización de la muestra, empleando un kit de diagnóstico de SIGMA, Chemical Co., USA. La determinación se basa en la reacción del fósforo inorgánico, presente en la muestra, con molibdato de amonio en medio ácido para formar fosfomolibdato. El agregado del reactivo de Fiske & Subbarow (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico al 0.8 % en sulfito de sodio y bisulfito de sodio) reduce el fosfomolibdato a la forma de un complejo azul. La intensidad del color es proporcional a la concentración de fósforo y se mide por absorvancia a 660 nm. La concentración se determina por comparación con una curva patrón de fósforo inorgánico, ensayada en paralelo con la muestra, que cubre un rango de concentraciones entre 0 y 128 mg/l. El límite de sensibilidad de esta prueba ha sido estimado en 0.8 mg/l.

2.24. Determinación de hierro en el medio de cultivo.

La determinación de hierro se lleva a cabo con un kit de análisis de MERCK, Darmstadt, de alta sensibilidad. La determinación se basa en la reducción inicial, con ácido ascórbico, de todo el hierro presente en la muestra. Así, en un medio tamponado con tioglicolato el Fe^{+2} reacciona con Ferrospectral (reactivo patentado por MERCK, Darmstadt) formando un complejo color violeta cuya intensidad es proporcional a la concentración de Fe en la muestra. Dicha intensidad se mide espectrofotométricamente a 565 nm. La concentración de hierro se determina por comparación con una curva patrón de hierro que cubre un rango de concentraciones entre 0 y 4 mg/l.

2.25. Determinación de cisteína y prolina en el medio de cultivo.

La determinación de Pro y Cys se lleva a cabo en muestras previamente desproteinizadas, según el método descrito por Gaitonde¹³⁵, que permite la determinación de cada uno de estos aminoácidos, aún en presencia de otros. La técnica para la determinación de cisteína, se basa en que este aminoácido es el único capaz de reaccionar con ninhidrina/ác. acético/HCl y dar un complejo que absorbe a 560 nm. A esta longitud de onda, este método es muy específico para cys y no hay interferencia de los demás aminoácidos. El medio de cultivo tiene cistina por lo tanto, como paso previo a la determinación se reduce la misma con ditioneitol. Para determinar prolina, se procede de manera similar pero el reactivo es ninhidrina/ác. acético/ác. fosfórico que forma un complejo con Pro cuyo máximo de absorción está en 510 nm. A esta longitud de onda el único aminoácido que interfiere es la cisteína por lo cual, de manera simultánea, se determina su concentración según se describe mas arriba.

2.26. Determinación de NAD^+ y de NADH intracelular

El muestreo para la determinación de estos dos metabolitos intracelulares se lleva a cabo según lo recomendado por Sáez y Laguna¹³⁶. La extracción y la determinación de ambos metabolitos a partir de los extractos celulares se lleva a cabo según lo descrito por Bernofsky¹³⁷. Brevemente, a 500 μl extracto celular neutralizado (pH 7.5) de ambos metabolitos, se les agrega 400 μl de H_2O , 100 μl de buffer glicilglicina 1M, 50 μl de bromuro de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), 8.4 mM, 50 μl de etosulfato de fenazina (PES) 33.2 mM y 10 μl de etanol 96%. Se incuba la mezcla 3 min. a 35°C, y se le agrega 10 μl de acohol dehidrogenasa (900 U/ml). Es posible determinar la velocidad de reducción del MTT espectrofotométricamente a 570 nm. La curva de calibración se realiza agregando 0, 2, 5 y 10 μM de NAD^+ o NADH patrón (SIGMA, Chemical Co., USA) durante el proceso de extracción de los nucleótidos.

2.27. Determinación de sideróforos en sobrenadante de medio de cultivo

Se determina la presencia de sideróforos según la técnica desarrollada por Schwyn. & Neilands¹³⁸. La técnica se basa en la alta afinidad de los sideróforos por el hierro. Así, la muestra

donde se quiere determinar la presencia de sideróforos se mezcla con una solución que contiene hexadeciltetrametilamonio (HDTMA), hierro (III), Cromo Azul S y piperazina en medio ácido. El hierro (III), la HDTMA y el Cromo Azul S, en estas condiciones, forman un complejo de estructura desconocida color azul. Si en el medio hay sideróforos, éstos capturan el hierro del complejo y como consecuencia aparece un cambio de color (evoluciona hacia el color naranja). La intensidad del nuevo color (proporcional a la concentración de sideróforo en el medio) se mide espectrofotométricamente a 630 nm, después de alcanzado el equilibrio.

2.28. Análisis estadístico

La comparación de los resultados de tratamientos se realiza mediante el análisis de varianza utilizando para la comparación de las medias el test de Menor Diferencia Significativa (LSD)¹³⁹ con un grado de significación de $\alpha < 0.05$.

NOTA: En todos los ensayos llevados a cabo en sobrenadante de cultivo se tuvo especial cuidado de que estuvieran libres de células. Para lo cuál después de la centrifugación, el sobrenadante se filtra a través de membranas de tamaño de poro de 0.22 μm .

Capítulo 3

*Estudio del crecimiento y la expresión
antigénica en sistema de cultivo batch*

Capítulo 3: Estudio del crecimiento y la expresión antigénica en sistema de cultivo batch

Resultados	38
3.1. Estudios preliminares de medio de cultivo y condiciones de operación. Escala de frascos agitados.....	38
3.1.a. Ajuste de medio de cultivo y empleo de agentes antiespumantes.....	38
3.1.b. Ajuste de las condiciones de operación del biorreactor en función de la demanda de oxígeno de <i>B. pertussis</i>	42
3.2 Estudio de la influencia de la agitación y aireación sobre el $K_L a$ del tanque agitado a emplearse en el estudio cinético y estequiométrico.....	44
3.3. Descripción cinética y estequiométrica del crecimiento de <i>B. pertussis</i> en sistema de cultivo batch.....	45
3.3.a. Estequiometría del crecimiento de <i>B. pertussis</i>	45
3.3.b. Cinética del crecimiento de <i>B. pertussis</i>	50
Discusión	54

Para llevar a cabo la caracterización cinética y estequiométrica del cultivo de *B. pertussis* en medio líquido, es necesario el empleo de tanques agitados. No sólo porque sus características de diseño posibilitan un control estricto de las variables fisicoquímicas del proceso, sino también porque, además de permitir el análisis de la fase gaseosa, permite un adecuado muestreo de la fase líquida sin que se alteren demasiado las condiciones de cultivo. Un muestreo de estas características posibilita la determinación de parámetros confiables.

El empleo de este tipo de reactores implica conocer previamente determinados aspectos del proceso, por lo cual se realizaron los siguientes estudios preliminares en escala de frascos agitados.

RESULTADOS

3.1. Estudios preliminares de medio de cultivo y condiciones de operación. Escala de frascos agitados.

3.1.a. Ajuste de medio de cultivo y empleo de agentes antiespumantes.

Como se mencionó anteriormente, el medio líquido recomendado en bibliografía para la producción de vacuna pertussis es el medio de Stainer-Scholte (SS). Este medio, químicamente definido, soporta el crecimiento seriado de *B. pertussis* en fase virulenta. Es un medio de cultivo integrado por cantidades conocidas de aminoácidos, sales y vitaminas (según se especifica en Materiales y Métodos). Está formulado de manera tal que la fuente de carbono y energía (el glutamato) es la limitante del crecimiento.

En la Figura 3.1 se muestra una curva típica de *B. pertussis* creciendo en medio SS, en sistema de cultivo batch. Dicho crecimiento microbiano se llevó a cabo en frascos agitados, a 36°C, 160 rpm y en una relación de volumen de erlenmeyer a volumen de medio de cultivo de 4:1 (estas condiciones de cultivo fueron tomadas de datos bibliográficos).

Según se puede ver en la Figura 3.1, la fase latencia del crecimiento es bastante prolongada. En este sentido cabe señalar que se comprobó que, si se emplea un inóculo menor al 10% del volumen final de cultivo no se produce desarrollo celular alguno. La fase logarítmica de crecimiento se extiende por 20 hs. aproximadamente. Los niveles de PT y FHA (ésta última evaluada como actividad hemaglutinante-HA-) en el medio extracelular aumentan durante la fase logarítmica.

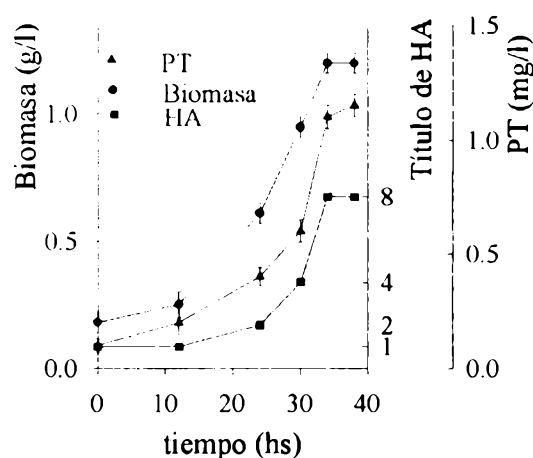


Figura 3.1: Cinética en sistema de cultivo batch, del crecimiento y producción de antígenos extracelulares de *B. pertussis* en medio SS. Escala de trabajo: frascos agitados.

En un intento por disminuir la fase latencia, se ensayó el agregado de extracto de levadura (E.l.) en pequeñas cantidades (entre 0 y 1 g/l) al medio SS. El extracto de levadura agregado en esta concentración aporta fundamentalmente micronutrientes y factores de crecimiento. Se ha visto en otros procesos microbianos que la falta de componentes de este tipo es generalmente la causa de una fase de latencia prolongada y la necesidad de inóculos relativamente grandes. En el caso de *B. pertussis* se pudo comprobar que, mediante el agregado de E.l. al medio SS, la fase de latencia no sólo se reduce notablemente sino que, a partir de una concentración de 0.75 g/l, no se verifica retardo alguno en el comienzo de la fase crecimiento exponencial. En lo que se refiere a la producción de células y antígenos, en la Figura 3.2 se puede observar que la adición de este agente al medio SS aumenta los niveles alcanzados al final de la fase exponencial. Este efecto, que es función de la concentración de E. l., alcanza un máximo para 0.75 g de E.l. por litro de medio SS. En este sentido es importante señalar que, en sobrenadante de fase estacionaria de crecimiento en cultivo discontinuo (batch) de *B. pertussis* en medio SS, no se verificó agotamiento de ningún nutriente del medio de cultivo. Por el contrario, en cultivos discontinuos llevados a cabo en medio SS a los que se le adicionó 0.75 g/l de E.l., no se pudo detectar glutamato en sobrenadante de cultivo de fase estacionaria. De estos resultados resulta evidente que el aumento de biomasa mostrado en la Figura 3.2 se debe a que la incorporación del extracto de levadura posibilita un mejor aprovechamiento de los nutrientes del medio SS. Por otra parte, el aumento verificado en los niveles extracelulares de FHA y PT sería consecuencia del aumento de biomasa y no una acción directa de algún componente del E.l. sobre los mecanismos de excreción de antígenos, ya que la producción específica de los mismos no se ve modificada en las distintas condiciones ensayadas.

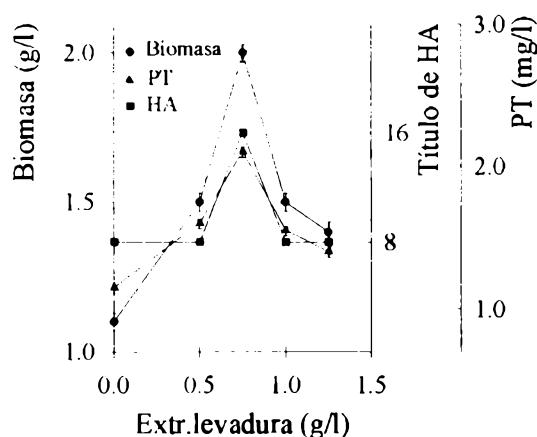


Figura 3.2: Efecto de la incorporación de extracto de levadura al medio SS sobre la producción de células y antígenos extracelulares de *B. pertussis*. Los valores de biomasa y antígenos representados en ésta figura corresponden a los niveles máximos alcanzados en cada condición de medio de cultivo, ensayada en sistema batch. Escala de trabajo: frascos agitados.

Otro de los ajustes previos al empleo de tanques agitados está relacionado con la formación de espuma. Las proteínas liberadas al medio extracelular durante el crecimiento de *B. pertussis* favorecen la formación de espuma cuando se trabaja con tanques agitados operados con aireación en profundidad. La espuma debe ser evitada no sólo por los problemas operacionales a los que conduce, sino porque implica pérdida de control, de productividad y de homogeneidad del proceso en su conjunto. Existen datos bibliográficos¹¹⁸ que señalan a las siliconas como el tipo químico de antiespumante más adecuado para el cultivo de *B. pertussis*. Teniendo en cuenta estos datos se estudió, en escala de frascos agitados, el efecto de la adición de cantidades crecientes de un antiespumante (Ae) de este tipo químico, al medio SS y al medio SS adicionado de 0.75 g/l de E.I. (SSE). Se pudo comprobar que el agregado de Ae al medio SS no afecta la producción de células ni de antígenos extracelulares cuando se lo emplea en un intervalo de concentración de 0.1 a 0.6 g/l. Se observó que en concentraciones superiores a la citada se produce inhibición del desarrollo celular, ya sea que el Ae se agregue desde el comienzo del cultivo o en pleno crecimiento exponencial. Por el contrario, cuando se emplea SSE como medio de cultivo, no se observa ningún efecto sobre células ni antígenos solubles como consecuencia del agregado de Ae, aún en concentraciones de hasta 1g/l.

Para completar estos estudios se determinó el efecto del agregado de E.I. y Ae al medio SS, en relación a la antigenicidad celular. Se evaluó la capacidad protectora, según se describe en Materiales y Métodos, de las células de *B. pertussis* crecidas en las diferentes condiciones de cultivo. Ambos factores (E.L. y Ae) se evaluaron conjuntamente, según se muestra en la Tabla 3.1. El extracto de levadura se ensayó en dos niveles: 0 y 0.75 g por litro de medio SS. El agente Ae en cambio se ensayó en tres niveles: 0, 0.6 y 1 g/l. En medio SS se ensayaron solamente las dos concentraciones menores porque, como ya se mencionó, un nivel de Ae superior a 0.6 g/l en el medio SS, provoca inhibición del crecimiento de *B. pertussis*.

En todas las condiciones ensayadas las muestras se tomaron a las 24 hs. de proceso. Determinaciones anteriores indican que en este tiempo de cultivo las células presentan un buen título antigénico. Las células se lavaron en forma estéril y se resuspendieron al mismo valor de densidad óptica en todos los casos. Con estas suspensiones celulares se formularon las vacunas para la determinación de la capacidad protectora, según se especifica en Materiales y Métodos

En la Tabla 3.1. se muestra la capacidad protectora de las células crecidas en las distintas condiciones de cultivo. Se pudo comprobar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos, con un nivel de certeza del 95%. Estos resultados indican que, ni el agente antiespumante empleado, ni el extracto de levadura, en los niveles ensayados, afectan la inmunogenicidad de las células.

Tabla 3.1: Efecto del agregado de antiespumante y extracto de levadura al medio SS, sobre la capacidad protectora de las células de *B. pertussis*. El test de potencia empleado es el recomendado por la OMS^{110,121}. La potencia celular esta expresada en: UPI/ml

E.l. (g/l)	Antiespumante (g/l)		
	0.00	0.60	1.00
0.00	7.9 ± 0.2	7.9 ± 0.2	--
0.75	7.9 ± 0.3	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.3

A partir de estos estudios se pudo definir que el SSE es un medio adecuado para llevar a cabo el estudio cinético y estequiométrico de crecimiento de *B. pertussis* en tanques agitados. Tal afirmación surge de los resultados detallados más arriba y que pueden resumirse como sigue. El agregado de extracto de levadura al medio SS en una concentración de 0.75 g/l: 1. evita que el desarrollo celular se detenga como consecuencia de otros factores indeterminados (aparentemente, acumulación de inhibidores), que no sean el agotamiento de algún nutriente. Este aspecto es fundamental para la determinación de parámetros cinéticos y estequiométricos; 2. el aporte de macronutrientes es despreciable; 3. no altera la expresión antigénica celular como así tampoco la excreción de antígenos solubles; 4. permite el empleo de antiespumante en concentraciones suficientes para el control de espuma, sin afectar la producción de células ni de antígenos.

3.1.b. Ajuste de las condiciones de operación del biorreactor en función de la demanda de oxígeno de *B. pertussis*

Por tratarse de un microorganismo aerobio, durante el cultivo de *B. pertussis* es necesario un suministro adecuado de oxígeno que satisfaga los requerimientos metabólicos relacionados con la oxidación de la fuente de carbono y energía y su transformación en células, productos y CO₂.

Debido a la baja solubilidad del oxígeno en agua (0.182 mmol/l) y a que los microorganismos son capaces de utilizar solamente oxígeno disuelto, durante el desarrollo celular este nutriente debe ser transferido de forma continua desde la fase gaseosa a la fase líquida. Cuando se trabaja en pequeña escala (frascos agitados), el suministro de oxígeno no presenta grandes inconvenientes por tratarse de volúmenes chicos. En esta escala la transferencia de oxígeno, que ocurre a través del área interfacial, aumenta con la velocidad de agitación orbital por formación de un vórtice mas pronunciado.

En una escala de trabajo mayor, con volúmenes de cultivo mas grandes, la transferencia de oxígeno (y la transferencia de masa en general), comienza a ser crítica. Por esta razón, los biorreactores tipo tanque agitado, que son los más utilizados en procesos a gran escala, están diseñados en función de favorecer la transferencia de oxígeno. En estos biorreactores el chorro de aire estéril ingresa por debajo del agitador y al ser golpeado por las paletas se transforma en pequeñas burbujas. El primer efecto que se consigue con la agitación es aumentar el área de contacto aire-líquido, favoreciendo así el intercambio gaseoso. La presencia de cortacorrientes en estos biorreactores aumenta la turbulencia en el líquido, lo cual mejora el mezclado y aumenta el tiempo de permanencia de las burbujas dentro del reactor favoreciendo, en última instancia, la transferencia de oxígeno

En términos generales, la transferencia de oxígeno depende de las condiciones de operación (temperatura, pH, agitación, aireación, volumen de líquido, etc.), de la geometría del reactor y de las características fluidodinámicas del líquido. Un biorreactor operado en condiciones definidas puede ser caracterizado, en lo que se refiere a su capacidad para transferir oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida, a través de un parámetro denominado "coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno" (K_La). Así, para condiciones de trabajo definidas existe un único valor de K_La que es constante mientras no cambien las condiciones de operación, la geometría del reactor o las características fluidodinámicas del cultivo.

Entonces bajo condiciones de operación determinadas, el suministro de oxígeno de un biorreactor se puede calcular según:

$$\frac{dc}{dt} = k_L a(C^* - C_1) \quad \text{cc. 3.1}$$

Donde:

- K_La coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno en las condiciones de trabajo [h⁻¹].
- C* concentración saturante de oxígeno disuelto en las condiciones de trabajo [mol/l].
- C₁ concentración de oxígeno disuelto en la fase líquida [mol/l].

Si no hay consumo de oxígeno la concentración de oxígeno disuelto (C_1) aumenta, hasta que finalmente $C_1 = C^*$, llegando entonces al equilibrio en el que se cumple la ley de Henry en todo el seno del líquido.

Si en el seno del líquido hay microorganismos que consumen oxígeno, en el momento que comience la aireación se establecerá un estado transitorio que se define:

$$\frac{dcO_2}{dt} = \overset{\text{suministro}}{k_L a (C^* - C_1)} - \overset{\text{demanda}}{qO_2 X} \quad \text{ec. 3.2}$$

Donde:

qO_2 consumo específico de oxígeno [mol/g.h]

X concentración de biomasa [g/l]

dcO_2/dt variación de la concentración de oxígeno disuelto en el tiempo [mol/l/h]

Este estado transitorio evoluciona hacia un estado estacionario donde el oxígeno transferido a la fase líquida es simultáneamente consumido por los microorganismos. En el estado estacionario:

$$k_L a (C^* - C_1) = qO_2 X \quad \text{ec. 3.3}$$

$$k_L a = qO_2 X / (C^* - C_1) \quad \text{ec. 3.4}$$

De la ecuación 3.3 se deduce que a partir del conocimiento del consumo de oxígeno de un microorganismo, es posible establecer las condiciones de transferencia necesarias para evitar que el crecimiento se vea limitado por la baja disponibilidad de este nutriente.

El máximo consumo específico de oxígeno de un microorganismo en un medio de cultivo dado, es el que se verifica en fase exponencial de crecimiento irrestricto. Por esta razón las muestras para el ensayo respirométrico de *B. pertussis* se tomaron de cultivos discontinuos en esta fase de crecimiento. Las muestras se tomaron en forma estéril y los ensayos respirométricos se llevaron a cabo según lo detallado en Materiales y Métodos.

El producto del consumo específico de oxígeno de estas células ($qO_{2,m}$) por la concentración máxima de biomasa (X_m) que es posible alcanzar en el medio de cultivo en estudio, representa la demanda máxima de oxígeno del cultivo. Se determinó que, el $qO_{2,m}$ de *B. pertussis* es 168 mmol O_2 /C-mol.h. Por otra parte, la X_m que se alcanza en el medio de cultivo empleado es aproximadamente 0.087 C-mol/l. En lo que se refiere a la concentración de oxígeno disuelto en el medio de cultivo (C_1) no hay datos bibliográficos acerca del nivel crítico para este

microorganismo. Por esta razón se eligió trabajar en un 20% del valor de saturación ($C^* = 0.182$ mmol O_2/l , a $36^\circ C$), nivel en el cual generalmente no hay limitación de crecimiento por oxígeno para ningún microorganismo. Teniendo en cuenta los resultados y consideraciones anteriores se reemplazaron los términos de la ecuación 3.4 por sus valores correspondientes, y se pudo establecer que el valor de $K_L a$ del biorreactor debía mantenerse alrededor de $100 h^{-1}$ para posibilitar un desarrollo celular no limitado en oxígeno.

3.2 Estudio de la influencia de la agitación y aireación sobre el $K_L a$ del tanque agitado a emplearse en el estudio cinético y estequiométrico.

Como ya se mencionó, el $K_L a$ de un biorreactor depende de muchas variables entre las cuales se encuentran: geometría del reactor, velocidad de agitación (N), caudal de aire por unidad de volumen (F/V), diámetro y geometría del agitador, presencia o ausencia de cortacorrientes, volumen de medio empleado, temperatura, presión, etc. La determinación del $K_L a$ del biorreactor a emplear en el cultivo de *B. pertussis*, se llevó a cabo según lo especificado en Materiales y Métodos. Se trabajó en condiciones de agitación y aireación variables modificando de a una variable por vez (N o F/V), manteniendo los demás parámetros que influyen en el $K_L a$, fijos en los valores a emplearse en el cultivo.

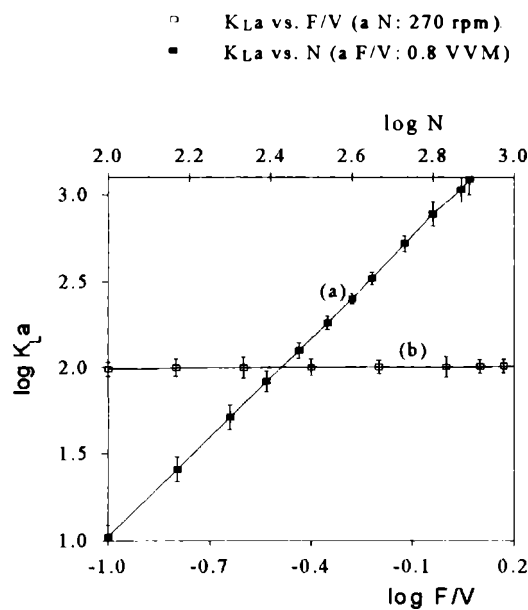


Figura 3.3: Influencia de la velocidad de agitación (a) y el nivel de aireación (b) en el $K_L a$ del biorreactor tipo tanque agitado (LKB), de 7 litros de capacidad, operado con un volumen de trabajo de 2.5 litros, a $36^\circ C$. El biorreactor posee cuatro cortacorrientes, agitador de paletas planas y aireación en profundidad.

En la Figura 3.3 (a) se muestra la curva obtenida para un volumen de trabajo de 2.5 L y una temperatura de $36^\circ C$. El caudal de aire se mantuvo en 0.8 VVM y la velocidad de agitación

varió entre 100 y 800 rpm. La ecuación empírica ($p < 0.01$) que determina la curva de la Figura 3.3 (a) es la siguiente

$$k_L a = 2.5 \times 10^{-4} (N)^{2.31} \quad \text{ec. 3.5}$$

De este estudio se deduce que para obtener un $K_L a$ de 100 h^{-1} debería seleccionarse, como condición de operación para el estudio de la cinética y estequiometría de crecimiento de *B. pertussis*, una velocidad de agitación (N) de 270 rpm si el nivel de aireación es de 0.80 l/l min.

Con el fin de establecer la influencia de la aireación en la transferencia de oxígeno en la zona de trabajo, se determinó el rango de valores de $K_L a$ obtenidos para el mismo reactor, en condiciones idénticas a las anteriores pero manteniendo fija la velocidad de agitación en 270 rpm y variando el caudal de aire por unidad de volumen entre 0.1 y 1.5 VVM. En la Figura 3.3 (b) se puede ver que, para el rango de aireación testado, esta variable de proceso no ejerce una marcada influencia sobre los niveles de transferencia de oxígeno alcanzados en el equipo. Fue posible establecer la siguiente ecuación empírica ($P < 0.01$) para la curva de la Figura 3.3 (b)

$$k_L a = 100.4 (F / V)^{0.02} \quad \text{ec. 3.6}$$

Cabe señalar que, teniendo en cuenta que los agentes antiespumantes disminuyen la transferencia de O_2 , todas las determinaciones se llevaron a cabo agregando al biorreactor una concentración de 1g/l del antiespumante a utilizar en el cultivo.

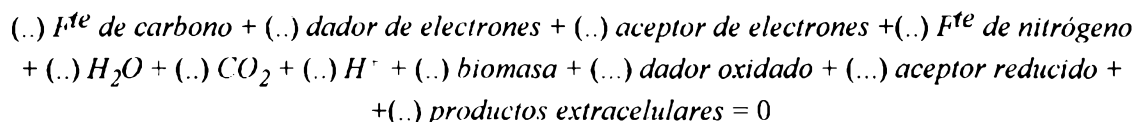
3.3. Descripción cinética y estequiométrica del crecimiento de *B. pertussis* en sistema de cultivo batch.

Con los resultados anteriores se establecieron las condiciones iniciales de medio de cultivo y operación para el cultivo de *Bordetella pertussis* en tanque agitado. Como ya se mencionó, esta escala de trabajo es la apropiada para llevar a cabo la determinación precisa de los parámetros cinéticos y estequiométricos que caracterizan un crecimiento microbiano.

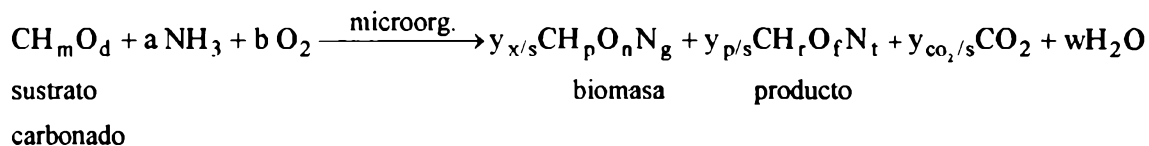
3.3.a. Estequiometría del crecimiento de *B. pertussis*

El estudio de la conversión microbiológica de nutrientes en biomasa y demás productos tiene como objeto establecer la relación existente entre consumo de sustrato, obtención de energía, formación de nuevo material celular y formación de producto. Durante el desarrollo celular existen relaciones fijas entre los rendimientos de biomasa, producto, el consumo de oxígeno y la generación de calor. El conocimiento de estas relaciones resulta indispensable para definir cualquier estrategia de optimización. Minkevich y Eroshin¹⁴⁰ fueron los primeros que describieron la correspondencia existente entre el consumo de fuente de carbono, de energía, de nitrógeno y oxígeno; con la formación de biomasa, dióxido de carbono, otros productos extracelulares y calor. Estos autores describen el crecimiento microbiano como una ecuación

química, que tiene la particularidad de ser autocatalítica. Así, basándose en la descripción general del crecimiento microbiano, se puede escribir una ecuación macroquímica del tipo:



Con el fin de facilitar los balances de materia y de energía (o grado de reducción), los productos y reactivos se representan mediante sus "fórmulas mínimas", que son aquellas que contienen solo un átomo de carbono en su composición. Así se define el C-mol (o Cmol) de un producto o reactivo como la cantidad del mismo que contiene un átomo gramo de carbono. Por otra parte, a la fuente de carbono y energía se le asigna el coeficiente estequiométrico 1 (uno), para que el resto de los coeficientes estequiométricos queden normalizados respecto a este nutriente. Teniendo en cuenta estas consideraciones, el crecimiento de un microorganismo aerobio, cultivado en un medio donde la fuente de carbono es también fuente de energía, puede escribirse de la siguiente forma:



ec. 3.7

Donde:

- a mol de amonio consumido por C-mol de sustrato carbonado consumido
- b C-mol de oxígeno consumido por C-mol de sustrato carbonado consumido
- $y_{x/s}$ C-mol de biomasa producida por C-mol de sustrato carbonado consumido
- $y_{p/s}$ C-mol de producto extracelular formado por C-mol de sustrato carbonado consumido
- $y_{co_2/s}$ C-mol de dióxido de carbono producido por C-mol de sustrato carbonado consumido

Como en cualquier ecuación química se pueden realizar dos tipos de balances: el balance de materia (para cada elemento) y el balance de energía o de grado de reducción. Entre los balances de materia de mayor utilidad están:

1. El balance de carbono:

$$y_{x/s} + y_{p/s} + y_{co_2/s} = 1 \qquad \text{ec. 3.8}$$

2. El balance de nitrógeno:

$$g y_{x/s} + t y_{p/s} = a \qquad \text{ec. 3.9}$$

El balance de energía o grado de reducción se realiza teniendo en cuenta el número de electrones que cada compuesto puede transferir al oxígeno. Así, el grado de reducción del

sustrato carbonado, biomasa y productos respectivamente, pueden ser calculados, según Minkevich y Eroshin¹⁴⁰, como sigue:

$$\begin{aligned}\gamma_s &= 4 + m - 2d \\ \gamma_x &= 4 + p - 2n - 3g \quad \text{ec. 3.10} \\ \gamma_p &= 4 + r - 2f - 3t \quad \text{ec. 3.10}\end{aligned}$$

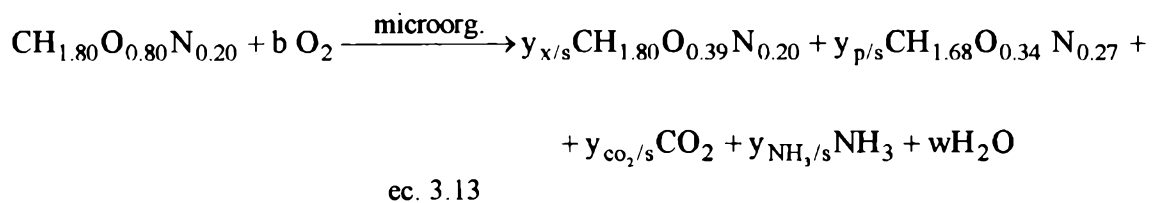
Donde γ es el número de electrones disponibles por C-mol de compuesto. El grado de reducción de un compuesto se calcula como la sumatoria de los electrones disponibles de los elementos que lo componen, esto es: carbono = 4, hidrógeno = 1, oxígeno = -2, y nitrógeno = -3. El grado de reducción del C, H y O surgen de considerar al H₂O y al CO₂ como estados de referencia. El grado de reducción: -3 del nitrógeno surge de considerar, arbitrariamente, al NH₃ como estado de referencia. De esta manera, estamos en condiciones de plantear una ecuación de balance de grado de reducción para la ecuación de crecimiento 3.7:

$$\gamma_s - 4b = y_{x/s}\gamma_x + y_{p/s}\gamma_p \quad \text{ec. 3.11}$$

$$y_{x/s} \frac{\gamma_x}{\gamma_s} + y_{p/s} \frac{\gamma_p}{\gamma_s} + \frac{4b}{\gamma_s} = 1 \quad \text{ec. 3.12}$$

La formulación del medio de cultivo empleado en el presente estudio determina que el sustrato limitante del crecimiento es la fuente de carbono y energía (glutamato). Este aminoácido es también fuente de nitrógeno. El primer paso en la ruta metabólica de utilización del glutamato es una desaminación oxidativa¹⁰⁵. Cabe destacar que, los demás aminoácidos presentes en el medio de cultivo son micronutrientes que cumplen funciones tales como factores de crecimiento y/o determinantes del potencial redox. Por esta razón, al plantear la ecuación 3.7 para representar el balance estequiométrico del crecimiento de *B. pertussis*, se considera únicamente al glutamato como sustrato carbonado. La fórmula del C-mol de biomasa de *Bordetella pertussis* fue tomado de datos bibliográficos. Los únicos productos extracelulares considerados son las proteínas excretadas al medio de cultivo. Se tuvo en cuenta la composición media de las proteínas¹⁴¹ para calcular su fórmula mínima. Cabe señalar que, si existiera formación de otro producto y el mismo no fuese considerando en el análisis estequiométrico, los balances de masa y energía darán cuenta de ello.

Así entonces, reemplazando en la ecuación 3.7, el crecimiento de *Bordetella pertussis* se puede describir según la ecuación siguiente:



Según estas fórmulas mínimas, los pesos moleculares correspondientes al C-mol de sustrato, biomasa, y producto serán, respectivamente: 29.40, 22.84 y 22.90 g/C-mol. Así como sus respectivos grados de reducción serán: 3.6, 4.4 y 4.2.

El cálculo de los coeficientes estequiométricos de la formación de biomasa y productos se realizó a partir de la determinación del sustrato consumido, en función de la biomasa y los productos formados durante el cultivo en sistema batch.

El cálculo de los coeficientes estequiométrico del O_2 y CO_2 , se realizó a partir del balance de materia en fase gaseosa. Para la determinación del coeficiente estequiométrico del O_2 consumido se calculó, en primer lugar, la velocidad de consumo de oxígeno (r_{O_2} [mmol/l.h]) a lo largo del crecimiento en batch, como se detalla en Materiales y Métodos. Así, integrando dichas velocidades a lo largo del tiempo en el que transcurrió el proceso, y corrigiendo el valor obtenido en función del glutamato total consumido durante el batch, se calcula el consumo global de oxígeno por carbono mol de fuente de carbono y energía. La determinación del coeficiente estequiométrico del CO_2 producido se calcula de manera similar, integrando los valores de velocidad de producción de CO_2 (r_{CO_2} [mmol/l.h]) entre el tiempo inicial y final de proceso, y corrigiendo luego según el glutamato consumido en ese tiempo. En las Figuras 3.4 A y B, se observa la variación de ambas velocidades durante el proceso.

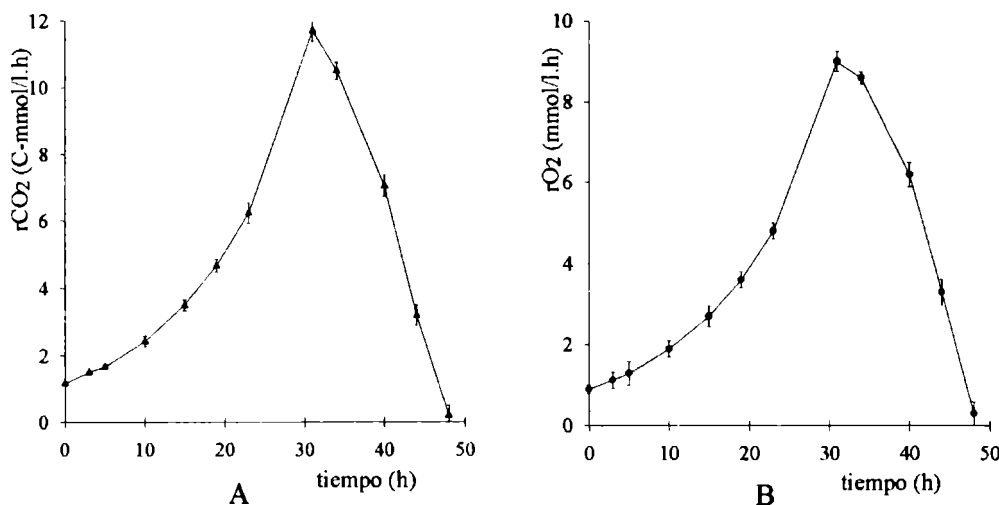
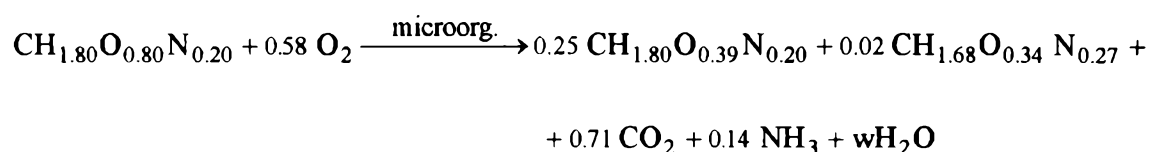


Figura 3.4: Cinética de producción de CO_2 (A), y de consumo de O_2 (B) durante el crecimiento en batch de *B. pertussis* en medio SSE. Escala de trabajo: tanques agitados de 7 litros de capacidad, operado con un volumen de trabajo de 2.5 litros, a 36°C. $K_L a$: 100 h⁻¹

En las condiciones de trabajo del presente estudio se encontró que por cada C-mol de glutamato metabolizado se consumen 0.58 moles de O_2 , y se producen 0.25 C-mol de biomasa, 0.024 C-mol de proteína y 0.71 C-mol de CO_2 .

El glutamato es fuente de carbono y energía, pero también es fuente de nitrógeno. Del balance de masa para este elemento, ecuación 3.9, es posible comprobar que solo un 30% del nitrógeno aportado por el glutamato se fija en la biomasa y proteína extracelular. El 70% restante se liberaría al medio de cultivo. Esta consideración se vio confirmada por medidas de amonio en el sobrenadante de cultivo de fase estacionaria de crecimiento, donde se pudo verificar la presencia de este catión en una concentración 30 mM. Por cálculos teóricos este valor estaría levemente por debajo de lo esperado, lo cual puede atribuirse a las condiciones de temperatura y pH en las que se lleva a cabo el crecimiento (36°C y pH alcalino), que favorecen el pasaje de este ion a la fase gaseosa en la forma de NH_3 . Esta acumulación de amonio deberá ser motivo de estudio a la luz de investigaciones llevadas a cabo en otras bacterias Gram negativas donde se pudo comprobar que la presencia de amonio en el espacio extracelular conduce a alteraciones metabólicas y estructurales en la membrana externa^{142,143}.

Finalmente, reemplazando en la ecuación 3.13, el crecimiento de *Bordetella pertussis* puede describirse según la siguiente ecuación:



ec. 3.14

El glutamato es el sustrato limitante del crecimiento, pero este nutriente es a la vez fuente de carbono y de energía. Teniendo en cuenta que el grado de reducción de la biomasa es mayor que el grado de reducción del glutamato, es evidente que el crecimiento de *Bordetella pertussis* en este medio de cultivo no está limitado en carbono sino en energía¹⁴⁴. Esto explica los bajos rendimientos de biomasa y productos extracelulares, frente a la elevada producción de dióxido de carbono.

El análisis de consistencia interna, realizado reemplazando los términos de las ecuaciones 3.8 y 3.12 por los valores correspondientes obtenidos experimentalmente, arrojan los siguientes resultados:

$$\text{C} \rightarrow 0.25 + 0.71 + 0.02 = 0.98$$

ec. 3.15

$$\gamma \rightarrow 0.25 \frac{4.4}{3.6} + 0.02 \frac{4.2}{3.6} + 0.58 \frac{4.0}{3.6} = 0.97$$

Como se puede ver, tanto el balance de carbono como el de grado de reducción dan valores muy cercanos a la unidad. Esto nos hace suponer que no se comete un error significativo al considerar que el carbono del glutamato queda retenido íntegramente en la biomasa, el CO_2 , y las proteínas extracelulares; y que sus electrones son transferidos únicamente al O_2 , la biomasa y las

proteínas extracelulares. A partir de estos resultados es posible inferir que, si existiese algún otro producto (carbonado o no) que no se está considerando, su producción es lo suficientemente baja como para pasar inadvertida en los balances de materia y energía. Se ha encontrado que durante el desarrollo celular, *Bordetella pertussis* libera lipopolisacárido (LPS) de membrana externa al medio extracelular. Debido a que aún no se ha establecido la estructura exacta de este componente para *Bordetella pertussis* (la cual además varía con las condiciones de cultivo), no es posible establecer una fórmula mínima y así incorporarlo a los balances. De todas formas, la cantidad de LPS liberado al medio extracelular es insignificante en términos del balance de carbono y energía.

3.3.b. Cinética del crecimiento de *B. pertussis*

El objetivo principal de un estudio cinético es describir la velocidad de cambio del sistema en estudio y por lo tanto, la evolución de dicho sistema en el tiempo. Así la caracterización cinética del crecimiento microbiano consiste en definir el perfil de velocidades de cambio en las concentraciones de sustratos, biomasa y otros productos de interés.

La caracterización cinética del crecimiento irrestricto de *Bordetella pertussis* que se detalla en este capítulo está referida exclusivamente al estudio de la velocidad con que transcurre, en un sistema de cultivo cerrado (sistema de cultivo batch o discontinuo), la conversión microbiológica de nutrientes en biomasa y demás productos extracelulares.

A lo largo de un cultivo microbiano llevado a cabo en un sistema de este tipo se pueden reconocer al menos cuatro fases de crecimiento. La primera es un período de latencia, donde no se verifica crecimiento, cuya extensión depende de la edad y tamaño del inóculo que se utilice y de la capacidad de adaptación del microorganismo al medio de cultivo. La siguiente etapa es la de crecimiento exponencial, donde la velocidad específica de crecimiento es máxima y constante. Esta etapa se prolonga hasta que comienza a agotarse uno de los nutrientes del medio de cultivo (este nutriente es al que se denomina sustrato limitante). En este momento comienza la fase de desaceleración, donde la velocidad específica de crecimiento disminuye con el tiempo hasta que, finalmente, el crecimiento se detiene por completo y comienza la fase estacionaria.

El desarrollo celular de un microorganismo en un sistema de cultivo de este tipo, en presencia de los nutrientes adecuados y en ausencia de inhibidores de crecimiento, puede describirse según la siguiente ecuación¹⁴⁴:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{ec. 3.16}$$

Donde:

- dx/dt velocidad de acumulación de biomasa [C-mol/l.h].
 μ velocidad específica de crecimiento [h^{-1}].
 X concentración de biomasa [C-mol/l].

Según el modelo cinético de crecimiento microbiano propuesto por Monod¹⁴⁵:



$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S} \quad \text{ec. 3.17}$$

Donde:

K_s constante de saturación aparente del sustrato limitante [C-mol/l].

μ_m velocidad específica máxima de crecimiento [h^{-1}].

S concentración de sustrato limitante [C-mol/l].

Así, según este modelo:

Si $S \gg K_s \rightarrow \mu$ es una constante = μ_m (característico de fase exponencial)

Si $S \cong K_s \rightarrow \mu$ disminuye con la disminución de la concentración del sustrato limitante del crecimiento (característico de fase de desaceleración).

Por lo tanto, la integral de la ecuación 3.16, durante la fase exponencial de crecimiento da lugar a la siguiente expresión:

$$\ln X = \ln X_0 + t \mu_m \quad \text{ec. 3.18}$$

Donde:

X_0 concentración inicial de biomasa al tiempo: $t = 0$ [C-mol/l].

X concentración de biomasa al tiempo: t [C-mol/l].

El crecimiento microbiano, como ya se ha mencionado, va acompañado de consumo de nutrientes (entre los cuales está el O_2) y formación de productos asociados al desarrollo celular (entre los que se encuentra el CO_2). Así, la cinética de consumo y producción de estas sustancias en sistema de cultivo batch, se puede describir según:

$$\frac{dO_2}{dt} = q_{O_2} X \quad \frac{dCO_2}{dt} = q_{CO_2} X$$

$$\frac{dS}{dt} = q_S X \quad \frac{dP}{dt} = q_P X$$

Donde:

dO_2/dt velocidad de consumo de oxígeno [mol/l.h].

dCO_2/dt velocidad de formación de dióxido de carbono [C-mol/l.h].

dS/dt velocidad de consumo de sustrato [C-mol/l.h].

dP/dt velocidad de acumulación de proteínas [C-mol/h.l].

q_{O_2} velocidad específica de consumo de oxígeno [mol/C-mol.h]

q_{CO_2} velocidad específica de formación de dióxido de carbono [C-mol/C-mol.h]

q_S velocidad específica de consumo de sustrato [C-mol/C-mol.h]

q_P velocidad específica de producción de proteínas [C-mol/C-mol.h]

X concentración de biomasa [C-mol/l].

Si el crecimiento microbiano y el consumo de sustrato se ajustan a la ecuación 3.17, entonces las velocidades específicas de consumo de nutrientes y formación de productos, muestran una dependencia con el sustrato limitante similar a la descrita para la velocidad específica de crecimiento; de manera tal que, en fase exponencial de crecimiento dichas velocidades específicas son máximas y caracterizan el crecimiento del microorganismo.

La Figura 3.5 muestra la cinética de producción de células y antígenos de *Bordetella pertussis* en el medio SSE. El desarrollo celular se ajusta al modelo de crecimiento irrestricto mencionado anteriormente. Se puede observar una fase exponencial de crecimiento que se mantiene aproximadamente 30 hs., luego de la cual comienza la fase de desaceleración

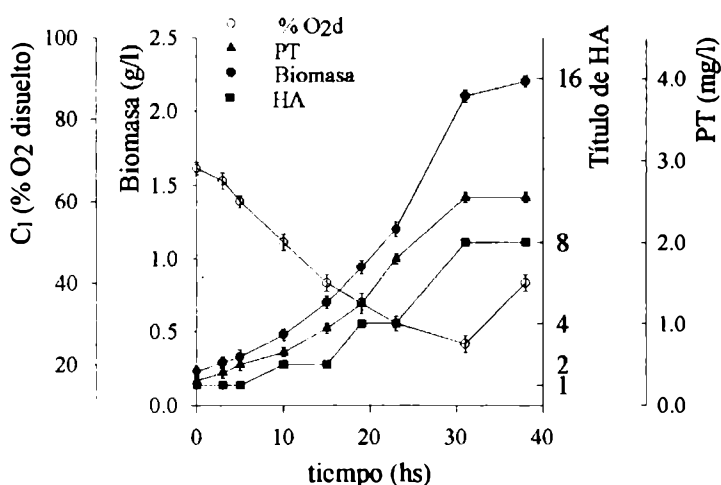


Figura 3.5: Evolución del oxígeno disuelto y cinética de producción de células y antígenos durante el cultivo de *B. pertussis* en medio SSE. Escala de trabajo: tanques agitados de 7 litros de capacidad, operado con un volumen de trabajo de 2.5 litros, a 36°C. $K_L a$: 100 h⁻¹

Usando el modelo matemático descrito y los datos experimentales recogidos en fase líquida y gaseosa durante periodo exponencial de crecimiento se estimó, por balance de materia en ambas fases, que *B. pertussis* en este medio de cultivo desarrolla una velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) de 0.073 h⁻¹, una velocidad específica máxima de consumo de O₂ (q_{O_2m}) de 0.17 mol O₂/C-mol.h, una velocidad específica máxima de consumo de glutamato (q_{Sm}) de 0.29 C-mol S/C-mol.h, una velocidad específica máxima de producción de CO₂ (q_{CO_2m}): 0.21 C-mol CO₂/C-mol.h, y una velocidad específica máxima de liberación de proteínas (q_{Pm})de 0.0098 C-mol P/C-mol.

En lo que se refiere a la producción de antígenos solubles, en la Figura 3.5 se puede ver que la concentración de los mismos en el medio de cultivo alcanza un máximo al final de la fase exponencial de crecimiento. Un resultado particularmente interesante es el aumento de la producción específica de dichos antígenos y la acumulación de LPS que se verifica durante el desarrollo celular. Esto podría explicarse en términos de reportes bibliográficos^{146,147} que proponen como método de excreción de antígenos la asociación de los mismos a restos de membrana externa. De todas formas, a partir de los resultados presentados no es posible realizar ninguna especulación al respecto. Sobre este punto y el efecto del entorno sobre la producción específica de antígenos se vuelve en capítulos posteriores.

DISCUSIÓN

La caracterización cinética y estequiométrica de un cultivo líquido requiere un muestreo adecuado y un control estricto de los parámetros fisicoquímicos del entorno. Tales requisitos solo pueden cumplirse en una escala de trabajo y tipo de biorreactor adecuados. Por esta razón, en el presente estudio se empleó un biorreactor tipo tanque agitado, 2.5 l de volumen de trabajo, equipado con los sensores y controladores necesarios para el control automático de las variables fisicoquímicas.

Para llevar a cabo un cultivo en este tipo de biorreactores debieron realizarse algunos ajustes previos de medio de cultivo y condiciones de operación, que arrojaron los siguientes resultados:

En lo que se refiere al medio de cultivo se pudo comprobar que el agregado de 0.75 g/l de extracto de levadura al medio SS evita la aparición de fase de latencia, posibilita un mejor aprovechamiento de los nutrientes, y permite el empleo de agentes antiespumantes sin perjuicio de los rendimientos celulares o antigénicos. Los resultados obtenidos sugieren: a) que la fase de latencia que se verifica en el medio SS es un tiempo de adaptación metabólica al pasar de un medio de cultivo rico (ABGs) a un medio sintético (SS). El agregado de extracto de levadura aportaría los componentes que de otra manera el microorganismo debería sintetizar, retardándose así el crecimiento. En apoyo de esta observación, se pudo comprobar que después de sucesivos pasajes por el medio SS la fase de latencia disminuye. b) El efecto observado sobre la concentración final de células y antígenos podría estar relacionado con la captura de inhibidores de crecimiento. Como ya se mencionó, *B. pertussis* libera al medio de cultivo sustancias tóxicas durante su crecimiento. Ha sido sugerido que podría tratarse de ac. grasos que se acumularían provocando la inhibición del crecimiento celular. Esta hipótesis se vio en parte confirmada porque el agregado de sustancias con propiedades complejantes (carbón activado, albúmina, etc.) al medio de cultivo revirtió esta situación posibilitando un buen desarrollo celular. Teniendo en cuenta esto, es posible suponer que el aumento observado en los niveles de biomasa cuando se agrega E.I. al medio SS, se deba fundamentalmente a las propiedades complejantes que pudieran tener algunos componentes del extracto de levadura (péptidos, etc.). Ensayos de determinación de sustrato limitante de crecimiento (glutamato) en sobrenadante de estacionaria de cultivos llevados a cabo en SS y SSE demostraron que dicho nutriente sólo se consume totalmente en cuando se agrega E.I. al medio SS, indicando claramente que la causa de la detención del crecimiento en el medio SS no es el agotamiento de los nutrientes.

El aumento verificado en los niveles extracelulares de FHA y PT sería consecuencia del aumento de biomasa y no una acción directa de algún componente del E.I. sobre los mecanismos de excreción de antígenos, ya que la producción específica de los mismos no se modifica por el agregado de E.I. al medio de cultivo.

Por otra parte la incorporación de este agente al medio SS permite el empleo de antiespumante en concentraciones suficientes para el control de espuma sin afectar la producción celular ni antigénica

Es importante destacar que el E.I., agregado al medio SS en una concentración de 0.75 g/l, hace una aporte mínimo macronutrientes que puede ser considerado despreciable.

En lo que se refiere al ajuste de las condiciones de operación se determinó que, la demanda de oxígeno de *B. pertussis* establece que el $K_L a$ del biorreactor en el que se pretende cultivar a este microorganismo no puede ser inferior a 100 h^{-1} , si se quiere evitar que el desarrollo celular se limite por suministro insuficiente de oxígeno. Se estudió la capacidad de transferencia de oxígeno del biorreactor a utilizar y se definieron las condiciones de agitación/aireación en las que debía llevarse a cabo el cultivo para que el único sustrato limitante del crecimiento sea el glutamato.

El glutamato es a la vez fuente de carbono, energía y nitrógeno. Dado que este aminoácido tiene un estado de reducción menor que la biomasa, el desarrollo celular de *Bordetella pertussis* en este medio de cultivo resulta, en realidad, limitado en energía. Esto trae como consecuencia una alta tasa de producción de dióxido de carbono y NH_3 , conjuntamente con bajos rendimientos celulares.

En el sistema de cultivo batch se puso en evidencia una relación directa entre el crecimiento exponencial y la excreción de antígenos de *Bordetella pertussis*. Se pudo determinar que la velocidad de acumulación de biomasa y antígenos en el espacio extracelular presentan perfiles similares. Esto estaría indicando que la fase de crecimiento exponencial es la más apropiada para la producción de este tipo de antígenos. Por lo tanto, una extensión de este período de crecimiento implicaría prolongar la fase de producción antigénica. Evidentemente, esto podría lograrse empleando un sistema de cultivo como el continuo, en el cual el microorganismo se está duplicando durante todo el tiempo de proceso.

En lo que se refiere a la producción de antígenos por unidad de biomasa, se encontró que no se mantiene constante durante el crecimiento exponencial sino que aumenta con el tiempo. En este tipo de sistema cerrado de cultivo las condiciones de entorno varían permanentemente por lo que resulta imposible atribuir el fenómeno observado a algún parámetro de cultivo en particular. Conocer la causa de este aumento en los rendimientos antigénicos implicaría poder manejar la variable responsable con el fin de optimizar el proceso de producción de los mismos. Para estudiar cada variable de proceso por separado y comprobar su influencia en dichos rendimientos es necesario el empleo de un tipo de sistema de cultivo diferente: el cultivo continuo (capítulo 5).

Por último, durante el crecimiento se observó también una acumulación de LPS en el medio extracelular. Este componente es endotóxico y por lo tanto debe ser eliminado en el proceso de recuperación de antígenos del sobrenadante de medio de cultivo con vistas a la formulación de vacunas. Por esta razón resulta de suma importancia estudiar si se libera conjuntamente con los antígenos y si es posible desacoplar ambas excreciones.

La caracterización del cultivo de *Bordetella pertussis* desde el punto de vista cinético y estequiométrico llevada a cabo en este trabajo, permite la extrapolación de los resultados obtenidos a escalas de producción mayores y constituye el paso inicial indispensable para la evaluación de la influencia de los distintos efectores ambientales sobre la fisiología de *B. pertussis*.

Capítulo 4

*Influencia de la fluidodinámica del cultivo
sobre los principales antígenos celulares y
extracelulares*

Capítulo 4: Influencia de la fluidodinámica del cultivo sobre los principales antígenos celulares y extracelulares

Breve reseña teórica de la fluidodinámica y esfuerzo de corte en biorreactores	56
Resultados	59
4.1. Estudio del origen de la pérdida de HA en el medio extracelular de cultivos agitados de <i>B. pertussis</i>	59
4.2 Efecto de las fuerzas de corte sobre los antígenos celulares de <i>B. pertussis</i>	65
Discusión	68

Como se ha mencionado anteriormente, *Bordetella pertussis* produce y libera al medio de cultivo dos hemaglutininas: FHA y PT. La actividad hemaglutinante específica de FHA es siete veces mayor que la de PT³⁸. FHA es una proteína de tipo filamentosa de 2 nm de diámetro y 100 nm de largo. PT, en cambio, es una proteína de tipo globular de 6 nm de diámetro. Se ha reportado que la producción de estos inmunógenos muestra una gran dependencia de las condiciones de cultivo¹¹⁷. Solamente en sobrenadante de cultivos estáticos se obtienen altos títulos de actividad hemaglutinante (HA).

En los sistemas agitados se generan esfuerzos cortantes en el seno del líquido, que están directamente relacionados con la energía entregada al sistema. Existen numerosos reportes bibliográficos que dan cuenta de daño celular^{148,149}, inactivación de enzimas¹⁵⁰ y ruptura de polímeros¹⁵¹ en este tipo de sistemas, como consecuencia de dichas fuerzas de corte.

Siendo FHA una proteína de tipo filamentosa (lo cual podría hacerla especialmente sensible a estos esfuerzos cortantes), y habiendo sido reportado que sólo la molécula entera de FHA (220-210 kDa) exhibe actividad hemaglutinante, es posible suponer que la pérdida de dicha actividad en cultivos agitados pueda deberse a una ruptura de la molécula de proteína por efecto de las fuerzas de cizalla generadas por la agitación.

En este capítulo se intenta establecer si es esta la causa de la pérdida de HA en el sobrenadante de cultivo; si en dicha pérdida está involucrada solamente FHA o también PT (que es la otra hemaglutinina presente), y si los antígenos anclados a la membrana celular, entre los que se encuentran FHA, PT y fimbrias, resultan afectados de alguna forma por las condiciones de operación.

Breve reseña teórica de la fluidodinámica y esfuerzo de corte en biorreactores

En esta sección se pretende hacer una breve reseña de los aspectos fundamentales de la hidrodinámica de un fluido moviéndose según un patrón de flujo laminar o turbulento y de las interacciones fluido↔sólidos suspendidos en el líquido en movimiento.

El movimiento de un líquido Newtoniano dentro de un biorreactor (o cualquier otro sistema donde un fluido se encuentre contenido y en movimiento) puede ser descripto a través del número de Reynolds (R_e), que es un número adimensional que surge de la relación entre las fuerzas inerciales y las fuerzas viscosas que se generan en el seno del líquido como consecuencia del movimiento del fluido. Según Rushton & Oldshue¹⁵², el R_e de un tanque agitado queda definido por:

$$R_e \text{ (biorreactor)} = \frac{\text{Fuerzas inerciales}}{\text{Fuerzas viscosas}} = \frac{\rho N D^2}{\eta} \quad \text{ec. 4.1}$$

Donde: ρ es la densidad aparente del cultivo, N es la velocidad del agitador, D es el diámetro del agitador, y η es la viscosidad del cultivo.

Así, el R_e es una medida de las propiedades físicas de un fluido en movimiento y queda determinado por el régimen de flujo del mismo. Cuando un sistema se encuentra en régimen

laminar su $Re < 10$, cuando opera en régimen turbulento su $Re > 10^3$ y cuando está en régimen de transición su $10 < Re < 10^3$. Así, en teoría, es posible pasar de un tipo de régimen a otro variando alguno de los parámetros de los que depende el Re . Cada régimen de flujo posee determinada fluidodinámica que lo caracteriza, de la cual depende el esfuerzo de corte generado en el seno del líquido. El esfuerzo cortante y la transferencia de masa y calor dentro del biorreactor están íntimamente relacionados. Un mezclado más eficiente generalmente implica un mayor esfuerzo de corte. Las fuerzas de cizalla que se generan en estas condiciones pueden tener efectos indeseables sobre los sólidos en suspensión. Como se mencionó anteriormente, se han reportado daños de distinta magnitud sobre materiales biológicos^{148,149,150} como consecuencia de dichas fuerzas.

En un sistema de flujo laminar la cantidad de movimiento se transmite de una lámina a otra. Es un flujo regular que involucra gradientes de velocidad. Las fuerzas viscosas dominan el flujo. Un flujo de tipo laminar en un tanque agitado genera un perfil de velocidades paralelo a la superficie del biorreactor. El movimiento del líquido se produce a través de grandes remolinos formados alrededor del agitador y con su mismo sentido de giro. El gradiente transversal de velocidades causa un esfuerzo cortante (τ), proporcional a dicho gradiente. Así el esfuerzo de corte en este tipo de régimen se calcula según:

$$\tau = \eta \frac{dv}{dx} \quad \text{ec. 4.2}$$

Donde: τ es el esfuerzo de corte, η es la viscosidad del cultivo y dv/dx es el gradiente de velocidad a lo largo del eje x .

Este esfuerzo cortante se traduce en fuerzas compresivas y extensivas en los ejes del elemento de fluido o de la partícula en suspensión, y en la rotación de los mismos. Este tipo de régimen produce un esfuerzo de corte relativamente bajo en relación al que se produce en régimen turbulento.

Para la descripción del flujo de tipo turbulento se acepta la teoría de turbulencia isotrópica desarrollada por Kolmogoroff¹⁵³. 'Isotropía' significa: estadísticamente independiente de la dirección. Según este modelo, en un fluido en régimen turbulento puede distinguirse una macroescala definida por remolinos de gran tamaño que dependen de las características del flujo principal y son anisotrópicos. Estos remolinos son inestables, y a diferencia de lo que ocurre en el flujo laminar, se destruyen transfiriendo su energía a remolinos menores y así sucesivamente hasta alcanzar la microescala, definida por microrremolinos cuyo tamaño está determinado por la cantidad de energía entregada al sistema. La transferencia de energía entre los remolinos de distinto tamaño se produce en todas las direcciones y de esta manera la información direccional se pierde. De esta forma, el movimiento de los microrremolinos es independiente del movimiento del fluido en su conjunto y es a lo que se llama: isotropía. A nivel de la microescala es donde la energía cinética se disipa como calor. Los fenómenos de transporte de masa y energía se producen fundamentalmente a este nivel, como así también el esfuerzo cortante. Por esta razón el régimen turbulento es más eficiente en el transporte de masa y calor, en relación al régimen laminar, puesto que hay infinitos microrremolinos llevando a cabo los fenómenos de transporte en todas las direcciones. Cuanto mayor es la energía entregada al sistema, menor es el tamaño de la

microescala, lo cual redundará en un mezclado más eficiente, pero también en un aumento del esfuerzo cortante generado en el seno del líquido.

El orden de magnitud de la microescala (λ_0) propuesta en el modelo de Kolmogorff puede estimarse según la ecuación:

$$\lambda_0 = \left[\frac{\nu^3 \rho}{\bar{E}} \right] \quad \text{ec. 4.3}$$

Donde: ν es la viscosidad cinemática del cultivo, ρ es la densidad del cultivo y \bar{E} es la potencia media entregada al sistema vía el agitador y el aireador, por unidad de volumen.

Las interacciones entre el fluido y las partículas suspendidas en él, bajo un régimen de flujo turbulento, depende de los tamaños relativos del microrremolino y la partícula. Si el microrremolino es de mayor tamaño, entonces la partícula queda dentro de él y no se produce ningún efecto sobre la misma. En el otro extremo, si la partícula es mucho mayor que el microrremolino, éste 'flotará' a su alrededor sin afectarla. Por último, si la partícula en suspensión es del orden de magnitud de la microescala entonces podrá ser atrapada entre microrremolinos moviéndose en distintas direcciones. Las diferencias de presión instantáneas, y la energía cinética concentrada a lo largo de la partícula debido al gradiente de velocidad, son lo que causa la deformación y ruptura de la misma. También, si la partícula es del orden de magnitud de la microescala se producen colisiones entre partículas y entre las partículas y las superficies sólidas.

En régimen de flujo turbulento, el esfuerzo cortante producido es, entonces, directamente proporcional a la energía disipada en el sistema. En este sentido, el mejor parámetro para medir el esfuerzo de corte en turbulencia es la velocidad máxima de disipación local de energía (E_m). Este parámetro puede calcularse a partir de la siguiente fórmula¹⁵⁴:

$$E_m = 0.5 \bar{E} \left(\frac{D}{T} \right)^{-3} \quad \text{ec. 4.4}$$

Donde D y T son factores geométricos característicos del sistema que contiene el fluido en movimiento (en nuestro caso: el biorreactor).

RESULTADOS

4.1. Estudio del origen de la pérdida de HA en el medio extracelular de cultivos agitados de *B. pertussis*

El estudio del efecto de la agitación sobre la HA de sobrenadantes de cultivo se llevó a cabo en tanques agitados, ya que éste es el tipo de biorreactor que se emplea comúnmente para el cultivo de microorganismos en gran escala.

Se llevaron a cabo experimentos en sistema de cultivo batch. Se emplearon tanques agitados, equipados con cuatro cortacorrientes y aire inyectado en profundidad. Se operó a distintos niveles de velocidad de agitación (N) y caudal de aire por unidad de volumen (F/V). Las velocidades de agitación y los caudales de aireación empleados se eligieron de manera tal que en las cuatro condiciones de operación se mantuviera el $k_L a$ en un valor constante de 100 h^{-1} (Tabla 4.1). De esta forma, en todos los casos la población microbiana fue cultivada en las mismas condiciones de transferencia de oxígeno no limitante del crecimiento.

Previamente debieron llevarse a cabo determinaciones del $k_L a$ en distintas condiciones de operación de manera similar a lo descrito en el capítulo 3. De este modo, en los cuatro procesos se mantuvieron constantes todas las variables excepto la agitación y la aireación. Se empleó SSE como medio de cultivo.

La Tabla 4.1 muestra el efecto de las diferentes condiciones de operación sobre los valores máximos alcanzados para biomasa, PT soluble y HA del sobrenadante

Tabla 4.1: Efecto de las condiciones de operación del tanque agitado sobre la producción de biomasa, PT y HA extracelular de *B. pertussis*.

expt.	N* rpm	F/V* VVM	$R_c^{**} \cdot 10^{-4}$	P_p W	$A_{650\text{max}}$	HA _{max} título	PT _{max} mg/l
1	210	1.00	1.7	0.88	2.40	32	2.57
2	270	0.80	2.2	18.90	2.40	8	2.58
3	320	0.48	2.6	33.00	2.42	4	2.57
4	450	0.30	3.7	96.0	2.46	1	2.57

* El $K_L a$ se mantuvo en 100 h^{-1} .

** En todas las condiciones ensayadas la densidad del cultivo fue de $1 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}$ y la viscosidad de $1.3 \times 10^{-3} \text{ N} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$. El cultivo de *B. pertussis* aún en la máxima concentración de biomasa tiene un comportamiento Newtoniano.

Estos valores máximos se alcanzaron en las cuatro experiencias en el mismo tiempo de proceso: final de fase exponencial (Figura 4.1)

Como se puede ver, las concentraciones máximas de biomasa y PT fueron similares para las cuatro condiciones de operación. Los datos mostrados en la Tabla 4.1 corresponden a la media de cuatro determinaciones independientes con triplicados. Los datos se sometieron al análisis de varianza. Las medias se compararon según el test de Menor Diferencia Significativa ($\alpha < 0.05$) y los rendimientos de biomasa y PT no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Sin embargo, el título máximo de HA fue variando con las condiciones de cultivo. Cabe esperar que esta variación se deba a alguna modificación en FHA extracelular, ya que la otra hemaglutinina presente (PT) no mostró variación. Por otra parte, la actividad hemaglutinante de PT, como ya se mencionó, es considerablemente inferior a la de FHA.

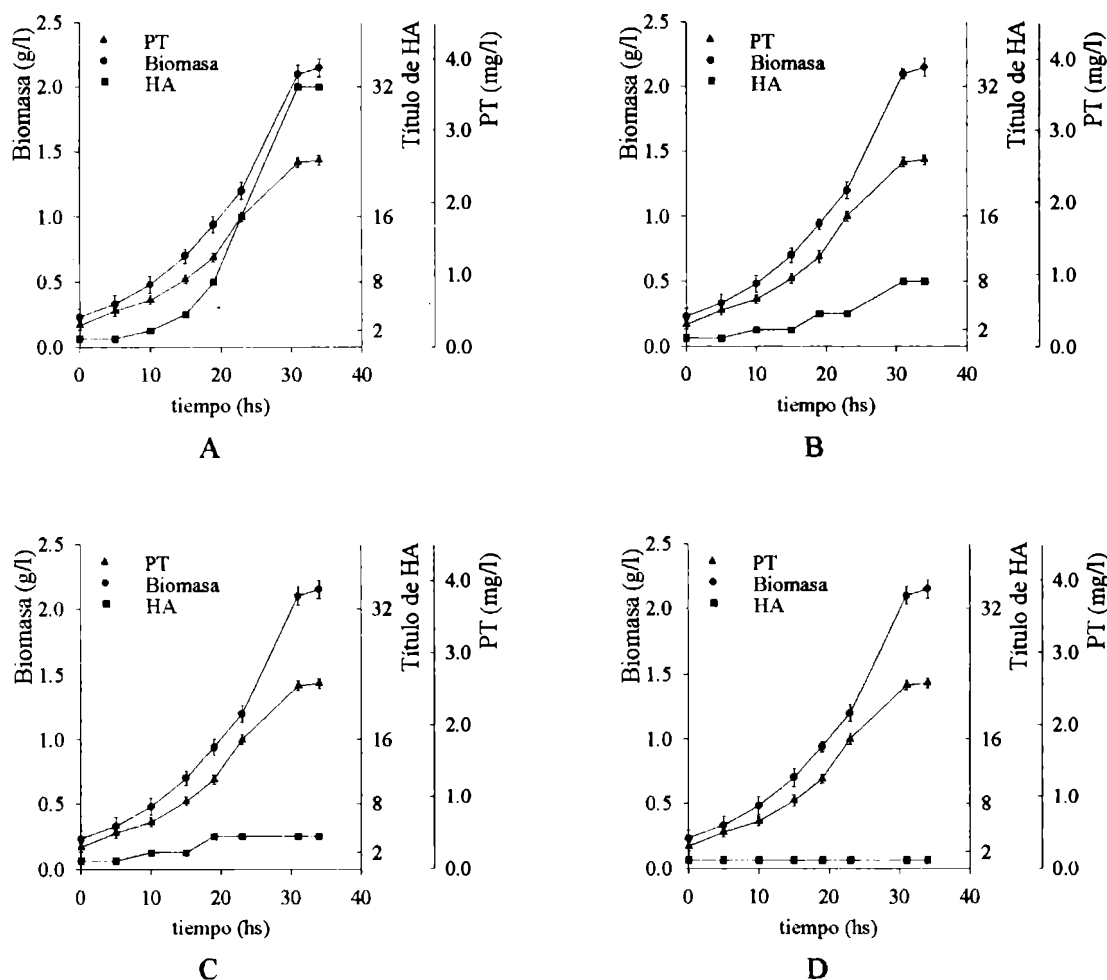


Figura 4.1: Efecto de las condiciones de operación del biorreactor en la cinética de crecimiento, la HA extracelular y la producción de PT extracelular de *B. pertussis*. Condiciones de operación empleadas: A) N=210, F/V=1.00 VVM; B) N=270, F/V=0.80 VVM; C) N=320, F/V=0.48 VVM; D) N=450, F/V=0.30 VVM.

En experimentos llevados a cabo en escala de frascos agitados, Gorringe y col.¹¹⁶ encontraron que la actividad hemaglutinante del sobrenadante de cultivo de *B. pertussis* disminuye con el aumento de la velocidad de agitación orbital del cultivo. Estos autores postularon que esto podría ser consecuencia de la formación de agregados de FHA, sin actividad hemaglutinante, que aparecerían en la superficie del líquido debido a la hidrofobicidad de la molécula de FHA. De acuerdo con esta teoría, la pérdida de HA estaría relacionada con el área interfacial generada en los cultivos agitados. A medida que aumenta el área interfacial, aumentaría la proporción de FHA comprometida en la formación de agregados. Es decir, HA debería disminuir a medida que el área interfacial aumentase. Sin embargo, bajo las condiciones de cultivo empleadas en el presente trabajo, esta relación no parece ajustarse a los resultados experimentales obtenidos (Tabla 4.1). Esto es, frente al mismo valor de $k_L a$, a medida que aumenta la agitación y disminuye el caudal de aire por unidad de volumen líquido en el reactor, cabría esperar que el área interfacial disminuya o, a lo sumo, no varíe. Según la teoría postulada por Gorringe y col., bajo estas condiciones la HA no debería disminuir, sino aumentar o no modificarse.

Los resultados obtenidos muestran una disminución en los niveles de HA a medida que aumenta la agitación y disminuye la aireación, con lo cual la teoría de la agregación superficial de FHA no puede explicar la pérdida de HA observada en los tanques agitados. Aunque no se puede descartar que exista cierto grado de agregación o pegado a superficies sólidas que contribuyan a la pérdida de HA, en el esquema experimental del presente estudio, no parece ser ésta la causa principal. Tampoco es posible atribuir la pérdida de HA a la proteólisis de la molécula de FHA (solo la proteína entera presenta HA) porque no se ha detectado actividad proteolítica en los sobrenadantes de medio de cultivo de las cuatro condiciones analizadas.

Se intentó establecer si la caída en los títulos hemaglutinantes del sobrenadante se debía a la ruptura de la molécula de FHA como consecuencia del esfuerzo cortante generado por la agitación del cultivo. En primer lugar debió determinarse el tipo de flujo hidrodinámico en las condiciones de trabajo para saber cómo evaluar el esfuerzo cortante en cada caso. Por lo cual, previamente fue necesario definir si el cultivo se comporta como un líquido Newtoniano o No-Newtoniano. Por medidas de viscosidad frente a esfuerzos de corte crecientes se precisó que el cultivo de *Bordetella pertussis*, aún en su máxima concentración de biomasa, presenta las características de un líquido Newtoniano. El número de Reynolds, calculado según la ecuación 4.1, demostró que en las cuatro condiciones de operación el cultivo se mantuvo en régimen de flujo turbulento. Teniendo en cuenta estos resultados, se puede esperar algún efecto sobre la molécula de FHA soluble si el tamaño de los microrremolinos formados en el seno del líquido es similar al de dicha proteína. Empleando la ecuación 4.3 se estimó la magnitud de la microescala generada en las cuatro condiciones de operación ensayadas, pudiendo comprobarse que el tamaño de los microrremolinos es del orden de magnitud de FHA en todos los casos. A partir de estos resultados, y teniendo en cuenta la naturaleza fibrilar de FHA, es posible suponer que la particular estructura de esta proteína resulte dañada al entrar en zonas de alta turbulencia donde sería capturada entre remolinos moviéndose en distintas direcciones¹⁵¹. El gradiente de velocidad, transformado en energía cinética localizada en un punto, podría romper la cadena proteica de FHA. Así, es posible esperar cierto grado de ruptura que será mayor al aumentar el esfuerzo

cortante. Es de esperar que el grado de ruptura se ponga de manifiesto a través del grado de pérdida de actividad hemaglutinante ya que sólo la proteína entera presenta esta actividad²⁰.

Como se ha mencionado, el mejor parámetro para evaluar el esfuerzo cortante en un régimen de flujo turbulento es la velocidad máxima de disipación local de energía (E_m). En la ecuación 4.4, se puede ver que dicho parámetro depende de la potencia media entregada al sistema vía el agitador y el aireador, por unidad de volumen (\bar{E}) y de dos factores geométricos: D y T . Estos últimos permanecen constantes en las cuatro condiciones de trabajo testadas; por lo tanto, el parámetro con el que se puede evaluar la variación del esfuerzo de corte en las distintas condiciones de trabajo, es directamente \bar{E} .

La Figura 4.2 muestra la variación de los niveles máximos de PT y HA alcanzados en cada condición, en función de \bar{E} .

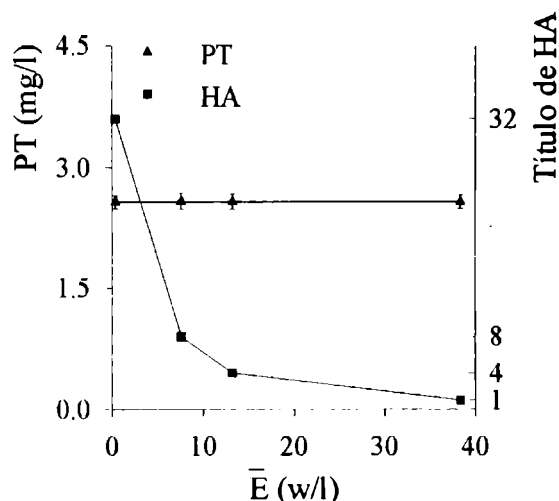


Figura 4.2: Efecto de la potencia disipada en el biorreactor por unidad de volumen sobre los niveles máximos de producción de PT y título HA alcanzados en un cultivo de *B. pertussis*, llevado a cabo en tanque agitado.

Como puede verse, al aumentar la potencia disipada en el sistema, el nivel de PT no varía pero la HA de los sobrenadantes disminuye de manera significativa; por lo que parece probable que sea FHA la que resulta afectada por las fuerzas de corte.

Para confirmar estos resultados se diseñó la siguiente experiencia: se tomaron muestras de cultivos estáticos de *Bordetella pertussis*, se centrifugaron a $8000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . Se obtuvieron de este modo sobrenadantes de medio de cultivo, libres de células (según se pudo verificar por observación microscópica), con altos títulos de HA (tiempo inicial de incubación, Tabla 4.2). Muestras estériles de 2.5 l de sobrenadante así obtenidas fueron sometidas durante 6

hs., a cada una de las condiciones de operación ensayadas previamente, especificadas en la Tabla 4.1. Se empleó como control una muestra que se incubó a 36°C durante 6 hs. sin agitación. Se tomaron muestras al principio y al final de cada experiencia en las que se determinó la actividad hemaglutinante. La Tabla 4.2 muestra los resultados obtenidos.

Se puede ver que durante la incubación sin agitación no hubo caída en los títulos hemaglutinantes. Sin embargo, las muestras que fueron sometidas a agitación durante la incubación mostraron menor HA al finalizar el período de incubación. Esta pérdida en la HA fue más pronunciada al aumentar los niveles de agitación, y por lo tanto de esfuerzo de corte, al que fuera sometida la muestra. Estos resultados confirman los obtenidos con el cultivo entero (Tabla 4.1), lo cual indica que existe un efecto directo de las condiciones de operación sobre la actividad hemaglutinante del sobrenadante de cultivo, independientemente de la presencia del microorganismo.

Tabla 4.2: Efecto de las condiciones de operación del tanque agitado sobre el título hemaglutinante (HA) de sobrenadantes de cultivo de *B. pertussis* libres de células.

expt.	N rpm	F/V VVM	Título HA	
			tiempo de incubación	
			0 (hs.)	6 (hs.)
control	0	0.00	32	32
1	210	1.00	32	32
2	270	0.88	32	8
3	320	0.42	32	4
4	450	0.30	32	1

Finalmente, se emplearon técnicas de SDS-PAGE e inmunodetección para analizar los pesos moleculares y la identidad de los polipéptidos al final de cada tratamiento. El perfil polipeptídico en geles de poliacrilamida al 12.5%, muestra una parcial desaparición de las bandas de peso molecular entre 220 y 117 kDa (rango en el que se encuentra comprendido el peso molecular de la molécula entera de FHA) en la muestra sometida a mayor agitación en relación a aquellas tomadas antes y después de la incubación estática. Estas últimas muestras no revelan ninguna diferencia entre sí cuando se las analiza por electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Con el fin de determinar si esta variación en los polipéptidos de alto peso molecular podía ser atribuida a la ruptura de FHA, se transfirieron las proteínas desde el gel de electroforesis a una membrana de polivinildifluoruro para analizar dichos polipéptidos por técnicas de Western Blot empleando anticuerpos mono-específicos contra FHA.

En la Figura 4.3 se puede observar que las muestras tomadas antes y después de la incubación estática (líneas A y B, respectivamente) no revelan diferencia y presentan sólo dos bandas de FHA, ambas de alto peso molecular. Por el contrario, la muestra del sobrenadante sometido a la mayor agitación no contiene las bandas correspondientes a los componentes de mayor peso molecular de FHA. Conjuntamente con la pérdida de estos componentes, aparecen en dicha muestra polipéptidos de FHA de peso molecular por debajo de los 97 kDa. No habiéndose detectado actividad proteolítica en ninguna muestra, la ruptura que se verifica en la estructura de la proteína entera de FHA con el aumento de agitación sólo puede ser atribuida al esfuerzo cortante generado en el sistema.

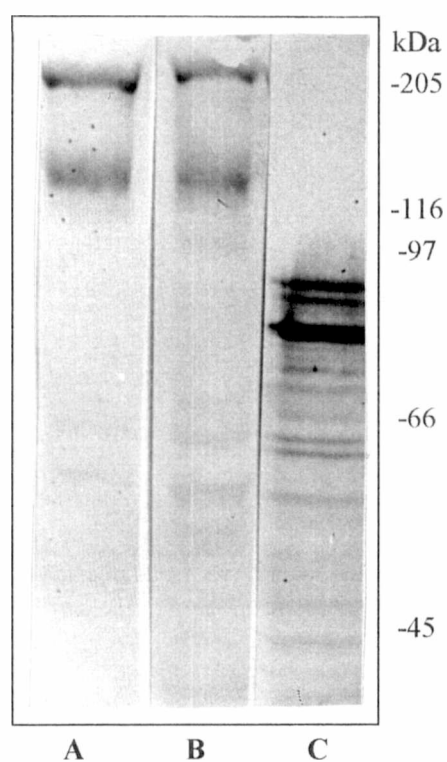


Figura 4.3: Inmunodetección de FHA en sobrenadantes de cultivo de *B. pertussis*, sometidos a los siguientes tratamientos: línea A) sobrenadante sin ningún tratamiento, línea B) sobrenadante incubado sin agitación ni aireación durante 6 hs a 36°C, línea C) sobrenadante incubado en tanque agitado con agitación y aireación durante 6 hs. a 36°C, bajo las siguientes condiciones: N=450 y F/V= 0.3 VVM.

A partir de estos resultados, es posible concluir que la pérdida de HA del sobrenadante en cultivos agitados se debe a la ruptura de la molécula de FHA. Esto es de particular importancia si se tiene en cuenta que solamente los componentes de mayor peso molecular de FHA son capaces

de producir respuesta inmune²², y por lo tanto sólo la molécula "completa" de FHA debería ser incluida en la formulación de vacunas

4.2 Efecto de las fuerzas de corte sobre los antígenos celulares de *B. pertussis*

La fracción de FHA asociada a células se encuentra anclada a la membrana externa de *Bordetella pertussis*. Como ya se ha mencionado, esta proteína es un factor importante durante la colonización bacteriana del tracto respiratorio superior. Este antígeno está involucrado, junto con las fimbrias bacterianas y otras adhesinas menores, en el pegado inicial de la bacteria a las cilias del tracto respiratorio superior. Por esta razón, los niveles celulares de FHA (así como la presencia de fimbrias) en bacterias destinadas a la formulación de vacunas resultan de fundamental importancia en la estimulación de anticuerpos que eviten la colonización. Habiendo determinado el efecto que tienen las fuerzas de corte sobre FHA extracelular se estudió si estas afectaban en alguna forma a FHA celular y demás antígenos. En definitiva, se intentó definir si las condiciones de entorno, en lo que se refiere al stress hidrodinámico, afectan la inmunogenicidad y capacidad protectora de las células cultivadas bajo dichas condiciones. Con este fin, se tomaron muestras de fase exponencial de crecimiento (24 hs. de cultivo), cultivadas bajo cada condición operacional indicada en la Tabla 4.3.

Se determinó en cada muestra el título hemaglutinante de las células y el grado de adhesión a células eucariotas de la línea celular HeLa 229. Se eligió esta línea celular porque presenta un tipo de receptores en particular, que determinan que la adhesión de *Bordetella pertussis* a dichas células esté mediada fundamentalmente por el nivel de FHA celular¹⁶.

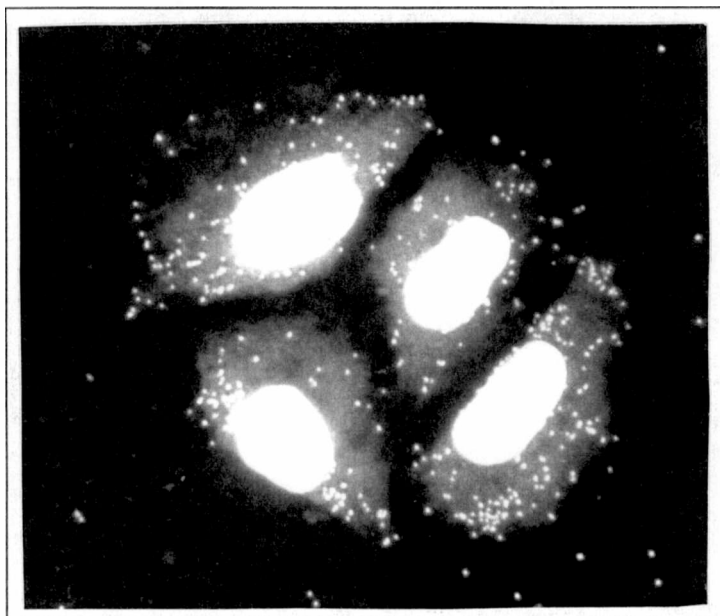


Figura 4.4: Microscopía de fluorescencia. Adhesión de *B. pertussis* a células HeLa

Es importante destacar que sólo los componentes de mayor peso molecular de FHA (220 - 210 kDa)^{16,17,18} son capaces de mediar la adhesión de *Bordetella pertussis* a glóbulos rojos y otras células eucariotas como las HeLa 229.

El ensayo se llevó a cabo según lo descrito en Materiales y Métodos. Las bacterias adheridas a cada célula HeLa fueron visualizadas por microscopía de fluorescencia. La Figura 4.4 es una fotografía tomada de un campo microscópico. En ella se pueden ver cuatro células HeLa rodeadas por bacterias que se hallan adheridas a las mismas.

Cabe señalar que las condiciones de ensayo empleadas son las adecuadas¹⁵⁷ para evitar la excreción de FHA durante la prueba, de manera tal que en la adhesión sólo esté involucrada FHA anclada a la membrana bacteriana. En la Tabla 4.3 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.3: Efecto de las condiciones de operación del biorreactor (agitación y aireación) sobre FHA celular y antígenos protectores de *B. pertussis*.

expt.	N° rpm	F/V* VVM	E w.l. ¹	N° medio de bacterias adheridas por célula HeLa ± SD		
				HAc título	Potencia UPI/ml	
1	210	1.00	0.3	94 ± 15	64	7.9 ± 0.2
2	270	0.80	6.3	97 ± 19	64	7.9 ± 0.3
3	320	0.48	11.0	95 ± 16	64	7.9 ± 0.1
4	450	0.30	32.0	97 ± 17	64	7.9 ± 0.2

* El $K_L a$ se mantuvo en 100 h⁻¹.

Se puede ver que no hay diferencia en los títulos hemaglutinantes celulares (HAc) que presentan las células provenientes de cada condición, como tampoco es posible establecer diferencias estadísticamente significativas ($\alpha < 0.05$) en los niveles de adhesión a células HeLa. A partir de estos datos es razonable suponer que FHA anclada a la membrana bacteriana no se ve afectada por las fuerzas de corte generadas en el biorreactor.

Para confirmar estos resultados, se analizaron lisados de células provenientes de cada condición de cultivo, por técnicas de Western blot, con anticuerpos mono-específicos anti-FHA.

En la Figura 4.5 se ve que dichos anticuerpos revelan la existencia de una banda difusa que corresponde a componentes de alto peso molecular de FHA. En ninguna muestra se detectaron componentes de este antígeno de peso molecular inferior a 116 kDa. De esta manera se pone en evidencia que, efectivamente, el esfuerzo cortante propagado en el tanque agitado no afecta a FHA celular.

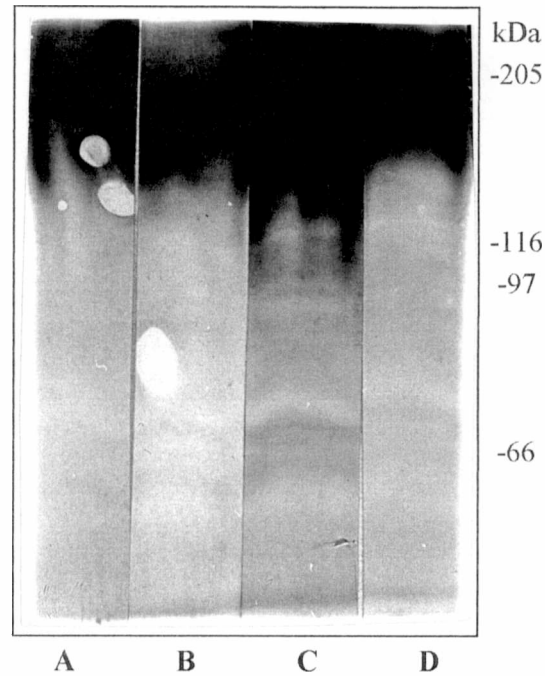


Figura 4.5: Inmunodetección de FHA celular en células de *B. pertussis* cultivadas en tanque agitado, bajo las siguientes condiciones de operación: línea **A**) $N=210$, $F/V=1.00$ VVM; línea **B**) $N=270$, $F/V=0.80$ VVM; línea **C**) $N=320$, $F/V=0.48$ VVM; línea **D**) $N=450$, $F/V=0.30$ VVM

Para completar este estudio, se determinó si otros componentes involucrados en la protección conferida por la vacuna de células enteras se ven afectados por el parámetro de proceso en cuestión. Tal podría ser el caso de las fimbrias bacterianas, soporte de aglutinógenos involucrados en la respuesta inmune del huésped, cuya estructura de tipo fibrilar podría ser afectada por el esfuerzo de corte.

Se analizó el poder protector de las células provenientes de cada condición de cultivo (Tabla 4.3). Para tal fin, se empleó el ensayo de potencia en animales recomendado por la Organización Mundial de la Salud para la evaluación de antígenos protectores (ver Materiales y Métodos). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($\alpha < 0.05$) entre las distintas muestras (Tabla 4.3). Estos resultados indican que el esfuerzo cortante que se genera en un tanque agitado operado en régimen turbulento, al menos en los niveles de disipación de energía ensayados en este estudio, no afecta los antígenos celulares de *Bordetella pertussis*.

DISCUSIÓN

En este capítulo se ha demostrado que el esfuerzo cortante generado en un biorreactor tipo tanque agitado, operado en régimen de flujo turbulento, provoca la ruptura de la molécula de FHA extracelular. La estructura filamentosa de esta proteína es lo que la hace particularmente sensible a las fuerzas de corte. La fragmentación de la estructura proteica de FHA implica la pérdida de su actividad hemaglutinante pero, más importante aún, también significa la pérdida de su capacidad inmunogénica. Así, la desaparición de actividad hemaglutinante, verificada en los sobrenadantes de cultivos llevados a cabo en tanques agitados es un índice de la pérdida de FHA como antígeno recuperable.

Por otra parte, se encontró que el esfuerzo cortante generado en tanques agitados, no afecta en forma alguna a los antígenos celulares involucrados en la generación de respuesta inmune protectora. En particular se pudo comprobar que, a diferencia de lo que ocurre con FHA soluble, FHA anclada en la membrana celular no es afectada por las fuerzas de corte generadas en el biorreactor. De estos resultados se desprende que para la producción de células con buen nivel antigénico, tendiente a la formulación de una vacuna celular, este parámetro de proceso no resulta crítico y, por lo tanto, no será necesario tenerlo en cuenta como criterio de escalado, ni en la elección del diseño del biorreactor a emplear.

Por el contrario, si el objetivo es obtener sobrenadantes de cultivo con buenos títulos antigénicos, el discernimiento del efecto causado por las fuerzas de corte sobre la molécula de FHA facilita la selección de las condiciones de operación adecuadas para la producción de este antígeno extracelular. Más aún, la incorporación de la microescala como criterio de pérdida de FHA es, en sí misma, un avance de particular importancia en el diseño y escalado del proceso de coproducción de los dos antígenos más importantes para la formulación de vacunas acelulares: FHA y PT.

Desde el punto de vista de la producción a gran escala de antígenos solubles para la formulación de vacunas, la obtención de sobrenadantes de cultivo con buenos títulos de ambos antígenos resulta fundamental. De acuerdo a los resultados obtenidos, la producción de este tipo de sobrenadantes sólo puede lograrse bajo condiciones de cultivo que garanticen esfuerzos de corte mínimos en el seno del líquido. Así, el cultivo de *Bordetella pertussis* con vistas a la recuperación de antígenos extracelulares, no debería llevarse a cabo en los reactores convencionales de turbina, sino que debería utilizarse un "reactor de bajo shear". Esto plantea la necesidad de diseñar un biorreactor adecuado que, además de generar un esfuerzo de corte mínimo, brinde condiciones adecuadas para el crecimiento celular y la producción de antígenos. En este sentido se ha comenzado la caracterización del cultivo de *B. pertussis* en biorreactores de tipo Air-lift. En este tipo de reactores la agitación es neumática. La ausencia de agitación mecánica determina características fluidodinámicas muy distintas a las del tanque agitado. La velocidad de líquido es uniforme en todo el sistema, lo cual determina la ausencia de gradientes de esfuerzos cortantes y disminuye significativamente su magnitud. Por esta razón se está estudiando si este tipo de biorreactores podría constituir una alternativa para la producción de sobrenadantes de cultivo con mejores títulos hemaglutinantes que los producidos en tanques agitados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, para minimizar las pérdidas de FHA extracelular en los estudios llevados a cabo en sistema de cultivo continuo (capítulos siguientes), se trabajó con biorreactores sin cortacorrientes y aireación en superficie. Estas modificaciones favorecen la formación de vórtice y conducen a un patrón de flujo hidrodinámico diferente, que conlleva una disminución significativa del esfuerzo cortante generado en el biorreactor¹⁵²

Capítulo 5

*Estudios fisiológicos en sistema de cultivo
continuo*

Capítulo 5: Estudios fisiológicos en sistema de cultivo continuo

Breve reseña teórica del cultivo continuo.....	71
Resultados	74
5.1 Cálculo de parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de <i>B. pertussis</i> en medio SS.....	74
5.2. Efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre el desarrollo celular y expresión antigénica.....	79
5.3. Efecto de la tensión de oxígeno disuelto en el medio de cultivo sobre la producción de células y antígenos.....	85
5.4 Estudio de la respuesta adaptativa de <i>B. pertussis</i> a la baja disponibilidad de nutrientes.....	91
5.4.a. Influencia del sustrato limitante del crecimiento sobre las características de membranas externa de <i>B. pertussis</i>	94
5.4.a.I. Comparación de los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana externa.....	94
5.4.a.II. Comparación de los perfiles electroforéticos de LPS celular.....	97
5.4.b Influencia del sustrato limitante del crecimiento sobre los parámetros estequiométricos de la producción de células y antígenos de <i>B. pertussis</i>	98
5.5. Otros aspectos relacionados con el estudio de medio de cultivo.....	102
Discusión	104

En los cultivos llevados a cabo en sistemas cerrados como el sistema batch, las condiciones de cultivo cambian permanentemente en el tiempo sin que pueda ejercerse sobre ellas prácticamente ningún control. De esta manera, el entorno con el que interacciona el microorganismo se modifica continuamente en el tiempo. En un sistema de cultivo de estas características es imposible discernir el efecto que pudiera tener algún parámetro de cultivo en particular sobre el desarrollo celular y la expresión antigénica.

En este sentido, el sistema de cultivo continuo resulta de suma utilidad. En él, el entorno del microorganismo permanece estable en el tiempo una vez alcanzado el estado estacionario; esto, sumado a que cada variable del proceso puede ser modificada independientemente de las demás, posibilita el estudio preciso de la influencia de la variable de interés sobre el aspecto en estudio.

Por otra parte, en el caso de microorganismos infecciosos como *B. pertussis*, el estado estacionario que se establece en un cultivo continuo es semejante a su entorno natural, ya que los mecanismos de homeostasis del huésped ofrecen al patógeno un ambiente que no se modifica en el tiempo.

En este capítulo se empleó el sistema de cultivo continuo con dos finalidades:

(1) Completar el estudio de caracterización cinética y estequiométrica del cultivo de *B. pertussis* a través del cálculo de parámetros que sólo es posible determinar con precisión en sistema de cultivo continuo.

(2) Estudiar la influencia de los principales parámetros de cultivo (velocidad específica de crecimiento, nivel de oxígeno disuelto y tipo de sustrato limitante del crecimiento), sobre la fisiología y expresión antigénica de *B. pertussis*.

Con relación a este último punto, hay que señalar que el estudio del efecto del tipo de sustrato limitante en la fisiología del microorganismo se complica si el medio de cultivo es un medio complejo como el SSE. Un medio de cultivo químicamente definido, como el SS sin agregado de E.I., es lo indicado en este tipo de estudios. De todas formas, si el cultivo se lleva a cabo en un sistema abierto como es el cultivo continuo, el agregado de E.I. no debería ser necesario. En primer lugar, porque los inhibidores de crecimiento (si la hipótesis planteada en el capítulo 3 es válida) se removerían continuamente junto con el cultivo, con lo cual se evitaría la acumulación de los mismos y por lo tanto su efecto inhibitor. En segundo lugar, porque el empleo de reactores con aireación en superficie para evitar la ruptura de la molécula de FHA permite suprimir el uso de agentes antiespumantes, ya que este tipo de aireación evita la formación de espuma.

Los estudios en sistema de cultivo continuo que se detallan en este capítulo, se llevaron a cabo empleando medio SS sin el agregado de E.I. ni antiespumante. El biorreactor utilizado es un tanque agitado (LH, serie 210) sin cortacorrientes y con aireación en superficie, con un volumen de trabajo de 700 ml. Fue posible utilizar aireación en superficie porque el requerimiento de oxígeno de este microorganismo es bajo y porque el volumen de trabajo, en este caso, es pequeño.

En todos los casos el crecimiento celular quedó determinado únicamente por la cantidad de sustrato limitante, no verificándose efecto inhibitor alguno sobre el crecimiento celular.

Breve reseña teórica del cultivo continuo

Un cultivo continuo (esquema en la Figura 5.1) es un sistema cultivo en el que se introduce continuamente medio fresco al biorreactor, a una velocidad uniforme. El volumen del cultivo permanece constante por extracción, también a velocidad uniforme, de un volumen de medio igual al que ingresa al reactor. Idealmente el mezclado debe ser perfecto, es decir que cuando una gota de medio entra al biorreactor, inmediatamente deberá quedar uniformemente distribuida en el cultivo. Esto significa, en la práctica, que el tiempo requerido para mezclar un pequeño volumen de medio de cultivo será también pequeño comparado con el tiempo de retención (t_r) calculado como V/F_a , donde V es el volumen del cultivo y F_a la velocidad volumétrica de flujo del medio de cultivo.

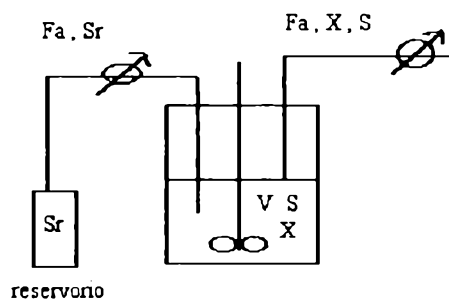


Figura 5.1 Esquema de un cultivo operado en continuo

- S_r concentración del sustrato limitante del crecimiento en el reservorio.
- X concentración de biomasa en el estado estacionario.
- S concentración del sustrato limitante en el estado estacionario.
- V volumen del cultivo.
- F_a caudal de alimentación.

Las bases teóricas de la utilización del nutriente limitante del crecimiento, en un cultivo continuo donde los parámetros fisicoquímicos permanecen estables en el tiempo, fueron desarrolladas por Monod¹⁵⁸, y revisadas por Herbert¹⁵⁹, Powell¹⁶⁰, Hsu¹⁶¹ y Tempest¹⁶²

Las ecuaciones que describen el crecimiento microbiano en un quimiostato están basadas, fundamentalmente, en dos supuestos (ya mencionados en el capítulo 3).

El primer supuesto es que la velocidad específica de crecimiento (μ) está relacionada con la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) y la concentración de sustrato limitante

remanente en el medio (S), a través de una ecuación similar a la desarrollada por Michaelis-Menten para la descripción de la cinética enzimática, esto es:

$$\frac{\mu}{\mu_m} = \frac{S(t)}{K_s + S(t)} \quad \text{ec. 5.1}$$

Donde S(t) es la concentración de sustrato remanente en el medio de cultivo en el momento t, y K_s es la constante de "saturación aparente" del microorganismo respecto del sustrato limitante del crecimiento, que se define como la concentración de sustrato que posibilita el desarrollo celular a una velocidad específica de crecimiento que es la mitad de la velocidad máxima.

El segundo supuesto es que el rendimiento celular en base al sustrato ($y_{x/s}$) es constante, de manera que en cualquier momento t, es válida la siguiente ecuación:

$$dX(t)/dt = -y_{x/s} dS(t)/dt \quad \text{ec. 5.2}$$

Así, para un monocultivo en quimiostato, las ecuaciones de balance de materia de acuerdo con Monod¹⁵⁸ tendrían la siguiente forma:

$$\frac{dS(t)}{dt} = [S_r - S(t)] D - \frac{\mu_m X(t) S(t)}{y_{x/s} [K_s + S(t)]} \quad \text{ec. 5.3}$$

$$\frac{dX(t)}{dt} = \frac{\mu_m X(t) S(t)}{K_s + S(t)} - D X(t) \quad \text{ec. 5.4}$$

Esto es:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D) X \quad \text{ec. 5.5}$$

donde $D = F_a/V$, es la velocidad de dilución del quimiostato, y S_r es la concentración de sustrato limitante en el reservorio de alimentación del quimiostato.

En el equilibrio, o estado estacionario, no hay acumulación neta de biomasa: $dX(t)/dt = 0$, por lo tanto:

1- De la ecuación 5.4 es posible calcular el valor S, que toma S(t) en el equilibrio:

$$S(t) \rightarrow S = K_s D / (\mu_m - D) \quad \text{ec. 5.6}$$

2- De la ecuación 5.5, se deduce que si $dX(t)/dt = 0$, entonces $\mu = D$. Esto quiere decir que, en un quimiostato, la velocidad específica de crecimiento queda determinada por la velocidad de dilución empleada. Este constituye uno de los aspectos más importantes y característicos del cultivo continuo, porque significa poder establecer y controlar la velocidad específica de crecimiento del microorganismo a través del caudal de alimentación y el volumen de cultivo.

En el equilibrio, o estado estacionario, tampoco hay acumulación de sustrato en el tiempo, entonces: $dS(t)/dt = 0$, por lo tanto según la ecuación 5.3:

$$X = y_{x/s} (S_r - S) \quad \text{ec. 5.7}$$

Donde X es el valor que toma $X(t)$ en el equilibrio.

RESULTADOS

5.1 Cálculo de parámetros cinéticos y estequiométricos del crecimiento de *B. pertussis* en medio SS.

Como ya se mencionó, Monod¹⁵⁸ introdujo el uso de una ecuación empírica (ec. 5.1) para describir la relación existente entre la velocidad de crecimiento de un microorganismo y la concentración del sustrato limitante.

Sin embargo, este modelo no se ajusta a los valores experimentales en todos los casos. Se han propuesto otras ecuaciones para la descripción del crecimiento microbiano en casos particulares donde el consumo de sustrato y la velocidad específica de crecimiento no se relacionan entre sí de acuerdo a la ecuación 5.1.

Por esta razón, antes de comenzar cualquier estudio fisiológico en sistema de cultivo continuo se analizó si es posible describir el crecimiento de *B. pertussis* en términos de la ecuación de Monod.

Existen básicamente dos maneras de determinar si es posible aplicar la ecuación mencionada a un crecimiento microbiano. Una ellas consiste en determinar la velocidad específica de crecimiento que desarrolla el microorganismo frente a concentraciones conocidas (del orden de K_s) de sustrato limitante. La otra forma es, para velocidades específicas de crecimiento conocidas, determinar la concentración de sustrato limitante remanente en el medio de cultivo. En la práctica, la forma más simple y precisa (y la única recomendable¹⁶³) es la que se menciona en segundo término. Trabajando en cultivo continuo, se fija la velocidad específica de crecimiento del microorganismo a través de la velocidad de dilución (D), según se mencionó anteriormente. Se opera a distintas velocidades de dilución y en cada estado estacionario, se determina la concentración de sustrato limitante remanente en el sobrenadante de medio de cultivo. De esta manera es como se estudió si el crecimiento de *B. pertussis* y el consumo de glutamato se ajustan al modelo matemático propuesto por Monod.

Se llevaron a cabo cultivos de *B. pertussis* limitados en glutamato (medio SS). Se empleó el sistema de cultivo continuo operado a distintas velocidades de dilución (distintas μ) y se determinó la concentración de glutamato remanente en cada estado estacionario. Generalmente el cálculo de K_s y de μ_m se lleva a cabo linealizando la ecuación de Monod; las ecuaciones lineales usadas comúnmente¹⁶⁴ son: Lineweaver-Burke ($1/S$ vs. $1/\mu$), Langmuir (S vs. S/μ) y Eadie-Hofstee (μ/S vs. μ). En este tipo de representaciones, los errores cometidos en las determinaciones experimentales quedan disimulados. El mejor método de análisis es el reportado por Eisenthal & Cornish-Bowden¹⁶⁵. Según este método, si $\mu_m = \mu + K_s \mu/S$, es posible graficar μ_m vs. K_s , para cada observación (μ_i , S_i), como una recta de pendiente μ_i/S_i , que intercepta el eje de las K_s en $(-S_i)$ y al eje de las μ_m en μ_i . La técnica consiste en ubicar, para cada observación (μ_i , S_i), el valor de $(-S_i)$ en el eje de las abscisas y el de μ_i en el eje de las ordenadas y trazar luego una recta entre ambos puntos. Si la relación entre el crecimiento microbiano y el consumo de sustrato se puede describir en términos de la ecuación 5.1, las rectas correspondientes a todas las observaciones se interceptan en un punto único, cuyas coordenadas son (K_s , μ_m).

En la práctica, aunque el crecimiento se ajuste al modelo, puede no existir un punto único de intersección debido a errores experimentales. En estos casos la mejor estima de los valores de K_s y μ_m , se calcula tomando la media para la serie de intersecciones. Consecuentemente, este modelo da una mayor información acerca de la incertidumbre en los valores de K_s y μ_m . Los errores experimentales quedan en evidencia, a diferencia de los métodos de linealización citados

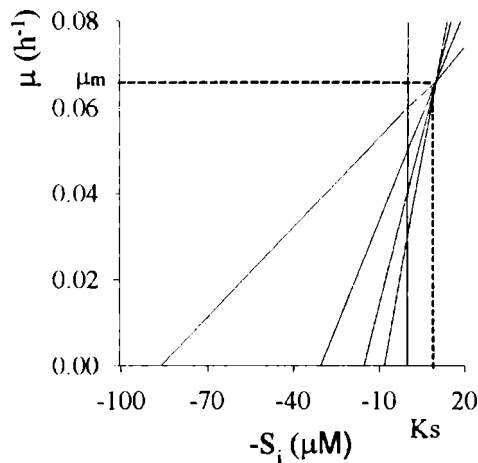


Figura 5.2: Aplicación del método de Eisenthal & Cornish-Bowden a la determinación, en cultivo continuo, de la constante de saturación aparente de Monod (k_s) y la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) de *B. pertussis* cultivada en limitación de glutamato.

Del análisis de la Figura 5.2, donde se han graficado los valores experimentales de acuerdo a la representación propuesta por Eisenthal & Cornish-Bowden, se desprende que los datos experimentales se ajustan al modelo propuesto por Monod. Así, el consumo de la fuente de carbono y energía en un cultivo de *B. pertussis* puede describirse en términos de este modelo. Se puede observar que existe un punto único de intersección, lo cual indica que el error experimental es mínimo. Los valores que se obtienen de la intersección de las cuatro rectas son: $K_s = 10 \pm 2 \mu M$ y $\mu_m = 0.066 \pm 0.003 h^{-1}$. Conocer el valor de μ_m y K_s , es de suma utilidad para el modelado de cultivos microbianos, especialmente cultivos continuos.

Estos parámetros dan una idea de la aptitud de *B. pertussis* para "capturar" glutamato del entorno. La metabolización de dicho nutriente una vez dentro de la célula se puede describir según la ecuación lineal de consumo de sustrato desarrollada por Pirt¹⁶⁶. De acuerdo con este autor, el microorganismo destina la fuente de carbono y energía a tres fines fundamentalmente (si consideramos que los rendimientos de productos extracelulares son despreciables frente a los de biomasa): crecimiento, obtención de energía para procesos anabólicos, y mantenimiento celular. Las dos primeras están englobadas en lo que se conoce como rendimiento celular "verdadero" respecto al sustrato limitante ($y'_{x/s}$), y el término de mantenimiento celular (m_s) está relacionado con el glutamato consumido para proveer la energía necesaria para mantener gradientes de

concentración, para recambio de material celular, movilidad celular, etc.. En realidad, en m_s queda incluido todo gasto de fuente de carbono y energía que no esté directamente relacionado con la formación neta de biomasa. Por esta razón este parámetro se convierte en una medida del desacople metabólico, y cabe esperar que su valor sea mínimo cuando la fuente de carbono y energía es la limitante del crecimiento celular¹⁶⁷.

La magnitud del término de mantenimiento celular está íntimamente ligado con las condiciones de entorno como la presión osmótica, el pH, la temperatura de trabajo, etc.. La evaluación de este término es importante, ya que un aumento en el mismo implica una disminución del sustrato disponible para el crecimiento y, por lo tanto, una caída en los rendimientos del proceso.

La ecuación desarrollada por Pirt (1966), y más tarde modificada por Neijssel¹⁶⁸, presupone que el consumo de sustrato destinado al mantenimiento celular es independiente de la velocidad específica de crecimiento (μ):

$$q_s = \mu / y'_{x/s} + m_s \quad \text{cc. 5.8}$$

Donde, q_s es el consumo específico de sustrato. En esta ecuación se asume que no existe un término de mantenimiento celular que esté asociado a la velocidad específica de crecimiento. Si bien para muchos microorganismos se ha comprobado la validez de tal aseveración, se han detectado numerosas anomalías a este comportamiento general. Dichas anomalías se han verificado fundamentalmente en cultivos en los que el sustrato limitante del crecimiento no es la fuente de energía. En este sentido, se han planteado nuevos modelos matemáticos¹⁶⁷ para la ecuación de consumo de sustrato inicialmente desarrollada por Pirt. Estos modelos incluyen, generalmente, un mantenimiento celular definido por una parte constante (que no varía con μ), m_s , y una parte que varía de la velocidad específica de crecimiento.

Para evaluar la cantidad de glutamato que se deriva para mantenimiento en un cultivo de *B. pertussis* limitado en energía (medio SS), se empleó el sistema de cultivo continuo operado a distintas velocidades de dilución ($D = \mu$) y se determinó, en cada estado estacionario, el consumo específico de glutamato.

En la Figura 5.3 se muestran los resultados obtenidos

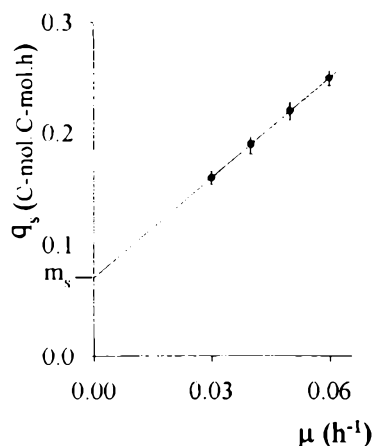


Figura 5.3. Variación de la velocidad específica de consumo de glutamato en función de la velocidad específica de crecimiento de *Bordetella pertussis* en medio SS. Determinación del coeficiente de mantenimiento celular (m_s) y el rendimiento 'verdadero' ($y'_{x/s}$), en sistema de cultivo continuo.

De acuerdo a la ecuación 5.8, la cantidad de glutamato destinada a energía de mantenimiento celular, que es independiente de la velocidad de crecimiento, puede ser estimada a partir del valor que tome la ordenada al origen. Si existiese un término de mantenimiento directamente asociado al desarrollo celular, estaría incluido (aunque no discriminado) en el término: $\mu/y'_{x/s}$ y se reflejaría en la pendiente de la curva q_s vs μ , mostrando una relación no lineal entre ambas velocidades específicas. Los datos experimentales (Figura 5.3) se ajustan a la ecuación de una recta con un coeficiente de correlación de 99.9%. De lo cual se puede deducir que, en las condiciones de trabajo empleadas, la cantidad de glutamato consumido para mantenimiento celular no varía con la velocidad específica de crecimiento, sino que se mantiene en un valor constante de 0.07 ± 0.01 C-mol de glutamato por cada C-mol de biomasa por hora. La curva de la Figura 5.3 se ajusta a una recta cuya ecuación es:

$$q_s = 0.07 (\text{C - mol} / \text{C - mol.h}) + 3.03(\text{C - mol} / \text{C - mol}) \times \mu$$

Del análisis de esta ecuación se deduce que, si no se destinase parte del glutamato a mantenimiento celular, el rendimiento que se obtendría sería de 0.33 ± 0.02 C-mol de biomasa por cada C-mol de glutamato. Este valor constituye el límite teórico superior del rendimiento de biomasa en función del glutamato consumido.

La existencia del término de mantenimiento celular también disminuye la velocidad específica máxima con que es capaz de duplicarse el microorganismo. Para evaluar dicha disminución es necesario calcular lo que se conoce como velocidad específica de mantenimiento (a), que puede entenderse como una "velocidad de metabolismo endógeno"¹⁶⁹. Por sus dimensiones (h⁻¹) es un parámetro muy útil para comparar energías de mantenimiento,

independientemente de las unidades energía y del rendimiento en ATP de cada sustrato en particular.

Este parámetro (a) se define como:

$$\mu_m = \mu'_m - a \quad \text{ec. 5.9}$$

Donde μ'_m sería la velocidad específica máxima de crecimiento si no hubiera gasto de glutamato para mantenimiento celular. El valor de "a" puede calcularse gráficamente¹⁶⁹. Si se grafica la velocidad específica de consumo de sustrato en el estado estacionario (q_s) vs. la velocidad específica de crecimiento (μ), tal como se hizo en la Figura 5.3, la recta termina en el punto de abscisa: μ_m experimental (0.066 h⁻¹, según se vio en la Figura 5.2), que tiene por ordenada: $q_{s,m}$ experimental (0.27 C-mol/C-mol.h). Según los resultados anteriores, en el caso de *B. pertussis* existe un único término de consumo de sustrato para mantenimiento celular, que tiene un valor constante y se refleja en la ordenada al origen de la recta en cuestión. Por lo tanto, una recta paralela a la curva de la Figura 5.3, con la misma pendiente pero que pase por el origen de coordenadas (esto significa $m_{s,0} = 0$), nos dará en el punto de ordenada $q_{s,m}$, el valor de μ'_m sobre el eje de las abscisas.

En la Figura 5.4 se graficaron los datos experimentales. A partir de dicha gráfica el valor de μ'_m se estimó en 0.087 h⁻¹, con lo cual "a" toma un valor de 0.021 h⁻¹.

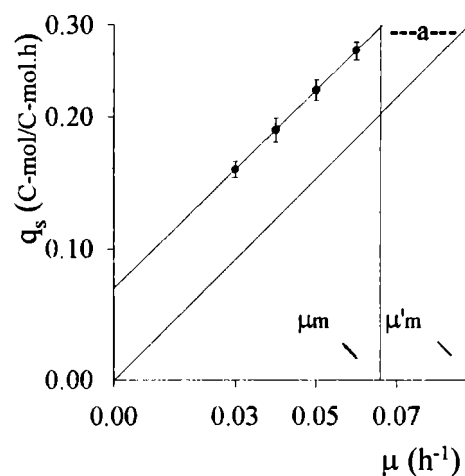


Figura 5.4: Determinación, en cultivo continuo, de la velocidad específica de mantenimiento "a" de *B. pertussis* creciendo en medio SS.

Como puede apreciarse el valor de "a" es de magnitud considerable frente al valor de μ_m experimental, lo cual da muestras de la importancia que este término podría tener en un cultivo a gran escala. Disminuir este valor significa detectar posibles factores en las condiciones de cultivo susceptibles de ser optimizados. Uno de ellos podría estar relacionado con la acumulación de

NH_4^+ en el espacio extracelular como consecuencia de la utilización del glutamato como fuente de energía. Se ha reportado que¹⁴² la presencia de este ion provoca en algunos microorganismos la aparición de ciclos fútiles lo cual, obviamente, redundaría en un aumento del coeficiente de mantenimiento celular. Por otro lado, la presencia de amonio en concentraciones elevadas produce injurias en la membrana externa de algunos organismos Gram (-)¹⁴³. La aparición de tales lesiones en *B. pertussis* implicaría, entre otras cosas, gasto de energía para recambio de material celular. Se han llevado a cabo estudios cuyos resultados indican que la membrana externa de *B. pertussis* no se altera por la presencia de ion amonio en el medio extracelular. No obstante, estos resultados son preliminares y deberán ser confirmados.

Independientemente de la disminución que pueda lograrse en el término m_s a través del ajuste de las condiciones de cultivo, es evidente que en un cultivo limitado en energía, en el cual m_s es independiente de μ , es posible reducir comparativamente la proporción de sustrato derivado a mantenimiento si se trabaja a altas velocidades específicas de crecimiento.

5.2. Efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre el desarrollo celular y expresión antigénica.

En el capítulo 3 se mencionó que en un cultivo batch de *B. pertussis*, el incremento de biomasa en fase exponencial es acompañado por un aumento en la producción específica de antígenos solubles y una acumulación de LPS en el medio extracelular. En éste sistema de cultivo, en el cual las condiciones de entorno varían permanentemente, resulta imposible determinar la causa del aumento observado en los rendimientos de ambos productos extracelulares. Estudios previos¹⁷⁰, llevados a cabo con otro medio de cultivo y con otra cepa de *B. pertussis*, indican que la producción de PT podría estar asociada al crecimiento microbiano, pero nada se dice acerca de la liberación de LPS, ni cómo se ven afectados estos productos por las demás variables de cultivo.

En el presente estudio se empleó el sistema de cultivo continuo con el fin de estudiar cada variable de cultivo por separado y estimar su influencia en el desarrollo celular y expresión antigénica. En esta sección se muestran los resultados obtenidos en cultivos de *B. pertussis* llevados a cabo en un medio de composición constante (medio SS) y velocidad específica de crecimiento variable.

Tabla 5.1: Efecto de la velocidad específica de crecimiento sobre los rendimientos celulares y la producción de toxina pertussis extracelular y lipopolisacárido (evaluado como KDO) liberado al medio de cultivo.

μ h ⁻¹	y _x /s Cmol/Cmol	Y _{PT} /s mg/g	Y _{KDO} /s μg/g
0.03	0.18	0.11	0.28
0.04	0.20	0.14	0.38
0.05	0.22	0.19	0.50
0.06	0.24	0.23	0.63

Los datos mostrados en esta tabla corresponden a la media de 3 determinaciones independientes con duplicados. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Las medias se compararon según el test de Menor Diferencia Significativa (LSD), con un grado de significación: $\alpha < 0.05$.

En la Tabla 5.1 se muestran los valores medios de los rendimientos de células y productos extracelulares, en base a la fuente de carbono y energía (sustrato limitante en el SS), obtenidos en cada estado estacionario de cultivos conducidos a distintas velocidades específicas de crecimiento. Los rendimientos de células, PT soluble y LPS extracelular alcanzados en cada velocidad de dilución ($D = \mu$) (Tabla 5.1), mostraron diferencias estadísticamente significativas. Se puede observar que estos rendimientos aumentan con la velocidad específica de crecimiento. Los rendimientos específicos extracelulares de PT y LPS (medido como KDO), también aumentan con μ . Se calcularon entonces, las productividades específicas respectivas (q_{PT} y q_{KDO}) y se determinó, por cuadrados mínimos, la relación existente entre cada una de ellas y la velocidad específica de crecimiento (Figura 5.5 A y 5.5 B).

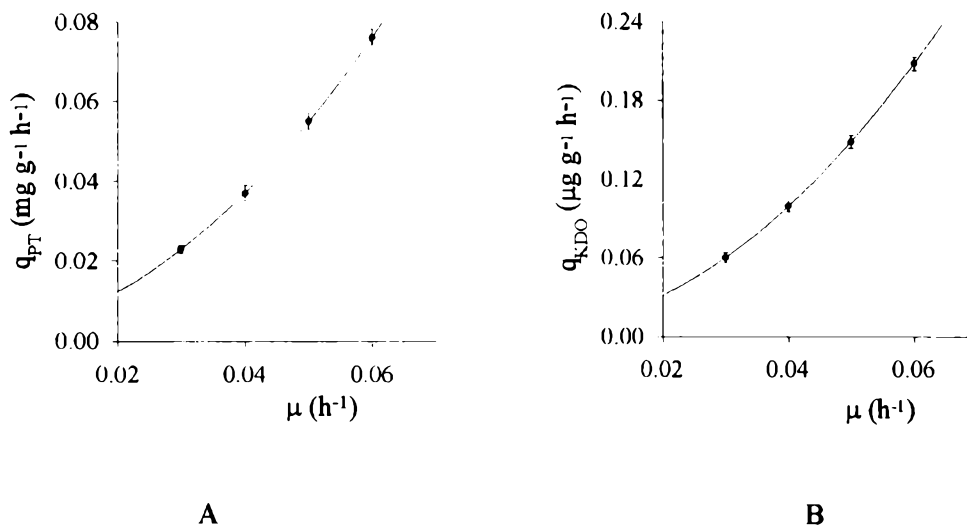


Figura 5.5: Efecto de la velocidad específica de crecimiento de *B. pertussis* en medio SS, sobre la velocidad específica de producción de PT (A) y LPS (KDO) (B) extracelulares.

Las curvas de las Figura 5.5 se ajustan ($p < 0.01$) a las siguientes ecuaciones empíricas

$$q_{PT} = 0.00 + 0.26 \mu + 17.02 \mu^2 \quad \text{ec. 5.10}$$

$$q_{KDO} = 0.01 + 0.12 \mu + 52.85 \mu^2 \quad \text{ec. 5.11}$$

Estos resultados indican que tanto PT como LPS pueden ser considerados productos asociados al crecimiento celular. Sin embargo, mientras PT presenta un patrón de producción totalmente asociado al crecimiento (término independiente: cero), la excreción de LPS presenta, además, un término de producción no asociado al desarrollo celular. Este resultado está de acuerdo con estudios previos¹⁷¹ donde se encontró que células de *B. pertussis* que no estaban en división, liberaban LPS al medio extracelular. Esta fracción de LPS que se excreta independientemente del crecimiento explica, en cierta medida, la diferencia encontrada en la relación LPS(KDO)/PT en el medio extracelular de cultivos continuos y cultivos batch (Tabla 5.2). El cultivo continuo es un sistema que sólo se puede operar si los microorganismos están duplicándose permanentemente. En el cultivo batch, en cambio, hay períodos de tiempo en los cuales las bacterias no están dividiéndose. En este último caso, según la ec. 5.10 y 5.11, habría liberación de LPS pero no de PT, aumentando finalmente la relación LPS(KDO)/PT global.

Al margen de esto, se encontró una relación constante a distintos D, en los niveles de excreción de ambos productos extracelulares cuando las células están en división, lo cual se refleja en una relación lineal entre ambas productividades, según se puede ver en la Figura 5.6.

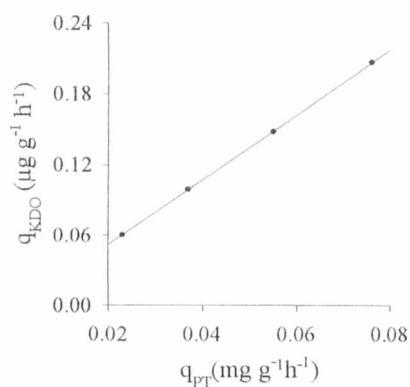


Figura 5.6: Relación de velocidades específicas de producción de PT y KDO extracelular, en cultivos de *B. pertussis* en medio SS, llevados a cabo en cultivo continuo a distintas velocidades de dilución.

Se estudió la posibilidad de que la causa de la variación observada en los niveles extracelulares de PT y LPS en las diferentes velocidades específicas de crecimiento, se debiera a alguna modificación de la membrana externa que alterase la permeabilidad de la misma. Existen publicaciones al respecto donde se reporta que la velocidad específica de crecimiento modifica la composición y permeabilidad de la membrana externa de algunos patógenos, modificando así la excreción de toxinas periplásmicas¹⁷². Estas modificaciones suelen reflejarse en cambios cuali/cuantitativos de los componentes de membrana externa: proteínas y/o LPS.

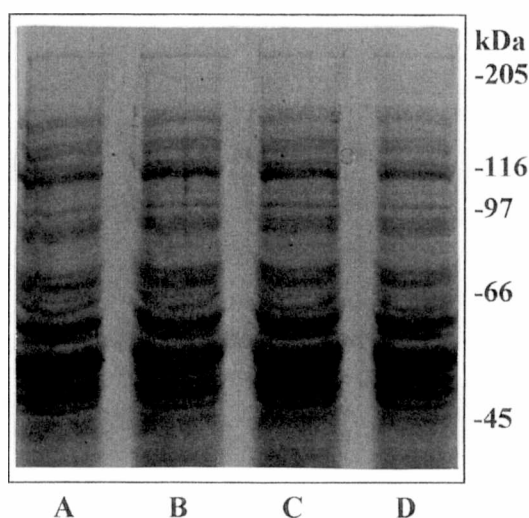


Figura 5.7: SDS-PAGE (12.5%) de polipéptidos de membrana externa de células de *B. pertussis* cultivadas en sistema de cultivo continuo a distintas velocidades de dilución: **A)** D: 0.03 h^{-1} , **B)** D: 0.04 h^{-1} , **C)** D: 0.05 h^{-1} , **D)** D: 0.06 h^{-1} .

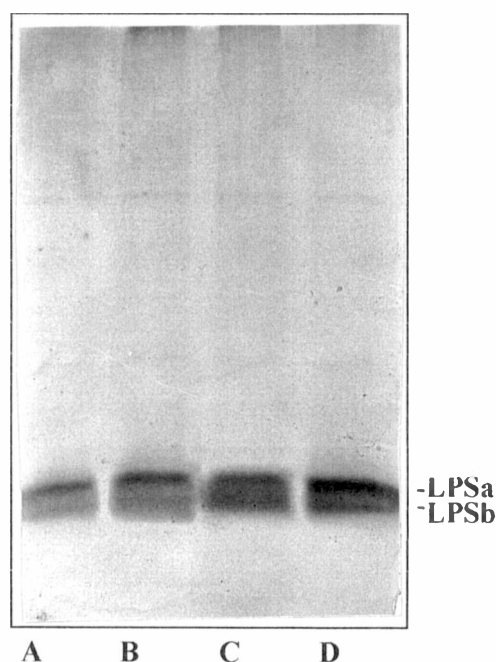


Figura 5.8: SDS-PAGE (15%) de LPS de células de *B. pertussis* cultivadas en sistema de cultivo continuo a distintas velocidades de dilución: **A)** D: 0.03 h⁻¹, **B)** D: 0.04 h⁻¹, **C)** D: 0.05 h⁻¹, **D)** D: 0.06 h⁻¹.

El análisis de polipéptidos de membrana externa (PME) y de LPS celular por electroforesis en condiciones desnaturalizantes no deja traslucir ninguna diferencia apreciable en las cubiertas celulares de microorganismos cultivados a distintas velocidades de dilución (Figuras 5.7 y 5.8).

Estos resultados indican que el incremento observado en la liberación de PT y LPS con el aumento de la velocidad específica de crecimiento, podría estar relacionado con algún tipo de ajuste metabólico más que con una alteración a nivel de la membrana externa.

A diferencia de lo observado en la Figura 5.7, existen claras diferencias en los perfiles polipeptídicos de membrana externa (Figura 5.9) de células de *B. pertussis* provenientes de un cultivo en medio sólido, de un cultivo continuo conducido a velocidad submáxima ($\mu = 0.05 \text{ h}^{-1} < \mu_m$), y de un cultivo batch en fase exponencial (μ_m). No es posible atribuir estas diferencias a una causa en particular, ya que las condiciones de cultivo son diferentes en muchos aspectos: velocidad específica de crecimiento, medios de cultivo (ABGs y SS), tipo de crecimiento (restringido e irrestringido), etc. De todas formas, este resultado es particularmente interesante dado que las condiciones de crecimiento *in vivo* imponen velocidades específicas de crecimiento submáximas. Desde este punto de vista las proteínas diferenciales que aparecen en la cubierta celular en condiciones de velocidad específica de crecimiento submáxima (cultivo continuo), pueden tener importancia desde el punto de vista antigénico¹⁷². En definitiva, es posible que la existencia de proteínas de membrana externa diferenciales, según las células de *B. pertussis*

provengan de un cultivo batch o continuo, señale a este último sistema de cultivo como el más adecuado para la producción de vacunas celulares.

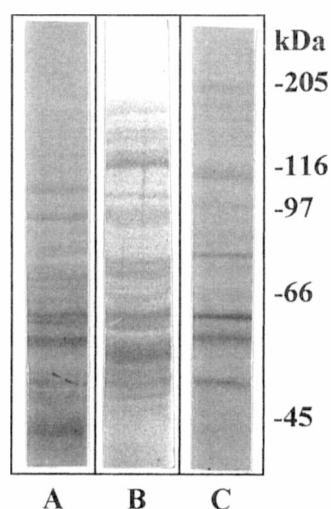


Figura 5.9: SDS-PAGE (12.5%) de polipéptidos de membrana externa de células de *B. pertussis* provenientes de : **A)** medio sólido (ABGs), **B)** medio líquido (SS) en sistema de cultivo continuo, **C)** medio líquido (SS) en sistema de cultivo batch.

Por otro lado, siendo el cultivo continuo un sistema en el cual hay crecimiento celular durante todo el tiempo de proceso, parece ser también el más adecuado para la producción de células y antígenos asociados al crecimiento, tal como PT.

En la Tabla 5.2 se muestran las productividades de células y PT extracelular, alcanzadas en cultivo batch y en cultivo continuo de *B. pertussis* en medio SS. Se puede observar que, la concentración de biomasa obtenida en cultivo continuo es dos veces mayor. Esto es coherente con la observación anterior, en la que se verificó que en cultivo batch (en medio SS) el desarrollo celular no se detiene por agotamiento de nutrientes sino por acumulación de sustancias tóxicas. Es evidente que por tratarse de un sistema abierto, en el cultivo continuo no hay acumulación de dichas sustancias lo cual posibilita un adecuado aprovechamiento de los nutrientes. La concentración de PT extracelular alcanzada en cultivo continuo también es aproximadamente el doble de la obtenida en cultivo batch, lo cual estaría indicando que la producción específica de este antígeno no se ve afectada. Pero la productividad volumétrica (P_v) de PT extracelular, en sistema de cultivo continuo, es aproximadamente siete veces mayor que en sistema batch, lo cual indica a este sistema de cultivo conducido a altas velocidades de dilución, como óptimo tanto para la producción de células como de PT extracelular. Mas aún teniendo en cuenta que la relación LPS(KDO)/PT en el sobrenadante del cultivo continuo es menor que la detectada en cultivos batch; lo cual favorece el proceso de purificación de antígenos de sobrenadante.

Tabla 5.2: Estudio comparativo de la productividad de células y antígenos de *B. pertussis* en medio SS, en sistema de cultivo batch y continuo

Sistema de cultivo	X g/l	PT mg/l	KDO μg/l	KDO/PT μg/mg
C. BATCH	1.10	1.20	4.87	4.06
C. CONTINUO	2.10	2.46	6.49	2.63

Los datos presentados en esta tabla corresponden a la media de tres determinaciones independientes con duplicados

$$P_r \text{ CB} = C / (t_{\text{cul}} + t_{\text{lag}} + t_m) \quad \text{CULTIVO BATCH}$$

$$C: 1.20 \text{ mg/l} \quad t_{\text{cul}}: 25 \text{ hs.} \quad t_{\text{lag}}: 6 \text{ hs.} \quad t_m: 25 \text{ hs}$$

$$P_r \text{ CB} = 0.021 \text{ mg/l.h}$$

$$P_r \text{ CC} = C \times D \quad \text{CULTIVO CONTINUO}$$

$$C: 2.46 \text{ mg/l} \quad \mu_m: 0.06 \text{ h}^{-1}$$

$$P_r \text{ CC} = 0.150 \text{ mg/l.h}$$

Donde:

- P_r : productividad
- C: concentración de toxina
- D: velocidad de dilución
- t_{cul} : tiempo de cultivo
- t_{lag} : tiempo de latencia
- t_m : tiempo muerto
- CB: cultivo batch
- CC: cultivo continuo

5.3. Efecto de la tensión de oxígeno disuelto en el medio de cultivo sobre la producción de células y antígenos.

Ningún microorganismo es indiferente a la presencia de oxígeno. Para algunos es esencial para la vida, para otros es tóxico incluso en pequeñas cantidades, y para casi todos se comporta como un efector ambiental muy importante en la regulación metabólica. El oxígeno es un efector complejo, cada microorganismo reacciona de forma diferente y algunos incluso, cambian sus

constituyentes enzimáticos para adaptarse al entorno oxidante o reductor en el que se están desarrollando. Siendo *B. pertussis* un organismo acrobio estricto que infecta las vías respiratorias superiores, este efector puede tener influencia en la expresión de los factores de virulencia y demás antígenos del microorganismo. En el cultivo batch (capítulo 3) el oxígeno disuelto se dejó evolucionar libremente, con lo cual el nivel de este nutriente en el medio de cultivo cambió constantemente a lo largo del tiempo junto con las demás condiciones.

En esta sección se empleó el sistema de cultivo continuo para estudiar la influencia de la tensión de oxígeno disuelto sobre el desarrollo celular y la expresión antigénica. Se trabajó en cuatro niveles de oxígeno (Tabla 5.3), manteniéndose invariables las demás condiciones de cultivo. Los niveles ensayados fueron: uno bajo (5%), dos medios (30% y 60%), y uno alto (90%). Todos los cultivos continuos se llevaron a cabo con medio SS, y se operaron a una velocidad de dilución alta (0.05 h^{-1}) con el fin de obtener buen nivel de antígenos solubles. No se trabajó a velocidad de dilución mas cercana a μm porque el sistema se vuelve inestable y lograr un estado estacionario se hace dificultoso.

En la Tabla 5.3 se muestran los valores medios de los rendimientos de biomasa ($y_{x/s}$) obtenidos en cada condición de cultivo. Sólo los rendimientos alcanzados en las dos condiciones de mayor concentración de oxígeno disuelto (60 y 90 %), presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí y respecto de los rendimientos alcanzados en las demás condiciones de cultivo especificadas en dicha Tabla. Estos resultados ponen de manifiesto que los niveles altos de oxígeno en el cultivo van en detrimento de los rendimientos celulares, y que la caída en dichos rendimientos es mayor cuanto más alto es el nivel de oxígeno.

En lo que se refiere a la producción específica de PT extracelular ($Y_{PT/x}$) cabe señalar que sólo la producción observada en condiciones de cultivo del 30% de saturación de oxígeno es diferente, con un grado de significación $\alpha < 0.05$, a las alcanzadas en las otras condiciones de cultivo especificadas en la Tabla 5.3. Con lo cual queda en evidencia que en esta condición de cultivo se favorece la producción específica de este antígeno extracelular. Lo mismo se verifica para la producción específica de LPS extracelular (medido como KDO).

La actividad hemaglutinante del sobrenadante (HA) desaparece a niveles altos de oxígeno disuelto. Cabe señalar que esta pérdida de actividad no se debe a la ruptura de la molécula de FHA, según se pudo comprobar por inmunodetección.

En lo que se refiere a la concentración de LPS (medido como KDO) en el sobrenadante de cultivo, en la Tabla 5.3 se puede ver que su producción específica ($Y_{KDO/x}$) tiene un perfil de variación con el oxígeno disuelto, similar a la producción específica de PT. Este resultado está de acuerdo con estudios previos que sugieren una posible liberación conjunta de ambos componentes. En apoyo de esta teoría cabe indicar además, que los niveles estacionarios de PT y LPS alcanzados en los distintos cultivos continuos, conducidos a diferentes niveles de oxígeno disuelto, mantuvieron una relación PT/LPS aproximadamente constante y de un valor similar al obtenido anteriormente (en la serie de cultivos continuos llevados a cabo a diferentes velocidades de dilución).

Tabla 5.3. Influencia del nivel de oxígeno disuelto en el medio de cultivo, sobre los rendimientos celulares, antigénicos y endotóxicos de *B. pertussis* cultivada en medio SS

PO ₂ d % de saturación de O ₂	Y _{x/s} Cmol/Cmol	Y _{PT/x} mg/g	Y _{KDO/x} μg/g	HA título
5	0.22	0.67	1.68	32
30	0.22	1.12	2.90	32
60	0.19	0.70	1.69	2
90	0.16	0.68	1.67	0

Los datos mostrados en esta tabla corresponden a la media de 3 determinaciones independientes con duplicados. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Las medias se compararon según el test de Menor Diferencia Significativa (LSD), con un grado de significación: $\alpha < 0.05$.

Tabla 5.4: Influencia del nivel de oxígeno disuelto en el medio de cultivo en la producción de dióxido de carbono y el consumo de oxígeno de *B. pertussis* en medio SS.

PO ₂ d % de saturación de O ₂	Y _{CO₂/x} Cmol/Cmol	Y _{O₂/x} mol/Cmol	Y _{CO₂/s} Cmol/Cmol	Y _{O₂/s} mol/Cmol
5	3.27	2.77	0.72	0.61
30	3.36	2.81	0.74	0.62
60	4.10	3.58	0.78	0.68
90	5.25	4.75	0.84	0.76

Los datos mostrados en esta tabla corresponden a la media de 3 determinaciones independientes con duplicados. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Las medias se compararon según el test de Menor Diferencia Significativa (LSD), con un grado de significación: $\alpha < 0.05$.

De los valores medios mostrados en la Tabla 5.4, sólo los correspondientes a las dos condiciones de cultivo de mayor concentración de oxígeno disuelto, presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí y respecto a las demás condiciones de cultivo. En estas condiciones de operación hay un aumento en la producción específica de dióxido de carbono ($y_{CO_2/x}$) y en el consumo específico de oxígeno ($y_{O_2/x}$), que se acentúa a medida que aumenta el

nivel de oxígeno disuelto. También la producción de dióxido de carbono y el consumo de oxígeno por carbono-mol de glutamato consumido, aumentan en estas condiciones de cultivo.

La composición proteica y lipídica (fundamentalmente los ac. grasos insaturados del LPS) de la membrana externa de los microorganismos es generalmente sensible a los niveles de oxígeno en el medio extracelular¹⁷³. Se compararon los perfiles electroforéticos de proteínas de membrana externa y LPS, celular y extracelular, de células cultivadas bajo cada uno de los cuatro niveles de oxígeno disuelto.

Los perfiles de LPS, tanto celular como extracelular, no mostraron diferencias apreciables (Figuras 5.10.I y 5.10.II), .

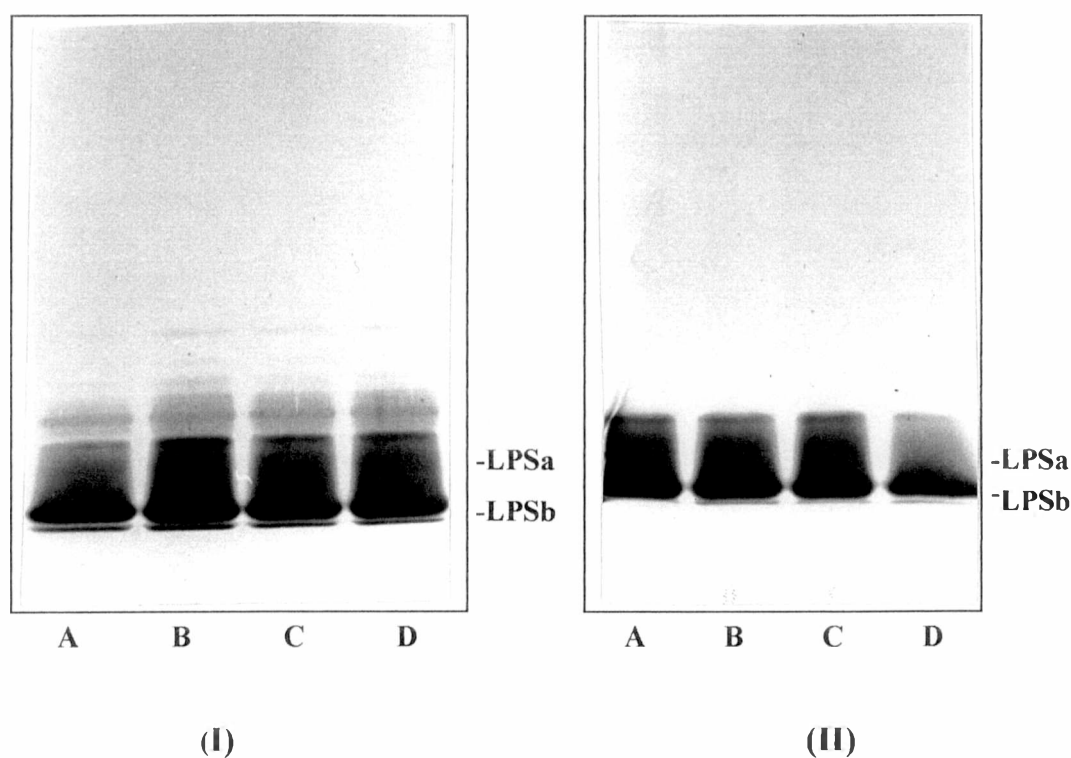


Figura 5.10: SDS-PAGE (15%) de LPS de células (I) y sobrenadante (II) de *B. pertussis* cultivada en sistema continuo en distintos niveles de saturación de oxígeno disuelto: A) 90%, B) 60%, C) 30%, D) 5%

En lo que se refiere a la composición proteica de las células, el perfil proteico total de células no muestra ninguna modificación apreciable con la variación de la tensión de oxígeno disuelto (Figura 5.11).

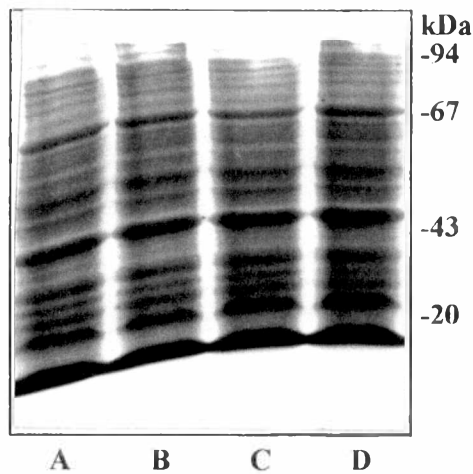


Figura 5.11: SDS-PAGE (15%) de polipéptidos totales de células de *B. pertussis* cultivadas en sistema continuo a distintos niveles de saturación de oxígeno disuelto: **A)** 90%, **B)** 60%, **C)** 30%, **D)** 5%

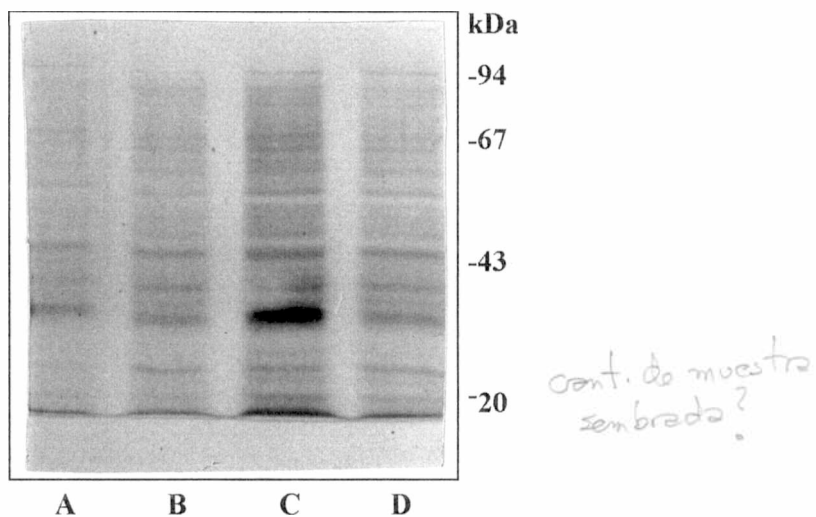


Figura 5.12: SDS-PAGE (15%) de polipéptidos de membrana externa de células de *B. pertussis* cultivadas en sistema continuo a diferentes niveles de saturación de oxígeno disuelto: **A)** 90%, **B)** 60%, **C)** 30%, **D)** 5%

Los componentes proteicos de membrana externa, en cambio, muestran una banda de mayor intensidad en la zona de pesos moleculares cercana a los 30 kDa, en aquellas células crecidas en 30% de saturación de oxígeno (Figura 5.12). Esta zona de pesos moleculares no corresponde a ningún antígeno previamente caracterizado (ver Introducción), pero es la zona correspondiente a los marcadores de virulencia de *B. pertussis*. Lo que se ve en la Figura 5.12 es un aumento relativo de estas proteínas en las células crecidas en 30 % de saturación de oxígeno.

Se investigó entonces, por inmunodetección, la presencia de otro marcador de virulencia: pertactina (P69), en membrana externa de células cultivadas en las cuatro condiciones.

Como se puede ver en la Figura 5.13, P69 está presente en todas las condiciones ensayadas, con lo cual podría esperarse que las células cultivadas en cualquiera de las cuatro condiciones de trabajo se encuentren en fase virulenta (la síntesis de esta proteína se regula conjuntamente con los demás factores de virulencia). No obstante, J. Poolman y col.¹⁷⁴ encontraron que las proteínas de membrana externa de pesos moleculares cercanos a los 30 kDa (en particular las de 32 y 38 kDa) están directamente involucradas en la respuesta inmune generada por la vacuna celular de pertussis. Por esta razón, el aumento de intensidad observado en bandas de este peso molecular en el perfil de PME de células cultivadas en niveles del 30% de saturación de oxígeno, podría tener importancia desde el punto de vista antigénico y deberá ser motivo de estudio.

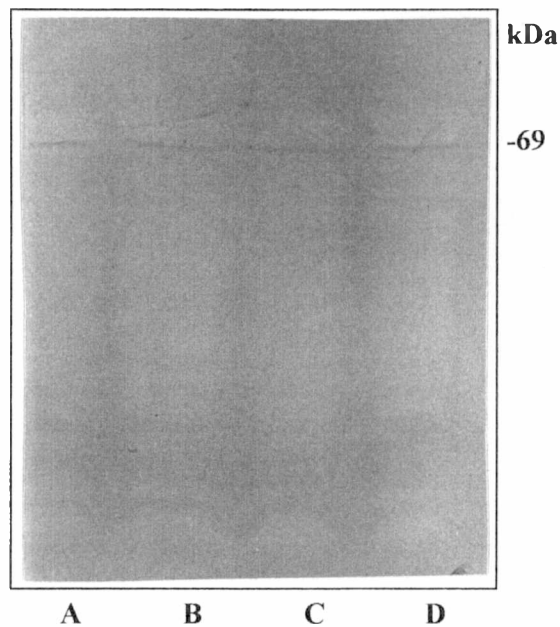


Figura 5.13: Inmunodetección de la proteína de 69 kDa de membrana externa en células de *B. pertussis* cultivadas en sistema continuo a distintos niveles de saturación de oxígeno disuelto: **A)** 90%, **B)** 60%, **C)** 30%, **D)** 5%

Un resultado que debe ser considerado preliminar, pero que es interesante mencionar, se detalla a continuación. Cuando se analizó el contenido intracelular de NADH en las células cultivadas en las cuatro condiciones oxígeno disuelto, se encontró una concentración relativamente mayor de este metabolito, en aquellas células cultivadas en las condiciones de menor PO_2 (5%).

Se encontró el mismo resultado en muestras de células provenientes de quimiostatos iniciados a partir de cultivos batch independientes, y en muestras de células provenientes de cultivos continuos donde cada estado estacionario sirvió de punto de partida para el establecimiento de la siguiente condición a ensayar. Con lo cual, las células parecen variar

efectivamente su contenido de NADH intracelular en respuesta a la variación en la concentración extracelular de oxígeno.

La toma de muestra es crítica cuando se trata de metabolitos intracelulares como este. Si bien en todos los casos dichas muestras se tomaron según lo recomendado por Sáenz y Laguna¹³⁶, estos resultados quizás deberían ser confirmados empleando otras técnicas de toma de muestra.

Lo que llama la atención, es que el mecanismo comúnmente utilizado por los microorganismos para evitar la acumulación de poder reductor, es la liberación de productos intermedios del metabolismo. Los resultados expuestos muestran que, según el balance de carbono, no hubo liberación de tales productos. Evidentemente podría suceder que las cantidades producidas fuesen lo suficientemente pequeñas frente a las de los demás productos carbonados, como para pasar inadvertidas en los balances de materia y energía. Esto sugiere la necesidad de investigar la presencia de eventuales productos en sobrenadante de cultivo con técnicas de alta sensibilidad. Una investigación complementaria sería el estudio de los flujos metabólicos en condiciones de limitación de oxígeno, determinando si existe excreción de intermediarios metabólicos, y qué efecto produce la limitación de oxígeno sobre los niveles de NADH intracelular. Un estudio de este tipo podría significar un importante avance en la comprensión de la poco conocida fisiología de este microorganismo.

5.4 Estudio de la respuesta adaptativa de *B. pertussis* a la baja disponibilidad de nutrientes.

La composición cuali-cuantitativa del medio de cultivo es un aspecto decisivo en el metabolismo y los constituyentes celulares del microorganismo. En particular, las limitaciones nutricionales pueden cambiar drásticamente la fisiología del mismo. Los cambios que se producen están generalmente vinculados con la adaptación e interacción con el entorno y se reflejan a nivel de la superficie celular.

Sin embargo, este aspecto ha sido muy poco explorado en el caso de *B. pertussis*. La única limitación nutricional que ha sido examinada es la baja disponibilidad de hierro. Dicho estudio se ha restringido a los cambios ocurridos en proteínas y lipopolisacáridos de membrana externa, como consecuencia de la escasez de hierro libre en el medio de cultivo.

En los ecosistemas de los microorganismos, uno o más nutrientes esenciales se encuentran en defecto. En el caso particular de los patógenos, la adaptación al entorno implica, además del desarrollo de los mecanismos necesarios para enfrentar la escasez de nutrientes, la expresión de factores de virulencia y mecanismos de protección frente a las defensas del organismo huésped. Un cuadro de infección involucra una primera etapa de adhesión superficial, un crecimiento lento en un entorno pobre en nutrientes esenciales, una estructura de membrana externa y fisiología general característica de estas condiciones, además de la máxima expresión de los factores de virulencia.

En particular, el entorno natural de *B. pertussis* está constituido por secreciones de la mucosa del tracto respiratorio superior. En este medio, como en lo demás fluidos corporales de los mamíferos, la mayor parte del hierro no está libre sino que está asociado a una proteína de alta afinidad (en este caso, lactoferrina). La baja disponibilidad de hierro libre ($\sim 10^{-12}$ μM ¹⁷⁵) en

células y espacio extracelular se conoce como inmunidad nutricional¹⁷⁶ y constituye una defensa generalizada en los organismos huésped. Ante esta situación, la posesión de sistemas de alta afinidad para la captura y el transporte de hierro al interior de la célula, es un determinante de virulencia esencial para el establecimiento de una bacteria infecciosa.

Los microorganismos patógenos han desarrollado mecanismos de captura de hierro¹⁷⁷. Los genes involucrados en estos mecanismos están generalmente regulados por la disponibilidad de este nutriente. En muchas bacterias, estos mecanismos están basados en la síntesis y secreción de pequeños compuestos (de peso molecular menor a los 1.000 Da) llamados sideróforos, que tienen alta afinidad por el hierro¹⁷⁸. Se han descrito más de 200 tipos de sideróforos que en su gran mayoría son hidroxamatos o catecol-fenolatos. Estos compuestos son capaces de extraer el hierro de proteínas tales como la lactoferrina o transferrina y formar ferrisideróforos. Los cuales a su vez, son reconocidos por proteínas de membrana externa, cuya síntesis también es inducida por la falta de hierro, internalizados y despojados de dicho catión. Algunas bacterias no secretan sideróforos¹⁷⁹ pero poseen proteínas de membrana externa, cuya síntesis se reprime en presencia de altas concentraciones de hierro, capaces de unir directamente transferrina o lactoferrina.

Rehead y col.¹⁸⁰ mostraron que *B. pertussis* es capaz de crecer en presencia de hierro quelado con transferrina, ovotransferrina o lactoferrina. En su estudio no pudieron detectar la presencia de sideróforos, sugiriendo que *B. pertussis* obtendría el hierro a través de una interacción directa con la transferrina, lactoferrina, etc. Tiempo después, otros autores^{181,182} encontraron (empleando técnicas más sensibles) que, si en el medio de cultivo hay transferrina o lactoferrina, *B. pertussis* produce y excreta sideróforos (químicamente hidroxamatos). También encontraron que en estas condiciones se induce la síntesis de una proteína de membrana externa de 27 kDa, capaz de unir directamente transferrina y lactoferrina *in vitro*. Se encontró que este posible receptor, único para ambas proteínas, tiene mayor afinidad por lactoferrina¹⁸³. Este resultado es coherente con el comportamiento no invasivo de esta bacteria, lo cual hace que sea muy poco probable que tome contacto con transferrina en su entorno natural.

También se han descrito proteínas de membrana externa que se inducen en presencia de altas concentraciones de hierro (PIF)^{183,184}.

Estos estudios, que representan todo lo que se ha publicado acerca la respuesta adaptativa de *B. pertussis* frente a un entorno deficiente en hierro, se llevaron a cabo en sistema de cultivo batch y en presencia de complejantes (lactoferrina y transferrina) en el medio de cultivo para disminuir la concentración de hierro libre. No hay estudios referentes al desarrollo celular ni a la excreción de antígenos en estas condiciones de cultivo. Esto último es particularmente interesante, ya que la producción y excreción de una gran variedad de proteínas extracelulares bacterianas, incluyendo toxinas, es regulada por los niveles de hierro presentes en el entorno del microorganismo¹⁸⁵. Por último, tampoco hay estudios comparativos del efecto de esta limitación en relación a otros sustratos limitantes.

Si bien *B. pertussis* crece en condiciones de baja disponibilidad de hierro *in vivo*, razón por la cual el estudio de esta condición de cultivo es importante, esto no significa que este nutriente sea necesariamente el único sustrato que se encuentra en baja disponibilidad. El fósforo y el azufre son dos nutrientes que también suelen encontrarse en baja disponibilidad en este tipo de entornos naturales y ambos son considerados importantes efectores fisiológicos.

Los microorganismos cuentan con sistemas de transporte específicos de fosfatos¹⁸⁶ (las fuentes de fósforo orgánicas son muy poco comunes). No se sabe nada acerca de la adaptación fenotípica de estos "carriers" en condiciones de limitación de P, como así también, es poco lo que se conoce acerca de la forma en que la asimilación inicial de fosfato, que procede vía la fosforilación del ADP, se ve afectada por dicha limitación.

Del estudio de los cambios producidos en la composición química de la célula microbiana en respuesta a la falta de P, se sabe que la célula utiliza el poco P disponible para la síntesis de aquellos compuestos fosforados esenciales para la vida. Así la síntesis de ácidos nucleicos se prioriza frente a las demás estructuras celulares en las que la presencia de P no es de vital importancia. Generalmente la composición de la cubierta celular, en particular la fracción fosfolipídica de las membranas, varía notablemente ya que es reemplazada por componentes no fosforados¹⁸⁶. Otro mecanismo de adaptación observado frecuentemente en estas condiciones de cultivo es la represión de ciertas proteínas periplásmicas y la inducción de la síntesis de otras generalmente relacionadas, directa o indirectamente, con la captura y metabolización del fósforo.

En el caso de *B. pertussis* las posibles modificaciones a nivel de membrana externa y proteínas periplásmicas son particularmente interesantes ya que los antígenos más importantes son, precisamente, proteínas de localización periplásmica.

La respuesta de *B. pertussis* a la baja disponibilidad de azufre en el entorno también presenta un interés especial, pues se ha encontrado que el grado de disponibilidad de este nutriente afecta de forma directa los mecanismos de regulación de la virulencia en otros organismos Gram(-)¹⁸⁷.

El empleo del quimiostato permite estudiar la respuesta fisiológica del microorganismo frente a entornos con deficiencias nutricionales, en condiciones de cultivo donde cualquier otro parámetro, como la velocidad específica de crecimiento, el pH, etc., se mantiene invariable y en niveles prefijados. De esta forma se puede atribuir inequívocamente cualquier efecto observado, al cambio de sustrato limitante del crecimiento. En atención a los resultados obtenidos en estudios previos (punto 5.3 y 5.4) todos los ensayos se llevaron a cabo a una velocidad de dilución alta ($D: 0.05 \text{ h}^{-1}$) y en un nivel de PO_2 del 30%. Las restricciones nutricionales investigadas aquí se refieren a la baja disponibilidad de fuente de hierro, fósforo, azufre (a través la deficiencia en cistina) y prolina. La discusión se ha limitado a la respuesta observada en cada estado estacionario y se la ha comparado con los resultados encontrados en limitación por carbono y energía (sustrato limitante del medio formulado por Stainer Scholte y recomendado para la producción de vacunas), con el fin de considerar la reformulación del medio de cultivo en función de la expresión antigénica.

La composición de los medios de cultivo utilizados para limitar el crecimiento de *B. pertussis* en cada uno de los nutrientes indicados anteriormente, se detalla en Materiales y Métodos.

En lo que se refiere a la limitación de hierro hay que señalar que, antes de emplear la concentración de hierro libre indicada en Materiales y Métodos, se llevaron a cabo varios cultivos continuos preliminares. Se trabajó con medio SS sin agregado de hierro, de acuerdo a un reporte previo de Gorringer y col.¹⁸¹ en el cual se indica que el requerimiento de *B. pertussis*, en lo que se refiere a este nutriente, es tan bajo que queda cubierto con las impurezas de hierro que contienen las demás drogas que componen el medio de cultivo. En el presente trabajo, en el que se empleó el

sistema de cultivo continuo, el medio SS formulado sin SO_4Fe no posibilitó el desarrollo microbiano. La razón de esta aparente discrepancia entre lo reportado por Gorringe y lo observado en este trabajo está justamente en el tipo de sistema de cultivo empleado. Gorringe y col. comienzan el cultivo de *B. pertussis* a partir de un crecimiento en placas de ABGs que luego transfieren a un medio líquido formulado sin hierro (excepto aquél que esté como impureza en las otras drogas del medio de cultivo). Como el cultivo se lleva a cabo en batch, que es un sistema cerrado, la sangre arrastrada desde el medio sólido queda en el medio líquido durante todo el proceso. *B. pertussis* es capaz de utilizar el grupo hem como fuente de hierro¹⁸², y esto es lo que le permite crecer. Esta observación está respaldada por los resultados obtenidos por Redhead y Hill¹⁸⁴ que encontraron que si las células se lavan antes de comenzar el cultivo batch en medio SS sin hierro, *B. pertussis* no crece.

Por último, en lo que se refiere a la limitación de azufre hay que aclarar que se ha reportado¹⁰⁵ que *B. pertussis* es capaz de incorporar azufre únicamente a través de cistina. En principio, en el medio SS habría otras dos fuentes de azufre: el glutatión reducido y el SO_4^- . La cantidad de S aportada por el SO_4^- es muy pequeña, además *B. pertussis* no es capaz de usar esta fuente de azufre. En lo que se refiere al glutatión, su función como agente reductor conjuntamente con el ácido ascórbico, resulta indispensable para la remoción de productos tóxicos que se forman como consecuencia de la reducción del oxígeno molecular. *B. pertussis* posee una catalasa y una superóxido dismutasa, metaloenzimas dependientes de glutatión y ác. ascórbico, responsables de la remoción de dichos productos tóxicos. La conservación de la estructura del glutatión como tal, es imprescindible para la vida de esta bacteria. De cualquier forma aunque los reportes bibliográficos señalan a la cistina como única fuente de S presente en el medio SS, es imposible asegurar que el glutatión no sufra degradación alguna. Cabe destacar, sin embargo, que estudios previos revelan que *B. pertussis* es incapaz de crecer en medio SS formulado sin cistina.

5.4.a. Influencia del sustrato limitante del crecimiento sobre las características de membranas externa de *B. pertussis*.

5.4.a.I. Comparación de los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana externa

En la Figura 5.14 se pueden ver los perfiles de PME de células cultivadas en limitación de carbono y energía (SS) y de células cultivadas en limitación de hierro (SS-Fe).

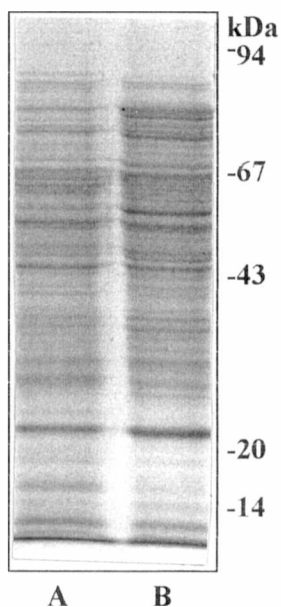


Figura 5.14: SDS-PAGE (16%) de polipéptidos de membrana externa de células de *B. pertussis* cultivadas en quimiostato en condiciones de baja disponibilidad de: línea **A**) fuente de carbono y energía (glutamato) y línea **B**) fuente de hierro.

En la Figura 5.14 se puede ver que el perfil de PME de células cultivadas en SS-Fe difiere bastante del de células cultivadas en medio SS. Varias de las bandas proteicas diferenciales que se observan en limitación de hierro en la Figura 5.14, coinciden con bandas diferenciales reportadas en trabajos (mencionados anteriormente) donde la baja disponibilidad de hierro en el medio de cultivo de *B. pertussis* se logró mediante el agregado de proteínas complejantes de dicho nutriente, como transferrina, lactoferrina, ovotransferrina, etc.. Así, Redhead y col.¹⁸⁰ reportaron el ensanchamiento de una banda proteica de 77 kDa en membrana externa de *B. pertussis* cultivada en limitación de hierro. Estos autores demostraron que la proteína responsable del ensanchamiento de la banda de 77 kDa poscía capacidad inmunogénica. Pensaron que podría tratarse de ovotransferrina (presente en el medio de cultivo utilizado por ellos) que habría permanecido unida a la membrana externa de la bacteria. Sin embargo, en la Figura 5.14 (línea B) aparece el ensanchamiento de una banda proteica de este peso molecular. Siendo ésta una electroforesis de PME de células que no han estado en contacto con ovotransferrina, cabe suponer que la falta de hierro induce en *B. pertussis*, la síntesis de una proteína antigénica de este peso molecular.

Por otra parte, Gorrige y col.¹⁸¹ reportaron que en baja disponibilidad de hierro libre aparece una banda proteica de aproximadamente 74 kDa, y sugirieron que podría tratarse de un receptor de sideróforos. En la Figura 5.14 aparece una banda de este peso molecular en los PME de células cultivadas en limitación de hierro. Se investigó la presencia de sideróforos en sobrenadantes de cultivo de *B. pertussis* llevados a cabo en medio SS-Fe, según lo descrito en Materiales y Métodos. La confirmación de la presencia de sideróforos en dichos sobrenadantes demostró que la producción de estos componentes en *B. pertussis* está inducida por la falta de

hierro, sin importar si dicha deficiencia está dada por baja concentración de hierro en el medio de cultivo o porque dicho elemento se encuentre complejoado.

Asimismo, Menozzi, y col¹⁸³ reportaron la inducción de la síntesis de una proteína de 27 kDa en membrana externa de *B. pertussis* en condiciones de baja disponibilidad de hierro en el medio de cultivo (hierro complejoado con transferrina o lactoferrina). Indicaron que ésta proteína podría ser el receptor de membrana externa de transferrina y lactoferrina, pues encontraron que era capaz de unirse a ambas proteínas *in vitro*. En la Figura 5.14 se ve que en esta zona de pesos moleculares aparece una banda proteica mas acentuada en el perfil de PME de las células crecidas en SS-Fe. Esto podría estar indicando que este receptor, si es que lo es, sería inducido en condiciones de baja disponibilidad de hierro aunque no haya transferrina ni lactoferrina en el medio de cultivo. Otra posibilidad es que sea, en realidad, una proteína con afinidad por el hierro y por esta razón se comporte como un receptor de transferrina y lactoferrina. Existen reportes que indican que ésta proteína de 27 kDa es retenida en columnas cromatográficas de hierro inmovilizado. A la luz de estos resultados hay que señalar que, si en realidad se tratase de un receptor de transferrina/lactoferrina y no de una proteína con alta afinidad por el Fe, sería un receptor muy atípico. Los receptores bacterianos de lactoferrina y transferrina que han sido caracterizados como tales son, precisamente, indiferentes a la presencia o ausencia de hierro ligado a las mismas

Por último, otras bandas diferenciales que han sido reportadas^{182,180} y se pueden ver en la Figura 5.14, son las siguientes:

-En exceso de hierro, limitación de carbono y energía, aparecen proteínas diferenciales inducidas por la alta concentración de hierro (PIF), cuyos pesos moleculares son : 24 y 18 kDa. Estas proteínas se cree que podrían estar involucradas en el almacenamiento de hierro.

-En limitación de hierro se atenúa una banda de 28 kDa.

En la Figura 5.15 se puede observar el perfil de polipéptidos de membrana externa de células cultivadas en limitación de carbono y energía (SS), células cultivadas en limitación de azufre (SS-S), y células cultivadas en limitación de fósforo (SS-P).

Se observan diferencias a lo largo de todo el perfil electroforético entre los PME de las células cultivadas en limitación de cistina y aquellas cultivadas con cistina en exceso (crecimiento limitado en otro nutriente, como es el caso de células cultivadas en SS o en SS-P). En particular, en las células cultivadas en SS-S falta una banda en la zona cercana a los 63 kDa, respecto a las otras dos condiciones. Paralelamente, en las células que han crecido en limitación de cistina, se acentúa y agranda una banda proteica de aproximadamente 58 kDa, mientras que se atenúan algunas bandas correspondientes a la zona de pesos moleculares cercanos a los 30 kDa..

Las proteínas diferenciales que aparecen en los PME de células cultivadas en SS-S podrían estar vinculadas con mecanismos de alta afinidad inducidos por la escasez de cistina en el entorno, tal como se ha descrito en otras bacterias¹⁸⁸, o simplemente ser consecuencia de la baja disponibilidad de aminoácidos azufrados. Lo más interesante es que las diferencias se encuentran en la zona de los marcadores de virulencia de membrana externa. Según Roberts y col.³² las proteínas de cubierta de peso molecular de 62.5 kDa y las de la zona de pesos moleculares alrededor de los 30 kDa son marcadores de fase virulenta. La atenuación o desaparición de estas

bandas proteicas en el perfil de PME de *B. pertussis* indica la reversión de la bacteria a fase avirulenta. De esta forma, el perfil polipeptídico de la Figura 5.15 podría estar indicando que en estas condiciones de cultivo la virulencia del microorganismo disminuye. Algo así se encontró en *Neisseria gonorrhoeae*, donde la limitación del crecimiento por privación de cistina provoca la reversión a fase avirulenta¹⁸⁷.

En lo que se refiere al efecto de la baja disponibilidad de fósforo sobre los PME de *B. pertussis*, en la Figura 5.15 se puede observar que en estas condiciones de cultivo la diferencia más significativa, respecto a los PME de células cultivadas en exceso de P (medios: SS-S y SS), es la desaparición de una banda proteica de aproximadamente 55 kDa. Los polipéptidos marcadores de virulencia, disminuidos o ausentes en PME de células cultivadas en limitación de cistina, no sólo están presentes en PME de células cultivadas en limitación de fósforo, sino que están acentuados incluso respecto a las células provenientes del SS (medio rico en fósforo).

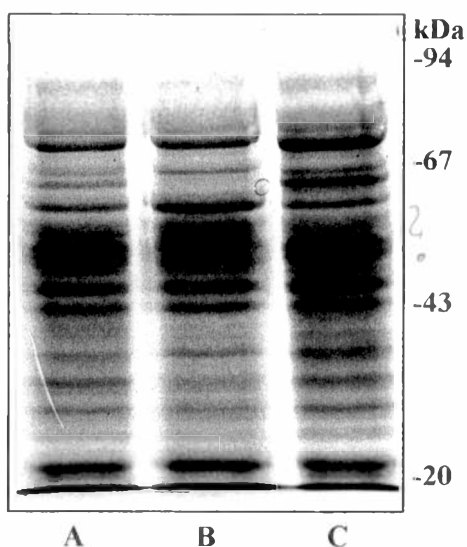


Figura 5.15: SDS-PAGE (14%) de polipéptidos de membrana externa de células de *B. pertussis* cultivadas en sistema continuo en condiciones de limitación de: línea **A**) glutamato, línea **B**) cistina, línea **C**) fósforo.

5.4.a.II. Comparación de los perfiles electroforéticos de LPS celular

Del análisis por SDS-PAGE de los LPS celulares, provenientes de células cultivadas en limitación de distintos nutrientes (Figura 5.16), es posible establecer que la naturaleza del sustrato limitante del crecimiento no tiene ningún efecto, visible a través de este método de análisis, sobre el LPS celular.

En este sentido se ha reportado¹⁸² que en condiciones de limitación de hierro se produce una alteración en la fracción LPS_b, del LPS de *B. pertussis*. En el reporte mencionado se sugiere que la falta de hierro podría provocar una fosforilación deficiente en este componente del LPS,

alterando su movilidad electroforética. En las condiciones experimentales en las que se llevó a cabo el presente estudio no se observó tal alteración. La discrepancia entre los resultados mostrados en este trabajo y los reportados en el artículo citado podría deberse a diferencias en las condiciones electroforéticas empleadas, o en las condiciones de cultivo del microorganismo. En relación a esto último hay que destacar que los datos bibliográficos se refieren al LPS de células cultivadas en un medio de cultivo donde el hierro está unido a lactoferrina o transferrina. Se ha visto que, tanto la transferrina como la lactoferrina en bajo porcentaje de saturación tiene efectos bactericidas en microorganismos Gram(-)¹⁸⁹ pues capturan los cationes estabilizantes de la membrana externa (Ca^{+2} y Mg^{+2}) alterando la composición y permeabilidad de la misma. Es posible que la presencia de estas proteínas en el medio de cultivo haya contribuido en la modificación de la movilidad electroforética del LPS de *B. pertussis* observada por estos autores.

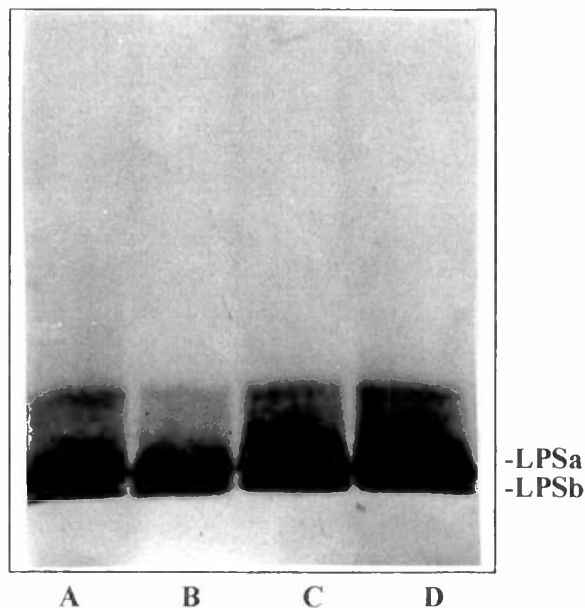


Figura 5.16: SDS-PAGE (15%) de LPS de células de *B. pertussis* cultivadas en quimiostato en condiciones de baja disponibilidad de: línea A) fuente de carbono y energía (glutamato), línea B) hierro, línea C) cistina, línea D) fósforo.

5.4.b Influencia del sustrato limitante del crecimiento sobre los parámetros estequiométricos de la producción de células y antígenos de *B. pertussis*.

Un comportamiento general encontrado en bacterias que están creciendo en un entorno deficiente en algún nutriente es el desarrollo de mecanismos de alta afinidad por dicho nutriente y, al mismo tiempo, una adaptación en los flujos de metabolitos que contienen a este nutriente, en función de maximizar el rendimiento celular en base al sustrato limitante. Esto se ha verificado, en general, en crecimientos limitados en cualquier sustrato. Es así que cabe esperar que la utilización de la fuente de carbono y energía cuando no es sustrato limitante, no se halle bajo regulación tan estricta y se desvíe hacia destinos metabólicos diferentes tales como la producción

de energía, de productos secundarios que no contengan el sustrato limitante, etc. En este sentido es interesante establecer si en una situación de estas características *B. pertussis* deriva el glutamato en exceso a la producción de antígenos, de endotoxinas, o si se consume en ciclos fútiles u otras reacciones propias del desacople metabólico característico de los cultivos donde la fuente de energía está en exceso¹⁹⁰.

En la Tabla 5.5 se han resumido los principales parámetros relacionados con el consumo de la fuente de carbono y energía en cada limitación, y la producción de células, PT extracelular y LPS liberado al medio de cultivo. Se pudo comprobar que las diferencias encontradas en los distintos parámetros como consecuencia del cambio de sustrato limitante, es estadísticamente significativa ($\alpha < 0.05$) en todos los casos, excepto en lo que se refiere al consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono por unidad de glutamato consumido ($Y_{CO_2/s}$ e $Y_{O_2/s}$, respectivamente), que sólo presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí y respecto a las demás condiciones, si el cultivo está limitado en hierro o fósforo.

Tabla 5.5: Influencia del sustrato limitante del crecimiento de *B. pertussis* sobre el consumo de la fuente de carbono y energía, y la excreción específica de PT y LPS al medio extracelular.

Sustrato limitante	$Y_{x/s}$ Cmol/Cmol de glu	$Y_{CO_2/s}$ Cmol/Cmol de glu	$Y_{O_2/s}$ mol/Cmol de glu	$Y_{x/O}$ mol/mol	$Y_{PT/x}$ mg/g	$Y_{KDO/x}$ μ g/g
glutamato	0.22	0.74	0.62	0.35	1.12	2.90
hierro	0.17	0.81	0.68	0.25	2.02	5.01
cistina	0.14	0.74	0.62	0.22	0.72	2.59
fósforo	0.20	0.77	0.65	0.30	0.28	0.72

Los datos mostrados en esta tabla corresponden a la media de 3 determinaciones independientes con duplicados. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza. Las medias se compararon según el test de Menor Diferencia Significativa (LSD), con un grado de significación: $\alpha < 0.05$.

Así, del análisis de la Tabla 5.5 se desprende que la conversión de glutamato en biomasa es menos eficiente en aquellos cultivos cuyo crecimiento no está limitado por este nutriente. En el caso particular de la limitación del crecimiento por hierro, se puede ver que la disminución en $y_{x/s}$ se acompaña con un aumento proporcional en $y_{CO_2/s}$ y en $y_{O_2/s}$, que permite el cierre de los balances de materia y energía. De lo que se deduce que no hay formación de nuevos productos. Una mayor proporción de glutamato está siendo derivada hacia la obtención de energía, la cual no

se conserva en forma de biomasa ni de productos. El aumento registrado en $y_{PT/x}$ y en $y_{KDO/x}$ es insignificante en términos del balance de materia.

En *E. coli*¹⁹¹, como así también en otros microorganismos¹⁹², se ha descrito una situación similar en condiciones de cultivo con baja disponibilidad de hierro o azufre. Aparentemente, en dichos microorganismos la falta de estos elementos se traduce en una disminución o pérdida reversible de aquellos componentes de la cadena de fosforilación oxidativa que contienen hierro y/o azufre. En el caso de la baja disponibilidad de azufre se ven afectadas las proteínas Fe-S. En el caso de baja disponibilidad de Fe, además de estas proteínas, hay alteraciones a nivel de ciertos citocromos. Si algo así estuviera ocurriendo en el caso de *B. pertussis*, y se perdiesen sitios de fosforilación, disminuiría la eficiencia de conservación de la energía, disminuyendo así los rendimientos celulares en base al oxígeno ($y_{x/O}$). En la Tabla 5.5 se puede comprobar que, efectivamente, en limitación de hierro hay una disminución en $y_{x/O}$, paralela a la disminución de $y_{x/s}$.

Este juego de resultados nos está indicando un consumo de fuente de carbono y energía que no se traduce en reacciones anabólicas con la misma eficiencia que en limitación del crecimiento por carbono y energía. Esto demuestra que en limitación de hierro hay una alteración en el acople metabólico; pero, a partir de estos estudios, no es posible saber si existe disminución o pérdida de sitios fosforilación de la cadena de transporte electrónico.

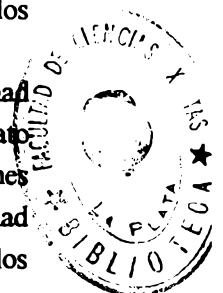
La producción específica de PT aumenta en células que crecen en deficiencia de hierro (Tabla 5.5). Se ha encontrado que este tipo de limitación favorece la excreción de toxinas en otros patógenos¹⁸⁵. Se cree que esta inducción en la expresión de factores de virulencia en limitación de Fe está relacionada con la similitud que tiene esta condición de cultivo con las condiciones de entorno que dichos microorganismos enfrentan *in vivo*.

Si la baja disponibilidad de hierro, en el caso de *B. pertussis*, está implicada en los mecanismos regulación de la expresión de los factores de virulencia, es algo que aún no se ha estudiado. Independientemente de esto, se ha podido establecer que la expresión de proteínas de membrana externa que se inducen en baja concentración de hierro (PRF) y la producción de sideróforos no está regulada por el gen *vir*. Sin embargo, sin la expresión de estos factores, *B. pertussis* es incapaz de colonizar el tracto respiratorio.

Finalmente, como se puede observar en la Tabla 5.5, en limitación de hierro la producción específica de LPS (medido como KDO) también aumenta. De manera tal que la proporción LPS(KDO)/PT liberada al medio de extracelular se mantiene en valores similares a los encontrados anteriormente en otras condiciones de cultivo. Esto representa una evidencia más en favor de la hipótesis de liberación conjunta de antígenos y LPS, mencionada en puntos anteriores.

Por último hay que señalar que, la disponibilidad de hierro en el medio de cultivo no altera los requerimientos de dicho nutriente. Se encontró que, tanto en condiciones de limitación o exceso de Fe, dichos requerimientos (calculados por balance de materia), son del orden de los 0.033 g de hierro por cada 100 g de biomasa.

En lo que se refiere a la limitación del crecimiento de *B. pertussis* por baja disponibilidad de cistina, en la Tabla 5.5 se puede ver que el rendimiento de biomasa en función del glutamato consumido ($y_{x/s}$) en ésta condición de cultivo es menor que el encontrado en las otras condiciones ensayadas. Sin embargo la producción de dióxido de carbono y el consumo de oxígeno por unidad de glutamato consumido no se modifica respecto al cultivo en medio SS. De manera que los



balances de carbono y grado de reducción indicarían la formación de algún producto que no se ha identificado.

El consumo de oxígeno por unidad de sustrato es menor que el encontrado en la limitación de hierro, lo cual podría estar indicando una menor derivación de glutamato hacia la obtención de energía y un mejor acople metabólico que se traduciría en la formación de nuevos productos. Cabe señalar que, en esta condición de cultivo en particular, la supuesta formación de productos en cantidades que tienen influencia en los balances de carbono y energía, invalida al $y_{x/o}$ como parámetro indicador del grado de eficiencia de conservación de la energía.

A diferencia de lo que se ha reportado en otras bacterias cultivadas en limitación de S, en el caso de *B. pertussis* los resultados obtenidos no parecen indicar que haya pérdida de sitios de fosforilación.

La producción específica de PT soluble en bacterias crecidas en SS-S es baja respecto a la producción específica alcanzada en limitación de carbono o limitación de hierro (Tabla 5.5).

Un aspecto llamativo, es el aumento en la relación LPS (KDO)/PT liberado al medio de cultivo. Es la única condición de cultivo ensayada en este trabajo, que presenta una alteración en la proporción de LPS y PT en el medio extracelular. Una posibilidad que deberá ser motivo de estudio es que la mayor liberación de LPS tenga su origen en una de las características de la formación de la membrana externa. Se sabe que en dicha membrana la proporción de sus componentes es balanceada y exacta¹⁹³. Por esta razón si se verificase una disminución en la síntesis de proteínas, esta no afectaría la síntesis de LPS, pero aquella porción que esté en exceso respecto a fracción proteica será liberada al espacio extracelular. En el presente caso el sustrato limitante es justamente un aminoácido y la maquinaria de síntesis proteica podría verse afectada. Si ocurriese algo así habría una liberación "extra" de LPS que nada tendría que ver con la liberación de antígenos, y que podría ser la que esté alterando la proporción LPS(KDO)/PT.

Se encontró que el requerimiento de azufre de este microorganismo no difiere demasiado si se trabaja en condiciones de limitación o de exceso de dicho nutriente (aproximadamente 0.5 gramos de azufre provenientes de cistina por cada 100 gramos de biomasa). Esto sugiere que la posibilidad de redistribución de este nutriente en función de la baja disponibilidad del mismo, es muy limitada en esta bacteria. En este sentido, se ha encontrado que los microorganismos son capaces de reordenar los contenidos de este nutriente solamente en proteínas de membrana externa y algunas otras proteínas estructurales, pero no se produce ninguna alteración a nivel de las proteínas ribosomales ni en ninguna otra fracción importante de la bioquímica celular.

Por último, en limitación del crecimiento de *B. pertussis* por baja disponibilidad de fósforo, en la Tabla 5.5 se puede observar que el rendimiento de biomasa en base al glutamato consumido es ligeramente inferior al alcanzado en el medio SS. Esta disminución se corresponde con un aumento en la producción de CO₂ por unidad de glutamato consumido. El balance de carbono y grado de reducción da valores cercanos a la unidad por lo que es posible suponer que no hay formación de nuevos productos. Teniendo en cuenta esto, la disminución observada en el rendimiento de biomasa por mol de oxígeno consumido ($y_{x/o}$), indica cierta disminución en la eficiencia de conservación de la energía que, en última instancia, se traduce en una pérdida de fuente de carbono y energía, aunque menor que la observada en limitación del crecimiento por Fe.

En lo que se refiere a la producción de antígenos, en la Tabla 5.5 se puede ver que el rendimiento específico de PT es bastante inferior al alcanzado en el medio SS e incluso al

alcanzado en SS-S. Este resultado podría estar originado, como ocurre con otras Gram (-) cultivadas en limitación de P, en que la síntesis de proteínas periplásmicas no relacionadas con el metabolismo de este nutriente es generalmente reprimida en función de priorizar la síntesis de aquellas que están involucradas en la captura y transporte de P hacia el interior de la célula. Más aún, en el caso particular de *B. pertussis*, la regulación de la síntesis de los principales factores de virulencia a través del locus *bvg* depende de la fosforilación de enzimas, por lo cual cabe esperar que la producción de antígenos sea particularmente sensible a los niveles de fósforo.

Es poco probable éste sea el nutriente que limita el crecimiento de *B. pertussis in vivo*. De ser así, los mecanismos de supervivencia del microorganismo priorizarían, junto con la expresión de sistemas de alta afinidad para la captura de fósforo, la síntesis y excreción de los factores de virulencia esenciales para la colonización del huésped, lo cual es contrario a lo que se encontró en este ensayo.

En lo que se refiere a la demanda de P, se pudo comprobar que *B. pertussis* es capaz de disminuir de manera significativa la demanda de dicho nutriente si la disponibilidad del mismo disminuye. La demanda de P en condiciones de limitación se calculó en: 1.98 g de P por cada 100 g de biomasa, mientras que en exceso de P en el medio de cultivo, la demanda ascendió a 5.9 g de P por cada 100 g de biomasa. Lo cual representa una disminución del 67% en los requerimientos celulares, en respuesta a la baja disponibilidad de nutriente.

5.5. Otros aspectos relacionados con el estudio de medio de cultivo.

Las razones por las cuales se ha incorporado prolina a la formulación del medio SS no está clara en la bibliografía. Los trabajos que han hecho mención a la función de los distintos componentes de dicho medio de cultivo no han establecido con precisión el rol de la prolina. Hay quienes han mencionado que es utilizada por el microorganismo como fuente de carbono y energía, cumpliendo la misma función que el glutamato, aunque se consumiría primero¹¹⁸. Otros autores¹⁹⁴, en cambio, han sugerido que estaría implicada en el desarrollo de la inmunogenicidad celular. Ellos reportaron que las células crecidas en ausencia de prolina tienen menor capacidad protectora.

Con el fin de determinar si es realmente necesaria la presencia de prolina en el medio de cultivo, se trabajó en quimiostato con medio de cultivo SS, formulado sin este aminoácido. Los resultados encontrados se detallan a continuación. En primer lugar, se encontró que la biomasa alcanzada en el estado estacionario no se modificó respecto al medio SS completo. Con lo cual, el aporte de la prolina como fuente de carbono y energía, si ésta fuese su función, sería insignificante y podría ser eliminada de la formulación. Tampoco parece tratarse de una diauxia de prolina y glutamato, pues se hubiera puesto en evidencia en las curvas de crecimiento en batch en medio SS, como así también, en los niveles de prolina y glutamato de los sobrenadantes provenientes de cultivos continuos, conducidos a alta y baja velocidad específica de crecimiento. No se verificaron diferencias en el consumo específico de oxígeno, ni en la producción de dióxido. El perfil de polipéptidos de membrana externa no se modificó respecto al de las células cultivadas en medio SS completo. Tampoco el perfil electroforético del LPS celular. La única modificación que se encontró fue en la productividad de PT liberada al medio de cultivo (aunque la proporción

de LPS(KDO)/PT se mantuvo en valores similares a los alcanzados en el medio SS). Se comprobó que la productividad de este antígeno en el medio SS sin prolina disminuyó en un 40 %. Este resultado parece coincidir con lo reportado acerca de la pérdida de inmunogenicidad celular¹⁹⁴. Si prolina es un modulador de fase o cuál es su función en la producción de antígenos deberá ser motivo de estudio. Pero lo que se desprende de estos resultados es que, al menos en principio, este aminoácido no puede eliminarse de la formulación del medio de cultivo.

DISCUSIÓN

En este capítulo se demostró que la relación existente entre el consumo de la fuente de carbono y energía (glutamato) y la velocidad específica de crecimiento de *B. pertussis* se puede describir en términos del modelo desarrollado por Monod. Esto implica que se puede estimar un valor de la constante de "afinidad aparente" por el glutamato (K_s) y la velocidad específica máxima (μ_m) con que puede crecer el microorganismo en este medio de cultivo. Estos parámetros son importantes para el modelado de cultivos microbianos y dan una idea del sustrato que permanece sin consumirse en el estado estacionario de un cultivo continuo. *B. pertussis* presenta una constante de afinidad por el glutamato que se estimó en $10 \pm 2 \mu\text{M}$ y una velocidad específica máxima de crecimiento, en un entorno limitado en dicho nutriente, de $0.066 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$.

En relación al consumo de fuente de carbono y energía se pudo determinar que cuando éste es el sustrato limitante del crecimiento, la energía destinada al mantenimiento celular es independiente de la velocidad específica de crecimiento. En estas condiciones 0.07 ± 0.01 C-moles de glutamato por C-mol de biomasa por hora son destinados a energía de mantenimiento. El rendimiento máximo teórico que es posible obtener en un cultivo de *B. pertussis* creciendo con glutamato como fuente de carbono y energía, si no se derivase parte del mismo para energía de mantenimiento, es 0.33 ± 0.02 C-moles de biomasa por C-mol de glutamato. Y, en este caso, la velocidad específica máxima de crecimiento que podría desarrollar el microorganismo sería de 0.087 h^{-1} .

Si el sustrato limitante del crecimiento no es la fuente de carbono y energía, los rendimientos celulares en base al glutamato consumido disminuyen. Los balances de materia y energía en estos casos indican, en general, un cierto desacople metabólico que se refleja en una disminución en la eficiencia de conservación de la energía. Esta situación, aparentemente desfavorable, constituye para el microorganismo una ventaja selectiva. Los entornos naturales, generalmente pobres en nutrientes, permiten un desarrollo celular lento. En estas condiciones ambientales, los microorganismos necesitan inducir sistemas de alta afinidad para la captura de los nutrientes que están en baja disponibilidad. Estos mecanismos de alta afinidad consumen energía, por lo que el microorganismo debe poder producirla y consumirla aún sin que aparezca formación neta de biomasa. En este sentido, la aparente capacidad de los organismos heterótrofos de disociar el catabolismo del anabolismo, obteniendo así la energía necesaria a la velocidad adecuada independientemente de la velocidad de crecimiento, aparece como una fuerza selectiva en la evolución de las especies.

En este contexto cabe esperar que, el coeficiente de mantenimiento en condiciones de baja disponibilidad de otro sustrato y en exceso de fuente de carbono y energía, sea mayor que en el caso de limitación del crecimiento por energía. Además, es muy posible que la cantidad de energía destinada al mantenimiento celular varíe con la velocidad específica de crecimiento. Sin embargo, esta "energía de mantenimiento" estaría sobrestimada pues involucraría, sin posibilidad de discriminación, funciones celulares que consumen energía pero que no están relacionadas estrictamente con el mantenimiento celular, tal como el desarrollo y funcionamiento de los mecanismos de adaptación a la baja disponibilidad del nutriente en cuestión. Por esta razón el término de consumo de energía para mantenimiento se vuelve confuso y pierde significado cuando el cultivo bacteriano se lleva a cabo en un entorno con baja disponibilidad de otros nutrientes, y

en exceso de fuente de energía. En atención a esto, en este capítulo la determinación de la energía destinada a mantenimiento se circunscribe a los cultivos limitados en energía, determinándose así la mínima cantidad de glutamato que se "pierde" en funciones de mantenimiento en un cultivo de *B. pertussis*.

También se verifica cierto desacople metabólico en niveles altos de oxígeno disuelto que quizás se relacione con la necesidad de disminuir los niveles de un compuesto tan reactivo. En general, altos niveles de oxígeno son tóxicos para los microorganismos. Dicha toxicidad deriva de la oxidación de grupos tioles, inactivación de enzimas, peroxidación de lípidos y acumulación de radicales libres¹⁹⁵. El desarrollo celular de *B. pertussis* necesita, per se, un ambiente reductor que es aportado por el ácido ascórbico y el glutatión reducido presentes en el medio de cultivo. Se cree que estos componentes actúan como cofactores de oxigenasas¹⁰⁴. Los niveles altos de oxígeno podrían estar oxidando dichos compuestos y/o producir un aumento en el catabolismo de la fuente de carbono (que no se corresponde con un aumento en los procesos anabólicos) en un intento por disminuir los niveles de oxígeno. El aumento en la producción de dióxido de carbono y en el consumo de oxígeno por unidad de fuente de carbono ($y_{O_2/s}$, $y_{CO_2/s}$, respectivamente), que se verifica en estas condiciones (Tabla 5.4), parece indicar un aumento en el catabolismo de la fuente de carbono y energía. Este fenómeno se ha observado también en otras bacterias expuestas a altas tensiones de oxígeno¹⁹⁵. La cadena de fosforilación oxidativa de muchos microorganismos puede habilitar más de una ruta, y en cada rama hay distinta eficiencia de fosforilación¹⁹². Algunos microorganismos son capaces de habilitar una u otra según necesiten energía o simplemente disminuir el nivel de oxígeno de su entorno. En otros casos el microorganismo tiene la posibilidad de saltar uno o más sitios de fosforilación. Evidentemente el nudo del problema reside en poder definir si los resultados observados en altos niveles de oxígeno disuelto indican que *B. pertussis* utiliza su aparente capacidad para desacoplar el metabolismo con el fin de revertir esta situación desfavorable o si, simplemente, se trata de alguna alteración del medio de cultivo. Los balances de carbono y energía de las cuatro condiciones de oxígeno disuelto indican que el glutamato se distribuye en biomasa, dióxido de carbono y proteínas extracelulares y que no habría, en ningún caso, formación de nuevos productos. Es posible especular entonces, que el glutamato que no se convirtió en biomasa o proteína, haya sido destinado (o "quemado") a disminuir los niveles de oxígeno disuelto en el entorno del microorganismo.

Haciendo uso de la ecuación 5.8 y asumiendo que el valor de $y'_{x/s}$ no cambia (el sustrato limitante es el mismo y no aparecen nuevos productos), es posible ver como una situación desfavorable, como la que plantea el alto nivel de oxígeno en el medio de cultivo, redundaría en un coeficiente de mantenimiento celular dos veces mayor que el calculado en condiciones de cultivo más favorables.

Los niveles altos de oxígeno no sólo conducen a un desaprovechamiento del medio de cultivo, con la consecuente disminución en los rendimientos celulares y antigénicos, sino que también provocan la pérdida de HA del sobrenadante de cultivo. Cabe señalar que en este caso no se detectaron fragmentos de FHA de bajo peso molecular que pudieran estar indicando ruptura de la cadena proteica, por lo que la pérdida de HA no pudo ser atribuida a la fragmentación de dicho antígeno.

Ante estos resultados, resulta bastante obvio que un nivel de oxígeno disuelto del orden del 30% de saturación es el más adecuado para la producción de células y antígenos. El perfil de

proteínas de membrana externa de las células cultivadas en este nivel de oxígeno podría indicar que dichas células tienen mayor capacidad protectora. En lo que se refiere a los niveles bajos de oxígeno, los rendimientos celulares alcanzados son similares a los obtenidos con 30% de saturación pero el rendimiento de PT soluble es significativamente menor.

El tipo de sustrato limitante del crecimiento mostró tener una marcada influencia en el metabolismo de la fuente de carbono y energía y en los rendimientos celulares en base a este nutriente. También se ven afectados los rendimientos antigénicos y las características proteicas de la cubierta celular de *B. pertussis*. Se ha podido comprobar que en limitación del crecimiento por cistina o fósforo el rendimiento específico de PT extracelular disminuye en relación al obtenido en condiciones de crecimiento limitado por fuente de carbono y energía. Sin embargo, la baja disponibilidad de hierro en el medio de cultivo conduce a un aumento significativo en dicho rendimiento. Así, de las condiciones nutricionales ensayadas en el presente estudio, es probable que la condición de medio de cultivo más próxima a la situación *in vivo* sea la limitación del crecimiento por hierro dado que la excreción de toxinas y demás factores de virulencia es de una importancia tan vital como el desarrollo de cualquier otro mecanismo de adaptación para un microorganismo patógeno. Este resultado está de acuerdo con deducciones previas basadas en la presencia de proteínas complejantes de hierro (lactoferrina) en los fluidos del tracto respiratorio superior.

Los perfiles polipeptídicos de membrana externa cambian notablemente con el tipo de sustrato limitante del crecimiento. Cambios de este tipo están generalmente relacionados con la inducción de mecanismos de alta afinidad para la captura del nutriente que se encuentra en defecto. En la membrana externa de células cultivadas en limitación de hierro se identificaron proteínas cuya síntesis se induce por los bajos niveles de dicho nutriente y que están involucradas en la captura del mismo. En el presente esquema experimental, que no incluye la incorporación de proteínas complejantes de hierro como la transferrina, ovotransferrina o lactoferrina, se encontraron las mismas proteínas diferenciales de membrana externa que las reportadas en células de *B. pertussis* cultivadas en presencia de estos quelantes. Con lo cual se demuestra que dichas proteínas de membrana externa se inducen en respuesta a la falta de hierro independientemente de la presencia de los quelantes proteicos en cuestión. De los resultados obtenidos se puede señalar: en primer lugar, que la banda de peso molecular cercano a los 77 kDa que aparece en limitación de hierro, no es ovotransferrina como sugirieron Rehead y col., sino una proteína de membrana externa que se induce por la deficiencia de hierro en el entorno del microorganismo; en segundo lugar, que la producción de sideróforos, al igual que la proteína de membrana externa de 74 kDa (que se considera su receptor), se inducen como consecuencia de la escasez de Fe, independientemente de la presencia de transferrinas o lactoferrinas que complejen dicho nutriente; por último, que la proteína de 27 kDa que se ha propuesto como receptor de transferrina y lactoferrina, es inducida por la falta de hierro aunque dichos quelantes proteicos no estén presentes en el entorno de la bacteria.

Finalmente, si la limitación de hierro es la deficiencia nutricional que *B. pertussis* enfrenta en su entorno natural, y es muy probable que lo sea, es posible que aquellas proteínas diferenciales que aparecen en limitación de hierro tengan importancia inmunológica y, por lo tanto, deban ser consideradas en el momento de mejorar la formulación de la vacuna pertussis. En este sentido hay otro aspecto importante: las bacterias aisladas de portadores sanos de *B.*

pertussis presentan PRF en sus cubiertas celulares. Este hallazgo, además de dar pautas acerca de la limitación nutricional de hierro *in vivo*, plantea un principio de solución al grave problema que representa la existencia de reservorios humanos de *B. pertussis*. Como se mencionó, las bacterias aisladas de portadores sanos, son células avirulentas o con un estado de virulencia disminuido. En estas condiciones la producción de antígenos de fase I es muy baja o inexistente y las características de la cubierta celular difieren de las de células virulentas, esto le permite al microorganismo evadir las defensas del huésped. La presencia de PRF en células recuperadas de portadores asintomáticos, significa que estas proteínas tienen una regulación totalmente independiente de los factores de virulencia aunque sean esenciales en la colonización; pero más importante aún, está indicando que una vacuna formulada con células que presenten estas proteínas podría proteger al vacunado no sólo del contraer la enfermedad, sino también de constituirse en un reservorio de este microorganismo. Siendo éste un organismo cuyo único huésped es el hombre, esto podría significar el primer paso hacia la erradicación definitiva de la enfermedad

En limitación de cistina, los cambios en la composición proteica de la membrana externa se encuentran en la zona correspondiente a los marcadores de virulencia. Se verifica una disminución en la intensidad de algunas bandas proteicas en la zona de pesos moleculares cercanos a 30 y 63 kDa. No es posible asegurar si esto está relacionado con el menor estado de virulencia evidenciado a través de la disminución de los rendimientos específicos de PT extracelular; o bien si el cambio en el perfil electroforético de PME está relacionado con algún mecanismo de adaptación a la baja disponibilidad de cistina. Es importante señalar, sin embargo, que los resultados encontrados en limitación de fósforo ponen en duda el valor diagnóstico de dichos marcadores de virulencia. En condiciones de baja disponibilidad de fósforo, la producción específica de PT extracelular de *B. pertussis* es la más baja de todas las condiciones de cultivo ensayadas. No obstante, se encontró un perfil electroforético de polipéptidos de membrana externa que se caracteriza por tener un marcado aumento de las bandas de peso molecular correspondientes a los marcadores de virulencia. Es evidente que los marcadores de virulencia, definidos en condiciones de cultivo donde el crecimiento está limitado en fuente de carbono y energía, no tienen valor como marcadores de fase cuando cambia el sustrato limitante del crecimiento ya que aparecen nuevas proteínas de membrana externa, como parte de la respuesta adaptativa, que enmascaran dichos marcadores.

A diferencia de lo que ocurre con la fracción proteica, la fracción lipopolisacáridica de la membrana externa no se ve afectada por el tipo de sustrato limitante del crecimiento. Este resultado difiere de lo reportado por Menozzi y col.. Estos autores encontraron que en cultivos con baja disponibilidad de hierro libre la movilidad electroforética del LPS se modifica. Los resultados del presente esquema experimental, en el cual no se agregan proteínas complejantes al medio de cultivo, podría estar indicando que la alteración reportada por estos autores en el LPS de células cultivadas en presencia de transferrina y lactoferrina, puede haber sido causada por la presencia de agentes quelantes de cationes y no por la falta de hierro en el medio de cultivo.

En lo que respecta a la capacidad de *B. pertussis* para adaptar la demanda de nutrientes según la disponibilidad de los mismos en el entorno, se comprobó que los requerimientos de hierro y cistina no se modifican en limitación o exceso de dichos nutrientes. En cambio, el

requerimiento de fósforo disminuye un 67% en el caso que este nutriente esté en concentraciones limitantes del crecimiento.

De lo discutido hasta aquí parece claro que un cultivo de *B. pertussis* con vistas a la recuperación de antígenos o células para la formulación de vacunas debería llevarse a cabo en un medio de cultivo limitado en Fe. Con lo cual se podría obtener una mejor producción de antígenos solubles y células con mayor capacidad protectora. Debería tenerse en cuenta el desacople metabólico que se verifica en limitación de hierro para determinar la cantidad de glutamato adecuada que posibilite un desarrollo microbiano sin limitación de fuente de carbono y energía. Los demás componentes deberían agregarse levemente en exceso respecto a sus coeficientes estequiométricos, para luego aplicar la técnica de cultivo continuo con pulsos¹⁹⁶ con vistas a la optimización final del medio de cultivo. Deberá tenerse en cuenta que la presencia de prolina en el medio de cultivo parece favorecer la producción antigénica, por lo cual no debe ser omitida de la formulación. El oxígeno disuelto en el medio de cultivo debería mantenerse en valores cercanos al 30% para posibilitar un adecuado aprovechamiento de los nutrientes y favorecer la obtención de buenos rendimientos celulares y antigénicos. Finalmente, lo que falta definir es el tipo de sistema de cultivo más adecuado para llevar a cabo el proceso.

Según se pudo comprobar, la excreción de PT y LPS extracelular esta asociada al crecimiento de *B. pertussis*. La velocidad específica de producción de PT está totalmente asociada a la velocidad específica de crecimiento. La liberación de LPS, en cambio, está parcialmente asociada y existe un cierto nivel de excreción de LPS aún cuando el microorganismo no está duplicándose. Este término independiente del crecimiento quizás sea el responsable de la menor producción específica de LPS extracelular verificada en cultivo continuo respecto al cultivo batch.

Por otra parte, se demostró la existencia de una relación lineal en la excreción de ambos componentes, y ninguna de las condiciones de cultivo ensayadas en este trabajo posibilitó el desacople de la excreción de los mismos. Se determinó una relación LPS(KDO)/PT extracelular constante, que prácticamente no se modifica con el cambio en las condiciones de cultivo. Esto podría estar indicando una liberación conjunta de PT y LPS. Esta hipótesis es coherente con resultados de otros autores (obtenidos *in vitro*) que demostraron, por un lado, que LPS posee un receptor en el lípido A que une específicamente la subunidad S₂ de la molécula de PT y, por otro lado, la presencia de LPS en sobrenadante de medio de cultivo formando parte de pequeñas micelas y vesículas de membrana externa en las cuales se ha detectado también la presencia de toxina pertussis¹⁴⁷. Por otra parte, el agregado de ciclodextrina al medio de cultivo aumenta la liberación de antígenos^{107,108,109,197} pero también aumenta la liberación de LPS^{146,198}. Por último hay que señalar que en el proceso de purificación de PT empleado comúnmente¹⁹⁹, este antígeno se recupera con una contaminación de un 18% de LPS. Se ha publicado un trabajo²⁰⁰ donde se menciona que existen dos proteínas que compiten con PT por el mismo receptor del lípido A: una de ellas es la lisozima y la otra es la α -lactoalbúmina. Este hallazgo significa que una cromatografía de afinidad con alguna de estas proteínas sería una alternativa válida para la purificación final de PT, pero además confirma la existencia de un receptor de PT en la molécula de LPS.

Finalmente, siendo PT una proteína periplásmica, tal como FHA y AC, y habiéndose encontrado dos (PT y AC) de estos tres antígenos unidos a vesículas de membrana externa en

sobrenadantes de cultivo, es posible que el proceso de excreción de tales antígenos involucre componentes de membrana externa, tal como se ha visto en otras bacterias Gram (-) que excretan los factores de virulencia en asociación con restos de membrana externa²⁰¹. Este aspecto podría ser de gran importancia en el desarrollo una vacuna acelular

Independientemente del modo de excreción, el comportamiento de PT como un producto totalmente asociado al crecimiento sugiere que la mayor productividad de este antígeno soluble podría lograrse empleando un quimiostato operado a altas velocidades de dilución para llevar a cabo el cultivo de *B. pertussis*.

Existen otras razones por las cuales elegir este sistema de cultivo para la producción de células y antígenos. En primer lugar, aparte de la mayor productividad de antígenos solubles alcanzados en este sistema de cultivo, también se logra una mayor productividad de células (Tabla 5.2). En segundo lugar, la menor relación de LPS(KDO)/PT en sobrenadante de cultivo continuo respecto al batch, facilitaría el proceso de purificación de antígenos. Por último, para un microorganismo patógeno los mecanismos de homeostasis del huésped, las condiciones de restricción nutricional y velocidad de crecimiento submáxima, hacen que las condiciones de cultivo *in vivo* sean similares al estado estacionario de un cultivo continuo más que a cualquier otro sistema de cultivo. Habiéndose encontrado que el perfil proteico de membrana externa de *B. pertussis* cambia según sea cultivada en batch o en continuo cabe esperar, según se ha reportado¹⁷², que las células de mayor capacidad protectora sean las provenientes de cultivo continuo. En este sentido hay que destacar que la velocidad específica de crecimiento, si se mantiene en valores submáximos, no tiene influencia sobre las características proteicas de la cubierta celular. Por lo tanto se puede emplear un quimiostato conducido a altas velocidades de dilución para obtener buenos rendimientos de células y antígenos.

Conclusiones

CONCLUSIONES

De los resultados presentados y discutidos en este trabajo surgen las siguientes conclusiones:

1. El agregado de 0.75 g/l de extracto de levadura al medio SS para el cultivo de *B. pertussis*, disminuye la fase de latencia, neutraliza el efecto tóxico de los inhibidores de crecimiento que se acumulan durante el cultivo en batch, y permite el empleo de antiespumantes en concentraciones suficientes para el control de espuma, sin afectar la producción celular ni antigénica.

2. *B. pertussis* presenta bajos requerimientos de oxígeno. En este sentido, un biorreactor cuyo diseño permita un coeficiente de transferencia de oxígeno de 100 h^{-1} es apto para sostener el desarrollo celular de este microorganismo sin limitación de oxígeno, hasta una concentración de biomasa final de 2g/l (que es la alcanzada en medio SS, tal como está formulado).

3. La caracterización cinética y estequiométrica del crecimiento de *B. pertussis* permite concluir que:

3.a. La limitación del crecimiento por glutamato (medio SS), es una limitación de tipo energética. En estas condiciones de cultivo, un 25% del carbono proveniente del glutamato se retiene en la biomasa, un 2 % se deriva a proteína extracelular y un 71% se libera como dióxido de carbono.

3.b. Si el sustrato limitante del crecimiento no es la fuente de carbono y energía (glutamato), la fracción de carbono retenida en la biomasa disminuye. En estas condiciones de cultivo aparece cierto grado de desacople metabólico que varía según el tipo de sustrato limitante.

3.c. En condiciones de limitación energética del crecimiento, la fracción de glutamato que se deriva a mantenimiento celular es independiente de la velocidad específica de crecimiento y mínima respecto a aquellos cultivos donde la limitación del crecimiento no es energética. Aún así, en un cultivo limitado en energía, la existencia de mantenimiento celular conduce a una disminución del 25% en la velocidad específica máxima de crecimiento y en el rendimiento celular en función del glutamato consumido.

3.d. *B. pertussis* presenta una cinética de consumo de glutamato que puede describirse según el modelo propuesto por Monod. En términos de este modelo matemático la constante de 'afinidad aparente', de este microorganismo por dicho sustrato, es de $10 \pm 2 \mu\text{M}$ y la velocidad específica máxima con que puede crecer en un medio limitado en glutamato es $0.066 \pm 0.003 \text{ h}^{-1}$

4. Si se cultiva *B. pertussis* en reactores tipo tanque agitado, bajo un régimen de flujo turbulento, se produce una pérdida significativa de FHA extracelular. Las fuerzas de corte generadas en el seno del biorreactor en estas condiciones de cultivo, rompen la estructura proteica de este antígeno lo cual trae como consecuencia la pérdida de su actividad hemaglutinante y de su potencial inmunogénico.

No se observó ningún efecto de las fuerzas de corte sobre las estructuras fimbriales, FHA celular, o algún otro componente involucrado en la capacidad protectora de la célula entera de *B. pertussis*.

De esto se deduce que, un cultivo de *B. pertussis* tendiente a producción a gran escala de vacuna pertussis celular puede llevarse a cabo en reactores convencionales con agitación por turbina. En tanto que, la producción de antígenos solubles de *B. pertussis* para la formulación de una vacuna acelular plantea la necesidad de emplear reactores de bajo esfuerzo de cortante

5. Las productividades específicas de PT y LPS extracelular están asociadas a la velocidad específica de crecimiento. Existe una relación lineal entre las productividades de ambos componentes extracelulares en las distintas velocidades específicas de crecimiento. La razón de sus productividades se mantiene constante a pesar de la modificación de las condiciones de cultivo.

6. La excreción de PT está totalmente asociada al crecimiento. La excreción de LPS, en cambio, está parcialmente asociada. Existe un cierto nivel de excreción de dicho componente aún cuando el microorganismo no está en división. Esto resulta en una mayor acumulación de LPS en sobrenadantes de cultivos llevados a cabo en sistema batch, respecto a aquellos llevados a cabo en sistema continuo.

7. El empleo del sistema de cultivo continuo conduce, en relación al sistema de cultivo batch, a una mayor productividad de PT, a una menor relación LPS(KDO)/PT extracelular, y a una mayor productividad de células. Esta situación indica a este sistema de cultivo como el más apropiado para la producción de células y antígenos de *B. pertussis* tendientes a la formulación de vacunas.

8. El nivel de oxígeno disuelto en el cultivo afecta el metabolismo de la fuente de carbono y energía, y la producción antigénica de *B. pertussis*. Niveles altos de oxígeno disuelto disminuyen los rendimientos antigénicos y celulares. En estas condiciones se verifica cierto grado de desacople metabólico que se acentúa con el aumento del nivel de oxígeno disuelto. El 30% de saturación de oxígeno mostró ser el nivel más adecuado para llevar a cabo un cultivo de *B. pertussis* con buenos rendimientos celulares y antgénicos.

9. El tipo de sustrato limitante del crecimiento de *B. pertussis* afecta significativamente la fisiología del microorganismo.

9.a. El perfil proteico de membrana externa cambia significativamente con el tipo de sustrato limitante. Cada limitación induce cambios a este nivel que le son característicos. Debido a esta variación, las proteínas tradicionalmente consideradas marcadores de virulencia, definidas en condiciones de limitación del crecimiento por fuente de carbono y energía, pierden su valor diagnóstico cuando cambia la naturaleza del sustrato limitante.

El perfil lipopolisacárido de membrana externa, en cambio, no se ve afectado por el tipo de sustrato limitante del crecimiento.

9.b. En particular, en células cultivadas en limitación de Fe aparecen proteínas de membrana externa asociadas a la captura de este nutriente, que se han encontrado también en las células infectantes. Tanto la síntesis de estas proteínas (incluso la de peso molecular 27 kDa, reportada como posible receptor de lactoferrina), como la síntesis de sideróforos, está inducida por la baja disponibilidad de hierro en el medio de cultivo, independientemente que éste se encuentre complejo o libre, e independientemente de la presencia de lactoferrina o transferrina en el medio extracelular.

9.c. Cuando la fuente de carbono y energía no es el sustrato limitante del crecimiento, el rendimiento específico de PT soluble disminuye, con excepción del cultivo limitado en hierro que presenta una producción antigénica significativamente mayor que la de cultivos limitados en carbono y energía.

10. La eliminación de Pro de la formulación del medio SS no afecta los rendimientos celulares pero conduce a una menor producción específica de PT.

De los puntos anteriores se desprende que para el cultivo de *B. pertussis*, el empleo del sistema de cultivo continuo, conducido a alta velocidad de dilución, en un nivel de oxígeno disuelto cercano al 30% de saturación, y empleando un medio de cultivo donde el crecimiento esté limitado en Fe, redundaría en un aumento significativo en la cantidad y calidad de antígenos celulares y extracelulares.

Referencias

1.

REFERENCIAS

1. **Khelef, N., B. Danve, M. Quentin-Millet & N Guisó.** *B. pertussis* and *B. parapertussis*: two immunological distinct species. 1993 *Infect. Immun.* **61**, p. 486.
2. **Robinson, A. & L. Ashworth.** 1988. Acellular and defined-component vaccines against pertussis. In: *Pathogenesis and immunity in pertussis* (eds Wardlaw, A. and Parton, R.) John Wiley, Chichester, p. 399.
3. **Recent Progress in Pertussis Research. Edited by K. Redhead.** 1993. *Biologicals.* **21**, p.1.
4. **Porter, J., R. Parton & C. Wardlaw.** 1991. Growth and survival of *B. bronchiseptica* in natural waters and in buffered saline without added nutrients. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, p. 1202.
5. **Woolfrey, B. & J. Moody.** 1991. Human infections associated with *B. bronchiseptica*. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, p.243.
6. **Arico, B., R. Gross, J. Smida & R. Rappuoli.** 1991. Evolutionary relationships in the genus *Bordetella*. *Mol. Microbiol.* **1**, p. 301.
7. **Henderson R.** EPI: 'shots' that save lives . *World Health.* 1987. p.4.
8. **Onorato, M. & S. Wassilak.** 1987. Laboratory diagnosis of pertussis: the state of the art. *J. Pediatr. Infect. Dis.* **6**, p.145
9. **Cookson, B. & W. Goldman.** 1987. Tracheal cytotoxin: a conserved virulence determinant of all *Bordetella* species. *J. Cell. Biochem.* **11B**: 124
10. **Endoh, M., T. Takezawa & Y. Nakase.** 1980. Adenylate cyclase activity of *Bordetella* organism. Its production in liquid medium. *Microbiol. Immunol.* **24**, p. 95
11. **Arico, B., V. Scarlato, D. Monack, S. Falkow & R. Rappuoli.** 1991. Structural and genetic analysis of the *bvg* locus in *Bordetella* species. *Mol. Microbiol.* **5** (10), p. 352
12. **Kloos, W., W. Dobrogosz, J. Ezzel & col.** 1979. DNA-DNA hybridization, plasmids and genetic exchange in genus *Bordetella*. In: C. R. Manclark and J.C. Hill (eds.), *International Symposium on Pertussis* U.S. Department of Health, Education and Welfare Publication 79-1830. Government Printing Office, Washington, D.C., p. 70

13. Weiss, A, & M. Goodwin. 1989. Lethal infection by *B. pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect. Immun.* **57**, p. 3757.
14. Iron, L., L. Ashworth & P. Wilton-Smith. Heterogeneity of the filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis* studied with monoclonal antibodies. 1983. *J.Gen Microbiol.* **129**, p. 2769.
15. Locht, C., P. Bertin, F. Menozzi & G. Renauld 1993. The filamentous haemagglutinin, a multifaceted adhesin produced by virulent *Bordetella* spp. *Mol. Microbiol.* **9** (4), p. 653.
16. Leininger, E., J. Kenimer & M. Brennan. 1990. Surface proteins of *Bordetella pertussis*: role in adherence In: C. R. Manclark C. (eds.), International Symposium on Pertussis U.S. Department of Health and Human services, United States Public Heath Service, Bethesda, Maryland. DHHS Publication No. (FDA) 90-1164, p.100
17. Brennan, M., J. Hannah & E. Leininger. 1991. Adhesion of *B. pertussis* to sulfatides and to GalNac β 4Gal sequence found in glycosphingolipids. *J. Biol. Chem.* **266**, p.18827.
18. Menozzi, F., C. Gantiez & C. Locht. 1991. Interaction of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin with heparin. *FEMS Microbiol. Lett.* **78**, p. 59.
19. Leininger, E., M. Roberts, J. Kenimer, I. Charles, N. Fairweather, P. Novotny & M. Brennan . 1991. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Prac. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, p. 345.
20. Kimura, A., K. Montzouros, D. Relman, S. Falkow & J. Cowell. 1990. *B. pertussis* filamentous haemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect. Immun.* **58**, p. 7.
21. Relman, D., E. Tuomanen, S. Falkow, D. Golenbock, K. Saukkonen & S. Wright. 1990. Recognition of bacterial adhesin by an integrin: macrophage CR3 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *B. pertussis*. *Cell.* **61**, p. 1375.
22. Cahill, E., D. O'Hagan, L. Illum & K. Readhead. 1993. Mice are protected against *B. pertussis* infection by intranasal immunization with filamentous haemagglutinin. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**, p. 211.
23. Sato, Y., K. Izumiya, M. Oda & H. Sato. 1979. Biological significance of *Bordetella pertussis* fimbriae or hemagglutinin for pathogenesis and antibacterial immunity. In: C. R. Manclark and J.C. Hill (eds.), International Symposium on Pertussis U. Department of Health, Education and Welfare Publication 79-1830. Government Printing Office, Washington, D.C.,p. 51.

24. Mooi, F, W. Jansen, H. Brunings, H. Gielen, H. van der Heide, H. Walvoort & P. Guinee. 1992. Construction and analysis of *B. pertussis* mutants defective in the production of fimbriae. *Microb Pathogen*. 12, p.127.
25. Willems, R., C. Geuijen, H. van der Heide, G. Renauld, P. Bertin, W. van der Akker, C. Locht & F. Mooi. 1993. Mutational analysis of *Bordetella pertussis* fim/fha gene cluster: identification of gene with sequence similarities to haemolysin accessory genes involved in export of FHA. *Mol. Microbiol*. 9 (4), p. 623.
26. Robinson, A., L. Irons, R. Seabrook, A. Pearce, M. Mathenson & S. Funnell. 1990. Structure-function studies of *Bordetella pertussis* fimbriae. In: C. R. Manclark C. (eds.), International Symposium on Pertussis U.S. Department of Health and Human services, United States Public Health Service, Bethesda, Maryland. DHHS Publication No. (FDA) 90-1164, p.126.
27. Charles, I., L. Jing Li, R. Strugnell & col. 1990. Repeat sequence motifs constitute the immunodominant regions of P69, pertactin of *Bordetella pertussis*: comparison with repeat sequences of *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. In: C. R. Manclark and J.C. Hill (eds.), International Symposium on Pertussis U.S. Department of Health, Education and Welfare Publication 79-1830. Government Printing Office, Washington, D.C.,p. 136.
28. Leininger, E., C. Ewanowich, A. Bhargava, M. Pepler, J. Kanemer & M. Brennan. 1992. Comparative roles of the Arg-Gly- Asp sequence present in the *B. pertussis* adhesin pertactin and Filamentous Haemagglutinin. *Infection and Immunity*. 60 (6), p. 2380.
29. Montaraz, A., P. Novotny & J. Ivanyi. 1985. Identification of a 68 kDa protective antigen from *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun*. 47, p. 744.
30. Brennan, M., Z. Li, J Cowell, M. Bisher, A. Steven, P. Novotny & C. Mancark. 1988. Identification of a 69-kilodalton nonfimbrial protein as an agglutinin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 56, p. 3189.
31. Roberts, M., N. Fairweather, E. Leininger, D. Pickard, E. Hewlett, A. Robinson, C. Hayward, G. Dougan & I. Charles. 1991. Construction and characterization of *Bordetella pertussis* mutants lacking the vir-regulated P69 outer membrane protein. *Mol. Microbiol*. 5, 1393.
32. Armstrong, S. & C. Parker. 1986. Surface proteins of *Bordetella pertussis*: comparison of virulent and avirulent strains and effects of phenotypic modulation. *Infect. Immun*. 54, p. 109.

33. **Munoz, J., H. Arai, R. Bergman & P. Sadowski.** 1981. Biological activities of crystalline pertussigen from *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **33**, p. 820.
34. **Tamura, M., K. Nogimori, S. Murai, M. Yajima, K. Ito, T. Katada & M. Ui.** 1982. Subunit structure of islet activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochem.* **21**, p. 5516.
35. **Covacci, A. & R. Rappuoli.** 1993. Pertussis toxin export requires accessory genes located downstream from the pertussis toxin operon. *Mol Microbiol.* **8** (3), p. 429.
36. **Pizza M., A. Covacci, M. Bugnoli, R. Manetti & R. Rappuoli.** 1990. The S1 subunit is important for pertussis toxin secretion. *J Biol Chem* **265**, p. 17759.
37. **Johnson, F. & D. Burns.** 1994. Detection and subcellular localization of three Ptl proteins involved in the secretion of pertussis toxin from *Bordetella pertussis*. *J of Bacteriol.* **176** (17), p. 5350.
38. **Irons, L. & P. MacLennan.** 1979. Substrate specificity and the purification by affinity combination methods of two *Bordetella pertussis* hemagglutinin. In: C. R. Manclark C. and J. Hill (eds.), *International Symposium on Pertussis* U.S. Department of Health, educationWelfare publicatio 79-1830. U.S. Government Printing Office, Washington, DC. p. 338.
39. **Tuomanen, E., H. Towbin, G. Rosenfelder, D. Braun, G. Larson, G. Hanson & R. Hill.** 1988. Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *J Exp Med.* **168**, p. 267.
40. **Sekura, R. & M. Quentin-Millet.** 1986. Pertussis toxin: identification of the carbohydrate receptor. In *Protein-Carbohydrate Interactions in Biological Systems*, D.L. Lark, ed. (New York: Academic Press), p. 241.
41. **Burns, D., C. Manclark & S. Hausman.** 1990. Pertussis toxin and its mode of entry into eukariotic cells. In: C. R. Manclark C. (eds.), *International Symposium on Pertussis* U.S. Department of Health and Human services, United States Public Heath Service, Bethesda, Maryland. DHHS Publication No. (FDA) 90-1164, p.53.
42. **Pittman, M.** 1979. Pertussis toxin: the cause of the harmful efects and prolonged immunity of whooping cough. A hypotesis. *Rev Infect Dis.* **1**, p. 140.
43. **Weiss, A. & E. Hewelett.** 1986. Virulence factors of *Bordetella pertussis* *Annu. Rev. Microbiol.* **40**, p. 661.

44. Barry, E., A. Weiss, M. Gray, E. Hewelett, I. Ehrmann & M. Goodwin. 1990. Mutational analysis of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. In: C. R. Manclark C. (eds.), International Symposium on Pertussis. S. Department of Health and Human services, United States Public Health Service, Bethesda, Maryland. DHHS Publication No. (FDA) 90-1164, p.260.
45. Khelef, N., H. Sakamoto & N. Guisó. 1992. Both adenylate cyclase and hemolytic activities are required by *Bordetella pertussis* to initiate infection. *Microb Pathog.* **12**, p.227.
46. Glaser, P., D. Ladant, O. Sezer, F. Pichot, A. Ullman & A. Danchin. 1988. The calmodulin-sensitive adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: cloning and expression in *E. coli*. *Mol. Microbiol.* **2**, p. 19.
47. Escuyer, V., E. Duflot, O. Sezer, A. Danchin & M. Mock. 1988. Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases. *Gene* **71**, p. 293.
48. Gueirard, P. & N. Guisó. 1993. Virulence of *Bordetella pertussis*: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* **61** (10), p. 4072.
49. Guiso, N., M. Szatanik & M. Rocancourt. 1991. Protective activity of *Bordetella* adenylate cyclase against bacterial colonization. *Microb Pathog.* **11**, p.423.
50. Cookson, B., H. Cho, L. Herwaldt & W. Goldman. 1989. Biological activities and chemical composition of purified tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **57**, p. 2223.
51. Adam, A. & Lederer, E. 1984. Muramyl peptides: immunomodulators, sleep factors, and vitamins. *Med Res Rev.* **4**, p. 111-52.
52. Chedid, L. 1983. Muramyl peptides as possible endogenous immunopharmacological mediators. *Microbiol Immunol.* **27**, p. 723.
53. Endoh, M. M. Amitani & Y. Nakase. 1986. Purification and characterization of heat-labile toxin from *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Immunol.* **30**, p. 659.
54. Endoh, M., M. Nagai, D. Burns, C. Manclark & Y. Nakase. 1990. Effect of exogenous agents on the action of *Bordetella parapertussis* heat-labile toxin on guinea pigs. *Infect Immun.* **58**, p. 1456.
55. Cowell, J., E. Hewelett & C. Manclark. 1979. Intracellular localization of dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **25**, p. 896.

56. **Le Dur, A., M. Caroff, R. Chaby & Szabo.** 1978. A novel type of endotoxin structure present in *Bordetella pertussis*. *Eur J Biochem.* **84**, p. 579.
57. **Le Dur, A., R. Chaby & L. Szabo.** 1980. Isolation of two protein-free and chemically different lipopolisaccharide of *Bordetella pertussis* phenol extracted endotoxin. *J Bacteriol.* **143**, p.78.
58. **Rietschel, E. & H. Brade.**1992. Bacterial endotoxins. *Sci. Am.* **267**, p. 54.
59. **Raetz, C.** 1993. Bacterial endotoxins: extraordinary lipids that activate eukariotic signal transduction. *J Bacteriol.* **175**(18), p. 5745.
60. **Chen, T., M. Lei, T Suzuki & D. Morrison.** 1992. In: *Macrophage and macrophage activation*. Edited by Gordon, M. & S. Russell. Springer Verlag Inc., Hlidelberg, p. 169.
61. **Tobias, P., K. Soldau & R. Ulevitch.** 1989. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolisaccharide binding protein. *J Biol Chem.* **264**, p. 10867.
62. **Dinarello, C.** 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* **77**, p. 1627.
63. **Morrison, D. & J. Ryan.** 1987. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med.* **38**, p. 417.
64. **Beutler, B & A. Cerami.** 1988. Tumor necrosis, cachexia, and inflammation: a common mediator. *Annu Rev Biochem.* **57**, p. 505.
65. **Bannatyne, R.& J. Jackowski.** 1987. Protective effectiveness of an endotoxin-depleted pertussis vaccine. *Vaccine* **5**, p. 268.
66. **Saukkonen, K., C. Cabellos, M. Burroughs, S. Prasad & E. Tuomanen.** 1991. Integrin-mediated localization of *Bordetella pertussis* within macrofages: role in pulmonary colonization. *J. Exp. Med.* **173**, p. 1143.
67. **Goldman, W, D. Klapper & J. Baseman.** 1982. Detection, isolation and analysis of released *Bordetella pertussis* product toxic to cultured traqueal cells. *Infect. Inmun.* **36**, p. 782.
68. **Goldman, W, J. Collier, B. Cookson, G. Marshall & K. Erwin** 1990. Tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis*: biosynthesis, structure, and specificity. In: C. R. Manclark C. (eds.), *International Symposium on Pertussis* U.S. Department of Health and Human services, United States Public Heath Service, Bethesda, Maryland. DHHS Publication No. (FDA) 90-1164, p. 5.

69. Collier, A., L. Peterson & J. Baseman. 1977. Pathogenesis of infection with *Bordetella pertussis* in hamster tracheal organ culture. *J Infect Dis.* **136**, p. S196.
70. Vogel, F., T. Klein, W. Stewart, T. Igarashi & H. Friedman. 1985. Immuno supression and gamma interferon by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **49(1)**, p. 90.
71. Friedman, R., R. Fiederlein, L. Glasser & J. Galgiani. 1987. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: effects of affinity-purified adenylate cyclase on human polymorphonuclear leucocyte functions. *Infect Immun.* **55**, p. 135.
72. Meade, B., P. Kind & C. Manclark. 1984. Lymphocytosis-promoting factor of *Bordetella pertussis* alters mononuclear phagocyte circulation and response to inflammation. *Infect Immun.* **46**, p. 733.
73. García -Sáinz, J., J. Juárez-Ayala & V. Valles. 1987. Pertussis toxin induces fatty liver, hyperlipemia and ketosis in hamsters. *Toxicon.* **25(6)**, p. 603.
74. Coote, J. & R. Brownlie. 1988. Genetics of virulence of *Bordetella pertussis*. In: *Pathogenesis and Immunity in Pertussis*. Edited by A. C. Wardlaw and R. Parton. Chicgeste: John Wiley, p. 39.
75. Lacey, B. 1960. Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *J Hyg.* **58**, p. 2516.
76. Melton A. & A. Weiss. 1993. Characterization of environmental regulators of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **61(3)**, p.807.
77. Robinson, A., C. Duggleby, A. Gorringe & I. Livey. 1986. Antigenic variation in *Bordetella pertussis*. In: *Antigenic Variation in Infection Diseases*, p. 147. Edited by: T.H. Birkbeck & C.W. Penn. Oxford.: IRL Press.
78. McGregor, D., J. Coote, J. Duggleby & R. Parton. 1991. Serotype variation in *Bordetella pertussis* is governed by *cis*-acting elements. *FEMS Immunology Letters.* **78** p. 333.
79. Weiss, A. & S. Falkow. 1984. Genetic analysis of phase change in *Bordetella pertussis*. *Infect immun.* **43**, p. 263.
80. Arico, B., J. Roy, C. Stibitz, S. Monack, D Falkow, S. Gross & R. Rappuoli. 1989. Sequences required for expression of *Bordetella pertussis* virulence factors share homology with prokariotic signal transduction proteins. *Proc Nat Acad Sci USA.* **86**, p. 6671.
81. Knapp,S. & J. Mekalanos. 1988. Two *trans*-acting regulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* **170**, p. 5059.

82. **Ronson, C. B. Nixon & F. Ausubel.** 1987. Conserved domains in bacterial regulatory proteins that respond to environmental stimuli. *Ccll.* **49**, p. 579.
83. **Scarlato, V., B. Arico, A. Prugnola, & R. Rappuoli.** 1991. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO.* **10** (12), p. 3971.
84. **Merkel, T. & S. Stibitz.** 1995. Identification of a locus required for the regulation of *bvg*-repressed genes in *Bordetella pertussis*. *J. of Bacteriol.* **177**(10), p. 2727.
85. **Stibitz, S. & M. Yang.** 1991. Subcellular localization and immunological detection of proteins encoded by the *vir* locus of *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol.* **173**, p. 4288.
86. **Miller, J., S. Johnson, W. Black, D. Beattie, J. Mekalanos & S. Falkow** 1992. Constitutive sensory transduction mutations in the *Bordetella pertussis bvgS* gene *J Bacteriol.* **174**(3), p. 970
87. **Willems, R., A. Paul, H. van der Heide, A. ter Avest, F. Mooi.** 1990. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *EMBO.* **9**, p. 2674.
88. **Kasuga, T., Y. Nakase, K. Ukishima & K. Takatsu.** 1954. Studies on *Haemophilus pertussis*. III. Some properties of each phases of *H. pertussis*. *Kitsato Arch Exp Med.* **27**, p. 37.
89. **Coote, J.** 1991. Antigenic switching and pathogenicity: anvironmental effects on virulence gene expression in *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol.* **137**, p. 2493.
90. **Beattie, D., R. Shahin & J. Mekalanos.** 1992. A *vir*-repressed gene of *Bordetella pertussis* is required for virulence. *Infect Immun.* **60**(2), p. 571.
91. **Cody, C., L. Baraff, J. Cherry, S. Marcy & C. Manclark.** 1981. Nature and rates of adverse reactions associated with DPT and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics* **68**. p.650.
92. **Sato, Y., M. Kimura & H. Fukumi.** 1984. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet.* **1**, p. 122.
93. **Wardlaw, A.** 1992. Mutiple discontinuity as a remarkable feature of the development of acellular pertussis vaccines. *Vaccine.* **10** (10), p.463.

94. Ewanowich, C., A. Melton, A. Weiss, A. Sherburne & M. Pepler. 1989. Invasion of HcLa 229 cells by virulent *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **57**, p. 2698.
95. Mills, K & K. Redhead. 1993. Cellular immunity in pertussis. *J. Med. Microbiol.* **39**, p. 163.
96. Mills, K., A. Barnard, J. Watkins & K. Redhead. 1993. Cell-mediated immunity to *Bordetella pertussis*: role of Th1 cells in bacterial clearance in a murine respiratory infection model. *Infect Immun.* **61**, p. 399.
97. Bordet, J. & O. Gengou. 1906. L'Endotoxin coquelucheses. *Ann. Inst. Pasteur, Paris.* **24**, p. 731.
98. Imaizumi, A., Y. Suzuki, S. Ono, H. Sato & Y. Sato. 1983. Heptakis (2,3-O-dimetyl) β -cyclodextrin, a novel growth stimulant of *Bordetella pertussis* phase I. *J Clin Microbiol.* **17**, p. 781.
99. Cohen S. & M. Wheeler. 1946. Pertussis vaccine prepared with phase I cultures grown in fluid medium. *Am J Public Health.* **36**, p.371.
100. Rowatt, E. 1957. The growth of *Bordetella pertussis*: a review. *J Gen Microbiol.* **17**, p. 297.
101. Syukuda, Y., H. Watanabe, A. Suehara, S. Fuji, H. Kuno-Sakai & M. Kimura. 1988. Aerosol infection test for evaluation of pertussis vaccine. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* **13**, p. 71.
102. Stainer, D. & M. Scholte. 1971. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol.* **63**, p. 221.
103. Jebb, W. & A. Tomlinson. 1955. The nutritional requirements of *Haemophilus pertussis* *J Gen Microbiol.* **13**, p. 1.
104. Abbot M., & S. Udenfriend. 1974. In "Molecular Mechanisms of Oxygen Activation" (O. Hayashi, ed). Academic Press, New York, p. 167.
105. Parker, C. 1976. Role of genetics and physiology of *Bordetella pertussis* in the production of vaccine and the study of the host-parasite relationship in pertussis. *Adv Appl Microbiol.* **20**, p. 27..
106. Imaizumi, A., Y. Suzuki, Y. Ginnaga, S Sakuma & Y. Sato. 1983. A new culturing method for the production of filamentous haemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *J Chem Microbiol.* **17**, p. 781.

107. Imaizumi, A., Y. Suzuki, S. Ono, H. Sato & Y. Sato. 1983. Effect of Heptakis (2,3-O-dimetyl) β -cyclodextrin on the production of pertussis toxin by *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **41**, p. 1138.
108. Menozzi, F., P. Boucher, G. Riveau, C. Gantiez & C. Locht. 1994. Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **62** (10), p. 4261.
109. Hozbor, D. A. Samo & O. Yantorno. 1991. Effect of methyl cyclodextrin on adenylate cyclase activity of *Bordetella pertussis*. *World J of Microbiol Biotechnol.* **7**, p. 309.
110. World Health Organization. 1982. Manual of Details of Test Required on Final Vaccines Used in the WHO Expanded Program Of Immunization. Geneva:WHO, BGL/UNDP, Rev. 1, -p. 77.
111. Sato Y., J. Cowell, H. Sato, D. Burnstyn & C. Manclark. 1983. Separation and purification of haemagglutinin from *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **41**, p. 313.
112. Suzuki, Y., A. Imaizumi, A. Ginnaga, H. Sato & Y. Sato. 1985. Effect of Heptakis (2,3-O-dimetyl) β -cyclodextrin on cell growth and the production of pertussis toxin and filamentous hemagglutinin in *Bordetella pertussis*. In: *Developments in biological standarization*, vol 61 (Proceedings of the Fourth International Symposium on Pertussis). Edited by the Association of Biological Standarization. S. Karger, Basel. p. 89.
113. Nikolajewski, H., H. Liepert, G. Nikolajewski, U. Pfuller, S. Swidsinski & G. Wettig. 1990. The effect of amphiphilic polymers on growth of *Bordetella pertussis* and production of *B. pertussis*. *Biologicals.* **18**, p. 305.
114. Licari, P., L. Winberry & R. Swartz. 1991. The effect of pH on the production of pertussis toxin by *Bordetella pertussis*. *J Biotechnol.* **17**, p. 189.
115. Arai, H. & J Munoz. 1979. Fimbrial haemagglutinin in stationary and shake culture of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* **25**, p. 728.
116. Gorringe, A., L. Irons & A. Robinson. 1988. The effect of methyl- β -cyclodextrin on the stability of *B. pertussis* filamentous hemagglutinin. *FEMS Microbiol. letters.* **55**, p. 315.
117. Arai, H. & Y. Sato. 1976. Separation and characterization of two distinct hemagglutinin in stationary and shake culture of *B. pertussis*. *Biochem Biophys. Acta* **444**, p. 765.
118. Andorn, N., Y. Zhang, R. Sekura & J. Shiloach. 1988. Large scale cultivation of *B. pertussis* in submerged culture for production of pertussis toxin. *Appl Microbiol Biotechnol.* **28**, p. 356.

119. **Umbreit, W., R. Burris & J. Stanffer.** 1972. *Manometric Biomechanical Techniques*, 5TH edn., Burgess Publishing Company, Minneapolis. Minnesota, p. 100.
120. **Cooper, C., G. Fernston & S. Miller.** 1944. Gas-liquid contactors. *Ind Eng Chem.* **36**, p. 504.
121. World Health Organization. *Manual for the production and control of vaccines - Pertussis Vaccine.* Geneva: BGL/UNDP/77-3, p. 55.
122. **Worcester J & E. Wilson.** 1943. A table determining LD50 or 50 percent end point. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **29**, p. 207.
123. Code of Federal Regulations. 1988. Title 21 Part 620.4, p. 68.
124. **Leininger, E., P. Probst, M. Brennan and J. Kenimer.** 1993. Inhibition of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin-mediated cell adherence with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol. Letters.* **106**: 31.
125. **Brown, D. & C. Parker.** .1987. Cloning of filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis* and its expression in *Escherichia coli*. *Infect. and Immun.* **55**, p:154-161.
126. **Wong, K. & S. Skelton.** 1988. New, practical approach to detecting antibody to pertussis toxin for public health and clinical laboratories. *J Clin Microbiol.* **26(7)**, p.1316.
127. **Lowry, D., A. Rosebrough & R. Randall.** 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, p. 265.
128. **Maagd, R. & B. Lugtenberg.** 1986. Fractionation of *Rhizobium leguminosarum* cells into outer membrane, cytoplasmic membrane, periplasmic, and cytoplasmic components. *J Bacteriol.* **167(3)**, p. 1083.
129. **Westphal, O. & K Jann.**1965. Bacterial lipopolysacharides. Extraction with phenol-water and further application of procedure. *Meth Carbohydr Chem.* **5**, p. 83.
130. **Laemmly, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature London.* **227**, p. 680.
131. **Wray, W., T. Boulikas, V. Wray & R. Hancock.** 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Analyt Biochem.* **118**, p. 197.

132. Hitchcock, P. & T. Brown. 1983. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* **154**, p. 269.
133. Towbin, H., T. Staehlin & J. Gordon. 1979. Electrophoresis transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Sci. USA.* **76**, p. 4350.
134. Karkanis, Y., J. Zeltner, J. Jackson & D. Carlo. 1978. A new and improved microassay to determine 2-keto-3-deoxyoctonate in lipopolysaccharide of Gram-negative bacteria. *Analyt Biochem.* **85**, p. 595.
135. Gaitonde, M. 1967. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in presence of other naturally occurring amino acids. *Biochem. J.* **104**, p. 627.
136. Sáez, M. & R. Laguna. 1976. Determination of intermediary metabolites in yeast. Critical examination of the effect of sampling conditions and recommendations for obtaining true levels. *Mol & Cel Biochem.* **132**, p. 73.
137. Bernofky, C. & M. Swan. 1973. An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Analyt Biochem.* **53**, p. 452.
138. Schwyn, B. & B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analyt Biochem.* **160**, p. 47.
139. Stell, R. & J. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics: a biometrical approach, 2nd ed. Mc Graw Hill Book Co., New York. p. 176.
140. Minkevich, J. & V. Eroshin. 1973. Productivity and heat generation of fermentation and oxygen limitation. *Folia Microbiologia*, **18**, p. 376.
141. Lehninger, A. 1972. *Biochemistry*. Editorial Worth Publishers, Inc. New York.
142. Kleiner, D. 1985. Energy expenditure for cyclic retention of $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ during N_2 fixation by *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS* **2738**, **187** (2), p. 237.
143. Naundorf, G. & N. Aumen. 1990. Ammonia-induced cell envelope injury in *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*. *Can J Microbiol.* **36**, p. 525.
144. *Comprehensive Biotechnology*. 1985. Editor-in-chief: Moo-Young, M. Pergamon Press Ltd, Oxford OX3 0BW, England. Vol. 1.
145. Monod, J. 1942. *Recherches sur la Croissance des Cultures Bactériennes*. Herman & Cie. Paris.

146. Hozbor, D. , M. E. Rodriguez, A. Samo, A. Lagares & O. Yantorno. 1993. Release of lipopolisaccharide during *Bordetella pertussis* growth. Res Microbiol. 144, p. 201.
147. Perera, V., A. Wardlaw & J. Freer. 1987. Release of pertussis toxin and its interaction with outer-membrane antigens. J Gen Microbiol. 133, p. 2427.
148. Kunas, K. & E. Papoutsakis. 1990. Damage mechanisms of suspended animal cells in agitated bioreactors with and without bubble entrainment. Biotech Bioeng 36, p. 476.
149. Silva, H., T. Cortiñas & R. Ertola. 1987. Effect of hydrodynamic stress on *Dunaliella* growth. J Chem Tech Biotechnol. 40, p. 41.
150. Charm, S & B. Wong. 1970. Shear inactivation in mixing biological material. Biotechnol Bioeng. 12, p. 1103.
151. Rodriguez, F & C. Winding. 1959. Mechanical degradation of polyisobutylene solutions. Ind Eng Chem. 51 (10), p. 1281.
152. Rushton, J. & J. Oldshue. 1953. Mixing-present theory and practice. Chem Eng Progress. 49(4), p. 161.
153. Landau, L. & E. Lifshitz. 1955. Fluids mechanisms. In: Course of teorical Physics . Vol 6. (Sykes, J & W. Reid. eds.). Pergamon Press. Great Britain, p.117.
154. Liepe, F., H.D. Mockel & H. Winkler. 1987. Hydromechanical damage. In: Physical Aspects of Bioreactor Performance (Fox, R.I., ed.). European Federation of Biotechnology. Frankfurt, Germany. p. 79.
155. Domenighini, M., D. Relman, C. Capiou, S. Falkow, A. Prugnola, V. Scarlato & R. Rappuoli. 1990. Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. Mol. Microbiol. 4, p. 787.
156. Menozzi, F., R. Mutombo, G. Renaud, C. Gantiez, J. Hannah, E. Leininger, M. Brennan & C. Loch. 1991. Heparin-inhibitable lectin activity of filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* Infect Immun. 62, p.769.
157. Urisu, A., J. Cowell & C. Manclark. 1986. Filamentous hemagglutinin has a major role in mediating adherence of *Bordetella pertussis* to human WiDr cells. Infect Immun. 52, p. 695.

158. Monod, J. 1950. La technique de culture continue. Théorie et applications. Ann Inst Pasteur Paris 79, p. 390.
159. Herbert, D., R. Elsworth & R. Telling. 1956. The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental study. J Gen Microbiol. 14, p. 601.
160. Powell, E.. 1958. Criteria for the growth of contaminants and mutants in continuous culture. J Gen Microbiol. 18, p. 259.
161. Hsu, S., S. Hubbell & P. Waltman. 1977. A mathematical theory for single nutrient competition in continuous culture of microorganisms. SIAM (Soc. Ind. Appl. Math.) J Appl Math. 32: p. 366.
162. Tempest, D. & J. Wouters. 1981. Properties and performance of microorganisms in chemostat culture. Enzyme Microb Technol. 3: p. 283.
163. Owens, J. & J. Legan. 1987. Determination of the Monod substrate saturation constant for microbial growth. FEMS Microbiol. Rev. 46: p. 419.
164. Slater, J. 1979. Population and community dynamics. In: Microbial Ecology: A Concept Approach. Blackwell, Oxford.
165. Eisenthal, R. & A. Cornish-Bowden. 1974. The direct linear plot; a new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. Biochem. J. 139: p. 715-720.
166. Pirt, S. 1975. The principles of microbe and cell cultivation. Backwell. Scientific Publications. Oxford.
167. Tempest, D. 1978. The biochemical significance of microbial growth yields: a reassessment. Trends Biochem. Sci. August, p. 180.
168. Neijssel, O. 1977. The effect of 2,4-dinitrophenol on the growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 in aerobic cultures. FEMS Microbiol. Lett. 1: 47.
169. Pirt, S. 1982. Maintenance energy: a general model for energy-limited and energy-sufficient growth. Arch Microbiol. 133: p. 300.
170. Licari, P., G. Siber & R. Swart. 1991. Production of cell mass and pertussis toxin by *Bordetella pertussis*. J Bacteriol. 20, p. 117.
171. Ibsen, P., S. Moller & I. Heron. 1988. Lipopolysaccharides in a traditional pertussis vaccine. J Biol Stand. 16, p. 299.

172. **Brown, M. & P. Williams.** 1985. The influence of the environment on the envelope properties affecting survival of bacteria in infections. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**: p. 527-556.
173. **Arneborg, N., A. Steen Salskov-Iversen & T. Mathiasen.** 1993. The effect of growth rate and other growth conditions on the lipid composition of *E. coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **39**: p. 353.
174. **Poolman, J., H. Hamstra, A. Barlow, B. Kuipers, H. Loggen & J. Nagel.** 1990. Outer membrane vesicles of *Bordetella pertussis* are protective antigens in the mouse intracerebral challenge model. In: C. R. Manclark C. (eds.), *International Symposium on Pertussis* U.S. Department of Health and Human services, United States Public Health Service, Bethesda, Maryland. DHHS Publication No. (FDA) 90-1164, p. 148.
175. **Bullen, J.** 1981. The significance of iron in infection. *Rev. Infect Dis.* **3**: 1127.
176. **Bullen, J. H. Rogers & E. Griffiths.** 1978. Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* **80**, p 1.
177. **Kadurugamuwa, J., H. Anwar, M. Brown, G. Shand & K. Ward.** 1987. Media for study of growth kinetics and envelope properties of iron-deprived bacteria. *J Clin Microbiol.*, p. 849.
178. **Neiland, J.** 1982. Microbial envelope proteins related to iron. *Ann Rev Microbiol.* **36**, p. 285.
179. **McKenna, W., P. Mickelsen, P. Sparling & D. Dyer.** 1988. Iron uptake from lactoferrin and transferrin by *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun.* **56**, p. 785.
180. **Redhead, K., T. Hill & H. Chart.** 1987. Interaction of lactoferrin and transferrins with the outer membrane of *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol.* **133**, p. 891.
181. **Gorringe, A., G. Woods & A. Robinson.** 1990. Growth and siderophore production by *Bordetella pertussis* under iron-restricted conditions. *FEMS Microbiol Lett.* **66**, p. 101.
182. **Agiato, L. & D. Dyer.** 1992. Siderophore production and membrane alteration by *Bordetella pertussis* in response to iron starvation. *Infect Immun.* **60**(1), P. 117.
183. **Menozi, F., C. Gantiez & C. Locht.** 1991. Identification and purification of transferrin- and lactoferrin-binding proteins of *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Infect. Immun.* **59**(11), p. 3982.
184. **Redhead, K. & T. Hill.** 1991. Acquisition of iron from transferrin by *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, p. 303.

185. Litwin, C. & S. Calderwood. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. Clin Microbiol Rev. 6(2), p.137.
186. Harder, W. & L. Dijkhuizen. 1983. Physiological responses to nutrient limitation. Ann Rev Microbiol. 31, p.23.
187. Keevil, W., N. Major, D. Davies & A. Robinson. 1986. Physiology and virulence determinants of *Neisseria gonorrhoeae* grown in glucose-, oxygen- or cystine-limited continuous culture. J Gen Microbiol. 132, p. 3289.
188. Berger, E. & L. Heppel. 1972. A binding protein involved in the transport of cystine and diaminopimelic acid in *E. coli*. J Biol Chem. 247(23), p. 7684.
189. Ellison III, R., T. Giehl & F. LaForce. 1988. Damage of the outer membrane of enteric Gram negative bacteria by lactoferrin and transferrin. Infect Immun. 56(11), p. 2774.
190. Stouthamer, A. 1977. Microbial Energetics. Ed.: Haddock, B. & W. Hamilton. 27 Symposium of the Society for General Microbiology. Imperial College London. Cambridge University Press.
191. Poole, R. & B. Haddock. 1975. Effects of sulphate-limited growth in continuous culture on the electron-transport chain and energy conservation in *E. coli* K12. Biochem J. 152, p. 537.
192. Tempest, D. & M. Neijssel. 1987. In: Cellular and Molecular Biology. Vol. 1. (Neidhart, F., J. Ingraham, K. Low, B. Magasanik, M. Scharchter & H. Umbarger, eds.) American Society for Microbiology, Washington, D.C.
193. Rothfield, L. & M. Pearlman-Kothencz. 1969. Synthesis and assembly of bacterial membrane components. A lipopolisaccharide-phospholipid-protein complex excreted by living bacteria. J Mol Biol. 44, p. 477.
194. Lane, A. 1970. Use of glutamic acid to supplement fluid medium for cultivation of *Bordetella pertussis*. Appl Microbiol. 19(3), p. 512.
195. Harrison, D. 1972. Physiological effects of dissolved oxygen tension and redox potencial on growing population of microorganisms. J Appl Chem Biotechnol. 22, p. 417.
196. Mateles, R. & Battat, E. 1974. Continuous culture used for media optimization. Applied Microbiology. p, 901.

197. **Hozbor, D., M.E. Rodriguez & O. Yantorno.** 1994. Use of cyclodextrin as an agent to induce *Bordetella pertussis* antigens excretion. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **9**, p.117.
198. **Ibsen, P., C. Schou, M. Au-Jensen & I. Heron.** 1989. The effect of cyclodextrin on lipopolysaccharide production in cultures of *Bordetella pertussis*. *J Biol Stand* **17**, p. 321.
199. **Cowell, J., Y. Sato, H. Sato, B. Ander Lan & C. Manclark.** 1982. Separation, purification and properties of filamentous hemagglutinin and the leukocytosis promoting factor-hemagglutinin from *Bordetella pertussis*. In: *Seminars in Infectious Disease, Vol. IV, Bacterial Vaccine* (Robbins, J., J. Hill & J. Sadoff, eds.), Thieme-Stratton, New York. p. 371.
200. **Lei, M. & D. Morrison.** 1993. Lipopolisacharide interaction with S2 subunit of pertussis toxin. *J Biol Chem.* **268(2)**, p. 1488.
201. **Gankema, H., J. Wensink, P. Guinee, W. Jansen & B. Witholt.** 1980. Some characteristics of the outer membrane material released by growing enterotoxigenic *E. coli* *Infect. Immun.* **29**: p. 704-713.