

Caracterización del fenotipo piliado de *Moraxella bovis*

**Estabilidad de la expresión de pili en distintas
condiciones de cultivo**

Microbióloga Ana Silvia Donolo

Director: Dr. Osvaldo Yantorno

Presentada en La Plata, Argentina, a los 7 días del mes de julio del año 2008.

El presente trabajo de Tesis se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) bajo la dirección del Dr. Osvaldo Yantorno.

Se presenta a consideración de las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata a fin de acceder al Grado Académico de Doctor de la Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.

Agradecimientos

Deseo expresar mi agradecimiento a las personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de este Trabajo de Tesis:

Al Dr. Yantorno por la dirección de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca doctoral (1999-2004).

Al personal técnico y administrativo del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI) por su colaboración permanente a lo largo de los años de trabajo experimental.

A las autoridades de la Universidad Nacional de La Plata y de la Facultad de Ciencias Exactas por haber accedido a que realizara mis actividades en esta institución, en particular a las autoridades del CINDEFI por brindarme el equipo y la infraestructura que permitieron la realización de la parte experimental de este trabajo.

A la Dra. Prieto por facilitarme la técnica de ELISA que ella desarrollo y por permitirme usar los sueros que ella preparó, pero por sobretodo por brindarme sus conocimientos y la posibilidad de discusión acerca de estos temas.

Al Dr. Aguilar y al Dr. Lagares del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM), que me permitieron usar su equipamiento y por guiar mis estudios en el área de Biología Molecular.

Al Dr. Disalvo de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (UBA) que me permitió usar su equipo de determinación de potencial zeta.

A las autoridades del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) por permitirme el uso de su microscopio de epifluorescencia.

A mis compañeros de trabajo por las horas compartidas y por su colaboración en parte de los experimentos desarrollados para este trabajo de Tesis.

A mi marido Claudio y mis padres por su apoyo incondicional durante la realización de este trabajo.

A ellos ¡gracias!

A. S. D.

Capítulo I. Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina	1
I. 1. Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina	2
I. 2. Agente Etiológico: <i>Moraxella Bovis</i>	15
I. 3. Objetivos	28
I. 4. Referencias Bibliográficas	30
Capítulo II. Expresión y estabilidad de factores de virulencia de <i>Moraxella bovis</i>	36
II. 1. Introducción	37
II. 2. Objetivos	44
II. 3. Materiales y Métodos	45
II. 4. Resultados	56
II. 5. Discusión	66
II. 6. Conclusiones	68
II. 7. Referencias Bibliográficas	69
Capítulo III. Caracterización de propiedades de superficie de poblaciones piliadas y no piliadas de <i>Moraxella bovis</i>	73
III. 1. Introducción	74
III. 2. Objetivos	78
III. 3. Materiales Y Métodos	78
III. 4. Resultados	90
III. 5. Discusión	104
III. 6. Conclusiones	108
III. 7. Referencias Bibliográficas	109

Capítulo IV. estabilidad del fenotipo piliado de *Moraxella bovis* durante el crecimiento en reactores agitados **116**

IV. 1. Introducción	117
IV. 3. Materiales y Métodos	122
IV. 4. Resultados	128
IV. 5. Discusión	136
IV. 6. Conclusión	138
IV. 7. Referencias Bibliográficas	139

Capítulo V. Crecimiento de *Moraxella bvis* en biofilm **143**

V. 1. Introducción	144
V. 3. Materiales y Métodos	150
V. 4. Resultados	155
V. 5. Discusión	163
V. 6. Conclusiones	166
V. 7. Referencias Bibliográficas	167

Capítulo VI. Conclusiones Generales **171**

Capítulo I

QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA

I. 1. QUERATOCONJUNTIVITIS INFECCIOSA BOVINA

La queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) es una enfermedad infecciosa del ganado bovino también conocida como ojo rosado, queratitis infecciosa o enfermedad de New Forest (Bretschneider *and* Pérez, 1997). Esta enfermedad es producida por la bacteria Gram-negativa *Moraxella bovis*¹ (Hughes *and* Pugh, 1970; Baptista, 1979; George, 1984; Brown *et al.*, 1998; Kirkpatrick *and* Lalman, 2001). Si bien el primer reporte de la enfermedad data de 1889 y fue realizado por Billings, más de un siglo después de su descubrimiento la enfermedad no ha podido aún ser controlada (Davidson *and* Stokka, 2003). Actualmente se reportan brotes en todo el mundo y tanto su tratamiento como erradicación continúan siendo un grave problema para el sector ganadero. Aunque, QIB no es fatal tiene un impacto económico importante debido a las pérdidas que ocasiona en la industria ganadera (Kirkpatrick *and* Lalman, 2001; McConnel *and* House, 2005).

Las medidas terapéuticas y tratamientos desarrollados han tenido un éxito limitado por lo que la investigación tendiente a la prevención sigue siendo una necesidad. Los efectos negativos de QIB sobre el ganado en Estados Unidos, han sido documentados en boletines nacionales y regionales (Brown *et al.*, 1998). Ya en el año 1976 se estimó que

¹ Recientemente *Nebraska Veterinary Diagnostic Laboratory System* reporta que se ha logrado aislar *Moraxella (Branhamella) ovis* de casos clínicos de QIB demostrando además su importancia en la patogénesis de esta enfermedad (Cerny *et al.*, 2006).

alrededor del 20% de los 48 millones de terneros que nacían anualmente en Estados Unidos podían verse afectados por QIB (Miller *and* Fales, 1984). En dicho país, los costos resultantes de la enfermedad tienen distintas causas: i. menor de aumento de peso del animal; ii. menor producción de leche y iii. tratamiento antimicrobiano, que en el año 1993 fueron estimados en 150 millones de dólares (Kirkpatrick *and* Lalman, 2001). También en ese año, en Kansas, se reportó que QIB era la segunda enfermedad más común en el ganado bovino y que la disminución en el aumento de peso en terneros era mayor en los animales que tenían ambos ojos afectados. Estas observaciones estuvieron en coincidencia con las descritas por dueños de ganado en Missouri (Brown *et al.*, 1998). En el año 1996 se informó que QIB fue una de las dos infecciones prevalentes en hembras de ganado bovino en Estados Unidos (Kirkpatrick *and* Lalman, 2001).

El impacto de esta enfermedad también se ha reportado en Australia donde el 81,3% de los dueños de ganado informan haber tenido en su rodeo animales con QIB y el 75% observa pérdidas en la tasa de aumento de peso (Slatter *et al.*, 1982). Resultados similares se reportan en diferentes regiones del Sudeste de Etiopía (Takele *and* Zerihun, 2000). En Australia se estimaron pérdidas mayores a los 22 millones de dólares en la producción, de los cuales 1,5 millones fueron invertidos para tratamiento de animales enfermos (Brown *et al.*, 1998).

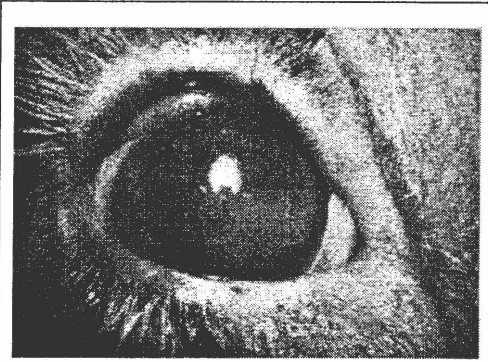
QIB se caracteriza por comprometer a dos estructuras del ojo: la córnea y la conjuntiva. La primera es un disco incluido en la esclerótica que forma la parte anterior de la capa externa del globo ocular y cuyo proceso inflamatorio se denomina queratitis. La conjuntiva es la membrana que tapiza la cara interna de los párpados y que a la vez cubre la porción anterior del globo ocular; a su reacción inflamatoria se la denomina conjuntivitis.

QIB puede cursar de dos maneras desde el punto de vista clínico: en forma *aguda* o *crónica*. La *queratoconjuntivitis aguda* es la forma más frecuente de la enfermedad. Se caracteriza por tener un principio abrupto, con manifestaciones como arborización de los capilares del ojo y congestión de las mucosas oculares. A continuación se observa un proceso febril leve que puede pasar inadvertido. Simultáneamente se observa blefaritis, secreción lagrimal abundante, continuo parpadeo con conjuntivitis marcada y fotofobia. Más tarde el cuadro se agrava, aparece exoftalmia -por el aumento de la presión intraocular-, aumenta la sensibilidad de los ojos afectados a la palpación y a la luz fuerte

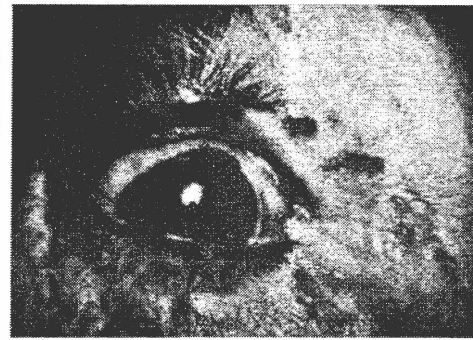
natural o artificial y se observa un ligero opacamiento de la parte central de la córnea. La conjuntiva congestionada hace contraste con el blanco arborizado de la esclerótica mostrando una coloración rosa, de allí el nombre vulgar de la enfermedad: ojo rosado. Progresando el período agudo, entre el cuarto y sexto día hay opacidad total y degeneración de la córnea; la secreción lagrimal se transforma en densa y purulenta siendo expulsada por la gotera lagrimal y adhiriéndose a toda la región inferior de la cabeza. Estas secreciones densas y purulentas aglutinan los pelos favoreciendo la presencia de moscas y la instalación de miasis -una de las complicaciones más graves, como se verá más adelante-. El color de la córnea en esta etapa de la enfermedad pasa de blanco lechoso a amarillo fuerte y termina en celeste, cuando esto ocurre la visión se ha perdido totalmente (Brown *et al.*, 1998).

La *queratoconjuntivitis crónica* es el resultado de la enfermedad aguda no tratada o deficientemente medicada y puede conducir tanto a la ceguera permanente como a la recuperación de la visión. La ceguera se produce en los casos en que se forma un queratocono (protuberancia en el centro de la córnea), que más tarde se rompe y forma úlceras que alcanzan la membrana de Descemet. Esto ocasiona pérdida de humor acuoso y/o vítreo e hipopión (acumulación de pus en la cámara anterior del ojo) que puede cursar con o sin desprendimiento del cristalino. También hay pérdida permanente de la visión si ocurre panoftalmia (destrucción del globo ocular y sus anexos) o si la infección se extiende por vía ascendente. En este caso puede llegar a producir la muerte del animal por septicemia. En otros casos de enfermedad crónica, el ojo enfermo puede retornar lentamente a la normalidad, disminuyendo la fotofobia, la exoftalmia y la sensibilidad a la palpación (Kirkpatrick *and* Lalman, 2001). En la Figura I.1. se muestran distintos estadios de la enfermedad.

a. Estadío inicial de la infección con inflamación de cornea y conjuntiva.



b. Estadío agudo avanzado.



c. Estadío de cicatrización.

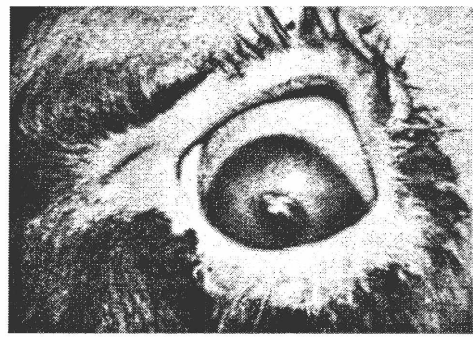


Figura I. 1. Ojos de bovinos infectados por *M. bovis* en distintos estadíos de la enfermedad. Las fotos se tomaron de Perez y colaboradores (1997).

Es importante señalar que los problemas en la visión provocados por QIB afectan también el comportamiento de los animales, ocasionando trastornos de distinta gravedad, que muchas veces incluso pueden resultar más graves que la afección *per se* (Baptista, 1979; Kirkpatrick and Lalman, 2001). Los problemas más importantes de este tipo son la miasis, la pérdida de peso, las heridas traumáticas y las fracturas. La miasis es una infección producida por las moscas directamente o por sus larvas que puede progresar hasta destruir el globo ocular produciendo ceguera. La pérdida de peso se debe a la dificultad del animal enfermo para buscar alimento, agua y sombra. Las heridas

traumáticas se producen cuando los animales chocan con postes, árboles, piedras, palenques, etc.; también se hieren al quedar atrapados en los alambrados y/o pueden sufrir fracturas de distinto tipo y en distintas partes del cuerpo (cráneo, aparato locomotor, etc.) (Kirkpatrick *and* Lalman, 2001).

I. 1. 1. Transmisión

La enfermedad se contagia por contacto directo, descargas nasales y oculares y por medio de vectores (Baptista, 1979). Entre los vectores más importantes encontramos a moscas de distintas especies como la mosca de la cara (*Musca autumnalis*), mosca doméstica (*Musca domestica*) y mosca del granero (*Stomoxys calcitrans*) (Kopecky *et al.*, 1986). Las moscas no sólo actúan como irritantes, al alimentarse de las secreciones de los ojos, sino que también sirven como medio de transmisión de *M. bovis* desde animales infectados a no infectados. Las moscas de la cara pueden mantenerse infectadas con *M. bovis* hasta tres días después de haberse alimentado de material contaminado (Punch *and* Slatter, 1984). Bajo condiciones experimentales la transmisión de la enfermedad es común en presencia de moscas y no lo es en su ausencia (Kopecky *et al.*, 1986). También se ha observado el contagio desde portadores asintomáticos; este estado es uno de los factores más importantes en la ocurrencia cíclica de QIB (Pugh *and* McDonald, 1986). Epidemiológicamente los animales portadores tienen una gran significación debido a que pueden actuar como fuente de infección para el ganado joven susceptible (Pugh *et al.*, 1979).

Existen varios elementos predisponentes de la enfermedad, como fallas en los mecanismos propios de protección del ojo, determinadas condiciones medioambientales, estado y raza del bovino, etc. Las fallas en los mecanismos de protección del ojo (que en condiciones normales se oponen al asentamiento microbiano) pueden facilitar la adhesión y colonización del ojo. Problemas de este tipo pueden presentarse en relación con el líquido lagrimal, la temperatura de la superficie conjuntival y/o la composición química de las lágrimas:

- *El líquido lagrimal*, en condiciones fisiológicas normales, limpia el ojo arrastrando todo cuerpo extraño que se ponga en contacto con la conjuntiva hacia las fosas nasales o hacia el ángulo interno del ojo para su eliminación; así se impide la colonización

microbiana, que es el primer paso de la infección. Si este mecanismo falla, *M. bovis* ve facilitada su adhesión y colonización.

- *La temperatura de la superficie conjuntival*, que es más baja (33° C-34° C) que la del resto del cuerpo del bovino como consecuencia de la evaporación de las lágrimas y del lavado lagrimal, dificulta el desarrollo de los microorganismos. Si se producen fallas en la secreción de las lágrimas y/o en el pestañeo esta temperatura sube, llegando a los 37° C que es una temperatura más favorable para el crecimiento de *M. bovis* por lo que luego de adherirse las bacterias pueden colonizar más fácilmente el ojo en esta condición.

- *La composición química de las lágrimas* hace que al no contener nutrientes, tener altas concentraciones de sales (cloruro de sodio, carbonato de sodio, sulfato de magnesio, etc.) y de lisozima de Fleming, ejerzan una fuerte acción bactericida. Si la composición química de las mismas se modifica se genera un ambiente más propicio para el desarrollo microbiano.

Dentro de los factores medioambientales los más importantes se asocian con las características de las estaciones y con la radiación ultravioleta. Los vientos, los pastos y la sequía también afectan la incidencia de la enfermedad. Se ha observado que del 100% de las infecciones producidas por *M. bovis* anualmente, 4,3% ocurre en invierno, 21,4% en primavera, 29,3% en verano y el 45% en otoño. En todas las estaciones los picos de incidencia de QIB son precedidos por valores altos de radiación ultravioleta (Hughes *and* Pugh, 1970; Kopecky *et al.*, 1980; Blakeship *and* Smith, 1984).

En lo referente al estado de los animales se ha observado que los más débiles o los que soportan condiciones de estrés son los más proclives a contraer la enfermedad. Se ha reportado que los animales que sufren deficiencia de vitamina A, los que se encuentran en condiciones de hacinamiento (en especial durante su traslado en camiones), los que tienen enfermedades infecciosas virales o bacterianas, asociadas o no al Complejo Ocular Bovino (Micoplasmas, Chlamydias y el virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina (RIB)) (Chandler *et al.*, 1981; Selfero *et al.*, 2003) son los que más frecuentemente adquieren la enfermedad. En más del 50% de las infecciones por *M. bovis* se observaron casos de coinfecciones con distintos microorganismos: *Actinomyces pyogenes* 21%, *Staphylococcus aureus* 15%, *Pasteurella haemolytica* 8%, *Escherichia coli* 7% y *Proteus* sp. 3,6% (Takele *and* Zerihun, 2000).

Además, de la predisposición por el estado fisiológico, también se observa que ésta enfermedad tiene prevalencia más alta en los animales más jóvenes, aunque la tasa de recuperación de *M. bovis* de las secreciones lagrimales es similar en animales jóvenes y adultos. Esto podría explicarse porque después de una infección inicial se desarrolla una respuesta inmune generalizada, más que localizada (Kopecky *et al.*, 1983) por lo que el animal adquiere protección y no vuelve, en general, a padecer la enfermedad en los años siguientes.

Existen variaciones en la prevalencia de la enfermedad tanto dentro de la misma raza de bovinos en distintos países, como en las distintas razas afectadas en cada región. En Sudamérica los Aberdeen Angus y Charolais tienen más alta prevalencia de QIB que las mismas razas en Norteamérica y Australia (Weber *and* Selby, 1981; Slatter *et al.*, 1982). En Estados Unidos los bovinos de la raza Hereford parecen estar más predispuestos a contraer la enfermedad, que los de raza Brama y Cebú, en tanto que otras cruas son menos afectadas (Slatter *et al.*, 1982). En Australia se observa mayor incidencia en la raza Channel Island (Slatter *et al.*, 1982). Por otra parte, Pugh y colaboradores (1986) estudiaron la variación en la incidencia de la enfermedad en la raza Hereford entre los animales con párpados pigmentados y no pigmentados y observaron que la incidencia de la enfermedad fue menor en los animales con párpados pigmentados (Pugh *et al.*, 1982). Distintos grupos estudiaron la relación entre la pigmentación de la región palpebral y la incidencia de la enfermedad y encontraron mayores tasas de ataque en el ganado vacuno sin pigmentación alrededor del ojo. La raza Angus que es pigmentada muestra menor tasa de ataque que las razas que son menos pigmentadas como Hereford, Holando, Shorthorn y Charolais. Se cree que la falta de pigmentación permite que la radiación ultravioleta sensibilice el ojo haciéndolo más propicio a la inflamación y la colonización (Frisch, 1975; Slatter *et al.*, 1982). Davidson y Stokka (2003) encontraron, mientras estudiaban distintas vías de inoculación para una bacterina de *M. bovis*, que existen diferencias estadísticamente significativas en la tasa de ataque entre sexos siendo las hembras más proclives a contraer la enfermedad que los machos.

I. 1. 2. Tratamiento

La severidad de la enfermedad, sus complicaciones y el impacto económico que ella representa se traducen en el creciente interés por hallar una estrategia efectiva para su control y posterior erradicación. En la actualidad se acepta que el empleo de agentes antimicrobianos es el tratamiento de elección contra QIB (George *and* Smith, 1985; George, 1990; Allen *et al.*, 1995). Sin embargo, hasta el momento no hay consenso en lo referente a cual es la mejor vía de aplicación del tratamiento (subconjuntival, tópica o parenteral). Los tratamientos antimicrobianos pueden lograr la cura de la sintomatología de la enfermedad pero no eliminan el estado de portador, que como mencionamos es de fundamental importancia en el ciclo de transmisión de la enfermedad. Eliminar *M. bovis* de un rodeo es muy complicado porque el tratamiento de la enfermedad, es desde el punto de vista práctico, sumamente difícil de concretar en forma efectiva. Mantener una concentración adecuada de droga terapéutica en el film lagrimal es difícil, no solo por la oposición que ofrecen los mecanismos de protección del ojo sino también porque resulta costoso y muy complicado contar con los antibióticos en las cantidades requeridas en el momento necesario, así como disponer de suficiente personal para la aplicación de tópicos o inyecciones, diariamente, a todos los animales de un rodeo.

Antes de seleccionar el o los antibióticos a utilizar, se deben hacer aislamientos y cultivos de la bacteria involucrada y pruebas de sensibilidad debido a diferencias regionales en los patrones de susceptibilidad antimicrobiana de *M. bovis*. Sin embargo, se acepta que esta bacteria es susceptible a gentamicina, cefalosporinas de primera generación, trimetoprima-sulfonamidas, nitrofuranos, tetraciclina y sulfonamidas; asimismo se reconoce que tiene resistencia contra tilosina, lincomicina, estreptomina, eritromicina y cloxacilina (Odeon *et al.*, 1996).

A continuación se mencionan, a modo de ejemplo, algunas de las formas comerciales en las que se encuentran estos antibióticos en el mercado nacional.

Genta P spray es un antibiótico en forma de tópico que contiene gentamicina 500 mg, polimixina B sulfato 160.000 UI., violeta de genciana 50 mg, próximetacaína 500 mg, difenhidramina 5 mg, cloruro de benzalconio 200 mg.

Colirio Paul son gotas oftálmicas, antibióticas y antiinflamatorias indicadas para afecciones oftálmicas en general: conjuntivitis, queratitis, queratoconjuntivitis, blefaritis,

iritis, iridociclitis. Este producto contiene fosfato disódico de betametasona 0,10 g; sulfato de neomicina 0,50 g; gramicidina 2 mg; metil hidroxibenzoato de sodio 0,05 g cada 100 g.

Diclovet es un antiinflamatorio indicado en casos de conjuntivitis de cualquier origen, queratoconjuntivitis, úlcera de córnea, inflamaciones traumáticas oculares, dolor ocular y uveítis no infecciosa. El mismo contiene diclofenac sódico 0,1%.

Paulfenicol oftálmico es un antibiótico que ayuda a combatir la conjuntivitis, blefaritis e inflamación del conducto lagrimal, contiene cloranfenicol 1 g.

Tobravet es un sistema antibiótico cicatrizante de liberación controlada, indicado en todo tipo de infección ocular (conjuntivitis, queratoconjuntivitis y blefaritis) y úlceras de córnea. *Tobravet* acorta el curso clínico de la úlcera comeal. Contiene Tobramicina 0,3%, el *Tobravet-D* además contiene dexametasona 0,1% que ayuda a combatir la queratitis no ulcerativa.

I. 1. 3. Profilaxis

La vacunación es el método de prevención por excelencia; sin embargo, también son necesarias medidas sanitarias complementarias para un adecuado control de la enfermedad (McConnel *and* House, 2005). Se deben hacer fumigaciones frecuentes para lograr un apropiado control de moscas; se debe evitar en lo posible el movimiento de pasturas secas o en flor que generen sprays, pólenes e irritación por acción mecánica; los establos donde los animales se alimentan deben estar limpios y se debe evitar que las pasturas se humedezcan o pudran. También es importante que haya suficientes lugares con sombra para que el ganado pueda descansar; que se hagan inmunizaciones apropiadas contra enfermedades virales como la RIB y el virus de la diarrea bovina y se aíslen los animales infectados para evitar la contaminación de los lugares de alimentación y del medioambiente en general (Miller *and* Fales, 1984; Kirkpatrick *and* Lalman, 2001).

Los requisitos para las vacunas de aplicación en veterinaria son diferentes a los requisitos para las vacunas humanas. Las vacunas para animales admiten un rango más amplio de efectos adversos pero, en oposición a lo que ocurre en las vacunas para humanos, tienen más exigencias en lo referente a los costos y a la facilidad de aplicación (Scheerlinck *and* Greenwood, 2006).

Un esquema general de los distintos tipos de vacunas actualmente en uso, preparadas con células enteras o fracciones purificadas y el tipo de inmunidad que producen puede verse en la Figura I. 2.

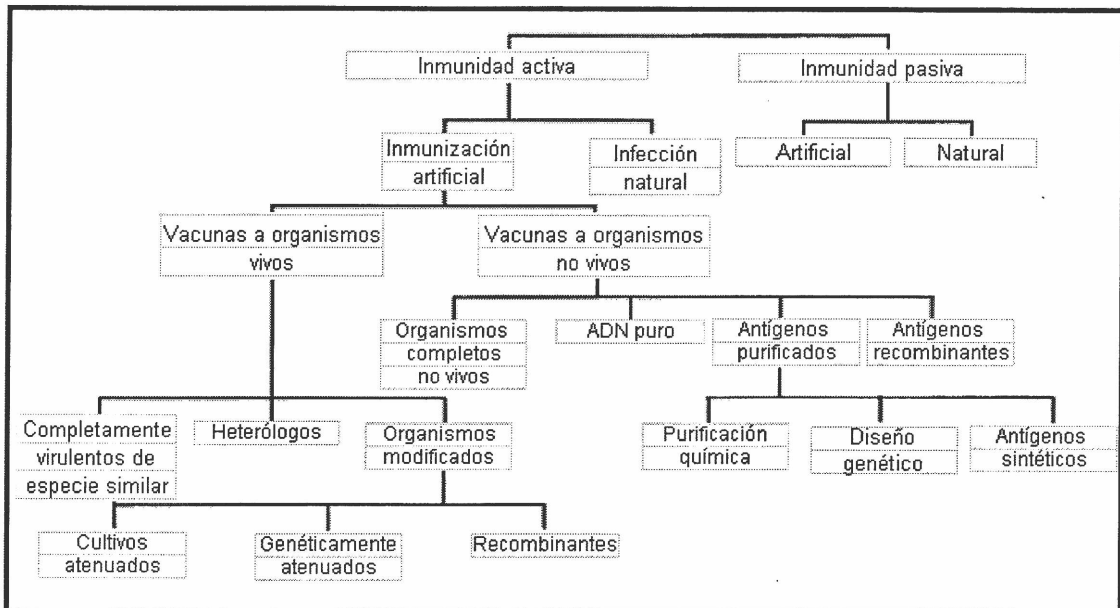


Figura I. 2. Clasificación de los distintos tipos vacunas e inmunidad que producen. La figura es adaptación de la mostrada por Tizard (2000).

Si bien desde 1960 se han desarrollado a nivel mundial numerosas vacunas contra QIB, la mayoría no han tenido éxito o el mismo ha sido escaso en el control de la enfermedad. La bibliografía internacional reporta asimismo niveles muy variables de protección para distintas vacunas (Lepper *et al.*, 1995). Por ejemplo, al estudiar la respuesta de los animales vacunados con lisados oculares (preparados a partir de ojos de animales enfermos recientemente sacrificados) frente a la infección experimental con microorganismos virulentos se encontraron niveles de protección de entre el 96% y el 98%. En el caso de las vacunas preparadas con formulaciones de *M. bovis* vivas piliadas se encontraron tasas de protección del 45% al 90%, en tanto que para vacunas preparadas con microorganismos vivos sin control de piliación se han reportado niveles de protección que variaron entre el 50% y el 75%. También se ensayaron vacunas preparadas con *M. bovis* sin control de piliación, inactivadas por distintos métodos y se encontró que las inactivadas con formalina conferían una protección de entre el 55% y el 85%, las inactivadas por calor mostraron una protección del 23%; y las inactivadas por calor con el agregado de

adyuvante de Freund incompleto mostraron una protección del 25% (Smith *and* Blakenship, 1990; Lepper *et al.*, 1995).

También se estudió la eficacia de vacunas integradas por componentes celulares como ribosomas, aislados de suspensiones celulares o distintos componentes antigénicos obtenidos por clonado molecular. Las vacunas ribosomales se prepararon por homogenización de volúmenes iguales de suspensión ribosomal y adyuvante de Freund incompleto. Con estas formulaciones se hicieron dos inoculaciones subcutáneas con 21 días de intervalo en animales; se observó que la efectividad de las vacunas fue nula (Selfero *et al.*, 2003).

En lo que respecta a vacunas obtenidas mediante técnicas de biología molecular: genes estructurales de la pilina de *M. bovis* se insertaron en plásmidos que fueron a su vez introducidos en *E. coli* o *Pseudomonas aeruginosa*. En *E. coli*, los productos de estos genes (pre-pilina) no pudieron ser expresados como pili. Sin embargo, en *P. aeruginosa* los productos del gen de la pilina fueron expresados como pili, indistinguibles del pili de *M. bovis* localizado a nivel de superficie (Elleman *et al.*, 1990). Es importante remarcar, que a nuestros conocimientos, en la bibliografía no se reportan datos sobre la producción de estos organismos a nivel industrial. Si bien esta estrategia resulta atractiva como forma alternativa a la obtención de vacunas que contengan células piliadas, es evidente que una formulación que contenga al microorganismo entero responsable de la enfermedad y que asegure un grado importante de piliación, permitirá disponer de un mayor número de inmunógenos específicos, como proteínas de cubierta, LPS (Johansen *et al.*, 1990), PME (Ostle *and* Rosenbusch, 1986), etc., lo que podría incrementar la efectividad de la formulación. También sería importante purificar la hemolisina y otras citotoxinas de los sobrenadantes de cultivos e incorporarlas a los preparados vacunales (Smith *et al.*, 2003). En la Tabla I. 1. se muestra un resumen realizado por Pérez y colaboradores en 1997 de distintos tipos de vacunas para QIB y sus características. Como se puede observar, la clasificación incluye: en el apartado **A** los resultados de aplicar dos tipos comerciales de vacunas preparadas con *M. bovis* vivas; en el apartado **B** los resultados de aplicar vacunas preparadas con *M. bovis* inactivadas por calor; en el apartado **C** los resultados de dos tipos de vacunas preparadas con *M. bovis* inactivadas por formalina; en el apartado **D** los efectos de aplicar vacunas preparadas con *M. bovis* inactivadas por calor y acompañada de adyuvante de Freund incompleto; en el apartado **E** los correspondientes a vacunas

preparadas con *M. bovis* piliadas en distintas condiciones: 1. en solución oleosa, 2. en solución acuosa, 3. acompañada de Al(OH)₃; 4. acompañada de enzimas degradadoras de la córnea inactivadas; en el apartado F los resultados de aplicar vacunas preparadas con ribosomas aislados de *M. bovis* y finalmente, en el apartado G se muestran los resultados del uso de vacunas preparadas con pili de *M. bovis* obtenidos por inserción del gen de la pilina en *P. aeruginosa* K/2.

Tabla I. 1. Tipos de vacunas empleadas contra QIB y sus características. Referencias HO: homólogo; HE: heterólogo, NA: natural. Los resultados obtenidos empleando el método estadístico de χ^2 se expresan como AB++: diferencias significativas con $p \leq 0,01$, AB+++ diferencias significativas con $p \leq 0,001$, AA no se observan diferencias significativas. La tabla es adaptación de la reportada por Pérez *et al.*, 1997.

TIPOS DE VACUNA	Tipo de desafío	Protección (%)	Vacunados enfermos/ vacunados	Controles enfermos (%)	Dosis	Intervalo de vacunación a desafío (días)	Resultados
A. Vacunas viva							
A. 1. Tipo comercial I	HO	75,5	0,24	90	3	9	AB+++
A. 2. Tipo comercial II	HO	50	0,75	100	3	14	AB++
B. <i>M. bovis</i> entera inactivada por calor							
	HO	25	0,75	100	3	14	AB++
C. <i>M. bovis</i> entera inactivada por formalina							
C.1.	HO	56	0,44	100	3	14	AB++
C. 2.	HO	87,5	0,13	100	3	14	AB++
D. <i>M. bovis</i> entera inactivada por calor + Freund incompleto							
	HO	23,5	0,76	100	2	28	AA
E. <i>M. bovis</i> Piliadas							
E. 1. oleosa	HO	45,4	0,55	100	2	14	AA
E. 2. acuosa	HO	18	0,82		2	14	AA
E. 3. + Al(OH) ₃	HO	85	0,15	58	2	14 a 17	AB++
	HO	81	0,19	62	2	14 a 17	AB++
E. 4. + enzimas degradadoras	HO						
	HE	92,3	0,08	47	2	7 a 29	AB++
	NA						
F. Ribosomal							
	HO	0	1	100	2	14	
	HE		1	100	2	14	
G. ADN recombinante							
	HO	80	0,2	90	2	9	AB++

Otro factor a tener en cuenta es la alta variabilidad en el porcentaje de protección reportada para vacunas empleadas en distintos países, que ha sido relacionado con las características epidemiológicas propias de cada una de dichas regiones (Lehr *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1998). Lepper y su grupo de trabajo sugirieron que la inmunidad contra esta enfermedad es específica para el serogrupo de pili de la bacteria que la causó (Lepper *et al.*, 1992), y que un tipo de vacuna no otorga protección frente a desafíos con serotipos

piliarios heterólogos (Lepper *et al.*, 1993). Esto llevó a detener el desarrollo de vacunas basadas en pili purificados hasta poder contar con una formulación multivalente (Lepper *et al.*, 1993). Esto genera por un lado, la necesidad de llevar a cabo estudios epidemiológicos sobre los serotipos piliarios de la región donde se aplicará la vacuna y, por otro, al requerimiento de producir distintos organismos que expresen diferentes serotipos. La falla de estas vacunas cuando no se hacen estudios serológicos previos lleva a la necesidad de identificar inmunógenos conservados en distintos tipos de *M. bovis*. La identificación de la enzima secretoria con actividad de fosfolipasa B (PLB) como uno de tales antígenos podría contribuir al desarrollo de una vacuna eficaz contra QIB (Fam *et al.*, 2001); lo mismo ocurre con otros determinantes de virulencia como proteasas, fibrinolisininas o proteínas de la membrana externa (McConnel *and* House, 2005).

La importancia de la QIB en la región se advierte en el hecho de que la misma fue considerada una de las ocho enfermedades a estudiar por el proyecto cooperativo regional Procisur (Programa de Desarrollo Científico del Mercosur) (Conceição, *et al.*, 2003). Aunque las vacunas conteniendo adhesinas fueron introducidas en el Mercosur en el año 1983 (Gil-Turnes, 1983), las epidemias en el ganado rutinariamente vacunado fueron frecuentemente reportadas desde 1990 (Conceição, *et al.*, 2003).

En Argentina aunque las pérdidas ocasionadas por QIB no han sido cuantificadas aun, el permanente incremento en el número de dosis vacunales empleadas a campo, es indicativo de una gran preocupación por su control, sobre todo si se tiene en cuenta que la vacunación no es obligatoria. Actualmente las vacunas elaboradas por los laboratorios nacionales e internacionales son en su mayoría a base de bacterias piliadas, con una o más cepas, algunas de ellas combinadas con el virus de la rinotraqueitis bovina o con toxoides específicos.

Trabajos efectuados al iniciarse esta tesis en nuestro laboratorio, demostraron que vacunas empleadas en Argentina carecen de células piliadas y/o de pili lo cual explicaría sus bajos niveles de protección. El problema de estas vacunas es que la producción del microorganismo se lleva a cabo en sistemas de cultivo líquido agitados mecánicamente que podrían producir pérdidas de piliación por estrés hidromecánico.

I. 2. AGENTE ETIOLÓGICO: *MORAXELLA BOVIS*

I. 2. 1. a. El microorganismo

M. bovis es un microorganismo Gram-negativo que se presenta en forma de cocobacilo, predominantemente en pares o cadenas cortas, no forma esporas ni presenta flagelos aunque puede presentar pili. Es aeróbico estricto, con temperatura óptima de crecimiento entre los 35° C y 37° C; el pH óptimo para su crecimiento está entre 7 y 7,5. No usa hidratos de carbono como fuente de carbono y energía, generalmente es catalasa, oxidasa y gelatinasa positivo; nitrato e indol positivo (Reyn, 1974; Alves Franco *and* Gil-Turnes, 1994). Este organismo crece en agar tripticasa de soja (TSAs) suplementado con 7% de sangre de caballo desfibrinada, produciendo β hemólisis. En este tipo de medio de cultivo se pueden observar tres tipos de colonias: piliadas, no piliadas e intermedias² (Bøvre *and* Froholm, 1972). Las colonias piliadas son rugosas, pequeñas (1 a 2 mm de diámetro), secas, con bordes definidos y doble halo. Se fragmentan cuando son tomadas con un ansa, son capaces de corroer el agar, lo cual se observa al remover las colonias (Ruehl *et al.*, 1988). Las colonias no piliadas son lisas, más grandes que las piliadas (2-4 mm de diámetro), mucosas, sin doble halo, no corroen el agar, su textura es granular (Wilcox, 1968; Sandhu, *et al.*, 1974). Mediante una prueba diferencial como la tinción con cristal violeta es posible distinguir ambos tipos de colonias: las colonias piliadas toman el colorante, observándose violetas, mientras que las no piliadas no se tiñen y permanecen blancas; las colonias intermedias se tiñen en el borde mientras que el centro permanece blanco, como lo describieron Bøvre y Froholm (Bøvre *and* Froholm, 1972). Las colonias así teñidas pueden ser subcultivadas durante los 4 minutos siguientes a la coloración, después de lo cual pierden su viabilidad.

La habilidad de *M. bovis* para producir QIB está asociada a la producción de factores de virulencia: pili, hemolisina, lipopolisacáridos (LPS), proteínas de membrana externa (PME) y citotoxinas. La bibliografía internacional reporta que los más importantes para la virulencia son los pili y la hemolisina (Pugh *and* Hughes, 1968; Ostle *and* Rosenbusch, 1984). Estos factores actúan en conjunto o por separado en cada una de las etapas de la enfermedad. Los pili median la adherencia de *M. bovis* a la superficie del ojo lo cual evita la remoción por barrido debida a la secreción lagrimal y al pestañeo. A continuación entra en juego la hemolisina (presente en la mayoría de las cepas de *M. bovis*)

² Las colonias intermedias se estudian en detalle en el Capítulo II

que posee actividad hemolítica y citotóxica (Hoiem-Dalen *et al.*, 1990) contra neutrófilos bovinos y células epiteliales de la córnea (Pugh *and* Hughes, 1968). Esta actividad citotóxica es muy importante en la injuria corneal asociada con QIB (Gray *et al.*, 1995). Después de adherirse a las capas externas de la córnea, *M. bovis* invade el estroma, modificando la disposición regular de las fibrillas del colágeno, necrotizando las células y produciendo una úlcera. Por lo tanto, en una primera etapa actúan adhesinas (factores primarios) y en una segunda etapa se liberan las toxinas (factores secundarios), que afectan varios sustratos presentes en las células de córnea y conjuntiva, sus tejidos blanco.

A medida que avanza la infección entra en juego otro factor de patogenicidad conocido como *pitting factor* que es una enzima hidrolítica productora de depresiones en forma de pozo en células epiteliales corneales. El daño causado por estas enzimas sería indirecto porque al dañar las células corneales se libera su enzima colagenasa que es importante en la progresión de la enfermedad porque su acción degradadora del colágeno (a péptidos más simples) produce severas úlceras de córnea. Ayudan en esta acción enzimas aminopeptidasas propias de *M. bovis* que hidrolizan los péptidos liberados por la colagenasa. Tales hidrólisis podrían llevar a la disolución de proteínas de matriz de tejido ocular resultando en severas úlceras corneales (Beard *and* Moore, 1994). Además actúa la leucocidina causando daño directo a neutrófilos que resultan en una gran liberación de enzimas lisosómicas (colagenasas y otras enzimas proteolíticas) que dañan aún más la córnea. Gran cantidad de neutrófilos infiltran la córnea del bovino con QIB en varios estados de degeneración y de degranulación (Chandler *et al.*, 1981; Rogers *et al.*, 1987). Debido a que *M. bovis* no produce colagenasa (Frank *and* Gerber, 1981), los abundantes neutrófilos observados serían una buena fuente de esta importante enzima. Los neutrófilos así dañados son ineficaces en la depuración de *M. bovis*, lo que lleva a un aumento del número de bacterias viables en el ojo.

I. 2. 1. b. Movilidad bacteriana y patogénesis

Las bacterias pueden desplazarse usando diferentes apéndices (flagelos o pili tipo IV), en diferentes formas (*gliding*, *twitching motility*, etc.) o en respuesta a diferentes estímulos (quimiotaxis, fototaxis, etc.). Las bacterias móviles pueden aislarse de hábitats tan diversos como fosas oceánicas, superficie de agua, suelo, contenido ruminal, criptas gástricas y placa dental. El movimiento gobernado por señales químicas y/o físicas provee a los

microorganismos la habilidad de migrar hacia un medioambiente más favorable escapando de los desfavorables (Otteman *and* Miller, 1997).

La movilidad mediada por flagelo es llevada a cabo por un complejo sistema que involucra tanto aspectos fenotípicos, como genotípicos y el consumo de gran cantidad de energía por parte de las células. Por ejemplo, *E. coli* tiene aproximadamente 49 genes asociados a la movilidad y consume el 2% de su energía para sintetizar los flagelos y hacerlos girar de una manera controlada (Macnab, 1996).

Las Myxobacterias se mueven por *gliding*. Este tipo de movimiento ocurre en una interfase (sólido-líquido, sólido-aire, sólido-sólido) y es caracterizado por suaves movimientos en el plano dirigidos a lo largo del eje de la célula y por la posibilidad de cambiar de dirección cada vez que sea necesario. El *gliding* es un tipo de movimiento que se describió además en citofagos, cianobacterias y micoplasmas y no todos ellos poseen pili tipo IV (Wall *and* Kaiser 1999); sin embargo, para otros autores es un hecho establecido que en gran número de bacterias Gram-negativas poseedoras de pili tipo IV la movilidad por *gliding* es absolutamente dependiente de este tipo de estructuras (Heinrichsen, 1975; Heinrichsen, 1983; Wu *et al.*, 1997; Merz *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Skerker *and* Berg, 2001; Shi *and* Sung 2002).

La primera propuesta de una función de movilidad para el pili tipo IV fue hecha por Heinrichsen (Heinrichsen, 1975; Heinrichsen, 1983) quien sugirió que la movilidad se originaba por interacciones hidrofóbicas entre las células bacterianas y los pili en medioambientes acuosos que resultaban en movimientos al azar de la bacteria (Elleman *et al.*, 1990; Wall *and* Kaiser, 1999).

El término *twitching* fue introducido para describir el movimiento de translocación de superficie que no depende del flagelo. Los movimientos de tipo *twitching* de células individuales parecen tirones intermedios y pequeños que frecuentemente producen cambios de dirección (Heinrichsen, 1972). Al igual que el movimiento por *gliding* el movimiento por *twitching* requiere la presencia de ambientes húmedos y de un número mínimo de células (aproximadamente 100) para producirse. A diferencia del *gliding* este movimiento, no es necesariamente dirigido a lo largo del eje mayor de la bacteria sino que incluye un amplio rango de movimientos desde desplazamientos largos a movimientos Brownianos (Wall *and* Kaiser, 1999).

Semmler y colaboradores (1999) estudiaron la movilidad por *twitching* de *P. aeruginosa* en la expansión de la colonia. Para esto tiñeron las colonias con azul de Coomassie y con cloruro de tetrafeniltetrasolio (TTC) lo que les permitió observar una serie de anillos concéntricos en la zona de expansión y crecimiento activo de la colonia. Además, pudieron identificar zonas más oscuras que corresponden a microcolonias y regiones claras que corresponden a monocapas de células. Estas microcolonias son similares a las observadas en el desarrollo de biofilms en plásticos, donde el desarrollo depende de la presencia del pili tipo IV funcional (O'Toole *and* Kolter, 1998). En las microcolonias las células expresan pili tipo IV que permiten la movilidad celular por *twitching* para la expansión de la colonia en tanto que las monocapas de células son zonas de crecimiento y división, es decir de consolidación de la colonia (Semmler *et al.*, 1999). Estos reportes muestran que los pili tipo IV son expresados únicamente en las partes externas de la colonia donde la movilidad por *twitching* tiene lugar activamente lo cual es una evidencia no solo de que hay diferenciación dentro de la colonia sino también de que la producción de pili tipo IV y probablemente también la velocidad y dirección del movimiento celular son regulados por las condiciones del medioambiente local (Semmler *et al.*, 1999).

Este tipo de movilidad se observa no sólo en *P. aeruginosa* y *M. bovis* sino también en *Myxococcus xanthus*, *Eikenella corrodens*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *E. coli* EPEC, *E. coli* enterotoxigénica y *Synechocystis* PCC6803 (Bieder *et al.*, 1998). En el caso de *Kingella denitrificans* y *Acinetobacter calcoaceticus* la movilidad por *twitching* se encuentra en estudio (Wall *and* Kaiser, 1999).

I. 2. 1. c. Movilidad dependiente de pili tipo IV

En 1970, Bradley propuso que el pili tipo IV puede generar movimientos de retracción. Estudios recientes muestran tres modelos de bacterias, *M. xanthus*, *N. gonorrhoeae* y *P. aeruginosa* que proporcionan evidencias directas acerca de que el pili tipo IV es necesario en la generación del movimiento por *gliding* o por *twitching* (Merz *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Skerker *and* Berg, 2001; Shi *and* Sung, 2002).

Sun y colaboradores (2000) desarrollaron un ensayo de adhesión de células de *M. xanthus* en medios de alta viscosidad (metilcelulosa al 1%). Usando este ensayo observaron que algunas de las células de *M. xanthus* pueden unirse perpendicularmente a

las superficies del vidrio o poliestireno en una forma dependiente de pili tipo IV. Estas células unidas se desplazan por movimiento de *gliding*. Análisis posteriores del comportamiento de estas células adheridas lideraron la teoría de que *M. xanthus* expande sus pili, los adhiere a una superficie sólida y luego estos se retraen, atrayendo su cuerpo celular a la superficie (Sun *et al.*, 2000; Skerker and Berg, 2001; Shi and Sung, 2002). Trabajos de Merz y colaboradores (2000) muestran estos mismos resultados en *N. gonorrhoeae*, en tanto que Skerker y Berg (2001) también lo hicieron con pili tipo IV marcado con tinción fluorescente en *P. aeruginosa*. A través de estos estudios se muestra claramente que estos pili son aparatos de movilidad que se extienden, adhieren sus extremos distales a la superficie y se retraen hacia ella, como se muestra en la Figura 1. 3.

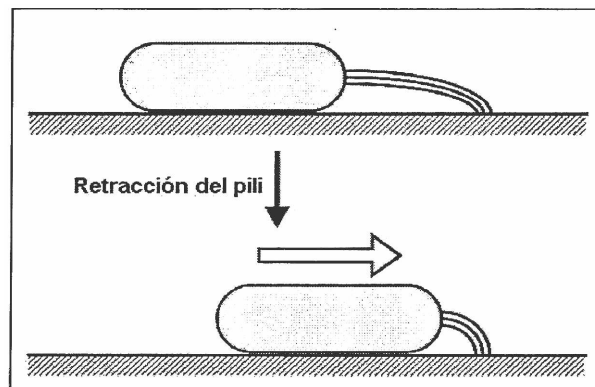


Figura I. 3. Movilidad por *twitching* en bacterias con pili tipo IV. La figura es adaptación de la mostrada Shi y Sung (2002).

Estos descubrimientos expandieron el conocimiento acerca de esta forma de movilidad bacteriana. Mientras que la movilidad por flagelo funciona perfectamente en medioambientes acuáticos, la movilidad dependiente de pili tipo IV funciona bien en superficies sólidas.

La movilidad dependiente de pili tipo IV no es un movimiento al azar; esta documentado que cianobacterias como *Synechocystis* sp PCC6803 dirigen su movimiento hacia la luz (Bhaya *et al.*, 2001) y que *P. aeruginosa* requiere este tipo de movimiento para la formación de biofilm (O'Toole and Kolter, 1998). Estos autores demostraron que los pili tipo IV son esenciales en la formación del biofilm bacteriano y que sin su presencia *P. aeruginosa* es capaz de unirse a superficies sólidas pero incapaz de construir las estructuras multicelulares del biofilm. Ahora se considera al pilus tipo IV como un aparato de

movilidad que puede empujar a las células hacia o en contra de un punto y que la acción puede ser guiada por un sistema quimiotáctico.

La quimiotaxis guiada por movimiento de pili tipo IV en *M. xanthus* podría desarrollarse de la siguiente forma: *a.* el sistema de genes *frz* (conjunto de genes encargados del reconocimiento de señales químicas) reconoce distintas señales químicas en el medioambiente y envía señales hacia los sitios de extrusión del pili; *b.* el pili que sufre extrusión coordina los movimientos de la célula en dirección del gradiente químico; *c.* el cambio de los sitios de extrusión del pili de un polo al otro de la célula produce movimiento reverso en *M. xanthus*; *d.* el cambio en la frecuencia entre los dos polos de la célula es controlado por el sistema del quimiosensor *frz* (Shi and Sun, 2002).

I. 2. 1. d. Clasificaciones propuestas para pili tipo IV

La bibliografía internacional no muestra consenso al momento de afirmar si los pili de *M. bovis* son polares (Wall and Kaiser, 1999) o peritricos (Ruehl *et al.*, 1988). Históricamente, diferentes familias de pili tipo IV han sido divididas en subclases en base a: secuencia de aminoácidos, especificidad para el reconocimiento de receptores en las células huésped y la seroactividad de los anticuerpos contra proteínas del pili.

Los pili tipo IV se clasifican en dos subclases, IV-A y IV-B, en base a similitudes de las secuencias de aminoácidos deducidas de prepilinas. Las prepilinas tipo IV-A tienen una secuencia líder muy corta (5-6 aminoácidos), y el aminoácido N-terminal de la pilina madura es una fenilalanina metilada. Las prepilinas tipo IV-B tienden a tener secuencias señal largas (13-30 aminoácidos), y el aminoácido N-terminal de la proteína madura podría ser una metionina (en algunos casos metiladas), leucina, triptófano o serina. La maquinaria de ensamblaje envuelta en la formación de los pili consiste en un conjunto de proteínas codificadas por genes que se pueden encontrar dispersos por todo el genoma bacteriano (subclase IV-A) u organizados dentro de operones consistiendo en este caso de 11-14 genes (subclase IV-B). Muchas de las proteínas envueltas en la biogénesis de pili tipo IV son homólogas a proteínas envueltas en el camino de secreción tipo II y sistemas de transformación natural (incorporación de ADN) en varias bacterias (Pugsley, 1993).

La determinación de la estructura primaria de las subunidades de pilina por secuenciación de proteínas y genes confirma la predicción de Ottow que el pilus tipo IV representa un grupo discreto y estrechamente relacionado. Este grupo ha sido llamado

como pilus NmePhe porque el aminoácido modificado N-metilfenilalanina se encuentra comúnmente en el extremo amino terminal de la subunidad nativa (Ottow, 1975). Los 32 residuos de las regiones amino-terminales de todos las pilinas tipo 4 NmePhe exhiben al menos 90% de homología y son muy hidrofóbicos. Sin embargo, los dos tercios carboxilo terminal de estas subunidades son relativamente hidrofílicos y tienen varios dominios variables e hipervariables. Esta región es la que da origen a las variaciones estructurales y antigénicas entre especies (Pugsley, 1993).

Otra clasificación que se puede hacer de los pili es, en el caso de *M. bovis*, la que los divide en 7 grupos (A a G) que muestran una pequeña variación antigénica cuando se comparan los aislamientos de Europa, Estados Unidos y Australia (Brown *et al.*, 1998). Los sueros de animales vacunados con una bacterina que contiene alguno de los tipos de pili (A, B, C, D, E, F y/o G) son capaces de inhibir la adherencia de *M. bovis* homóloga a células del endotelio de la córnea. Algunos casos de emergencia de QIB epizootica han sido asociados con la emergencia de nuevos tipos de pili que reaccionan débilmente con anticuerpos contra las cepas clásicas. Una de las principales fallas asociadas a las vacunas comerciales preparadas con pili de *M. bovis* se debe a la escasa o nula reactividad cruzada entre las variantes de pili incluidas en las vacunas y los tipos prevalentes en la región donde se utilizan esas vacunas.

Más recientemente los pili, han sido agrupados de acuerdo a la secuencia de bases del gen de la pilina y a sus mecanismos de ensamble. Aunque ellos difieren en morfología y estructura, la mayoría de los pili son adhesinas que median las interacciones entre las bacterias y el medioambiente o con otras células (Shi *and* Sun, 2002). Los pili tipo IV poseen secuencias conservadas de aminoácidos en la pilina, que se ensamblan a través de un camino de paso general de tipo II y son expresados en la superficie de una gran variedad de bacterias Gram-negativas. Los mismos han sido caracterizados genética y bioquímicamente, principalmente gracias al estudio de estas estructuras en *P. aeruginosa* y en *N. gonorrhoeae*.

Estudios genéticos completos acerca de los pili tipo IV han sido realizados en *P. aeruginosa* a partir del año 1996. Estos se iniciaron aislando bacterias que no tuvieran capacidad de realizar movilidad por *twitching* es decir bacterias (Twt⁻) no productoras de pili tipo IV. En cajas de agar las bacterias productoras de pili tipo IV capaces de moverse por *twitching* (Twt⁺) producen colonias grandes, rugosas y planas con bordes en serrucho;

mientras que las mutantes (producidas por inserción del transposón Tn5-B21) no productoras de pili tipo IV (Twt^-) dan colonias pequeñas, lisas y abovedadas con bordes nítidamente definidos. Usando este fenotipo encontraron 147 Twt^- entre 13000 mutantes Tn5-B21. Esta biblioteca fue refinada hasta 60 mutantes usando el ensayo de movilidad por *twitching* debajo del agar³. Lory y sus colegas aislaron mutantes no piliados por resistencia a fagos específicos contra el pili y selección de mutantes Twt^- (Strom *et al.*, 1994). Juntos sus trabajos permitieron identificar 34 genes. Estos genes pueden ser divididos en cuatro grupos:

- i. 5 factores de transcripción (pilS, pilR, fimS, algR y rpoN);
- ii. 8 genes tipo che que se sintetizan en respuesta a estímulos quimiotácticos (pilG, pilH, pilI, pilJ, pilK, pilL, chpA y chpB);
- iii. 19 genes de biogénesis de pili tipo IV (pilA, pilB, pilC, pilD, pilE, pilF, pilM, pilN, pilO, pilP, pilQ, pilV, pilW, pilX, pilY1, pilY2, pilZ, fimT y fimU);
- iv. 2 genes del funcionamiento del pili (pilT, pilU) (Wall *and* Kaiser, 1999).

El estudio del gen pilT se realizó con células mutantes *pilT* que si bien se muestran piliadas son defectivas en su movilidad por *gliding* y *twitching*. Las mismas son capaces de unirse a superficies sólidas pero fallan en retraer su cuerpo sobre la superficie a la que están unidas; lo cual sugiere que la proteína PilT es requerido para generar la fuerza de retracción (Sun *et al.*, 2000; Skerker *and* Berg, 2001; Shi *and* Sung, 2002).

Muchos de los componentes sintetizados a partir de estos genes son homólogos a los del camino de paso general de tipo II, incluso la pilina, la prepilina peptidasa, las proteínas solubles con o sin sitios específicos de unión a nucleótidos, las proteínas de membrana interna y las secretinas de membrana externa (Shi *and* Sung, 2002). El ensamblaje de pili tipo IV se lleva a cabo de la siguiente manera: la prepilina peptidasa cliva la subunidad del péptido líder positivamente cargado de la prepilina; una proteína integral de membrana localizada en la membrana interna sirve de plataforma para el ensamble de los pili; una proteína de unión a nucleótidos localizada en el citoplasma o asociada con la cara citoplasmática de la membrana interna da energía a la secreción por medio de la hidrólisis del ATP (Tönjum *and* Koomey, 1997; Turner *et al.*, 1993) y un

³ *Twitching* debajo del agar: esta prueba consiste en inocular las bacterias en la parte inferior del agar para favorecer este tipo de movilidad (ver materiales y métodos Capítulo II).

componente de membrana externa forma el canal que permite la translocación del pili ensamblado a través de la membrana externa⁴ (Soto *and* Hultgren, 1999). La presencia de grupos de pilina en la membrana celular confirma la hipótesis de que el pili es ensamblado desde su base y, además, descarta la creencia de que el ensamble ocurre por el extremo del pili (Wall *and* Kaiser, 1999) (Figura I. 4.).

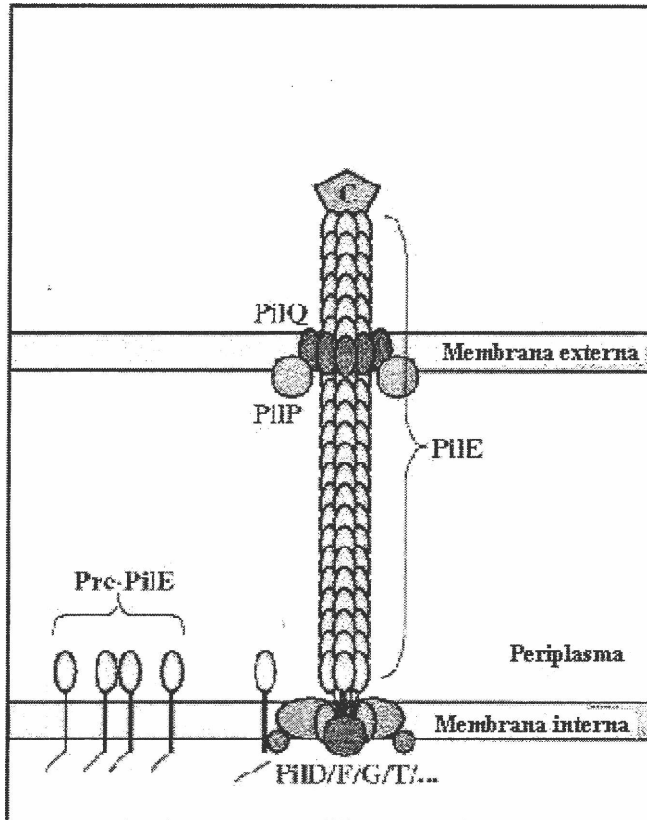


Figura I. 4. Ensamblaje de pili tipo IV de *N. gonorrhoeae* por el camino de paso general de tipo II. La prepilina es procesada por la peptidasa PilD, la cual cliva la secuencia líder positivamente cargada del extremo N-terminal de la subunidad de pilina. La subunidad PilE es entonces ensamblada por el complejo de ensamble de la membrana interna. La translocación del pili a través de la membrana externa es mediada por PilQ posiblemente con la asistencia de otros factores como PilP. Se piensa que la adhesina PilC es la última en incorporarse al extremo de la organela creciente, también parece ser necesaria para la

⁴ Este ensamble, como dijimos, es llevado a cabo por sistemas simples de transporte que no incluyen chaperonas; ello indicaría que la plataforma de ensamble está localizada en la membrana interna y que no hay necesidad de monómeros transportadores de pilina a través del espacio periplásmico. Es también muy importante que muchas proteínas, como la prepilina, posean secuencias líder de similares características y un aminoácido hidrofóbico terminal, lo que hace suponer que el pili puede jugar un papel importante como tubo de secreción para una variedad de proteasas, toxinas y otros factores extracelulares a través de la membrana externa (Pugsley, 1993; Soto *and* Hultgren, 1999).

translocación a través de la membrana externa. La figura es adaptación de la mostrada por Soto y Hultgren (1999).

Los pili tipo IV son homopolímeros formados por subunidades repetidas de pilina de 1000-4000 nm de largo, 60 Å de diámetro formados por una asociación ordenada de 1000-3000 subunidades idénticas de pilina más unas pocas copias de proteínas asociadas al pilus (Parge *et al.*, 1995).

Los pili de *N. gonorrhoeae* tienen 5 monómeros de pilina por vuelta de hélice de aproximadamente 4 nm de diámetro interno y 6 nm de diámetro externo. Los parámetros y el diámetro de la hélice coinciden con los de *P. aeruginosa* lo cual sugiere que la estructura propuesta para pili tipo IV es representativa de estos pili en distintos microorganismos. La secuencia N-terminal de aminoácidos está altamente conservada de una especie a otra, la parte interna de la cola se pliega en forma de α -hélice. Esta capa interna de la fibra tiene empaquetamientos hidrofóbicos de α -hélices paralelas. Este empaquetamiento hidrofóbico y la flexibilidad de las α -hélices podrían permitir al pilus doblarse y adoptar configuraciones desordenadas o abultadas. La capa media de la lámina β une un monómero de pilina con otro, en el sentido de que cualquier sección cruzada de la fibra puede ser cortada a través de los 25 residuos de la hebra β , y la lámina β unida a hidrógeno puede proveer mucha más resistencia mecánica para una fibra cuyo largo es de 4 μ m y su diámetro es de 6 nm (Wall *and* Kaiser, 1999) (Figura I. 5.).

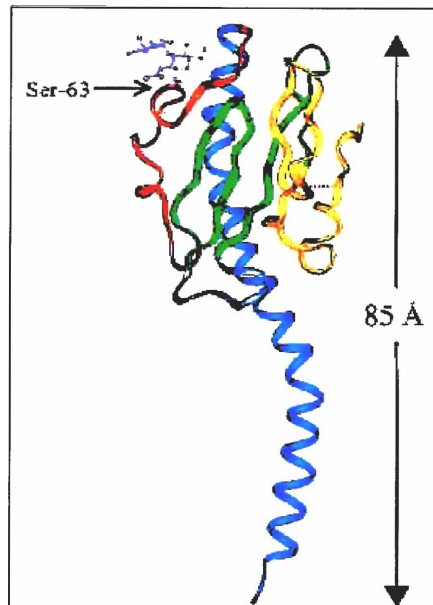


Figura I. 5. Esquema de cintas de la estructura del pilus tipo IV. En azul se observa un enrollamiento α - β plegado con una columna de plegamiento α_1 -hélice (residuos de 2-54). En naranja se representa la unión disacárida (residuos 55-77). En verde las dos horquillas β plegadas que forman 4 estratos antiparalelos (residuos 78-93 y 103-122). En gris un pliegue que conecta $\beta_2 - \beta_3$ (residuos de 94-102). En amarillo una región sulfuro (residuos 121-158) en la cual, a pesar de su naturaleza hipervariable, se encuentra una región altamente conservada que contiene el extremo carboxilo. También se muestran los puentes disulfuro (residuos de cisteína 121 y 151) señalados con línea punteada y la serina 63 (Ser-63) covalentemente unida a un disacárido. La figura es adaptación de la mostrada por Soto y Hultgren (1999).

I. 2. 3. Hemolisina

La hemolisina, es el otro factor de virulencia importante de *M. bovis*. La actividad hemolítica se puede presentar o no en cultivos en agar sangre, sin embargo, al momento de producir QIB en el ganado la capacidad hemolítica es un factor de virulencia esencial ya que las bacterias no hemolíticas no pueden iniciar la enfermedad (Billson *et al.*, 2000). Cepas aisladas de animales enfermos son predominantemente hemolíticas (Beard *and* Moore, 1994); además, estos aislados muestran también actividad citotóxica contra neutrófilos bovinos y células epiteliales de la córnea, lo que causaría las lesiones típicas de esta enfermedad.

La caracterización de la hemolisina de *M. bovis* no ha sido completada todavía, sin embargo, en general se asocia la actividad hemolítica a fracciones cuya masa molecular está entre 70 y 110 kDa por *Western blot* (Billson *et al.*, 1994). La hemolisina es una

proteína dependiente de calcio (el Ca^{+2} parece favorecer la acción de esta enzima acelerando la histólisis), lábil al calor (Deshpande *and* Khan, 1999), que pertenece a la familia de proteínas formadoras de poros (toxinas tipo RTX (Allison *and* Hillman, 1997)) a la cual pertenecen también las toxinas secretadas por *E. coli*, *Pasteurella hemolítica*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Se produce durante la fase exponencial del crecimiento y es destruida por proteasas al final de ésta fase de crecimiento (Ostle *and* Rosenbusch, 1984).

Angelos y colaboradores (2001) mostraron que cepas de *M. bovis* patógenas hemolíticas poseen el operon RTX con los genes mbxCABD que codifican para la citotoxina y también determinaron que las variantes no hemolíticas *M. bovis* carecen de los mismos (Angelos *et al.*, 2002). Más tarde, establecieron que la organización genética y el contenido de G+C (guanina + citosina) de los genes mbxCABDtolC y las regiones repetidas que lo flanquean en *M. bovis* hemolítica, así como la presencia o ausencia de las regiones repetidas que lo flanquean en *M. bovis* no hemolítica sugieren que el operon RTX se localiza en un elemento genético móvil y por lo tanto se podría aplicar la designación de esta región como isla de patogenicidad. Esta sería la primer isla de patogenicidad reportada en *M. bovis* (Hess *and* Angelos, 2006).

Estudios de Billson y colaboradores (1994) muestran que la acción tóxica de la hemolisina frente a células de córnea puede ser neutralizada con una preincubación de *M. bovis* con un anticuerpo monoclonal (epitope específico) neutralizante de la hemólisis. Estos autores encuentran que la explicación más plausible para esta observación es que las actividades hemolíticas y citotóxicas se deben a una única toxina. Sin embargo, los autores aclaran que la existencia de un epitope común para dos toxinas diferentes no puede ser excluida (Billson *et al.*, 2000).

Las citolisinas de bacterias Gram-negativas tienen un mecanismo de acción común que consiste en insertar la toxina en la membrana plasmática de la célula blanco y formar poros relativamente pequeños (0,9 nm en el caso de la citolisina de *M. bovis*) y definidos que la atraviesan produciendo la pérdida de iones. En el caso de esta hemolisina produce la pérdida de iones K^+ (Bhakdi *and* Tranum-Jensen, 1988), por otra parte se retienen las proteínas citoplasmáticas dentro de la célula lo que conduce a un aumento en la presión coloidosmótica intracelular, haciendo que el agua entre en cantidades anormalmente altas

lo que conduce al hinchamiento y la muerte por histólisis (Clinkenbeard *and* Thiessen, 1991). Debido a que los poros producidos por esta citolisina son relativamente pequeños y uniformes en tamaño, el hinchamiento celular y la citólisis pueden ser inhibidos con el agregado de protectores osmóticos de tamaños moleculares adecuados. Los protectores osmóticos tienen un tamaño mayor al de los poros por lo que no pueden entrar a la célula y quedan retenidos en el medio extracelular, donde contrabalancean el aumento intracelular de presión osmótica previniendo el hinchamiento y la citólisis. Se ensayaron distintos protectores osmóticos entre ellos carbohidratos y se encontró que aquellos carbohidratos con diámetros moleculares entre 0,72 nm y 1,32 nm fueron efectivos protectores. Mientras que los menores a 0,72 nm no lo fueron. Como los poros son de 0,9 nm no se entiende bien porque los protectores de tamaños entre 0,72 nm y 0,9 nm son efectivos; se piensa que esto podría indicar una variabilidad en el tamaño de los poros o limitaciones en el método de determinación del tamaño del poro.

I. 2. 4. Otros factores de virulencia

La patogenicidad de cepas de *M. bovis* está asociada además a una variedad de enzimas hidrolíticas, aminopeptidasas, leucocidinas. Enzimas hidrolíticas portadoras de un factor formador de huecos serían las encargadas de producir depresiones tipo hoyo en las células epiteliales de la córnea; estos hoyos ayudarían a la liberación de una colagenasa (que pertenece al hospedador) y que permitiría la progresión de las úlceras de córnea por degradación del colágeno en sus péptidos componentes. Enzimas de *M. bovis* pueden hidrolizar estos péptidos por producción de aminopeptidasas, como se mencionara anteriormente.

La leucocidina (hemolisina) causa daño directo a neutrófilos lo que da como resultado una gran liberación de enzimas lisosómicas de la célula que contribuyen al daño corneal. Durante la fagocitosis se liberan lisosomas de los neutrófilos que contienen colagenasas y otras enzimas proteolíticas, que son los responsables de las injurias corneales (Chandler *et al.*, 1981; Rogers *et al.*, 1987). Debido a que *M. bovis* no produce colagenasa (Frank *and* Gerber, 1981), los neutrófilos serían la fuente de esta enzima. Los neutrófilos dañados son inefectivos en la depuración de *M. bovis*, lo que lleva a un aumento del número de bacterias viables en el ojo. La leucocidina puede indirectamente contribuir a la lesión corneal (por su efecto de daño en neutrófilos) y puede directamente

aumentar la colonización de *M. bovis* en el ojo y subsecuentemente la duración de la enfermedad.

Alves Franco y colaboradores estudiaron distintas toxinas producidas por 12 cepas de *M. bovis*; de ellas 11 mostraron actividad gelatinasa. Sin embargo, esta actividad no fue detectada cuando los cultivos se calentaron a 100° C, ni cuando fueron filtrados; por ello los autores sugieren que la toxina está asociada con las células bacterianas creciendo activamente –como ocurre también con la hemolisina-. Debido a que se encontró actividad en los cultivos completos y no en los filtrados se puede decir que es una toxina que no se secreta al medio en cantidades detectables. Este hecho explicaría también la observación de que después de la adhesión a las capas superficiales de la córnea, *M. bovis* invade el estroma destruyendo las fibras de colágeno (Alves Franco and Gil-Turnes, 1994).

I. 3. OBJETIVOS

Objetivos generales

Teniendo en cuenta el grave problema que representa en queratoconjuntivitis infecciosa bovina no contar con una vacuna eficaz, el principal objetivo de este trabajo de investigación estuvo dirigido a tratar de esclarecer que factores pueden ocasionar el bajo nivel de protección que otorgan las vacunas contra QIB actualmente disponibles en el mercado, y que se traducen en importantes pérdidas económicas para el sector ganadero. El trabajo estuvo enfocado a mejorar la estrategia de producción de estas vacunas, partiendo de aspectos elementales como la selección de poblaciones a emplear como inóculos en procesos productivos. La bibliografía disponible en esta temática es muy reducida ya que son pocos los grupos a nivel internacional que trabajan en esta enfermedad. Otro elemento importante es que estas vacunas son para el productor productos de muy bajo costo, lo que lleva a las empresas fabricantes a hacer muy poca inversión en investigaciones dirigidas al desarrollo de un inmunógeno de mejor calidad que el que actualmente se encuentra en el mercado. La baja protección que otorgan estas vacunas podría ser consecuencia de que las formulaciones empleadas a campo, obtenidas a partir del desarrollo microbiano en reactores agitados mecánicamente, no son controladas de manera adecuada como para descartar aquellas partidas donde factores de patogenicidad como pili y hemolisina estuviesen por debajo de determinados valores límites.

Tomando en consideración los problemas planteados, los objetivos generales de este trabajo de investigación fueron los siguientes:

1. Avanzar en el conocimiento de los factores que condicionan la expresión y la estabilidad de los principales factores de virulencia de *M. bovis* durante su crecimiento en cultivo en medios líquidos como una forma de contribuir a la búsqueda de estrategias de producción apropiadas a escala industrial.

2. Analizar comparativamente el empleo de distintos sistemas de producción de manera de seleccionar una forma y estrategia de cultivo que permita mantener las características de virulencia y rendimientos celulares.

Objetivos específicos

Una vez identificados los objetivos generales del trabajo, se definieron los objetivos específicos del mismo:

1. Establecer el grado de estabilidad de factores de virulencia de *M. bovis* mediante el monitoreo de la presencia de pili y hemolisina en bacterias crecidas en cultivos en medio sólido y líquido.

2. Monitorear la presencia del gen de la pilina en microorganismos piliados y no piliados y establecer si durante el crecimiento en medios líquidos se produce la pérdida de dicho gen. Analizar comparativamente en poblaciones piliadas y no piliadas de *M. bovis* el perfil de plásmidos. Intentar establecer si el grado de piliación está asociado a determinado perfil de plásmidos y en caso positivo determinar en que medida este se modifica durante el cultivo en medios líquidos.

3. Caracterizar células de *M. bovis* piliadas y no piliadas en cuanto a propiedades fisicoquímicas y componentes de superficie. En especial, establecer si existen diferencias en índice de autoaglutinación, potencial zeta, capacidad de adhesión a hidrocarburos y adhesión a soportes abióticos. Correlacionar estas propiedades de superficie con la piliación y establecer si las propiedades mencionadas pueden ser empleadas para monitorear el cambio en piliación durante el crecimiento en medio líquido. Estudiar la expresión de componentes celulares de superficie como proteínas de membrana externa (PME) y lipopolisacáridos (LPS) en poblaciones piliadas y no piliadas y establecer si se modifican durante el cultivo en medios sólidos o líquidos.

4. Estudiar la estabilidad de la expresión de los factores de patogenicidad más importantes de *M. bovis* durante el cultivo en biorreactores con agitación mecánica.

5. Analizar la expresión y estabilidad del fenotipo piliado *M. bovis* en reactores con agitación neumática

6. Estudiar el crecimiento, características de superficie y estabilidad de piliación en bacterias crecidas en biofilm.

I. 4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen, L. J.; L. W. George; N. H. Willits. 1995. Effect of penicillin and dexamethasone in cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis. *Journal American Veterinary Medicine Association*, **206**:1200-1203.
- Allison, H. E.; J. D. Hillman. 1997. Cloning and characterization of a *Prevotella melaninogena* hemolysin. *Infection and Immunity*, **65**(7):2765-2771.
- Alves Franco, M.; C. Gil-Turnes. 1994. Toxins of *Moraxella bovis*: effect on substrates and cells. *Review Microbiology*, **25**:235-238.
- Angelos, J. A.; J. F. Hess; L. W. George. 2001. Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. *American Journal of Veterinary Research*, **62**(8):1222-1228.
- Angelos, J. A.; J. F. Hess; L. W. George. 2002. An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Veterinary Microbiology*, **92**(4):363-377.
- Baptista, P. J. H. P. 1979. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *British Veterinary Journal*, **135**:225-242.
- Beard, M. K.; L. J. Moore. 1994. Reproduction of Bovine Keratoconjunctivitis with a purified haemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*: *Veterinary Microbiology*, **42**:15-33.
- Bhakdi, S.; J. Tranum-Jensen. 1988. Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. *Progress in Allergy*, **40**:1-43.
- Bhaya, D.; A. Takajashi; A. R. Grossman. 2001. Light regulation of type IV pilus-dependent motility by chemosensor-like elements in *Synechocystis* PCC6803: *Proceedings of National Academy of Science USA*, **98**:7540-7545.
- Bieder, D.; S. W. Ramer; C. Wu; W. J. Murray; T. Tobe; R. Fernandez. 1998. Type 4 pili transient bacterial aggregates and virulence in enteropathogenic *Escherichia coli*: *Science*, **280**:2114-2118.
- Billson, F. M.; C. Harbour; W. P. Michalski; J. M. Tennent; J. R. Egerton; J. L. Hodgson. 2000. Characterization of hemolysin of *Moraxella bovis* using a hemolysis-neutralizing monoclonal antibody. *Infection and Immunity*, **68**:3469-3474.

- Billson, F. M.; J. L. Hodgson; J. R. Egerton; A. W. Lepper; W. P. Michalski; C. L. Schwartzkoff; P. R. Lehrbaer; J. M. Tennent. 1994. A hemolytic cell free preparation of *Moraxella bovis* confers protection against infectious bovine keratoconjunctivitis. *FEMS Microbiology Letters*, **124**:69-73.
- Blankenship, T. L.; P. C. Smith. 1984. Evaluation of a commercially available pilus vaccine for *Moraxella bovis* infection (IBK-Pinkeye) in cattle. *Proceedings Conference Research Workers Animal Disease (Chicago)*, **65**:17.
- Bovre, K.; L. O. Froholm. 1972. Variation of colony morphology reflecting fibrillation in *Moraxella bovis* and two reference strain of *M. nonliquefaciens*. *Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica Seccion B*, **80**:629-640.
- Bretschneider, G.; S. E. Pérez. 1997. Generalidades sobre queratoconjuntivitis infecciosa bovina. *Therios*, **26**:206-211.
- Brown, M. H.; A. H. Brightman; B. W. Fenwick; M. A. Rider. 1998. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *Journal American Veterinary Medicine Association*, **12**:259-266.
- Cerny, H. E.; D. G. Rogers; J. T. Gray; D. R. Smith; S. Hinkley. 2006. Effects of *Moraxella (Branhamella) ovis* Culture Filtrates on Bovine Erythrocytes, Peripheral Mononuclear Cells, and Corneal Epithelial Cells. *Journal of Clinical Microbiology*, **44**(3):772-776.
- Chandler, R. L.; K. Smith; B. A. Turfrey. 1981. Ultrastructural and histological studies on the corneal lesions in Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *Journal Compend of Pathology*, **91**:175-184.
- Clinkenbeard, K. D.; A. E. Thiessen. 1991. Mechanism of action of *M. bovis* hemolysin: *Infection and Immunity*, **59**:1148-1152.
- Conceição, F. R.; F. Paolicchi; A. L. Cobo; C. Gil-Turnes. 2003. Antigenic relationships of *Moraxella bovis* isolates recovered from outbreaks infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil, and Uruguay between 1983 and 2000. *Canadian Journal of Veterinary Research* **67**(4):315-318.
- CSIRO report of research July 2000 – June 2003, livestock industries. 2003. Compiladores: W. Pyper; A. Tuppack; P. Loveridge. www.joltstudio.com.au Managing editor: Wendy Pyper – CSIRO Livestock Industries.
- Davidson, H. J.; G. L. Stokka. 2003. A field trial of autogenous *Moraxella bovis* bacterin administered through either subcutaneous or subconjunctival injection on the development of keratonconjunctivitis in a beef herd. *The Canadian Veterinary Journal* **44**(7):577-580.
- Deshpande, R. G.; M. B. Khan. 1999. Purification and characterization of hemolysin from *Porphyromonas gingivalis* A7436: *FEMS Microbiology Letters*, **17**:387-394.
- Elleman, T. C.; P. A. Hoyne; A. W. Lepper. 1990. Characterization of the pilin gene of *Moraxella bovis* Dalton 2d and expression of pili from *M. bovis* in *Pseudomonas aeruginosa*: *Infection and Immunity*, **58**:1678-1684.
- Farn, J. L.; R. A. Strugnell; P. A. Hoyne; W. P. Michalski; J. M. Tennent. 2001. Molecular characterization of a secreted enzyme with phospholipasa B activity from *Moraxella bovis*. *Journal of Bacteriology* **183**(22):6717-6720.

- Frank, S. K.; J. D. Gerber. 1981. Hydrolytic enzymes of *Moraxella bovis*: Journal of Clinical Microbiology, **13**:269-271.
- Frisch, J. E. 1975. The relative incidence and effect of Bovine Infectious Keratoconjunctivitis in *Bos indicus* and *Bos Taurus*. Animal Production, **21**:265.
- George, L. 1984. Clinical infectious bovine keratoconjunctivitis. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, **6**:S712-S720.
- George, L. W. 1990. Antibiotic treatment of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. Cornell Veterinary, **80**:229-235.
- George, L. W.; J. W. Smith. 1985. Treatment of *Moraxella bovis* infections in calves using a long-acting Oxytetracycline formulation. Journal Veterinary Pharmacological Therapies, **8**:55-61.
- Gil-Turnes, C. 1983. Hemagglutination, autoagglutination and pathogenicity of *Moraxella bovis* strains. Canadian Journal of Comparative Medicine **47**:503-504.
- Gray J. T.; P. J. Fedorka-Cray; D. G. Rogers. 1995. Partial characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin. Veterinary Microbiology, **43**(2-3):183-96.
- Heinrichsen, J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. Bacteriology Reviews. **36**:478-503.
- Heinrichsen, J. 1975. The occurrence of twitching motility among Gram-negative bacteria. Acta Pathologica Microbiologica Immunologica Scandinavica, **83**:171-178.
- Heinrichsen, J. 1983. Twitching motility. Annual Review Microbiology, **37**:81-93.
- Hess, J. F.; J. A. Angelos. 2006. The *Moraxella bovis* RTX toxin locus mbx defines a pathogenicity island. Journal of Medical Microbiology, **55**:443-449.
- Hoiem-Dalen P. S.; R. F. Rosenbusch; J. A. Roth. 1990. Comparative characterization of the leukocidal and hemolytic activity of *Moraxella bovis*. American Journal of Veterinary Research; **51**(2):191-6.
- Hughes, D. E.; G. W. Pugh. 1970. A five-year study of infectious bovine keratoconjunctivitis in a beef herd. Journal American Veterinary Medical Association, **157**:443-451.
- Johansen, K. A.; M. S. Wannemuehler; R. F. Rosenbusch. 1990. Biological reactivity of *Moraxella bovis* lipopolysaccharide. American Journal of Veterinary Research, **51**:46-51.
- Kirkpatrick, J. G.; D. Lalman. 2001. Pinkeye in cattle infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). Oklahoma State University F-9128. On line library. 9128[1].
- Kopecky, K. E.; G. W. Pugh; D. E. Hughes. 1980. Wavelength of ultraviolet radiation that enhances onset of clinical infectious bovine keratoconjunctivitis. American Journal Veterinary Research, **41**:1415.
- Kopecky, K. E.; G. W. Pugh; T. J. McDonald. 1983. Infectious bovine keratoconjunctivitis: evidence for general immunity. American Journal of Veterinary Research, **44**:260-262.

- Kopecky, K. E.; G. W. Pugh; T. J. McDonald. 1986. Infectious bovine keratoconjunctivitis: contact transmission. *American Journal of Veterinary Research*, **47**:622-624.
- Lehr, C.; H. G. Jayappa; R. A. Good. 1985. Serologic and protective characterization of *Moraxella bovis* pili. *Cornell Veterinary*, **75**:484-492.
- Lepper A. W. D.; L. J. Moore; J. L. Atwell; J. M. Tennet. 1992. The protective efficacy of pili from different strains of *Moraxella bovis* within the same serogroup against infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology*, **32**:177-187.
- Lepper A. W. D.; T. C. Elleman; P. A. Hoyne; P. R. Lehrbach; J. L. Atwell; J. R. Egerton; L. C. Schwartzkoff; J. M. Tennet. 1993. A *Moraxella bovis* pili vaccine produced by recombinant DNA technology for the prevention of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology*, **36**:175-183.
- Lepper, A. W. D.; J. L. Atwell; P. R. Lehrbach; C. L. Schwartzkoff; J. R. Egerton; J M Tennent. 1995. The protective efficacy of cloned *Moraxella bovis* pili in monovalent and multivalent vaccine formulations against experimentally induced infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK). *Veterinary Microbiology*, **45**:129-138.
- Macnab, R. M. 1996. Flagella and motility. In *Escherichia coli* and *Salmonella*, in FC Neidhart (ed), Washington, DC, American Society for Microbiology Press, 123-145.
- McConnel C. S.; J. K. House. 2005. Infectious bovine keratoconjunctivitis vaccine development. *Australian Veterinary Journal*, **83**(8):506-10.
- Merz, A. J.; M. So; M. P. Sheetz. 2000. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*, **407**:98-102.
- Miller, R. B.; W. H. Fales. 1984. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: an update. *Symposium on Large Animal Ophthalmology*, **6**:597-608.
- Odeon, A. C.; R. Chayer; C. M. Campero; A. R. Moreira; G. Bretschneider; S. E. Pérez. 1996. Eficacia terapéutica de la oxitetraciclina de larga acción por vía intramuscular en el tratamiento precoz de la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina (QIB). *Revista de Medicina Veterinaria*, **77**:19-23.
- Ostle, A.; R. F. Rosenbusch. 1984. *Moraxella bovis* hemolysin. *American Journal of Veterinary Research*, **45**:1848-1851.
- Ostle, A.; R. Rosenbusch. 1986. Outer membrane protein antigens of *Moraxella bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, **47**:1419-1421.
- O'Toole, G. A.; R. Kolter. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: *Molecular Microbiology*, **30**:295-304.
- Ottemann, K. M.; J. F. Miller. 1997. Minireview. Roles for motility in bacterial-host interactions: *Molecular Microbiology*, **24**:1109-1117.
- Ottow, J. C. G. 1975. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annual Review of Microbiology* **29**:79-108.
- Parge, H. E.; K. T. Forest; M. J. Hickey; D. A. Christensen; E. D. Getzoff; J. A. Tainer. 1995. Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature*, **378**:32-38.

- Pérez, S. E.; G. Bretschneider; H. Y. Terzolo; A. R. Moreira. 1997. Evolución en el desarrollo de inmunógenos contra la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina: tipos y características. *Therios*, **26**:292-303.
- Pugh G. W. Jr.; T. J. McDonald; K. E. Kopecky. 1982. Experimental infectious bovine keratoconjunctivitis: efficacy of a vaccine prepared from nonhemolytic strains of *Moraxella bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, **43**(6):1081-4.
- Pugh, G. W.; D. E. Hughes; G. D. Booth. 1979. Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: influence of age on development of disease in vaccinated and nonvaccinated calves after exposure to *Moraxella bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, **40**:762-766.
- Pugh, G. W.; D. E. Hughes. 1968. Experimental bovine queratoconjunctivitis caused by sunlamp irradiation and *M. bovis* infection: Correlation of hemolytic ability and pathogenicity. *American Journal of Veterinary Research*, **29**:835-839.
- Pugh, G. W.; T. J. McDonald; K. E. Kopecky; W. G. Kvasnicka. 1986. Infectious bovine keratoconjunctivitis: evidence for genetic modulation of resistance in purebred Hereford cattle. *Canadian Journal of Veterinary Research*, **50**:259-264.
- Pugh, G. W.; T. J. McDonald. 1986. Identification of bovine carriers of *Moraxella bovis* by comparative cultural examinations of ocular and nasal secretions. *American Journal of Veterinary Research*, **47**:2343-2345.
- Pugsley, A. P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiology Review*, **57**:50-108.
- Punch, P. I.; D. H. Slatter. 1984. A review of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Bulletin*, **54**:193-207.
- Reyn, A. 1974. Gram-negative cocci and coccobacilli, in RE Buchanan and NE Gibbons (eds), *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 427-444.
- Rogers, D. G.; N. F. Chevillie; G. W. Pugh. 1987. Pathogenesis of corneal lesions caused by *Moraxella bovis* in gnotobiotic calves. *Veterinary Pathology*, **24**:287-295.
- Ruehl, W.; C. F. Marrs; R. Fernandez; S. Falkow; G. K. Schoolnik. 1988. Purification, characterization, and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. *Journal of Experimental Medicine*, **168**:983-1002.
- Sandhu, T.; F. White; C. F. Simpson. 1974. Association of pili with rough colony type of *Moraxella bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, **35**:437-439.
- Scheerlinck, J-P Y.; D. L.V. Greenwood. 2006. Particulate delivery systems for animal vaccines. *Animal Vaccines Methods*, **40**(1):118-124
- Selfero, N. A.; J. L. Merlassino; S. A. Disio; O. Ancés; J. M. Lac. 2003. Tratamiento de patologías del complejo ocular bovino: aplicación subconjuntival bulbar de arginina-inosina. *Portal de Veterinaria*.
- Semmler, A. B. T.; C. B. Whitchurch; J. C. Mattick. 1999. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **145**:2863-2873.
- Shi, W.; H. Sung. 2002. Minireview. Type IV pilus-dependent motility and its possible role in bacterial pathogenesis: *Infection and Immunology*, **70**:1-4.

- Skerker, J. M.; H. C. Berg. 2001. Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **98**:6901-6904.
- Slatter, D. H.; M. E. Edwards; C. D. Hawkins; G. E. Wilcox. 1982. A national survey of the clinical features, treatment and importance of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Australian Veterinary Journal*, **59**:69-72.
- Smith, P.; T. Blakenship. 1990. Effectiveness of two commercial infectious bovine keratoconjunctivitis vaccines: *American Journal of Veterinary Research*, **51**:1147-1150.
- Smith, S.; D. Heffelfinger; P. Kubik; C. Lawrence. 2003. The history of vaccines in Veterinary medicine.
- Soto, G. E.; S. J. Hultgren. 1999. Minireview Bacterial Adhesins: Common Themes and Variations in Architecture and Assembly. *Journal of Bacteriology*, **181**:1059-1071.
- Strom, M. S.; D. N. Nunn; S. Lory. 1994. *Methods in Enzymology*, **235**:527-540.
- Sun, H.; D. R. Zusman; W. Shi. 2000. Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Current Biology*, **10**:1143-1146.
- Takele, G.; A. Zerihun. 2000. Epidemiology of Infectious Keratoconjunctivitis in Cattle in South-east Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, **47**(3):169-173.
- Tizard, I. R. 2000. *Veterinary Immunology: An Introduction*, Saunders Company.
- Tönjum, T.; M. Koomey. 1997. The pilus colonization factor of pathogenic neisseria species: organelle biogenesis and structure/function relationships. *Gene*, **192**:155-163.
- Turner, L. R.; J. C. Lara; D. N. Nunn; S. Lory. 1993. Mutations in the consensus ATP-binding sites of XcpR and PilB eliminate extracellular protein secretion and pilus biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, **175**:4962-4969.
- Wall, D.; D. Kaiser. 1999. Type IV pili and cell motility. Microreview. *Molecular Microbiology*, **32**:1-10.
- Webber, J.; L. Selby. 1981. Risk factors related to the prevalence of Infectious Bovine Keratoconjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research*, **179**:823-826.
- Wilcox, G. E. 1968. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *Veterinary Bulletin*, **38**:349-360.
- Wu, S. S.; J. Wu; D. Kaiser. 1997. The *Myxococcus xanthus pilT* locus is required for social gliding motility although pili are still produced. *Molecular Microbiology*, **23**:109-121.

Capítulo II

EXPRESIÓN Y ESTABILIDAD DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *MORAXELLA BOVIS*

II. 1. INTRODUCCIÓN

Una forma de estudiar las estrategias adaptativas de las bacterias frente a distintas condiciones ambientales es analizar su expresión fenotípica, sea *in vitro* o en ambientes naturales. El conocimiento de estas estrategias es importante en el entendimiento de los mecanismos de patogenicidad y en la determinación de la capacidad evolutiva de cada organismo. Este conocimiento permite diseñar herramientas apropiadas para enfrentar determinados patógenos, como por ejemplo la composición de vacunas (Hallet, 2001).

Debido a que la adaptación bacteriana frente a las fluctuaciones ambientales es en muchos casos poco previsible, los mecanismos de variación de fase se describen frecuentemente como procesos esencialmente estocásticos que generan combinaciones al azar de fenotipos, sin anticipar si estos serán o no beneficiosos. Sin embargo, la diversidad genética podría ser generada por la influencia de factores externos tales como condiciones de estrés o densidad celular. La alteración en la frecuencia de la variación de fase se podría usar para modular la adaptabilidad y la puesta en forma de una población bacteriana bajo ciertas circunstancias, y para expresar fenotipos preferenciales en relación con ellas. Los sistemas de inversión sitio específico de ADN son controlados por factores celulares auxiliares, que funcionan como componentes de complejos de recombinación para asegurar que esta ocurra solamente entre sitios de recombinación correctamente orientados (Hallet *and* Sherrat, 1997). Como la expresión o actividad de muchos de estos factores está unida al estado fisiológico de las células, su participación en la recombinación puede proveer un mecanismo de regulación de frecuencia y tiempo en el cambio de fase. Históricamente se ha demostrado que la variación de fase, en un gran número de especies,

está mediada por una reacción de recombinación, liderada por la inversión de fragmentos de ADN pertenecientes a un *locus* específico (Dybvig, 1993). En este sitio específico, una modificación reversible en la expresión genética se obtiene por inversión en la orientación de un promotor con respecto a un gen estructural, o por conexión de regiones variables terminales de un gen con otro localizado fuera del fragmento invertible. En una bacteria las reacciones de inversión del ADN son usadas para cambiar la expresión de estructuras de superficie tales como el flagelo de *Salmonella typhimurium*, el pili tipo I de *E. coli* y el pili tipo IV de *Moraxella lacunata* y *M. bovis* (Dybvig, 1993). Otros pili pertenecientes a la familia de los pili metilfenilalanina (MePhe) han sido clonados y secuenciados –entre ellos los de *N. gonorrhoeae* (Meyer *et al.*, 1982), *B. nodosus* (Anderson *et al.*, 1984) y *P. aeruginosa* (Pasloske *et al.*, 1985) – y se observó que presentan grandes diferencias en sus mecanismos de síntesis. Por ejemplo, las cepas de *N. gonorrhoeae* mostraron múltiples *loci* para el gen de la pilina y las transiciones de una forma piliada a una no piliada y entre distintos tipos de piliación van generalmente acompañadas de re-arreglos en el ADN cromosomal (Meyer *et al.*, 1982).

Como se mencionó, los pili son esenciales para la adhesión de *M. bovis* al epitelio corneal (primera etapa de la colonización del ojo por parte de esta bacteria), ya que únicamente las cepas piliadas han mostrado ser capaces de producir infección en el ganado bovino. Una amplia variedad de fenotipos se asocian con la piliación, incluidas la morfología de colonia, la corrosión del agar (Bøvre *and* Froholm, 1972; Pedersen *et al.*, 1972), la movilidad por *twitching* (Heinrichsen, 1983) y la autoaglutinación de eritrocitos bovinos (Sandhu *et al.*, 1974).

La transición de la variante piliada a la variante no piliada de *M. bovis* ocurre espontáneamente *in vitro*. Uno de cada 1×10^4 organismos experimenta esta transición cuando estas bacterias crecen en agar sangre. La transición reversa, de una forma no piliada a una piliada ha sido observada en distintas frecuencias, pero siempre mucho menores a 1×10^4 (Bovre *and* Froholm, 1972).

Se ha descrito que distintas cepas producen pilina (la subunidad de los pili) de distintos pesos moleculares y ha sido reportada una cepa capaz de producir más de un tipo de proteína de pili (Marrs *et al.*, 1988). *M. bovis* Epp63 produce dos tipos de pilina, una tipo α de aproximadamente de 18000 daltons y una tipo β de 16000 daltons (Marrs *et al.*, 1988). La transición entre pilina α y pilina β y viceversa ocurre directamente, sin que la

cepa pase por un estado no piliado. Marrs y colaboradores (1988) mostraron que una región de ADN de 2 kilobases, que contiene porciones de los genes de la pilina α y β , se invierte respecto de la otra en la cepa de *M. bovis* Epp64. En este modelo la inversión ocurre en un sitio específico del ADN y el resultado es que un tipo de pilina deja de producirse y comienza a producirse el otro. La inversión ocurre en la región amino terminal de los genes de la pilina y solamente las secuencias de pilina que tienen el promotor y la porción inicial del gen producen la proteína. De esta manera, en una orientación de la región de ADN de 2 Kb, las secuencias específicas de la pilina β están en el locus de expresión adyacente al promotor y en la secuencia inicial del gen de la pilina que codifica para la secuencia líder y para los aminoácidos amino terminales. Las secuencias específicas para la pilina α están en una posición invertida y no se expresan. En la otra orientación lo inverso es correcto, es decir que cuando las secuencias específicas de la pilina α , a su vez, están en el locus de expresión, las secuencias específicas de la pilina β están en una posición invertida y no se expresan.

Marrs y colaboradores (1988) explican la variación de fase y los mecanismos de formación de las variantes que carecen de pili en la superficie celular. Existen al menos 2 tipos de células no piliadas (p-); **a.** bacterias que fenotípicamente son p- y producen pilina (α o β dependiendo de su origen) pero no pueden ensamblarla y **b.** bacterias que son fenotípicamente p- y que no producen pilina detectable por ELISA. Hasta el momento todas las variantes de p- que han sido estudiadas por análisis de hibridización *Southern* son indistinguibles del patrón α o β ; no se observa ninguna modificación en los mapas de restricción salvo la inversión descripta. Este modelo de alternancia puede predecir que un evento imperfecto de recombinación-inversión conduzca a un ensamble en contrasentido del péptido de la pilina o a una mutación en el marco de lectura. Un ensamble en contrasentido del péptido de la pilina probablemente sería indistinguible de las pilinas normales por análisis de *Western* y serían las del primer grupo de p-, productoras de pilina pero fenotípicamente p- porque no pueden ensamblar el pili en la superficie celular. Una mutación en el marco de lectura podría resultar en un polipéptido corto rápidamente degradable que sería indetectable y que correspondería con las bacterias p- descriptas en segundo lugar (Marrs *et al.*, 1988).

Hay evidencias de que los distintos tipos de pilina podrían jugar diferentes roles en la patogénesis. Por ejemplo la infectividad y patogenicidad de *M. bovis* Epp64 en terneros

es mayor para las bacterias β -piliadas (Marrs *et al.*, 1988). Las pilinas α y β dan origen a los pili I y Q respectivamente. En el caso de *M. bovis* Epp64 la variante productora de pili Q es más infectiva y patogénica que la productora de pili I y que la variante no piliada. Además, *M. bovis* productora de pili Q actúa aumentando la adhesión bacteriana a la córnea bovina más que las productoras de pili I o las no piliadas (Ruehl *et al.*, 1988) (Figura II. 1.).

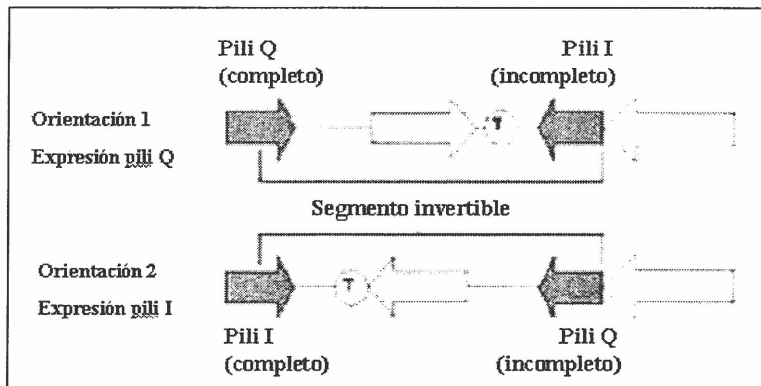


Figura II. 1. Mapa genómico del gen de la pilina, las flechas indican la extensión y la dirección de las regiones codificantes de proteínas. Los genes de la pilina se muestran con flechas grises y T indica el sentido de la transcripción. La figura es adaptación de la mostrada por Tennent y Mattick (1994).

Como mencionamos previamente, dentro de los factores de patogenicidad de *M. bovis* el pili y la hemolisina han sido identificados como esenciales para la virulencia (Ostle *and* Rosenbusch, 1984). Estos factores otorgan a la bacteria la habilidad de sobrevivir en el hospedador y de producir QIB. En bacterias tales como *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *E. coli* las funciones de supervivencia y/o virulencia están codificadas en plásmidos (Portnoy *et al.*, 1981; Sansonetti *et al.*, 1982); es por eso que a principios de los años 80 se pensaba que los plásmidos de *M. bovis* podrían cumplir estas importantes funciones (Wilt *et al.*, 1989) y por consiguiente varios grupos de trabajo (McDonald *and* Pugh, 1986; Schurig *et al.*, 1984; Vandergaast, 1989; Wilt *et al.*, 1989; Wilt *et al.*, 1990) se interesaron en el estudio de patrones de plásmidos.

Schurig y su equipo en 1984 reportaron que de tres aislamientos de *M. bovis* dos mostraron las variantes piliadas y no piliadas (*M. bovis* 867 y *M. bovis* 2), en tanto que el tercero no permitió establecer dicha separación (*M. bovis* OI19). Establecieron que el número de plásmidos se mantenía estable para cada aislamiento: un aislamiento tuvo 5

plásmidos (*M. bovis* 867) y dos aislamientos tuvieron 3 plásmidos (*M. bovis* 2 y *M. bovis* OI19); éstos últimos mostraron la mayor virulencia *in vitro* e *in vivo*. En los ensayos a campo los aislamientos que tuvieron baja capacidad para producir la enfermedad en el ganado mostraron 5 plásmidos, en tanto que los aislamientos de alta virulencia *in vivo* y fuerte actividad citotóxica *in vitro* mostraron sólo 3 plásmidos (Schurig *et al.*, 1984).

Contrariamente, Wilt y su equipo (1990) estudiaron los perfiles de plásmidos de *M. bovis* piliada y no piliada de distintos aislados obtenidos en granjas de Newport (USA) y hallaron que aunque todos los aislamientos de *M. bovis* contenían plásmidos, éstos variaban en número y tamaño independientemente de la patogenicidad y no se encontraron funciones relacionadas con ellos. Específicamente observaron que la forma piliada de *M. bovis* IBH64 contiene al menos un plásmido menos que la forma no piliada. Los aislados de *M. bovis* Newport y GRS contienen el mismo número de plásmidos en las formas piliadas y no piliadas (Wilt, 1990). McDonald y Pugh estudiaron 200 aislados de *M. bovis* y no encontraron relación entre el número de plásmidos de las variantes piliadas y no piliadas y la virulencia. Estos aislados fueron seleccionados al azar y examinados en lo que se refiere a su contenido de plásmidos por el método rápido de lisis alcalina con detergentes. Todos los aislados mostraron entre 1 y 6 plásmidos con distintos patrones de migración (McDonald *and* Pugh, 1986).

Como indicamos, la hemolisina es uno de los factores de virulencia más importantes de *M. bovis* ya que las bacterias no hemolíticas no pueden iniciar la etapa de colonización de la córnea bovina (Huges *and* Pugh, 1970; Cox *et al.*, 1984; Lepper *and* Barton, 1987; Beard *and* Moore, 1994; Billson *et al.*, 2000; Takele *and* Zerihun, 2000) y las cepas aisladas de animales que están enfermos son predominantemente hemolíticas (Beard *and* Moore, 1994). Por esto es que la hemolisina de *M. bovis* ha sido propuesta como un candidato a antígeno vacunal (Beard *and* Moore, 1994; Billson *et al.*, 1994) al igual que el pili tipo IV. Sin embargo, este antígeno presenta una ventaja muy importante respecto del pili y es que mientras las vacunas a base de antígenos piliares requieren la inclusión de todos los serogrupos de pili para conferir protección a campo (Raadsma, *et al.*, 1994), los concentrados de sobrenadante de cultivos de *M. bovis* hemolítica confieren protección frente a cualquier aislado hemolítico; es decir que si existen distintas hemolisinas todas comparten epitopes (Billson *et al.*, 1994).

Se evaluó la protección conferida contra QIB por distintas vacunas: **a.** una preparación libre de células de un aislado con actividad hemolítica de *M. bovis*; **b.** una fracción equivalente de un aislado de *M. bovis* sin actividad hemolítica; y **c.** una bacteria recombinante que expresa pili de *M. bovis*. Las vacunas se aplicaron a tres grupos de 10 animales cada uno en 2 aplicaciones; un cuarto grupo de 10 animales no fue vacunado. Los cuatro grupos fueron posteriormente desafiados con *M. bovis* virulenta, y se encontró que los animales a los que se les aplicó la vacuna **a.** y **c.** tuvieron una protección significativa (Billson *et al.*, 1994).

Aunque los aislados con actividad hemolítica resultaron efectivos en conferir protección contra QIB, es deseable lograr la purificación de la hemolisina. Beard y Moore (1994) lograron un alto grado de purificación de la hemolisina partiendo de un filtrado libre de células del cultivo bacteriano en el que encuentran hemolisina y vesículas usando una combinación de distintos métodos (compresión tangencial de flujo, intercambio iónico, cromatografía líquida y filtración por centrifugación). No obstante, los autores explican que a pesar de la purificación persiste la contaminación con carbohidratos (Beard *and* Moore, 1994). Estos autores confirmaron los resultados obtenidos por Sandhu y White (1977) acerca de que la hemolisina de *M. bovis* es una proteína que presenta actividad enzimática, y además mostraron una correlación positiva entre los niveles de hemolisina y de actividad citotóxica y que esta actividad está relacionada con la citotoxicidad contra leucocitos bovinos y células epiteliales de córnea *in vitro*. Más tarde, Billson y colaboradores (2000) obtuvieron un anticuerpo monoclonal neutralizante de la hemolisina que permitió identificar al antígeno en concentrados del sobrenadante de cultivo de cepas de *M. bovis* hemolíticas y que permitió establecer que su masa molecular aparente es de 94 kDa y que no se encuentra en las cepas no hemolíticas que el grupo estudió (Billson *et al.*, 2000).

Por su parte, George y colaboradores (2004; 2005) estudiaron la inmunogenicidad generada por la citolisina. Estos autores compararon la inmunogenicidad generada por una vacuna preparada con filtrados de sobrenadantes de cultivos de *M. bovis* hemolítica acompañada por el adyuvante comercial Quil A, con la inmunogenicidad generada por dos soluciones control: **a.** el adyuvante comercial sin aditivos; y **b.** una solución salina (0,9% NaCl). Las pruebas se realizaron sobre un total de 104 animales cruce, de entre 4 y 8 meses de edad. Se asignaron los terneros al azar para recibir la vacuna con citolisina (n=35) o las

preparaciones control con adyuvante (n=35) o solución salina (n=34). Luego del desafío con *M. bovis* con actividad hemolítica y citolítica se examinaron durante 15 semanas los ojos de todos los terneros semanalmente a fin de detectar señales de QIB. Los terneros vacunados con citolisina mostraron menos casos de QIB que los terneros control, además, los terneros vacunados con citolisina tardaron más tiempo en mostrar lesiones corneales que los controles. La conclusión de este trabajo fue que las vacunas preparadas con filtrados concentrados de la citolisina de *M. bovis* podrían proteger a los terneros contra QIB. Resultados similares fueron obtenidos al realizar inmunización de animales con una vacuna preparada con citotoxina recombinante de *M. bovis* (Angelos *et al.*, 2004).

La profilaxis contra QIB no ha sido incorporada al calendario de vacunación bovino obligatorio en Argentina, por esto la producción de la vacuna no se somete a controles estatales estrictos durante su elaboración. Debido a que es una vacuna basada en bacterias inactivadas, los controles por parte de los entes oficiales se reducen a analizar si existe algún tipo de contaminación, pero no determinan si los principales factores de patogenicidad tales como pili y hemolisina, se encuentran presentes en la formulación.

Como se mencionó, se han descrito distintos serotipos de *M. bovis* en distintas zonas geográficas, de allí que sea necesario, para formular vacunas, que se empleen en su producción bacterias que expresen el/los serotipo/s de pili predominante/s en cada región. Por lo tanto, en la definición de las bacterias que deberían ser incluidas en una vacuna se debería conocer qué tipo de población es la prevalente en la región de empleo de dicha vacuna. En Argentina la situación epidemiológica en QIB es, en este sentido, prácticamente desconocida (Conceição *et al.*, 2003). Para lograr vacunas protectoras se debería contar con un censo de los serotipos de pili presentes en nuestro país⁵. Conociendo esta situación, las industrias productoras de vacunas contra QIB han optado por incluir en sus vacunas aislamientos provenientes de distintas regiones. Los mismos no han sido en general caracterizados y por consiguiente su efectividad es desconocida. Hasta el presente sólo se cuenta con los pobres resultados de la vacunación reportados por los productores, que aunque conocen estas deficiencias continúan vacunando de manera al menos preventiva. Junto al desconocimiento del serotipo de pili, el otro problema grave es lograr mantener la estabilidad de la piliación en vacunas preparadas en reactores con agitación

⁵ El grupo de vacunas del CINDEFI empezó un trabajo en esta dirección pero los estudios aún no se han completado.

mecánica, lo cual hasta ahora ha resultado imposible. Ante esta situación nos planteamos avanzar gradualmente en el estudio de variables de proceso que podrían ser condicionantes de la baja efectividad de las vacunas.

II. 2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto es que nos planteamos en una primera etapa los siguientes objetivos:

1. Completar los estudios bioquímicos realizados en el INTA de Márcos Juárez, Córdoba, a los fines de confirmar que los aislamientos obtenidos por dicho laboratorio de animales con diagnóstico de queratoconjuntivitis, y que fueron los que utilizamos en nuestros estudios, corresponden a *M. bovis*.

2. Determinar la estabilidad del fenotipo piliado de *M. bovis* en pasajes seriados en medio sólido y líquido.

3. Determinar en medios de cultivo sólido, la movilidad por *twitching* en poblaciones piliadas y no piliadas de *M. bovis*.

4. Determinar la presencia del gen de la pilina en variantes piliadas y no piliadas de distintos aislamientos locales de *M. bovis*.

5. Comparar el perfil de plásmidos de variantes piliadas y no piliadas de aislamientos locales de *M. bovis*. Analizar si se producen modificaciones en dichos perfiles durante el crecimiento en medios sólidos y líquidos.

6. Monitorear la actividad hemolítica durante el crecimiento de *M. bovis* en medios líquidos a fin de establecer la cinética de producción y estabilidad de la misma.

II. 3. MATERIALES Y MÉTODOS

II. 3. 1. Organismos, medios y condiciones de cultivo

Organismos. Se dispuso de aislamientos de *M. bovis* obtenidos de córnea de bovinos con diagnóstico clínico de QIB. Estos organismos fueron provistos por el Dr. Zielinski de la estación INTA de Marcos Juárez (Córdoba). A estos aislamientos se les hicieron una serie de reacciones bioquímicas de caracterización, complementarias a las realizadas en el INTA, de acuerdo al Manual Bergey (1986) para *M. bovis*. A partir de confirmar que los mismos correspondían a *M. bovis* se seleccionaron variantes piliadas y no piliadas. Los aislamientos locales usados en este trabajo fueron *M. bovis* 1194-03, 1194-20, 295-177, SC3, CM1b. Los *stocks* bacterianos se conservaron liofilizados y congelados a -70°C en medio infusión cerebro corazón (BHI, Merck, Alemania) con 20% de glicerol. Para algunos estudios comparativos fue empleada una cepa de *Rhizobium sp.* cedida por el Dr. Mario Aguilar del Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata. Esta cepa corresponde a un aislamiento del norte de nuestro país caracterizada por métodos genéticos y bioquímicos por el laboratorio mencionado.

Medios y sistemas de cultivo. Como medio de cultivo sólido se empleó Agar Triplicasa Soya (TSA, Merck) adicionada de 7% de sangre equina desfibrinada (TSA sangre) proporcionada por el Instituto Biológico de La Plata. Para los estudios de movilidad (*twitching*) se utilizó Caldo Tripticasa Soya (TSB, Merck) con agregado de 1,0% de agar (Agar-Agar, Merck) y 7% de sangre equina desfibrinada.

En el caso de cultivos en medio líquido se empleó Caldo Cerebro Corazón (BHI Merck) suplementado con cloruro de calcio 0,01% P/V. Los cultivos se iniciaron reconstituyendo los *stocks* liofilizados y sembrándolos en cajas de TSA sangre; las cajas se incubaron 24 horas a 37°C , se seleccionaron las colonias por sus caracteres morfológicos y tintoriales correspondientes al fenotipo buscado en lo que se refiere a piliación y actividad hemolítica y se repicaron nuevamente en cajas de TSA sangre. Los cultivos en Erlenmeyer se inician a partir de estas cajas, salvo que se indique otro tipo de procedimiento. Las colonias de una o dos cajas se transfieren a un Erlenmeyer de 1 L de capacidad conteniendo 100 mL de medio de cultivo que se incuba en agitador rotatorio a 120 rpm y 37°C durante el tiempo que se indica en cada experiencia. En el caso de los ensayos de crecimiento en sistemas líquidos estáticos los cultivos se inician de la misma forma pero

son incubados sin agitación a 37° C. La densidad óptica se mide a 650 nm en un espectrofotómetro UV-visible Pye Unicam SP6-250 (una unidad de $DO_{650} \approx 3,2 \times 10^8$ organismos/mL). Los cultivos líquidos se inician ajustando la DO entre 0,1 y 0,2.

En el caso de rizobios, los mismos fueron cultivados en medio sólido agar extracto de levadura y manitol (LMA MERK) con el agregado de Rojo Congo como indicador.

II. 3. 2. Caracterización bioquímica de bacterias aisladas de bovinos con QIB

Pruebas bioquímicas. Tinción con cristal violeta (Schurig *et al.*, 1984). Se prepara una solución *stock* de cristal violeta disolviendo 2 g de cristal violeta en 20 mL de etanol puro al cual se le agregan 80 mL de oxalato de amonio acuoso al 1% P/V. En el momento de la tinción se diluye esta solución madre 1/40 en agua destilada estéril y se vierte sobre las colonias; se deja 15 segundos y se remueve. Las colonias piliadas se ven de color violeta y las no piliadas de color blanco. Esta tinción se observa con una lupa binocular (Wild M3, Heerbrugg, Switzerland, 40x) que permite analizar las características morfológicas y tintoriales de las colonias.

Tinción de Gram. Sobre un extendido se coloca solución de cristal violeta, se lo deja actuar durante 2 minutos, se lava con agua destilada. Se añade inmediatamente Lugol que se deja actuar durante 1 minuto, se decolora con alcohol etílico 70% y se lava nuevamente. Luego se tiñe con safranina durante 1 minuto, se lava, se seca y se observa. Es importante tener en cuenta que estas bacterias son resistentes a la decoloración por lo que a veces es necesario repetir el procedimiento.

Tinción con tinta china. Se coloca una gota de tinta china en un portaobjetos y se extiende una ansada del microorganismo sobre ella; se deja secar, sin pasar por la llama del mechero y se observa con objetivo de inmersión. Las bacterias con cápsula se observan refringentes.

Prueba de actividad oxidasa. Para esta prueba se utilizan discos comerciales embebidos en p-fenilendiamina. La prueba se realiza levantando una colonia de 24 horas de crecimiento con un ansa (que no sea de hierro ya que daría falsos positivos), o con una punta de pipeta de plástico y se pone en contacto con el disco. La prueba es positiva cuando el disco toma el color púrpura.

Actividad catalasa. Se toma con ansa una colonia de *M. bovis* de 18–24 horas de cultivo en medio TSA sangre y extiende sobre un portaobjetos (hay que tener especial cuidado en no levantar agar con sangre junto con la colonia porque originaría falsos positivos) y se le añaden unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% (10 volúmenes). La reacción es positiva cuando se observa desprendimiento de burbujas.

Utilización de hidratos de carbono: oxidación-fermentación de glucosa. Se determina la capacidad del microorganismo para utilizar uno o más hidratos de carbono incorporados a un medio de cultivo que puede contener un indicador de pH (generalmente se usan indicadores que viran a amarillo en medio ácido), produciendo ácido y gas en condiciones aerobias, anaerobias o en ambas. En este caso se usó medio de cultivo TSA suplementado con 10% de glucosa (esterilizada por filtración) y con 0,02 g/L de púrpura de bromocresol, en tubos de vidrio. Para ver oxidación y fermentación se inoculan por picadura dos tubos rectos, uno de los cuales se incuba tal cual y al otro se le agrega una capa de vaselina (esterilizada por vapor fluente), de modo que si los dos son positivos el microorganismo es oxidante y fermentador para el azúcar probado. La producción de ácido se observa como un cambio de color en el medio de cultivo, de púrpura a amarillo.

Reducción del nitrato. Esta técnica pone en evidencia la presencia de nitrito (producto de la reducción del nitrato) mediante el uso de dimetil- α -naftilamina al 6% (250 mL de agua destilada; 100 mL de ácido acético glacial; 2,1 mL de dimetil- α -naftilamina) y ácido sulfanílico 0,8% (250 mL de H₂O destilada, 100 mL de ácido acético glacial, 2,8 g de ácido sulfanílico). La prueba se realiza en caldo de peptona con 0,1% de nitrato de potasio que se inocula con los microorganismos y se incuba hasta observar desarrollo. Se añaden luego los dos reactivos por separado; si se observa cambio de color la reacción es positiva, es decir el nitrato se ha reducido a nitrito. Si no se observa cambio de color se agrega una punta de espátula de zinc; si se observa cambio de color la reacción es negativa (el zinc produce una coloración rosa-rojo en presencia de nitratos); si no hay cambio de color la reacción es positiva y los nitratos han sido reducidos hasta nitrógeno.

Actividad gelatinasa (licuefacción de gelatina). Se inocula el medio sólido preparado con gelatina en tubos con una abundante cantidad de bacterias y se incuba a 37° C. Cuando la reacción es positiva la gelatina se vuelve líquida, de lo contrario la gelatina permanece sin cambio. Si no se observa licuefacción se debe continuar la incubación hasta 14 días antes de descartar la prueba como negativa.

Coagulasa (licuefacción del suero). Se toma una colonia de 24 horas y se extiende en un portaobjetos (coagulasa ligada) al que se le agrega una gota de plasma citratado de caballo, se mezcla y se observa. Si la reacción es positiva aparecerán grumos blancos, si no, hay que hacer la prueba en tubo (coagulasa libre y coagulasa ligada) que se interpreta de la misma manera.

Ureasa. Es una enzima que descompone la urea originando amoníaco y dióxido de carbono. La alcalinización del medio debida al amonio se pone de manifiesto con un indicador de pH; se realiza en tubos de agar urea de Christensen con el agregado, posterior a la esterilización de 5 mL de solución de urea al 40%. Se inoculan y se incuban 24 horas. La prueba es positiva cuando se produce cambio de color originado por la alcalinización del medio.

II. 3. 3. Evaluación de la piliación en aislamientos locales de *M. bovis*

Se estudió la piliación de *M. bovis* 1194-03 en medios de cultivo sólidos y líquidos por: i. estimación del porcentaje de población piliada por morfología de colonia y ii. mediante una técnica de ELISA (Prieto *et al.*, 2003).

Estimación del porcentaje de población piliada por análisis de morfología de colonias. Estos estudios se llevaron a cabo por medio de recuentos de células viables mediante cultivos en caja de Petri con medio TSA sangre que se evalúan a las 24 horas usando técnicas de análisis de morfología de colonias y tinción con cristal violeta (ver *Pruebas bioquímicas*).

En la Figura II. 2. se pueden observar las diferencias morfológicas entre colonias de organismos piliados y no piliados de *M. bovis* creciendo en medio sólido. En el centro se muestra una placa de TSA sangre con dos estrías de *M. bovis*; a la izquierda colonias de bacterias piliadas y a la derecha de no piliadas. Se pueden apreciar claramente las diferencias entre ambos tipos de colonias. Las estrías de colonias formadas por bacterias piliadas son brillantes y muestran zonas de corrosión del agar cuando son removidas con ansa. Las estrías de bacterias no piliadas son lechosas, opacas y no producen corrosión en el agar. A los costados se muestran con un aumento de 20 X los detalles de las colonias de bacterias piliadas y no piliadas, teñidas con cristal violeta y sin teñir. Las colonias de bacterias piliadas son más pequeñas que las del mismo tiempo de cultivo no piliadas (1-2

mm de diámetro), secas, con bordes nítidos y doble halo tal como las descritas por Ruehl (1988). Las colonias de bacterias no piliadas, en cambio, son lisas, más grandes que las piliadas (2-4 mm de diámetro), mucosas, sin doble halo y grumosas, como describen independientemente Wilcox (1968) y Sandhu y colaboradores (1974). Al teñirlas, las colonias de bacterias piliadas se observan de color violeta y las colonias de bacterias no piliadas se observan claras ya que no toman el colorante.

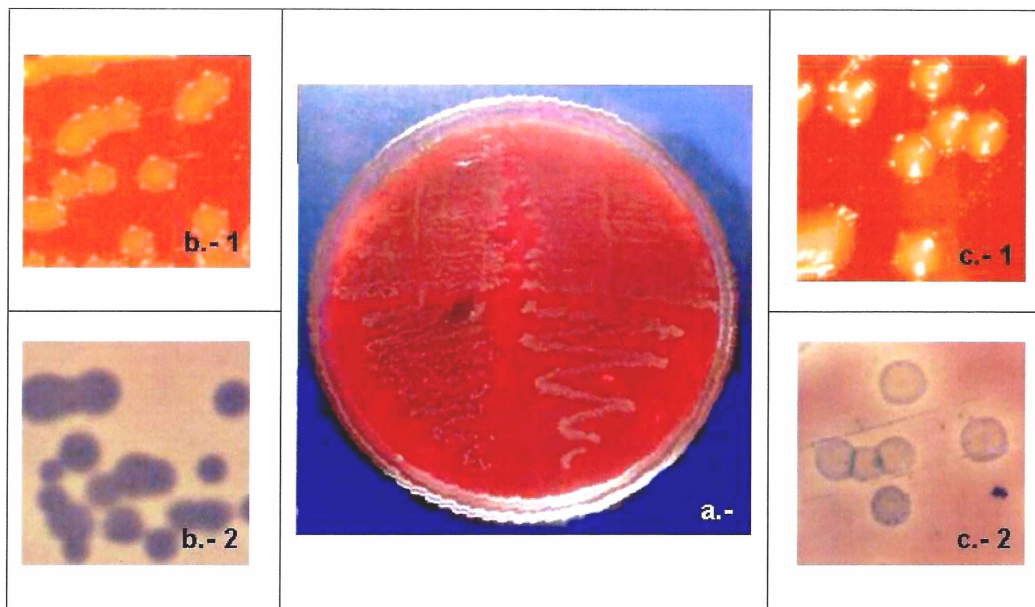


Figura II. 2. Análisis de morfología de colonias **a.** Crecimiento de *M. bovis* en medio sólido TSA sangre a las 18 horas de cultivo. Detalle de las colonias piliadas **b. 1.** sin teñir y **b. 2.** teñidas con cristal violeta. Detalle de las colonias no piliadas **c. 1.** sin teñir y **c. 2.** teñidas con cristal violeta.

Se describió un tercer tipo de colonia, denominada intermedia, que se presenta a la observación microscópica con centro granular y bordes definidos y brillantes. Cuando son teñidas se observa el borde violeta y el centro blanco. Este tipo de colonias fue reportado por Bøvre y Froholm (1972), quienes encontraron que las colonias intermedias están constituidas por bacterias que tienen menor piliación que las llamadas piliadas (detalles sobre este tipo de colonias se describirán más adelante).

Técnica de ELISA. Los pili unidos a células se cuantificaron usando una técnica de ELISA secuencial competitiva (bact-ELISA), desarrollada en nuestro laboratorio (Prieto *et al.*, 2003). Brevemente, el primer paso de esta técnica consiste en la preparación de un *stock* de células de *M. bovis* altamente piliadas (patrón 100% de piliación) que se obtienen

de colonias seleccionadas de medio sólido; se colectan, se lavan con PBS, se resuspenden en 0,5% de formalina e incuban toda la noche a 4° C. Las bacterias se vuelven a lavar 3 veces y se resuspenden en PBS; se dividen en alícuotas y se mantienen congeladas hasta su uso como recubrimiento de los pocillos donde se desarrolla el ELISA. Para preparar la curva de referencia se recubren placas Maxisorp (Nunc, Dinamarca) con 100 µL por pocillo de la suspensión *stock* bacteriana de $DO_{650}=0,5$. Las placas se incuban a 4° C, en cámara húmeda toda la noche. A continuación se hacen tres lavados con PBS 0,05% P/V de Tween 20 (PBS-T); los sitios de unión inespecíficos se bloquean con PBS-T conteniendo 10% de leche descremada, durante 1 hora a 37° C, las placas se lavan luego 3 veces con PBS-T. Los complejos inmunes se forman en la fase fluida durante el paso de preincubación por mezclado de volúmenes iguales de suero anti-pili obtenido en conejo (1:3000 en PBS) y suspensiones celulares de referencia o muestras fijadas con formalina y resuspendidas en PBS-T con 1% P/V de leche descremada (PBS-TS) y se incuban 2 horas a 37° C. De cada complejo inmune se toman 100 µL que se colocan en la placa multipocillo que se incuba 30 minutos a 37° C. Después de tres pasos de lavado, se agregan 100 µL de IgG de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa (Sigma), diluida 1:5000 en PBS-TS y se incuba 1 hora a 37° C. Se hacen tres lavados más y se agregan 100 µL/pocillo del sustrato de la enzima (o-fenilendiamina dihidroclorhídrico 1 mg/mL, Sigma) y H_2O_2 al 30% (1 µl/mL) en buffer 0,1 M citrato fosfato de pH 5,0 por pocillo. La reacción se detiene al cabo de 15-20 minutos por adición de 50 µL por pocillo de ácido sulfúrico 2 M. La absorbancia se mide a 492 nm con lector de placa (SLT Rainbow).

La curva de referencia consiste en una serie de diluciones de la suspensión de células de *M. bovis* altamente piliadas que se realiza en cada ensayo. El nivel de piliación de estas células fue arbitrariamente fijado en 100%. Los valores de absorbancia se transforman por la función $\logit p$. El nivel de piliación de las células se determina por comparación entre el título obtenido para las muestras y el título obtenido para la suspensión de células de referencia (la inversa de la dilución de la suspensión de células de referencia que producen un 50% de inhibición):

$$P = \frac{M}{R} \times 100$$

P es el porcentaje de piliación de células en la muestra

M es el título de la muestra

R es el título de la suspensión de referencia

Para cada ensayo se preparan los siguientes controles: i) pocillos con PBS-TS sin bacterias; ii) pocillos con PBS-TS en lugar de antisuero; iii) pocillos sin IgG anticonejo conjugada con peroxidasa; y iv) pocillos con suero normal de conejo en lugar de suero antípili.

Los resultados de la estimación del porcentaje de población piliada por morfología de colonias de *M. bovis* 1194-03 creciendo en medio líquido en Erlenmeyers, son el producto del análisis de entre 4 y 8 ensayos independientes; los resultados de análisis del porcentaje de piliación por la técnica de ELISA en estos cultivos provienen del análisis de por lo menos 3 ensayos independientes.

La metodología utilizada para estudiar la estabilidad de la piliación en los repiques seriados en medios sólidos y líquidos fue la siguiente. En el caso de los cultivos en medio sólido se trabajó con cajas de TSA sangre realizando los repiques de células del borde y del centro de las colonias teñidas: piliadas, intermedias y no piliadas (18-24 horas de crecimiento) con ansa de platino; este proceso se repitió por quintuplicado, cada 18-24 horas durante 16 días en el caso de colonias piliadas e intermedias y 25 días en el caso de las no piliadas. Después de los repiques se levantan las colonias restantes y se realizan los ELISA.

Los pasajes seriados en medios líquidos se hacen en dos modalidades, en Erlenmeyers agitados y en Erlenmeyers estáticos, en ambos casos con *M. bovis* proveniente de colonias piliadas y no piliadas. Las bacterias se colectan al cumplirse las 12 horas de cultivo por centrifugación a baja velocidad; el precipitado formado se resuspende en 5 mL de BHI estéril y se inoculan Erlenmeyers con una cantidad suficiente como para que la absorbancia inicial esté entre 0,1-0,2. La suspensión bacteriana restante se utiliza para hacer el análisis de piliación por ELISA. Los cultivos en medios líquidos con agitación y estáticos se siguieron durante 4 pasajes. Los resultados que se muestran provienen del análisis de por lo menos 5 ensayos independientes.

Para completar este estudio se determina el porcentaje de piliación de bacterias provenientes de colonias piliadas, intermedias y no piliadas.

II. 3. 4. Detección de movilidad por *twitching* en aislados locales de *M. bovis*

Este ensayo se realizó siguiendo, con mínimas modificaciones, los procedimientos descritos por Alm y Mattick (1997). Se pican con ansa en aguja colonias piliadas y no piliadas de *M. bovis* 1194-03 que se inoculan entre la caja y el agar TSA sangre y se incuban toda la noche a 37° C; se repican 36 colonias por caja. La zona de movilidad por *twitching* se observa en la interfase agar-caja de Petri por tinción con azul de Coomassie. Los resultados que se muestran provienen del análisis de por lo menos 15 ensayos independientes.

II. 3. 5. Detección del gen de la pilina en aislados locales de *M. bovis*

Este proceso consta de varias etapas: i. selección y preparación de los *primers*; ii. preparación de un templado de ADN; iii. reacción de amplificación propiamente dicha; iv. análisis de los productos amplificados en gel de agarosa.

Selección y preparación de primers. Para la selección de los *primers* se recurre al banco de genes Gene Bank (1999). Se elige del genoma de *M. bovis* el gen de la pilina completo; se empleó el programa Blast para comparar el gen de interés con los genes de la pilina de *M. bovis* de distintas cepas y con el gen de la pilina de otras especies; se elige la región a amplificar. En nuestro caso la región a amplificar se eligió teniendo en cuenta dos criterios: que la región seleccionada fuera codificante y que fuera la más conservada del gen. Una vez seleccionado el segmento a amplificar se ingresan en el programa las condiciones de trabajo (temperatura y tiempo de los ciclos de amplificación) y se obtiene la secuencia de los *primers forward* y *reverse* que se piden a DNAgency. En este caso la secuencias de los *primers* seleccionados fueron para el *primer forward*: 5' GAA CGC TCA AAA AGG TTT CA 3' y para el *primer reverse*: 5' TTA CCC TCA AAG CAG C 3'. Una vez recibidos los *primers* se prepararon soluciones madres de trabajo de concentración 10 µM en agua bidestilada estéril y libre de RNAsa. Inicialmente la concentración de *primer forward* fue de 398 µM y la del *primer reverse* de 347 µM.

Preparación del templado de ADN. Se toman 2-3 colonias de un cultivo de 8-12 horas y se resuspenden en 100 μL de cloruro de sodio 1 M donde se mantienen durante 15 minutos luego se centrifugan 4 minutos a 10000 x g. El pellet se resuspende en 100 μL de agua bidestilada estéril y se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones. Una vez obtenido este nuevo pellet se resuspende en 100 μL de suspensión acuosa 6% P/V de resina Chelex 100 (Bio-RAD) y se centrifuga 2-3 minutos a 2500 x g, después se deja 20 minutos a 56° C y 8 minutos a 99° C, esta muestra se conserva a -20° C hasta el momento de efectuar la reacción de amplificación.

PCR (Polymerase Chain Reaction). Se prepara inicialmente una premezcla de reacción que consiste en *primers* específicos, buffer de la polimerasa (Tris-ClH 10 mM pH 9, KCl 50mM, Tritón X 100 0,1%), DNTPs 2 μM , agua H₂O bidestilada estéril, Taq polimerasa y MgCl₂ 25 μM en las cantidades que se muestran en la Tabla II.1. En el momento de realizar la PCR se prepara la mezcla de reacción con 15 μL de la premezcla y 5 μL de la muestra de ADN obtenida como se indica en Preparación del templado de ADN; además se le agrega aceite mineral. Esta preparación se coloca en el termociclador (UNO-Thermoblock Biometra) donde fue sometida a 35 ciclos de 15 minutos a 65° C y 8 minutos a 99° C.

Tabla II. 1. Detalle de la premezcla de reacción usada para PCR.

Mezcla de reacción	Volumen (μL)
Primers 10 μM	8
Buffer 10 μM	8
DNTPs 2 μM	8
H ₂ O bidestilada estéril completar el volumen	28
Taq polimerasa	2,8
MgCl ₂ 25 μM	4,8

Análisis de los productos amplificados en gel de agarosa. El gel se prepara en buffer TBE 1X (Tris base 10,8 g/L, ácido bórico 5,5 g/L, 4 mL EDTA 0,5 M pH 8,0). Se disuelven 1,5 g de agarosa (grado electroforético, Sigma) en buffer TBE para un volumen final de 100 mL. La suspensión se hierve en horno de microondas a máxima potencia (850 W) durante 2 minutos para lograr una solución homogénea. Una vez que alcanza aproximadamente los 45° C se le agrega 1 μL de bromuro de etidio 10 mg/mL que actuará

como revelador. La solución se vierte en el sistema portageles de una cuba Bio-Rad (Mini Sub DNA Cell). Una vez gelificado (45-60 minutos) se preparan las muestras agregándoles 2-5 μL de buffer de siembra (Promega) y se procede a la siembra de 8-10 μL por calle. La corrida de estos productos lleva 1-2 horas a 60 V (Fuente BioRad). Las bandas de amplificación se visualizan por trans-iluminación del gel con luz ultravioleta. En todos los geles se incluye un marcador de peso molecular que es el fago lambda (λ) digerido con las enzimas de restricción HindIII y EcoRI (fragmentos de restricción de un tamaño de 23,130; 9,416; 6,557; 4,361; 2,322; 2,027; 0,564 y 0,125 Kb). Los resultados que se muestran corresponden a 2 ensayos independientes de cada aislamiento de *M. bovis*.

II. 3. 6. Extracción y observación del perfil de plásmidos en aislados locales de *M. bovis*

La técnica empleada es la descrita por Sambrock y colaboradores (1992). Se toman de medio sólido colonias de 3 placas de un cultivo de 8-12 horas de crecimiento y se resuspenden en 750 μL de cloruro de magnesio 10%. A partir de esta suspensión madre se prepara otra de $\text{DO}_{650} = 10$. Para las bacterias de medio líquido se toman 10 mL de suspensión de distintas horas de crecimiento y se preparan también suspensiones de $\text{DO}_{650} = 10$. Una vez obtenidas las mismas se centrifugan 2 minutos a 10000 x g, se descarta el sobrenadante y se reemplaza por agua bidestilada para lavar, se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones y se descarta el sobrenadante. Al precipitado se le agregan 200 μL de Tris-CIH pH 7,5, 500 mM, se agita hasta resuspender y se agregan 200 μL de solución 1:1 de SDS 2% y NaOH 0,4 N, para lograr la lisis celular y se mezcla por inversión sin agitar durante 30 segundos. Se agrega 1 μL RNAsa 10 ng/mL dejándola actuar durante 5 minutos a 37° C y 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agregan 200 μL AcK 2,55 N, pH 4,8 para precipitar las proteínas, se deja actuar 5 minutos en hielo. Se centrifuga 10 minutos a 17000 x g y se separa cuidadosamente el sobrenadante al que se le agregan 500 μL de isopropanol para precipitar el ADN plasmídico. Se centrifuga 20 minutos a 17000 x g; se descarta el sobrenadante y se deja secar en estufa a 37° C. El precipitado seco se resuspende en 20 a 40 μL de agua bidestilada y 2 μL de buffer de corrida. Se siembran las muestras en un gel de agarosa al 0,5% preparado en buffer TBE 0,5% con el agregado de 1 μL de bromuro de etidio (Sigma) y se corren las muestras sembradas a 60 V durante 3-4 horas. Simultáneamente,

para determinar el tamaño de los plásmidos, se emplea fago λ cortado con las enzimas HindIII y EcoRI (los fragmentos de restricción obtenidos se mencionaron previamente). Las bandas de amplificación se visualizan por trans-iluminación del gel con luz ultravioleta y las fotos se toman con film Polaroid 665. Los resultados que se muestran coinciden con los obtenidos del análisis de por lo menos 6 ensayos independientes de cada aislamiento de *M. bovis*.

Con esta metodología se estudiaron los perfiles de plásmidos de distintos aislamientos de *M. bovis* piliadas y no piliadas provenientes de medios de cultivo sólido y distintas horas de cultivo líquido.

II. 3. 7. Actividad hemolítica en sobrenadantes de cultivos de aislados locales de *M. bovis*

Este ensayo se realizó siguiendo los procedimientos descritos por Beard y Moore (1994) que consisten en los siguientes pasos: i. preparación del sobrenadante de cultivo; ii. preparación de la sangre; iii. preparación de la mezcla de reacción.

i. Preparación del sobrenadante de cultivo. Los sobrenadantes se toman en distintos momentos del cultivo líquido (como se indica en cada experiencia), se centrifugan (Sorvall Instrument DuPont) 5 minutos a 4000 x g, se recupera el sobrenadante y se lo filtra con membrana de policarbonato de 0,22 μm (bajo pegado) (MSI Osmonics); el líquido así recolectado constituye la muestra de trabajo que se mantiene en hielo hasta el momento de su empleo.

ii. Preparación de la sangre. Se colectan 45 mL de sangre de camero con 5 mL de una solución 10% de citrato de sodio para evitar la coagulación. Se determina el porcentaje de glóbulos rojos por hematocrito (centrifugando en condiciones de refrigeración un capilar con sangre a 700 x g durante 10 minutos). Paralelamente se centrifuga una muestra de sangre a 4° C, 10 minutos a 1500 x g (Beckman Tj- 6) para obtener glóbulos rojos, después de esto se descarta el plasma, se lavan los glóbulos rojos con PBS estéril y se prepara una suspensión al 2% en buffer (140 mM ClNa, 10 mM HEPES (N-2-hidroxietil piperazina N-2-ácido etano sulfónico), 5 mM Cl₂Ca) de pH 7,2.

iii. Preparación de la mezcla de reacción. Esta mezcla se prepara en placas Maxisorp (Nunc, Dinamarca) de 96 pocillos donde se agregan 100 μL del sobrenadante de

cultivo a los pocillos 1 y 2 y desde el pocillo 2 en adelante 100 µL de buffer (ClNa, HEPES, Cl₂Ca) pH 7,2. Se mezcla, se pasan 100 µL del pocillo 2 al 3, donde se repite la operación para lograr diluciones 1:2 seriadas y obtener una curva de dilución de la hemolisina contenida en el sobrenadante de cultivo. Inmediatamente después se agrega a todos los pocillos 100 µL de los glóbulos rojos preparados anteriormente. Además se preparan los controles de 100% hemólisis que dará la máxima absorbancia y de 0% de hemólisis que dará la mínima absorbancia. En el primero se reemplaza la muestra por el mismo volumen de Tritón X-100 al 0,25%, que lisa los glóbulos rojos, y el de 0% de hemólisis se prepara calentando el sobrenadante a 60° C por 40 minutos lo que garantiza la inactivación de las enzimas hemolíticas. La mezcla de reacción se incuba 12-18 horas a 37° C después de lo cual se pasan 100 µL del sobrenadante de cada pocillo a otra placa donde se determina su absorbancia a 540 nm en un lector de placa (SLT Rainbow).

El porcentaje de hemólisis fue calculado por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{[(\text{Absorbancia muestra}) - (\text{Absorbancia blanco})]}{[(\text{Absorbancia control 100\%}) - (\text{Absorbancia control 0\%})]} \times 100$$

La unidad hemolítica es la actividad suficiente para causar el 25% de hemólisis bajo condiciones estándar. Los resultados que se muestran representan los obtenidos del análisis de por lo menos 4 cultivos independientes.

II. 3. 8. Análisis estadísticos

Se emplean los programas Microsoft Excel y Systat (Systat, Inc.).

II. 4. RESULTADOS

II. 4. 1. Caracterización bioquímica de bacterias aisladas de bovinos con QIB

Debido a la necesidad de confirmar si los aislamientos recibidos de INTA correspondían a *M. bovis* se hicieron ensayos bioquímicos empleando reacciones descritas en el Manual

Bergey (1986). Se estudiaron enzimas usadas típicamente para clasificar estas bacterias. En la Tabla II. 2. se muestran los resultados de las pruebas realizadas.

Tabla II. 2. Resultados de las pruebas bioquímicas efectuadas con distintos aislados de *M. bovis*.

Prueba / <i>M. bovis</i>	1194-03	1194-20	295-177	SC3	CM1b
Oxidasa	+	+	+ ^d	+	+
Catalasa	débil	débil	débil	débil	Débil
OF¹ glucosa	-	-	-	-	-
Reducción de Nitrato	-	-	-	-	-
Gelatinasa	+	-	+	-	+
Coagulasa	+	+	débil	débil	+
Ureasa	-	-	-	-	-
Hemolisis	+	+	+	+	+
Tinta China	-	-	-	-	-

+^d positivo débil

¹ Oxidación fermentación

M. bovis es oxidasa, catalasa, hemolisina, gelatinasa y coagulasa positiva; no oxida ni fermenta glucosa y es nitrato reductasa y ureasa negativa (Pugh *et al.*, 1966; Henriksen and Bøvre, 1968; Reyn, 1974; Bøvre, 1984; Ruehl, *et al.*, 1988; Alves Franco and Gil-Turnes, 1994); sin embargo, existen excepciones. Pugh *et al.*, (1966) y Henriksen y Bøvre (1968) observaron, independientemente, que junto a una mayoría de resultados positivos para la producción de catalasa había un pequeño grupo de cepas que mostraban reacción débil o negativa. En ese trabajo se encontró que todos los aislados tenían una débil producción de la enzima. Los aislamientos 1194-20 y SC3 mostraron ser gelatinasa negativos lo cual coincide con los resultados de Henriksen y Bøvre (1968), quienes en un extenso grupo de cepas encontraron unas pocas gelatinasa negativas. También se observó coincidencia con resultados reportados por Fraser y Gilmour (1979) que encontraron que de 7 cepas estudiadas 1 era gelatinasa negativa y con los de Alves Franco y Gil-Turnes (1994) que encontraron que de 12 cepas estudiadas, una era gelatinasa negativa. Asimismo, ha sido frecuentemente descrito que un mismo aislamiento de *M. bovis* puede ser hemolítico o no hemolítico (Reyn, 1974; Pugh *et al.*, 1966; Anuar and Wilcox, 1985;

Alves Franco *and* Gil-Turnes, 1994; Brown *et al.*, 1998; Billson *et al.*, 2000). Sin embargo, todas las cepas estudiadas aquí mostraron alta actividad hemolítica. En la Figura II. 3. se observan colonias piliadas y no piliadas de *M. bovis* con un marcado halo de hemólisis; estos resultados se observaron en todos los aislamientos estudiados.

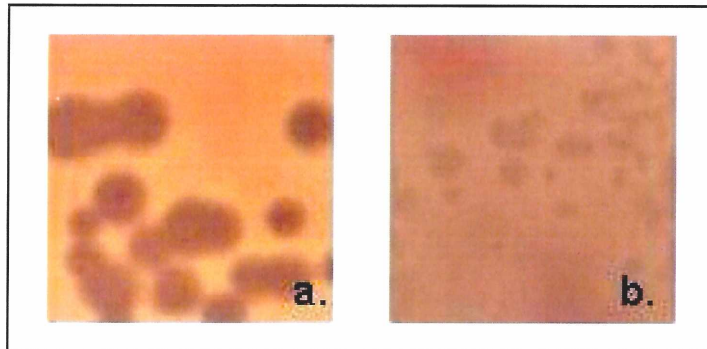


Figura II. 3. Hemólisis de *M. bovis* creciendo en medio sólido TSAB a las 18 horas, **a** colonias piliadas, **b** colonias no piliadas.

La tinción con tinta china fue negativa para todos los aislados de *M. bovis* estudiados; es decir no mostraron tener cápsula lo cual coincide con la bibliografía consultada (Bøvre *and* Froholm, 1972; Reyn, 1974).

Los resultados obtenidos nos permitieron confirmar que los aislados disponibles corresponden a *M. bovis*.

II. 4. 2. Evaluación de la piliación de aislados locales de *M. bovis*

En la Figura II. 4. se muestra la evolución de la piliación en cultivos de *M. bovis* en medio líquido en Erlenmeyers agitados evaluado por la técnica de ELISA; estos cultivos se iniciaron a partir de colonias seleccionadas como piliadas. Se observa que el porcentaje de piliación disminuye abruptamente entre las dos y las cinco horas de proceso.

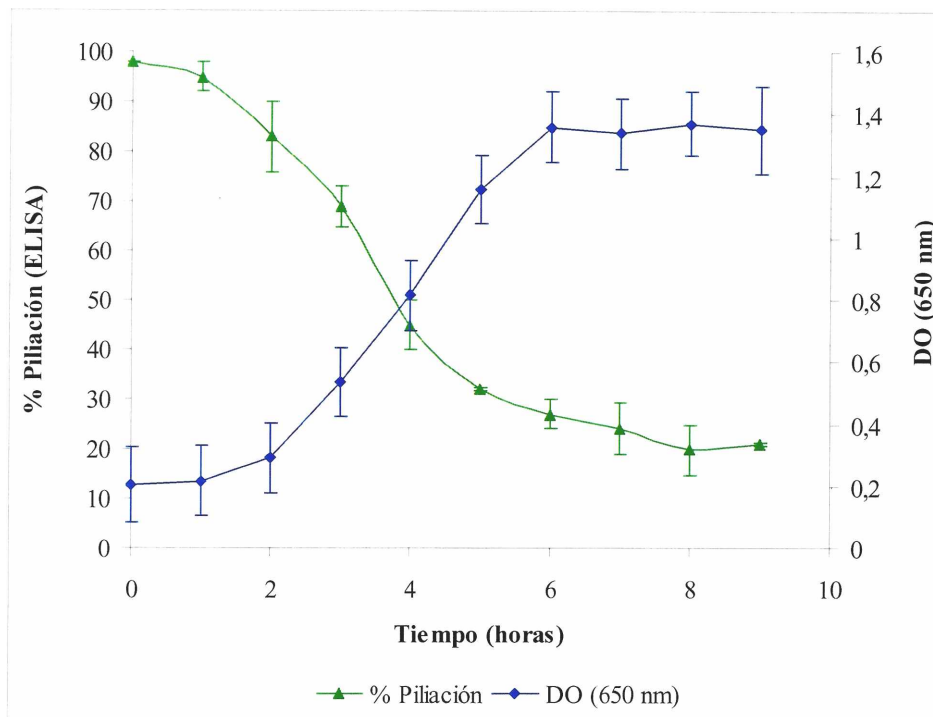


Figura II. 4. Evolución de la piliación y crecimiento de *M. bovis* 1194-03 piliada en cultivo en Erlenmeyer. Se evaluó la piliación por una técnica de ELISA (n=3) y el crecimiento por DO 650 nm (n=3).

La producción de vacunas exige como todo proceso fermentativo un escalamiento. A nuestro conocimiento, en el caso de vacunas nacionales contra QIB, las mismas se producen en biorreactores tipo tanque agitado en escalas de 100 a 200 L, o por cosecha de colonias en cultivos en medios sólidos. En ambos casos el escalado implica pasajes seriados ya sea en medios líquidos y/o sólidos. A efectos de determinar si dichos pasajes podrían ocasionar la modificación del fenotipo piliado de la población, se realizaron repiques en medio sólido partiendo de colonias piliadas, intermedias y no piliadas y se analizaron las características de las células resultantes de cada población al cabo de distintos pasajes. Los resultados mostraron que:

1. Cuando los repiques se inician a partir de una adecuada selección de colonias piliadas, se logra mantener el fenotipo piliado durante 5 pasajes. A partir del quinto repique se observa un porcentaje creciente de colonias intermedias y no piliadas en cada placa.

2. Cuando los repiques se inician a partir de colonias intermedias y el primer inóculo se toma del borde de una colonia intermedia (región de organismos piliados), se obtienen colonias piliadas que se mantienen hasta el quinto pasaje, lo cual es coincidente

con los resultados mostrados al repicar las colonias piliadas. Cuando, en cambio, se toma el inóculo del centro de la colonia intermedia, las colonias que se derivan en los repiques sucesivos son no piliadas.

3. Cuando los repiques se inician a partir de colonias no piliadas los repiques sucesivos dieron lugar a colonias de las mismas características que las originales. Raramente se observó la aparición de colonias intermedias y nunca se observó la aparición de reversión a colonias piliadas.

4. Las colonias piliadas, intermedias y no piliadas fueron analizadas por la técnica de ELISA. Esta prueba mostró que el porcentaje de piliación de las bacterias provenientes de colonias piliadas fue mayor al 95%, en tanto que el de las colonias intermedias estuvo entre el 8 y el 30%, y el de las bacterias provenientes de las colonias no piliadas fue inferior al 5%.

5. Los pasajes seriados realizados cada 12 horas en medio líquido con agitación, iniciados con bacterias piliadas mostraron que a partir del segundo pasaje no se detecta la presencia de piliación. Cuando los cultivos se iniciaron con bacterias no piliadas esta característica se mantuvo durante todos los subcultivos. El cultivo en medio líquido estático (sin aereación) de bacterias piliadas y no piliadas no mostró desarrollo.

II. 4. 3. Detección de movilidad por *twitching* en aislados locales de *M. bovis*

Esta prueba se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Alm y Mattick (1997). Para implementar esta prueba se sembró por punción un medio TSA sangre, el cual fue luego invertido e incubado a 37°C por 12 a 18 horas. Al cabo de este tiempo se observó una zona de movilidad por *twitching* en las colonias que crecían en la interfase agar-caja de Petri por tinción con azul de Coomasie. Las colonias piliadas se colorearon en el borde, lo cual indica que en esta zona de la colonia existen bacterias moviéndose por *twitching*. Las colonias intermedias mostraron coloración en los bordes pero en una franja más angosta y las colonias no piliadas no se colorearon; estos resultados se muestran esquemáticamente en la Figura II. 5.

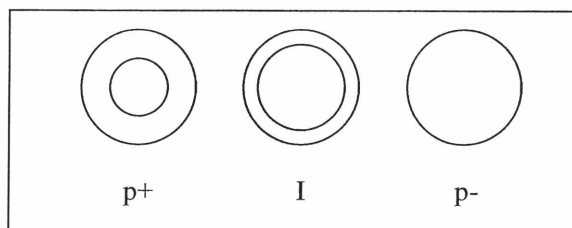


Figura II. 5. Esquema de zona de movilidad por *twitching* en colonias piliadas (p(+)), intermedias (I) y no piliadas (p(-)).

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Bøvre y Froholm (1972) quienes reportan que las colonias piliadas muestran en su periferia una zona de movilidad por *twitching*, que era más angosta en las colonias intermedias y no se presentaba en las colonias no piliadas. Ruehl y colaboradores (1988) describieron proyecciones en la periferia de las colonias piliadas compuestas por agregados de bacterias que a la observación microscópica mostraban movilidad por *twitching*; este fenómeno no se observó en las colonias no piliadas. Más tarde, Semmler y colaboradores (1999) encontraron que las colonias de *P. aeruginosa* (que poseen pili tipo IV al igual que *M. bovis*) también poseen zonas periféricas de movilidad por *twitching* que se observan como anillos concéntricos con una alta densidad de microcolonias. Estos resultados corroboran la presencia de piliación por otra metodología en aislados nacionales y tienen importancia para la selección de células piliadas en procesos de fabricación de vacunas.

II. 4. 4. Detección del gen de la pilina en aislados locales piliados y no piliados de *M. bovis*

A efectos de avanzar en el conocimiento de los mecanismos que podrían estar involucrados en la pérdida de piliación de *M. bovis* durante el crecimiento en medios líquidos, se analizó en primer lugar si el gen de la pilina, presente en la población piliada, se perdía en la población no piliada.

Una vez que se optimizó la metodología a emplear se preparó la mezcla de reacción y se tomaron las muestras como se indica en materiales y métodos. Como control negativo se utilizó una cepa de *Rhizobium sp.* (no contiene el gen de pilina). En la Figura II. 6. se muestran los resultados de la PCR de amplificación del gen de la pilina en *M. bovis* fenotipo CM1b piliado, y no piliado. Estos mismos resultados se repitieron en los 5 aislamientos estudiados por lo que se confirmó que el gen de la pilina está presente a nivel

cromosomal tanto en las bacterias piliadas como no piliadas de aislados locales de *M. bovis*.



Figura II. 6. Amplificación del gen de la pilina en *M. bovis* piliada y no piliada. **1.** *M. bovis* CM1b no piliada; **2.** *M. bovis* CM1b piliada; **3.** DNA *Rhizobium* (testigo sin el gen de la pilina); **4.** control de reactivos (muestra sin DNA).

II. 4. 5. Extracción y observación del perfil de plásmidos en aislados locales de *M. bovis*

Teniendo en cuenta que el gen de la pilina se encuentra tanto en la variante piliada como no piliada, se decidió analizar si el perfil de plásmidos presentaba diferencias entre estas dos variantes. Además, como la bibliografía analizada menciona la pérdida de plásmidos de otros organismos durante la fase exponencial de crecimiento en medios líquidos, especialmente si los plásmidos son de gran tamaño (Schurig, 1984), se analizó el perfil de plásmidos de bacterias piliadas creciendo en medio líquido.

El primer paso en este estudio fue poner a punto la técnica en lo referente a la cantidad de biomasa a emplear y la concentración de agarosa del gel de corrida.

i. Se ensayaron cantidades variables de biomasa: 1 mL de suspensión bacteriana de DO₆₅₀ 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 y 12,0; se determinó que para obtener una cantidad de plásmidos suficientes como para ser observados por tinción con bromuro de etidio se requería una DO₆₅₀ inicial de 10.

ii. Se ensayaron distintas concentraciones de agarosa: 0,5; 0,6; 0,75 y 1,0% P/V y se encontró que la que mejor resolvía los plásmidos de *M. bovis* era la de 0,5%. Este resultado está de acuerdo con el reportado por Wilt y colaboradores (1990), quienes

emplearon concentraciones de 0,45% de agarosa para el análisis de plásmidos completos y 0,6% para plásmidos cortados. Sin embargo, los grupos de Portnoy y Schurig en forma independiente utilizaron agarosa 0,75% (Portnoy *et al.*, 1981; Schurig *et al.*, 1984).

Luego, se hicieron las extracciones de plásmidos de aislados regionales de *M. bovis*: 1194-03, 1194-20, 295-177, SC₃ y CM₁b, tanto de variantes piliadas como no piliadas (Figura II. 7.). Se observó que el perfil de plásmidos fue similar tanto en los distintos aislamientos como entre las variantes piliadas y no piliadas. Nuestros resultados, coinciden con los de McDonald y Pugh (1986) que estudiaron 200 aislados de *M. bovis* y en todos ellos hallaron entre 1 y 6 plásmidos, más específicamente, en el 80% de los aislados encontraron 2 a 4 plásmidos y no encontraron relación entre el número de plásmidos y la piliación. También coinciden con los de Wilt y colaboradores (1989, 1990) que al estudiar tres aislamientos de *M. bovis* encontraron que dos de ellos contenían el mismo número de plásmidos en las formas piliadas y no piliadas. Estos resultados se oponen a lo observado por Schurig (1984), que encontró 3 plásmidos en las variantes patógenicas (fenotipo piliado) y 5 en las no patógenicas (fenotipo no piliado).

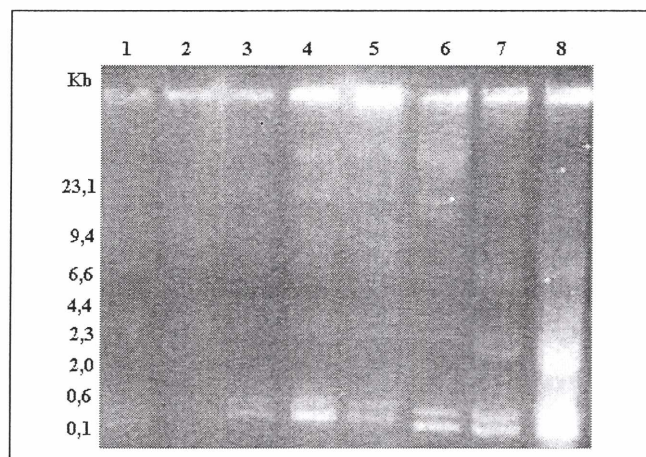


Figura II. 7. Perfil de plásmidos de aislamientos piliados y no piliados de *M. bovis*. Las poblaciones analizadas fueron obtenidas a partir de colonias seleccionadas en medio sólido 1. 1194-03 piliada, 2. 1194-03 no piliada, 3. 1194-20 piliada, 4. 1194-20 no piliada, 5. 295-177 piliada, 6. 295-177 no piliada, 7. SC₃ piliada, 8. CM₁b piliada.

En este estudio se encontró que los aislamientos locales de *M. bovis* presentan 7 plásmidos de: 48; 23,1; 7,2; 2,9; 2,1; 0,5 y 0,3 Kb. Estos resultados si bien no coinciden con los reportados previamente son muestra de la gran variabilidad en el patrón de plásmidos de *M. bovis* aisladas en distintas zonas geográficas. En relación con el tamaño

de los plásmidos Schurig (1984) reportó que variaban entre 4,54 y 60,61 Kb; McDonald y Pugh (1986) informaron que sus aislamientos oscilaban entre 3,94 y 121,21 Kb; Wilt y colaboradores (1989) que estaban entre 4,3 y 45 Kb y Vandergaast y Rosenbusch (1989) reportaron un único plásmido de 104 Kb.

A pesar de que las variantes piliadas y no piladas de *M. bovis* crecidas en medio sólido presentaban el mismo perfil de plásmidos se decidió estudiar si el número y tamaño de los plásmidos se modificaba durante el cultivo en medio líquido al crecer las células a mayor velocidad específica de crecimiento. Se analizaron células de *M. bovis* provenientes de distintas horas de cultivo en medio líquido BHI. Los resultados encontrados demostraron que tanto el número como el tipo de plásmidos se mantienen estables a lo largo de un cultivo líquido seguido hasta 24 horas de proceso (Figura II. 8.).

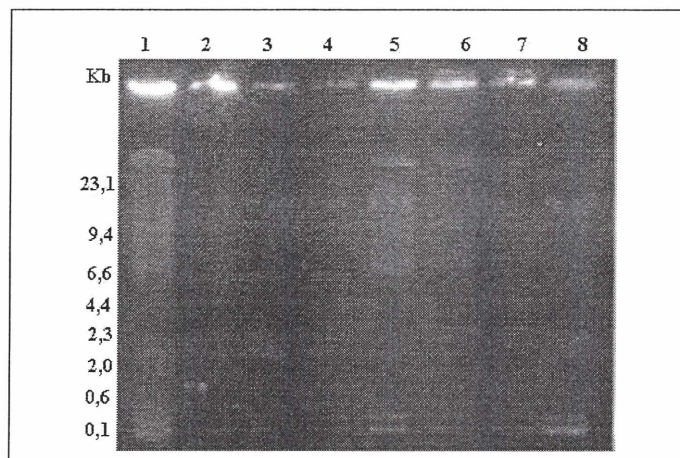


Figura II. 8. Perfil de plásmidos de *M. bovis* de distintos aislamientos piliados y de distintas horas de cultivo en medio líquido 1. 1194-03 2 horas, 2. 1194-03 8 horas, 3. 1194-20 4 horas, 4. 1194-20 24horas, 5. 295-177 6 horas, 6. SC₃ 4 horas, 7. SC₃ 24 horas, 8. CM₁b 24 horas.

II. 4. 6. Actividad hemolítica en sobrenadantes de cultivo de aislados locales de *M. bovis*

En la Figura II. 9. observamos la evolución de la actividad hemolítica en sobrenadantes de cultivo y la curva de crecimiento correspondiente a cada replicado tanto para una población piliada como para una no piliada. De acuerdo a estos resultados se puede observar que hay un pico de máxima actividad de hemolisina en la fase exponencial de crecimiento de *M. bovis*.

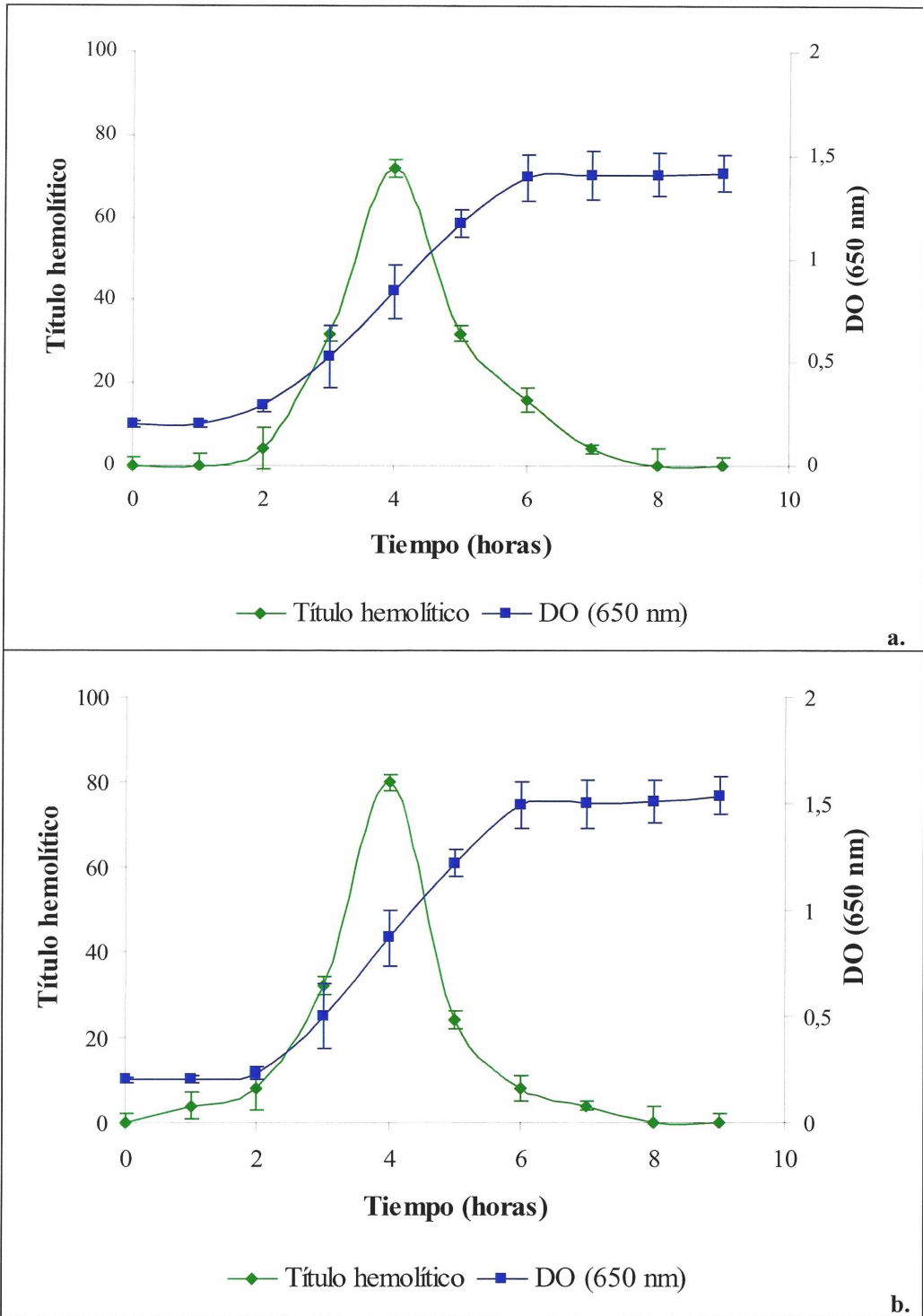


Figura II. 9. Evolución del título hemolítica en sobrenadante de cultivo y curva de crecimiento de *M. bovis* 1194-03 en Erlenmeyers agitados **a.** cultivo iniciado con bacterias piliadas; **b.** cultivo iniciado con bacterias no piliadas.

Estos resultados están en concordancia con los informados por Ostle y Rosenbusch (1984) y también por Leite y Gil-Turnes (1995) para otras cepas de *M. bovis* cultivadas en diferentes condiciones experimentales. Ostle y Rosenbusch (1984) reportan, además, que la producción de hemolisina continúa al menos hasta el final de la fase exponencial, cuando desaparece por degradación debida a la presencia de exotoxinas con actividad proteolítica en el sobrenadante de cultivo.

Intentos por mantener la actividad hemolítica en solución nos llevaron a ensayar el uso de agentes inhibidores de proteasas tales como EDTA y PMSF, pero los mismos si bien mostraban efectividad resultaron ser antieconómicos en el proceso productivo.

II. 5. DISCUSIÓN

La primera etapa del trabajo comenzó por una caracterización de aislados locales de organismos recuperados de lesiones de bovinos con diagnóstico de QIB. Estos aislados provenientes de la colección del INTA de Marcos Juárez fueron analizados mediante métodos bioquímicos de acuerdo con el Manual Bergey (1986). Como resultado de las pruebas efectuadas se confirmó que los mismos correspondían a *M. bovis*.

En cuanto a las experiencias tendientes a analizar las consecuencias de una selección inapropiada de colonias en el inicio del proceso industrial de producción de vacunas contra QIB encontramos, en nuestras condiciones experimentales, que cuando la selección de colonias se realiza apropiadamente (con conocimiento de las características morfológicas diferenciales de las distintas poblaciones) el fenotipo piliado se logra mantener hasta el quinto repique. A partir del quinto pasaje se empieza a observar un incremento en el número de colonias intermedias y no piliadas. En el caso de que el operador no seleccione adecuadamente las colonias, es decir que tome para la preparación de los inóculos colonias no piliadas, la consecuencia será que mantendrá el fenotipo no piliado en la expansión posterior, dando como resultado una vacuna constituída únicamente por células no piliadas. Algo similar ocurre si se repican colonias intermedias, inicialmente aparecerán algunas colonias intermedias y más tarde todas las colonias serán no piliadas. En el caso de las colonias intermedias sólo se podrán obtener bacterias piliadas si la muestra para el repique se toma del borde de la colonia. Al estudiar el crecimiento de

M. bovis en medio líquido se demuestra que en estos medios se produce pérdida de la piliación muy marcada, especialmente durante las primeras horas del cultivo.

Estos resultados son importantes porque la metodología empleada en el sector industrial para la producción de vacunas contra QIB consiste en iniciar los cultivos a partir de liofilizados, que son amplificados en medios de cultivo sólido para seleccionar las colonias piliadas que se usarán como inóculo de frascos agitados y posteriormente de reactores de producción. La realización de estas experiencias pone de manifiesto la importancia que tiene para la producción de la vacuna contra QIB una selección adecuada del fenotipo piliado en la etapa inicial del proceso de escalado en general y para la inoculación de los reactores en los que se producirán los organismos que integrarán la futura vacuna en particular. Afortunadamente la tinción con cristal violeta puede resultar de gran ayuda para la primera etapa de la producción, destinada a amplificar poblaciones, para los controles en procesos de producción y conservación. Aunque el tema de la selección de colonias parece trivial no era realizado por empresas nacionales de producción de vacunas contra QIB. Luego de que las mismas fueran alertadas del beneficio que esto traía para la producción, adoptaron este procedimiento como técnica de rutina dentro de un proceso productivo.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la existencia de variantes piliadas y no piliadas de un aislamiento de *M. bovis* no se relaciona con la presencia del gen de la pilina, ya que éste se encuentra en ambas variantes, de aislamientos obtenidos tanto de medio sólido como de medio líquido. Estos resultados se corresponden con los reportados por Marrs y colaboradores (1988) que indican que un rearrreglo genómico llevaría a la producción de variantes piliadas (incluso con distintos tipos de pili) y no piliadas de un mismo aislamiento.

Comparando nuestros resultados de determinación del perfil de plásmidos en aislados locales de *M. bovis* con los reportados por Schurig (1984), McDonald y Pugh (1986), Wilt (1989 y 1990) y Vandergaast y Rosenbusch (1989) se puede concluir en primer lugar que el número de plásmidos de *M. bovis* es variable dependiendo de la región geográfica y que en nuestro caso tanto el número como el tamaño de los mismos no presenta una relación directa con el fenotipo piliado. A pesar de esto resultó interesante determinar su presencia en aislados obtenidos de distintas regiones de Argentina porque los

mismos podrían ser empleados, a futuro, como herramienta epidemiológica para establecer un esquema de identificación de *M. bovis* a nivel nacional e internacional.

En estos estudios también se detectó que la actividad hemolítica en sobrenadantes de cultivos en medios líquidos de aislados locales de *M. bovis*, es máxima en la fase exponencial de crecimiento y que luego disminuye muy rápidamente. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ostle y Rosenbusch (1984), que postularon además, que la actividad hemolítica está asociada con vesículas unidas a la membrana externa liberadas por *M. bovis* durante la fase exponencial de crecimiento, resultados que fueron más tarde confirmados por Beard y Moore (1994). Por otra parte, es conocido que muchas bacterias Gram-negativas creciendo activamente liberan tales vesículas debido a la expansión de la membrana externa a una tasa de crecimiento más alta que la de la membrana más interna (Russell and McDonald, 1976; Beard and Moore, 1994). Estas vesículas están formadas en sitios de fusión entre la membrana interna y la membrana externa (Beard and Moore, 1994) entonces es posible que la actividad hemolítica esté asociada o que sea componente de la membrana o de la región periplásmica que queda atrapada dentro de la vesícula (Beard and Moore, 1994).

II. 6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos es posible arribar a las siguientes conclusiones:

1. Los análisis de la estabilidad de la piliación en medios de cultivo sólidos nos permiten afirmar que es posible mantener el fenotipo piliado de *M. bovis* creciendo en medio sólido durante un máximo de 5 pasajes, luego de lo cual el número de colonias intermedias y no piliadas aumenta. Las colonias no piliadas de *M. bovis* mantienen su fenotipo al ser repicadas en medio sólido.

2. En medios de cultivo líquido la variante piliada de *M. bovis* pierde el pili mostrándose no piliada en las pruebas de ELISA y morfología de colonia. La variante no piliada mantiene su fenotipo cuando es cultivada en medios líquidos.

3. Los resultados obtenidos por una técnica de ELISA demostraron que el porcentaje de piliación de las bacterias provenientes de colonias piliadas fue mayor al 95%,

el de las colonias intermedias entre el 8% y el 30% y el de las colonias no piliadas fue inferior al 5%.

4. Se observó movilidad por *twitching* en la zona de expansión de las colonias piliadas e intermedias, contrariamente no se observó este tipo de movilidad en las colonias no piliadas.

5. Se confirmó la presencia del gen de la pilina en variantes piliadas y no piliadas de distintos aislamientos locales de *M. bovis*.

6. El perfil de plásmidos presente en *M. bovis* se mantiene estable en todas las cepas estudiadas en sus variantes piliadas y no piliadas provenientes de medios de cultivo sólido y de distintos momentos de los cultivos en medios líquidos. El perfil de plásmidos de las cepas analizadas es diferente a los reportados en aislamientos de otras regiones geográficas.

7. Se observó que el título hemolítico en el sobrenadante de cultivos de *M. bovis* en Erlenmeyers muestra un pico durante la fase exponencial de crecimiento para luego disminuir rápidamente.

Estas conclusiones destacan los problemas asociados a la producción de la vacuna contra QIB donde los principales factores de virulencia (pili y hemolisina) se pierden en el curso de pasajes en medio sólido si no hay adecuada selección de colonias. Esto también ocurre en cultivos líquidos que son la forma tradicional de producción de biomasa a escala industrial.

II. 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alm, R. A.; J. S. Mattick. 1997. Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*, **192**:89-98.
- Alves Franco, M.; C. Gil-Turnes. 1994. Toxins of *Moraxella bovis*: effect on substrates and cells. *Reviews Microbiology*, **25**(4):235-238.
- Anderson, B. J.; M. M. Bills; J. R. Egerton; J. C. Mattick. 1984. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the structural subunit of *Bacteroides nodosus* fimbriae. *Journal of Bacteriology*, **160**:748-754.

- Angelos, J. A.; J. F. Hess; L. W. George. 2004. Prevention of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis with a recombinant *Moraxella bovis* cytotoxin-ISCOM matrix adjuvanted vaccine. *Vaccine*, **23**(4): 537-545.
- Annuar, B. O.; Wilcox G. E. 1985. Adherence of *Moraxella bovis* to cell cultures of bovine origin. *Research Veterinary Science*, **39**:241-246.
- Beard, M. K.; L. J. Moore. 1994. Reproduction of bovine keratoncojunctivitis with a purified haemolytic and cytotoxic fraction of *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology*, **42**:15-33.
- Bergey's manual of systematic bacteriology, 1986, vol. 1 Williams and Wilkins Co. Baltimore. N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.).
- Billson, F. M.; C. Harbour; W. P. Michalski; J. M. Tennent; J. R. Egerton; J. L. Hodgson. 2000. Characterization of hemolysin of *Moraxella bovis* using a hemolysis-neutralizing monoclonal antibody. *Infection and Immunity*, **68**:3469-3474.
- Billson, F. M.; J. L. Hodgson; J. R. Egerton; A. W. Lepper; W. P. Michalski; C. L. Schwartzkoff; P. R. Lehrbaer; J. M. Tennent. 1994. A hemolytic cell free preparation of *Moraxella bovis* confers protection against infectious bovine keratoconjunctivitis. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*, **124**:69-73.
- Bøvre, K.; 1984. Genus II. *Moraxella Lwoff 1939, 173 emend. Henriksen and Bøvre 1968, 391:296–303*. In: N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 1986 vol. 1 Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Bøvre, K.; L. O. Froholm. 1972. Variation of colony morphology reflecting fibrillation in *Moraxella bovis* and two reference strain of *M. nonliquefaciens*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, seccion B*, **80**:629-640.
- Brown, M. H., A. H. Brightman, B. W. Fenwick, M. A. Rider. 1998. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *Journal American Veterinary Medicine Association*, **12**:259-266.
- Conceição, F. R.; F. Paolicchi; A. L. Cobo; C. Gil-Turnes. 2003. Antigenic relationships of *Moraxella bovis* isolates recovered from outbreaks infectious bovine keratoconjunctivitis in Argentina, Brazil, and Uruguay between 1983 and 2000. *Canadian Journal of Veterinary Research* **67**(4):315-318.
- Cox, P. J.; J. S. Liddel; A. D. Mattinson. 1984. Infectious bovine keratoconjunctivitis: Isolation of *Moraxella bovis* from two groups of young beef cattle in fly control field trials during 1981. *The Veterinary Record*, **115**:29-32.
- Dybvig, K. 1993. DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, **10**:465-471.
- Fraser, J.; N. J. L. Gilmour. 1979. The identification of *Moraxella bovis* and *Neisseria ovis*. *Research Veterinary Science*, **27**:127-128
- Gene Bank. 1999. Broad Institute; Massachusetts Institute of Technology and Harvard University. www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi.
- George, L. W.; A. J. Borrowman; J. A. Angelos. 2005. Effectiveness of a cytolysin-enriched vaccine for protection of cattle against infectious bovine keratoconjunctivitis. *American Journal of Veterinary Research*, **66**(1):136-142.

- George, L. W.; J. A. Angelos; W. W. Ruehl. 2004. Stability, antigenicity, and aggregation of *Moraxella bovis* cytolysin after purification and storage. *American Journal of Veterinary Research*, **65**(7):977-983.
- Hallet, B. 2001. Playing Dr. Jekyll and Mr. Hyde: combined mechanisms of phase variation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **4**:570-581.
- Hallet, B.; D. J. Sherrat. 1997. Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangement. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*, **21**:157-178.
- Heinrichsen, J. 1983. Twitching motility. *Annual Review of Microbiology*, **37**:81-93.
- Henriksen J.; K. Bøvre. 1968. Genus II. *Moraxella*. The taxonomy of the genera *Moraxella* and *Neisseria*. *Journal of general Microbiology*, **51**, 387-392.
- Huges, D. E.; G. W. Pugh. 1970. A five-year study of infectious bovine keratoconjunctivitis in a beef herd. *Journal American Veterinary Medical Association*, **157**:443-451.
- Leite, F. P. L.; C. Gil-Turnes. 1995. Influence of culture media and air supply on the production of adhesins by *Moraxella bovis*. *Reviews Microbiology*, **26**:135-139.
- Lepper, A. W. D.; I. Barton. 1987. Infectious bovine keratoconjunctivitis: Seasonal variation in cultural, biochemical and immunoreactive properties of *Moraxella bovis* isolated from the eyes of cattle. *Australian Veterinary Journal*, **64**:33-39.
- Marrs, C. F.; W. W. Ruehl; G. K. Schoolnik; S. Falkow. 1988. Pilin gene phase variation of *Moraxella bovis* is caused by an inversion of the pilin genes. *Journal of Bacteriology*, **170**:3032-3039.
- McDonald, T. J.; G. W. Pugh. 1986. Plasmid profiles of *Moraxella bovis* isolates: *American Journal of Veterinary Research*, **47**:964-966.
- Meyer, T. F.; N. Mlawer; M. So. 1982. Pilus expression in *Neisseria gonorrhoeae* involves chromosomal rearrangement. *Cell*, **30**:45-52.
- Ostle, A.; R. F. Rosenbusch. 1984. *Moraxella bovis* hemolysin. *American Journal of Veterinary Research*, **45**:1848-1851.
- Pasloske, B.; B. Finlay; W. Paranchych. 1985. Cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Biochemistry/FEBS Letters*, **183**:408-412.
- Pedersen, K. B.; L. O. Froholm; K. Bøvre. 1972. Fimbriation and colony type of *Moraxella bovis* in relation to conjunctival colonization and development of keratoconjunctivitis in cattle. *Acta pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, **80**:911-918.
- Portnoy, D. A.; S. L. Mosebey; S. Falkow. 1981. Characterization of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infection and Immunity*, **31**:775-782.
- Prieto, C. I.; M. E. Rodriguez; A. Bosch; F. G. Chirido; O. M. Yantorno. 2003. Whole-bacterial cell enzyme-linked immunosorbent assay for cell-bound *Moraxella bovis* pili. *Veterinary Microbiology*, **91**:157-168.
- Pugh, G. W.; D. E. Hughes; T. J. McDonald. 1966. The isolation and characterization of *Moraxella bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, **27**(119):957-962.

- Raadsma, H. W.; T. J. O'Meara; J. R. Egerton; P. R. Lehrbach; C. L. Schwartzkoff. 1994. Protective antibody titres and antigenic competition in multivalent *Dichelobacter nodosus* fimbrial vaccines using characterized rDNA antigens. *Veterinary Immunology Immunopathology*, **40**:253-274.
- Reyn, A. 1974. Gram-negative cocci and coccobacilli. *Bergey's Manual of determinative Bacteriology*. Eight Edition. Buchanan, R. E., N. E. Gibbons Co-Editors.
- Ruehl, W.; C. F. Marrs; R. Fernandez; S. Falkow; G. K. Schoolnik. 1988. Purification, characterization, and pathogenicity of *Moraxella bovis* pili. *Journal of Experimental Medicine*, **168**:983-1002.
- Russell R. R.; McDonald IJ. 1976. Comparison of the cell envelope proteins of *Micrococcus cryophilus* with those of *Neisseria* and *Branhamella* species. *Canadian Journal of Microbiology*, **22**(2):309-12.
- Sambrock, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis. 1992. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sandhu, T. S.; F. H. White. 1977. Production and characterization of *Moraxella bovis* hemolysin. *American Journal of Veterinary Research*, **38**:883-885.
- Sandhu, T.; F. White; C. F. Simpson. 1974. Association of pili with rough colony type of *Moraxella bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, **35**:437-439.
- Sansonetti, P. J.; D. J. Kopecko; S. B. Formal. 1982. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infection and Immunity*, **35**:852-860.
- Schurig, G. G.; D. R. Lighthfoot; H. F. Troutt; B. I. Finkler. 1984. Genotypic, phenotypic, and biological characteristics of *Moraxella bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, **45**:35-39.
- Semmler, A. B. T.; C. B. Whitchurch; J. C. Mattick. 1999. A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, **145**:2863-2873.
- Takele, G.; A. Zerihun. 2000. Epidemiology of Infectious Keratoconjunctivitis in Cattle in South-east Ethiopia. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, **47**(3):169-173.
- Tennent, J. M.; J. C. Mattick. 1994. Type 4 fimbriae, in P Klemm (ed), *Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines*. CRC Press, 127-146.
- Vandergaast, N.; R. F. Rosenbusch. 1989. Infectious bovine Keratoconjunctivitis epizootic associated with the area-wide emergence of a new *Moraxella bovis* pilus type. *American Journal of Veterinary Research*, **50**(9):1437-1441.
- Wilcox, G. E. 1968. Infectious bovine keratoconjunctivitis: a review. *Veterinary Bulletin*, **38**:349-360.
- Wilt, G. R.; G. Wu, R. Curtis Bird. 1989. Characterization of the plasmids of *Moraxella bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, **50**:1678-1683.
- Wilt, G. R.; G. Wu; R. Curtis Bird; M. Toivio-Kinnucan. 1990. Plasmid content of piliated and nonpiliated forms of *Moraxella bovis*. *American Journal of Veterinary Research*, **51**:171-173.

Capítulo III

CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES DE SUPERFICIE DE POBLACIONES PILIADAS Y NO PILIADAS DE *MORAXELLA BOVIS*

III. 1. INTRODUCCIÓN

El estudio de las propiedades de superficie de las bacterias en general y de los patógenos en particular reviste un gran interés debido a que es a través de sus cubiertas que los organismos se relacionan con el medioambiente, con otras bacterias y con sus hospedadores. Características de cubierta tales como propiedades fisicoquímicas de superficie de bacterias están involucradas en la adherencia de las mismas a superficies bióticas y abióticas y en la formación de biofilms (Gallardo-Moreno *et al.*, 2002; 2003).

Las características fisicoquímicas de superficie bacteriana han sido evaluadas principalmente por medidas de hidrofobicidad y movilidad electroforética (Busscher *et al.*, 1993; Greertsema-Doombusch *et al.*, 1993; Gilbert *et al.*, 1993; Crow *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 1998). Se ha señalado que tanto la hidrofobicidad como la carga neta de superficie pueden influir en las interacciones iniciales entre bacterias (Gordon *and* Millero, 1984; van Loosdrecht *et al.*, 1987a; 1987b; 1987c; Stentrom, 1989), bacterias y células eucariotas (Kihlstrom *and* Magnusson, 1983; Walan *and* Kihlstrom, 1988), entre bacterias y fagocitos (Absolom, 1988) y bacterias y macromoléculas libres (Absolom, 1988; Makin *and* Beveridge, 1996). La cadena de polisacárido O de los LPS ha mostrado ser un determinante importante de las propiedades no específicas de superficie y su pérdida puede alterar dramáticamente la carga de superficie y el carácter hidrofóbico de la superficie de células Gram-negativas (Palomar *et al.*, 1995, Makin *and* Beveridge, 1996).

Entre las propiedades de superficie se encuentran la capacidad de autoaglutinación, el potencial zeta, la adhesión a hidrocarburos y la adhesión a soportes abióticos. También

influyen en estas propiedades las características de las proteínas de membrana externa (PME) y de los lipopolisacáridos (LPS).

La autoaglutinación es la capacidad de una población bacteriana de formar grumos o agregados visibles lo cual puede evaluarse en medios líquidos mediante el uso de microscopía. Aunque las referencias bibliográficas relacionadas a la autoaglutinación bacteriana se basaron durante mucho tiempo en la observación a directa, se demostró que una descripción cuantitativa confiere mayor significancia y permite un campo de comparación más amplio. Por esto es que las diferencias en esta propiedad entre especies o cepas bacterianas se determina cuantitativamente mediante el índice de autoaglutinación (IA) y el tiempo de autoaglutinación (TA) (Pérez *et al.*, 1998).

El potencial zeta (también llamado electrocinético) permite determinar la carga neta de la superficie bacteriana. Se han descrito diferentes maneras de obtener información sobre las cargas electrostáticas entre ellas el potencial zeta que es un procedimiento confiable de comparación para diferentes bacterias (van Loosdrech, 1987; Mozes *and* Rouxhet, 1990). Existen métodos cuantitativos que permiten medir el potencial electrocinético de una superficie, sin embargo, éstos son experimentalmente difíciles de llevar a cabo. El grado de electronegatividad periférico influye en la polaridad de la superficie celular, de allí que la interfase formada entre la envoltura celular externa y el medio ambiente extracelular tengan un rol particularmente importante en la fisiología de superficie. En general, la superficie de las células posee carga electrostática neta negativa debido a la ionización de los sustituyentes fosfato y carboxilato de las macromoléculas de la envoltura celular externa, las cuales están expuestas al medio ambiente (Wilson *et al.*, 2001). Esta carga negativa de superficie es contrabalaceada por iones de la carga opuesta cuya concentración decrece a medida que aumenta la distancia desde la superficie formando una doble capa difusa. La delgadez de esta capa está determinada por la fuerza iónica del medio de suspensión y el balance de las contraiones, así el potencial zeta de una bacteria está definido como el potencial localizado en la doble capa difusa (Harkes *et al.*, 1992).

En el proceso de adhesión de una bacteria a hidrocarburos la hidrofobicidad bacteriana resulta ser de suma importancia (Vanhaecke *and* Pina, 1988). Doyle y Rosenberg (1992) reportaron que la hidrofobicidad es la tendencia de un microorganismo a adherirse mejor a hidrocarburos o a sustratos no polares que al agua. Se han descrito varias

técnicas para medir la hidrofobicidad entre las que se incluyen la cromatografía de interacción hidrofóbica, pruebas de agregación por sales, medidas de ángulos de contacto (Reid *et al.*, 1992) y medida de adhesión a hidrocarburos (MATH). La última de estas técnicas diseñada por Rosenberg y colaboradores (1980) es ampliamente utilizada en la actualidad debido a su simplicidad (Vanhaecke *and* Pina, 1988). La adhesión ya sea a hidrocarburos en suspensión acuosa o a superficies abióticas es siempre el resultado de la interacción de diversos factores involucrados en el proceso; no solamente componentes hidrofóbicos o hidrofílicos de superficie sino también las interacciones de carga electrostática y las propiedades estructurales de la superficie de la célula (Van der Mei *and* Busscher, 2001).

La adhesión bacteriana a soportes abióticos es importante en áreas tan distintas como salud humana (Murga *et al.*, 2001; Kodjikian *et al.*, 2002), producción de alimentos donde *P. aeruginosa*, *Shewanella putrefaciens* y *Listeria monocytogenes* pueden contaminar las superficies y los equipos donde se elaboran, fraccionan y envasan distintos tipos de alimentos (Bagge *et al.*, 2001), el transporte de líquidos donde las bacterias sulfito reductoras pueden causar corrosión en superficies como cañerías, buques, etc. (Little *et al.*, 1998). La adherencia bacteriana a distintos materiales se debe a una combinación de factores entre ellos las características fisicoquímicas de la superficie abiótica y las propiedades de superficie de las bacterias. En general los materiales pueden ser divididos en dos clases principales. i. materiales de alta energía, hidrofílicos usualmente de carga negativa, por ejemplo materiales inorgánicos como vidrio, metales o minerales; y ii. materiales de baja energía relativamente hidrofóbicos, de baja carga electrostática, entre los cuales se incluyen por ejemplo polímeros orgánicos como los plásticos. La adhesión de células a sustratos es un proceso de varios pasos, que involucra el contacto de la célula con la superficie y se ve afectado por la estructura y composición de la membrana celular y por la interacción entre fases (van Loosdrecht *et al.*, 1990). Kim y Frank (1994) muestran que esta adhesión resulta de complejas interacciones fisicoquímicas entre la célula, la superficie y la fase líquida en que están inmersas. En muchos casos las interacciones son mediadas por apéndices de la superficie celular (como pili tipo IV), la hidrofobicidad (van Loosdrecht, 1987), las propiedades de aceptor o donante de electrones (Briandet *et al.*, 1999) y por la carga neta de superficie de las células (Dickson *and* Koohmaraie, 1989).

En referencia a proteínas de cubierta celular, gran variedad de estudios, como los de Gallot-Lavellee y colaboradores (1995) reportan que las PME varían con la fase de crecimiento en *Brucella melitensis*. Hernandez y colaboradores (1998) encuentran que la incubación de *Escherichia hermannii* con trazas de distintos metales puede producir cambios en el perfil de PME. Inzana y Pichichero (1984) encuentran que pueden detectarse variaciones en las PME de una misma cepa de *Haemophilus influenza* cuando las proteínas son extraídas con diferentes detergentes o por diferentes técnicas y también cuando las bacterias son cosechadas en distintos estadios de crecimiento o cuando son calentadas antes de la siembra por períodos de tiempo diferentes. Todo esto coincide con los resultados reportados para este mismo microorganismo por Barenkamp y colaboradores (1981), Loeb y Smith (1980) y Van Alphen y colaboradores (1983).

Los LPS son componentes característicos de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas que envuelven la superficie bacteriana con una fuerte propiedad hidrofílica, importante en la evasión de la fagocitosis y que además proveen cierta protección contra el complemento y capacidad para evitar el ataque inmunológico específico, mediante modificaciones del antígeno de superficie (Taylor, 1983; Nikaido and Vaara, 1985). Los LPS han sido estudiados en gran número de bacterias Gram-negativas (Lüderitz *et al.*, 1973). Estudios llevados a cabo en *V. cholerae* (Gupta *et al.*, 1992), *M. catarrhalis* (Robbins and Scheerson, 1990; Gu *et al.*, 1998), *Salmonella typhimurium* (Svenson and Lindberg, 1981), *M. glucidolytica* (Horisberger and Dentan, 1980) y otros patógenos muestran que los polisacáridos (PS) provenientes de la cápsula bacteriana o de su LPS o de las proteínas conjugadas con LPS son usualmente efectivos en la colonización de sustratos. Además demuestran propiedades como inmunógenos por lo cual para la producción de ciertas vacunas se hace necesario incluirlos en las formulaciones. Se ha reportado el aislamiento y caracterización del LPS de *M. bovis* por cromatografía en papel y líquida y por espectrometría de masa y se halló que contenía una pequeña cantidad de proteína junto a ácido 2-ceto-deoxioctónico, glucosa, manosa, glucosamina, heptosa y fosfato, ácidos grasos (palmítico, palmitoleico, margarico, esteárico, oleico y araquídico) (Araujo *et al.*, 1989).

A nuestro conocimiento, en el momento de realizar estas experiencias no existían en bibliografía descripciones de las propiedades de cubierta de *M. bovis*. La caracterización de estas propiedades en poblaciones de *M. bovis* piliadas y no piliadas permitiría establecer

si existen diferencias entre células de las diferentes variantes fenotípicas y progresar en el conocimiento de la interacción entre estas bacterias y la superficie del ojo del bovino infectado.

III. 2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la importancia de avanzar en el conocimiento de las propiedades de superficie de *M. bovis* los objetivos que nos planteamos aquí estuvieron dirigidos a caracterizar distintas propiedades de superficie tanto de células piliadas como de no piliadas. En concreto los objetivos específicos fueron los siguientes:

1. Determinar si existen diferencias entre poblaciones piliadas y no piliadas de *M. bovis* en relación con a. índice y tiempo de autoaglutinación; b. potencial zeta determinado mediante pruebas de movilidad electroforética y; c. adhesión a hidrocarburos (octano y hexadecano); d. adhesión microbiana a soportes abióticos (vidrio y polipropileno).

2. Caracterizar el perfil de PME y de LPS de poblaciones piliadas y no piliadas de *M. bovis* provenientes de medios de cultivo sólido y durante el crecimiento en medios líquidos.

3. Correlacionar, si es posible, el porcentaje de piliación determinado por una técnica de ELISA con las características fisicoquímicas de superficie de *M. bovis*.

III. 3. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 3. 1. Organismos, medios y condiciones de cultivo

Organismos. En todas las experiencias se empleó *M. bovis* 1194-03 piliada y no piliada. En el caso del análisis de perfiles de PME se trabajó además con *M. bovis* 1194-20 piliada y no piliada y en el caso del análisis del perfil de LPS se empleó *M. bovis* 1194-03 piliada y no piliada, 1194-20 piliada y no piliada y las variantes piliadas de los aislados 295-177, SC3 y CM1b.

Medios y condiciones de cultivo. Se emplearon los mismos medios y condiciones de cultivo que se describieron en el Capítulo II para medios sólidos y líquidos en

Erlenmeyer y además se prepararon muestras de *M. bovis* piliada proveniente de medio de cultivo sólido que fueron tratadas por agitación en vortex a máxima velocidad.

III. 3. 2. Determinación de la piliación de *M. bovis*

Para determinar el nivel de piliación de suspensiones celulares se empleó la técnica de ELISA que se describió en el Capítulo II (Prieto *et al.*, 2003).

III. 3. 3. Propiedades de superficie de *M. bovis*

a. *Índice y tiempo de autoaglutinación.* Índice de autoaglutinación (IA). Esta determinación se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita por Pérez y colaboradores (1998) con mínimas modificaciones. Se emplearon suspensiones celulares de *M. bovis* piliada y no piliada obtenidas a partir de colonias seleccionadas de 5 cajas de cultivo en medio sólido de 18-24 horas. Las colonias se resuspendieron en 10 mL de H₂O destilada estéril. Se agitó manualmente hasta obtener una suspensión homogénea y se dividieron las muestras en dos alícuotas de 5 mL. Una de ellas se centrifugó y se llevó el pellet a estufa de 100° C hasta peso constante; la otra se utilizó para evaluar la DO₆₅₀ en espectrofotómetro (UV-visible Pye Unicam SP6-250) cada 20 minutos hasta que permaneció constante. En el caso de los cultivos líquidos de *M. bovis* se tomaron muestras de 10 mL cada 1 hora, se lavaron 2 veces durante 5 minutos a 4000 x g a 4° C (centrífuga Sorvall Instrument DuPont) y las células se resuspendieron en 10 mL de H₂O destilada estéril, esta operación se repitió 2 veces.

El índice de autoaglutinación se calculó empleando la siguiente expresión:

$$IA = \frac{\text{Peso seco (mg / mL)}}{DO_{650}}$$

DO₆₅₀ es la densidad óptica al tiempo en que la misma se hace constante.

Esta determinación se hace por triplicado en cada proceso y los procesos se repiten 5 veces para *M. bovis* piliada y 3 veces para *M. bovis* no piliada.

Tiempo de autoaglutinación o autoagregación (TA). Se calculó el tiempo de autoaglutinación de células de *M. bovis* piliada y no piliada proveniente de medios de

cultivo sólido y de distintas horas de cultivo en medio líquido. En el caso de los cultivos en medio sólido se resuspendieron las células colectadas de 5 cajas de cultivos de 18-24 horas en 10 mL de H₂O destilada estéril, se agitaron manualmente hasta obtener una suspensión homogénea cuya DO₆₅₀ se ajustó entre 2,0 y 2,5. En el caso de los cultivos de *M. bovis* en medio líquido se tomaron muestras de 10 mL a intervalos regulares de 1 hora, se lavaron 2 veces durante 5 minutos a 4000 x g a 4° C en centrífuga (Sorvall Instrument DuPont) y se ajustó la DO de las suspensiones entre 2,0 y 2,5. Se colocaron 1,5 mL de cada suspensión en una cubeta y se evaluó el cambio en la turbidez a intervalos regulares de 10 a 20 minutos hasta que la DO permaneció constante. El procedimiento se repitió con diluciones de la suspensión original (muestra original y cuatro diluciones en los casos de *M. bovis* piliada y muestra original y tres diluciones en los casos de *M. bovis* no piliada).

Los cambios en la turbidez de una suspensión que sedimenta espontáneamente pueden ser monitoreados en función del tiempo, a partir de los cambios relativos en la sedimentación mediante la siguiente expresión (Bibiloni, 2001):

$$DO_{rel} = \left[\frac{(DO_t - DO_i)}{(DO_{sat} - DO_i)} \right]$$

DO_t es la turbidez de una muestra a un tiempo dado

DO_i es la turbidez inicial de la muestra

DO_{sat} es la turbidez de saturación obtenida a tiempo infinito (largos tiempos).

Se grafican los datos obtenidos: i. DO en función del tiempo de sedimentación y ii. (DO_t-DO_i) en función del tiempo. Finalmente, se calcula la DO_{rel} a cada tiempo, utilizando la expresión indicada arriba, donde DO_{sat} se obtiene del gráfico i. en el punto donde las curvas se unen, que es el punto de mínima DO alcanzada por el cultivo y se representa la variación de DO_{rel} en función del tiempo para cada dilución. Es importante notar que a partir de una determinada dilución las curvas se superponen. En esas condiciones se puede determinar el TA como el tiempo en el que la absorbancia relativa alcanza el 50% del valor de DO_{rel}, independientemente de la dilución (Bibiloni, 2001). Esta determinación se hace por duplicado en cada proceso y los procesos se repiten 4 veces para *M. bovis* piliada y 3 veces para *M. bovis* no piliada.

b. *Movilidad electroforética y potencial zeta*⁶. Para determinar la movilidad electroforética y el potencial zeta se utilizó la técnica descrita por Pérez y colaboradores (1998) con mínimas modificaciones. Se colectan muestras de *M. bovis* piliada y no piliada proveniente de cultivos de 18-24 horas en medio sólido y de distintos momentos del cultivo en medio líquido en Erlenmeyers agitados (0; 2; 4; 6 y 8 horas), se lavan 2 veces por centrifugación durante 5 minutos a 4000 x g a 4° C en centrífuga (Sorvall Instrument DuPont). El pellet obtenido de esta manera se resuspende en un volumen de agua destilada tal que permita alcanzar una DO inicial de 1. En el momento de la determinación se diluye la suspensión hasta un volumen final de 20 mL (DO ~ 0,05) que se usa para cargar una celda en forma de H con una región capilar con cámara de conteo. Las experiencias se hacen a temperatura constante de 20° C. En la región capilar se encuentra adosado un microscopio y en los extremos de la celda en H se encuentran los electrodos de platino que están unidos a una fuente en la que se fijó el voltaje en 40 V. Se realizaron al menos 40 determinaciones. Cada determinación se hace con un pulsador, que se encuentra unido al equipo, y que se usa para cronometrar el tiempo que le toma a una bacteria con movimiento rectilíneo uniforme (observada con el microscopio) atravesar un campo de la cámara de conteo. Estas determinaciones de movilidad electroforética se cargan automáticamente en la memoria del equipo, que proporciona el promedio y la desviación estándar de cada grupo de datos y además calcula el potencial zeta (ζ) con la siguiente ecuación:

$$\xi = \frac{4 \times \pi \times \eta \times \mu}{\epsilon}$$

η es la viscosidad del medio

μ es la movilidad electroforética

ϵ es la constante dieléctrica de la solución (Pérez *et al.*, 1998).

c. *Adhesión a hidrocarburos*. Se usa la técnica descrita por Doyle y Rosenberg (1992). Antes de analizar la adhesión a hidrocarburos se realizaron estudios preliminares en relación con la ruptura de células.

⁶ Estos estudios se llevaron a cabo en la Cátedra de Química General e Inorgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires en colaboración con el equipo del Dr. Disalvo.

Estudios preliminares sobre ruptura de células. Un aspecto importante, previo a la determinación de la adhesión a hidrocarburos, es establecer si el hidrocarburo a utilizar produce ruptura celular de relevancia que pueda afectar la determinación de manera significativa. Por ejemplo, se ha establecido que se produce una marcada reducción en las tasas de supervivencia y daños en la superficie celular en poblaciones bacterianas expuestas a dodecano en diferentes pruebas de MATH (Pembrey *et al.*, 1999). Vanhaecke y Pijck (1988) hallaron evidencias de lisis celular en un estudio en el cual 10 cepas de diferentes bacterias Gram-negativas fueron expuestas a hexadecano, octano y xileno. En nuestro caso, se estudió la posibilidad de ruptura de células procesadas en distintas condiciones, teniendo en cuenta que los protocolos usados pueden modificar significativamente las propiedades de superficie celular en una manera que depende del tipo de medio de lavado y de resuspensión empleados, tipo de tratamiento y de la naturaleza del microorganismo (Pembrey *et al.*, 1999). Con el fin de analizar si en estas condiciones experimentales se producía ruptura de células se analizaron suspensiones de *M. bovis* que fueron tratadas con i. hidrocarburos (hexadecano y octano), ii. solución de lavado (H_2O) y iii. solución de resuspensión ($MgCl_2$). Paralelamente, se preparó una suspensión de *M. bovis* en hidróxido de sodio (NaOH) que se usó como control positivo de ruptura celular. Las bacterias usadas en estas experiencias se colectaron de medio sólido de 18-24 horas de crecimiento, se resuspendieron 5 mL de cada una de las distintas soluciones mencionadas, se agitaron 10 segundos a baja velocidad y se determinó la absorbancia de las suspensiones en un rango de longitudes de onda entre 200 y 400 nm (en el que absorben distintos componentes celulares). Por otra parte, se prepararon los blancos de cada suspensión con el solvente usado en cada caso y sin bacterias. La Figura III. 1. muestra los espectros de absorción obtenidos luego del tratamiento de suspensiones de *M. bovis* con distintos solventes y su correspondiente blanco sin bacterias. Estas experiencias, como fue mencionado, se hicieron con el objeto de descartar que el solvente a usar en las pruebas de hidrofobicidad produjera ruptura celular.

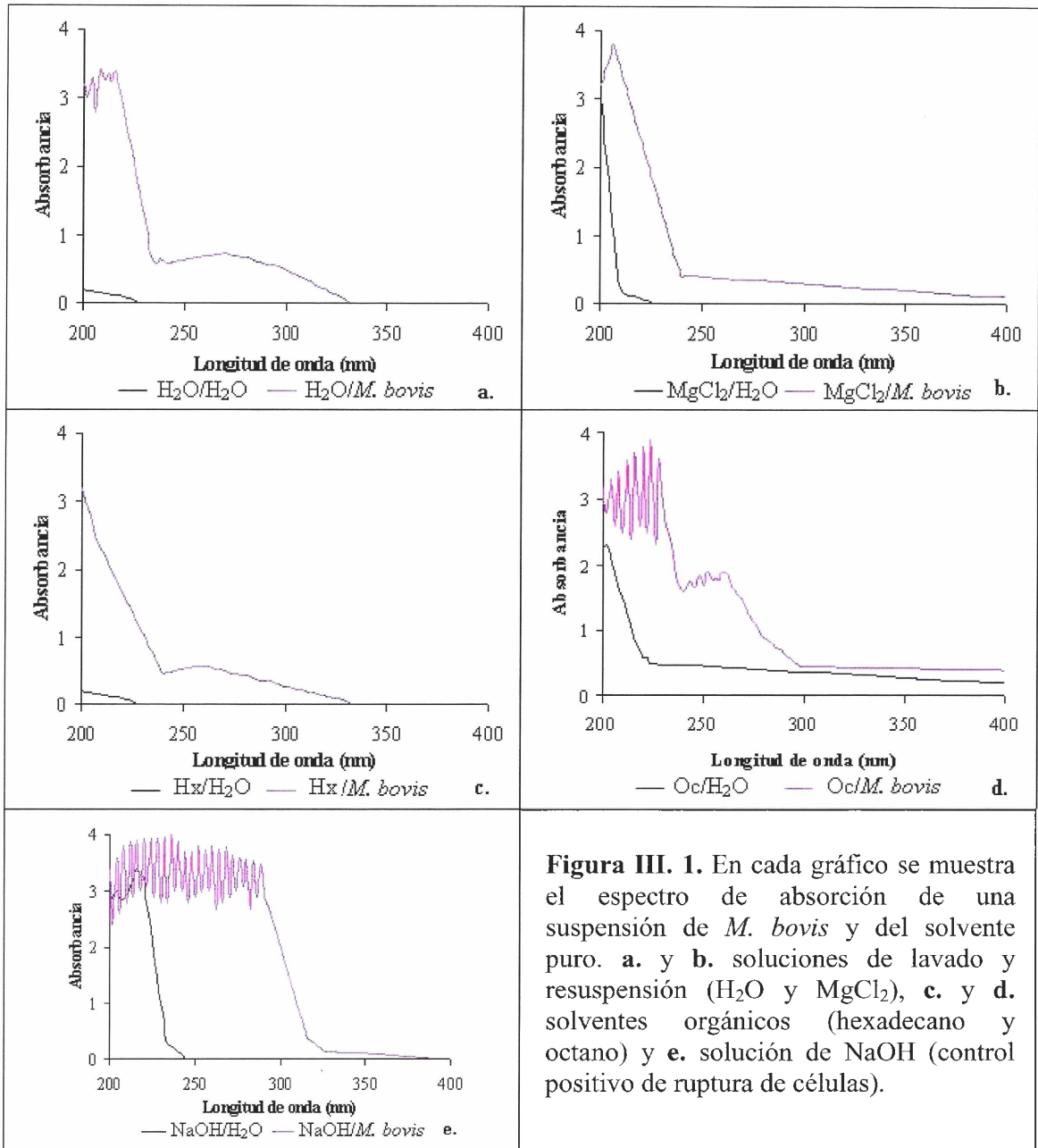


Figura III. 1. En cada gráfico se muestra el espectro de absorción de una suspensión de *M. bovis* y del solvente puro. **a.** y **b.** soluciones de lavado y resuspensión (H₂O y MgCl₂), **c.** y **d.** solventes orgánicos (hexadecano y octano) y **e.** solución de NaOH (control positivo de ruptura de células).

De acuerdo con estos estudios se pudo establecer que la solución de cloruro de magnesio produce menor ruptura celular que el agua (Figura III. 1. a. y b.). Además, es importante recordar que la solución de cloruro de magnesio evita la autoaglutinación, facilitando la obtención de suspensiones homogéneas, que son más fáciles de manejar y que producen resultados más precisos y exactos. Por otra parte, de la Figura III. 1. c. y d se concluye que mientras que el octano produce ruptura celular, similar a la observada con el

control positivo (Figura III. 1. e.), el hexadecano no produce cambios drásticos en la integridad celular. Teniendo en cuenta estos resultados es que para los estudios de hidrofobicidad se usó como solución de lavado y resuspensión una solución de $MgCl_2$ y como hidrocarburo para determinar la hidrofobicidad el hexadecano.

Ensayo de adhesión a hidrocarburos (MATH). Se prepararon suspensiones de *M. bovis* piliada y no piliada en $MgCl_2$ a partir de colonias seleccionadas de 5-7 cajas de cultivo en medio sólido de 18-24 horas. Se lavaron 2 veces 5 minutos a $4000 \times g$ y $4^\circ C$ en centrífuga (Sorvall) y se llevaron a una DO_{650} 0,8-1,0 en $MgCl_2$. Las suspensiones de *M. bovis* de medio líquido se tomaron regularmente de cultivos cada 2 horas, se lava 2 veces en las mismas condiciones que las de medio sólido y se llevaron a la misma absorbancia.

Se preparan 3 grupos de 16 tubos de vidrio cada uno con distintas proporciones de solvente : suspensión (1/2, 1/3 y 1/6). En cada uno de los tubos se agrega primero la suspensión bacteriana y después el hidrocarburo. Dentro de cada grupo los tubos son agitados en un vortex por un tiempo creciente que varía entre 0 y 180 segundos (cada 5-10 segundos). Luego de la agitación se dejaron los tubos en reposo hasta que las fases se separaron (15-20 minutos) y se extrae la fase inferior acuosa -evitando en todo momento contaminación con la fase superior orgánica- con micropipeta o con pipeta Pasteur y se transfiere a una cubeta para medir la DO_{650} en espectrofotómetro (Beckman DU-650, Beckman Co. IL). La turbidez de cada dilución preparada con la proporción correspondiente de hexadecano y suspensión bacteriana en $MgCl_2$ sin agitar (tiempo de agitación 0) se compara con la turbidez del blanco. El blanco de absorbancia se fija en el espectrofotómetro con el primer tubo de cada grupo. Para cada relación hidrocarburo : suspensión bacteriana, la disminución de la turbidez en el tiempo sigue una cinética de primer orden con una constante de velocidad denominada constante de remoción (k). Para obtener este parámetro se graficó $Ln \frac{DO_t}{DO_i}$ donde DO_i es la DO al tiempo cero de la dilución correspondiente sin agitar y DO_t es la DO al tiempo de agitación indicado para cada tubo en función del tiempo de agitación. Una vez obtenido el gráfico, mediante regresión lineal a partir de la pendiente se determinó la constante de remoción (k). Un gráfico de las constantes de remoción obtenidas a los distintos tiempos de agitación en función de las relaciones de volumen hidrocarburo : volumen de suspensión bacteriana, genera una línea recta cuya pendiente es el valor correspondiente de coeficiente de

remoción (K) (Doyle *and* Rosenberg, 1992) que es el parámetro usado para caracterizar la hidrofobicidad superficial.

d. Adhesión a soportes abióticos. La adherencia bacteriana a superficies es considerada la primera etapa en la colonización. Aunque se han hecho algunos estudios preliminares de adhesión de *M. bovis* a células eucariotas (Annear *and* Wilcox, 1985), no existe un estudio sistemático que detalle las propiedades de adhesión de esta bacteria a superficies abióticas, ni que tenga en cuenta la presencia del pili en este tipo de interacción. Por estos motivos se decidió realizar estudios empleando como superficies modelo vidrio (de alta energía e hidrofílico) y polipropileno (de baja energía e hidrofóbico).

Para iniciar estos estudios de adherencia se determina la uniformidad de la población bacteriana a estudiar por medio de la medida de potencial electroforético⁷. Una vez llevadas a cabo estas determinaciones de control se procede a efectuar la determinación de la adhesión de *M. bovis* a soportes abióticos.

Las pruebas de adhesión se realizaron con perlas de vidrio (4 mm de diámetro) y con cilindros de polipropileno (PPL) (3 x 3,5 mm). El número de perlas y cilindros se ajustó de manera tal que la superficie total de adhesión fuera similar (Tabla III. 1.) para lograr que los porcentajes de adhesión fueran comparables.

Tabla III. 1. Soportes usados en la evaluación de la adhesión de *M. bovis* a superficies abióticas.

Material	Vidrio	Polipropileno
Cantidad de perlas	30	25
Superficie por perla (mm) ²	100,53	122,52
Superficie total (mm)²	3015,90	3063,00

⁷ Antes de cualquier estudio de adhesión, los cultivos microbianos deben ser examinados en lo que se refiere a la heterogeneidad potencial de la población para evitar conclusiones erróneas debidas a la existencia de subpoblaciones con diferentes propiedades de superficie en cultivos de cepa única (Geertsema-Doornbusch *et al.*, 1994). La distribución de las medidas de movilidad electroforética parece ser el método ideal para este fin (van der Mei *and* Busscher, 2001).

La adhesión a superficies abióticas se estudia por dos métodos: por disminución de la DO₆₅₀ de la suspensión celular y por tinción con cristal violeta de las células adheridas (ver metodologías más adelante).

Se estudia la adherencia a vidrio y a polipropileno de suspensiones de *M. bovis* piliada y no piliada provenientes de medio sólido de 18-24 horas de crecimiento y líquido de 0; 2; 4 y 8 horas de crecimiento. Para esto las suspensiones fueron lavadas 2 veces por centrifugación durante 5 minutos a 4000 x g a 4° C en centrífuga (Sorvall Instrument DuPont) y resuspendidas en un volumen de PBS⁸ adecuado para alcanzar una DO₆₅₀ inicial de 0,8 (ésta DO₆₅₀ es lo suficientemente alta como para detectar disminuciones significativas y lo suficientemente baja como para que, en este tipo de sistemas, no se observe autoaglutinación significativa).

Se esterilizaron frascos de 50 mL con perlas de vidrio o con cilindros de PPL y dos frascos sin perlas por muestra, los blancos que permiten descontar la adhesión inespecífica de las bacterias a otras superficies (paredes de los frascos). La suspensión original se divide en cuatro fracciones iguales, la primera se usa para evaluar la adhesión por el método de disminución en la lectura de DO₆₅₀, las tres muestras restantes se usan para evaluar la adhesión por el método de cristal violeta. La determinación se hace por duplicado en cada proceso y los procesos se repiten 4 veces para *M. bovis* piliada y no piliada.

Determinación de la adhesión por medidas de disminución de la DO₆₅₀. En este caso la adhesión se evaluó siguiendo la disminución de DO₆₅₀, para esto se inocularon los frascos con 20 mL de suspensión bacteriana preparada en PBS, se los dejó en agitación suave (60 rpm), se determinó la DO₆₅₀ cada hora hasta que permaneció constante y los porcentajes de adhesión se establecieron por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Adhesión} = \frac{(DO_i - DO_t)}{DO_i} \times 100$$

DO_i es la DO inicial

DO_t es la DO al tiempo en que se hace constante

⁸ El PBS usado contiene cloruro de sodio (NaCl) 0,4 M, fosfato de sodio (Na₂HPO₄) 8,1 mM y fosfato de potasio (KH₂PO₄) 1,5 mM y su pH es de 7,4.

Determinación de la adhesión por el método de tinción con cristal violeta (Sonak and Bhosle, 1995). Antes de realizar la determinación propiamente dicha, se realiza una curva de calibración en la que se relacionan DO_{650} de la suspensión bacteriana con la DO_{550} resultante de la incorporación de cristal violeta por las células. Una vez que las bacterias están adheridas a las perlas de vidrio o a los cilindros de PPL se agrega a cada frasco 1 mL de solución de cristal violeta⁹ y se incuba durante 30 minutos en forma estática a temperatura ambiente. Seguidamente, se retira el sobrenadante que se descarta y se lava con PBS hasta eliminar el exceso de colorante. Después se procede a desadherir las bacterias de las perlas mediante uno de los siguientes métodos: i. incubación con buffer citrato; ii. sonicación; iii. agitación. Se ensayaron estos tres métodos debido a que aunque Lindsay y von Holy (1997) reportaron que son métodos equivalentes, otros autores reportaron grados de desadhesión variables (Jeong and Frank, 1994; Anwar *et al.*, 1992). Se analizaron los resultados obtenidos por los tres métodos y se encontró que es similar por lo que se decidió utilizar el método de agitación que es el más económico y sencillo de realizar.

III. 3. 4. Análisis de componentes de superficie de *M. bovis*

a. Extracción y análisis de PME. Se analizó el perfil de PME de suspensiones de *M. bovis* piliadas y no piliadas de distintos aislamientos provenientes de cultivo en medio sólido y distintas horas de cultivo en medio líquido en Erlenmeyer. Las PME se prepararon según el protocolo de Schneider y Parker (1982), con algunas modificaciones. Las bacterias cultivadas según las condiciones indicadas en cada ensayo se cosechan por centrifugación (Sorvall Instrument DuPont) durante 5 minutos a $6000 \times g$ a $4^\circ C$; el pellet obtenido se resuspende en PBS y se centrifuga nuevamente. Este nuevo pellet se resuspende en un volumen de solución HEPES 10 mM de pH 7,4 tal que se obtenga una DO_{650} de 8. Se le agregan 100 μL del inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 0,1 mM. Las células se sonicán en frío, en ciclos de 2 minutos repetidos 6 veces (Sonicador Sanyo Soniprep 150). Más tarde se centrifugan durante 20 minutos a $3000 \times g$ a $4^\circ C$ para remover los restos celulares. Las membranas totales se obtienen por centrifugación de la

⁹ El cristal violeta usado en esta experiencia se prepara mezclando 0,5 g de cristal violeta (Merk) con 10 ml de etanol 96% y se diluye a volumen final de 100 mL con agua bidestilada.

fracción sobrenadante, durante 10 minutos a 10000 x g a 4° C. El sobrenadante se centrifuga durante 2 horas a 15000 x g a 4° C. El pellet se resuspende en 1 mL de HEPES 10 mM con 2% de Tritón (X 100) y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se repite la centrifugación durante 2 horas a 15000 x g a 4° C y se resuspende e incuba nuevamente. Finalmente, se recupera el pellet con una centrifugación de 1 hora a 20000 x g a 4° C (fracción celular enriquecida en PME) que se resuspende en 10 mL de H₂O destilada.

Análisis de PME por electroforesis en geles de poliacrilamida. Para observar las PME en geles de SDS-PAGE, las muestras se preparan mezclando 10 µL de muestra, 10 µL de buffer de carga (0,065 M de Tris – HCl, pH 6,8; SDS 2% P/V; glicerol 10% P/V; EDTA sódico 2 molal; azul de bromofenol 0,001% P/V) y 2 µL β-mercaptoetanol (5% P/V). Las muestras se conservan a -20° C hasta su utilización. Las PME se someten a electroforesis en geles de 12,5 y 15% de 1 mm de espesor, según el método de Laemmli (1970). Se obtiene mejor resolución en geles de 12,5% por lo que se decide utilizar geles de estas características para la observación de PME.

Visualización de proteínas por tinción con plata. La tinción del gel se realiza según el método propuesto por Morrissey (1981). Brevemente, una vez finalizada la corrida electroforética se fija el gel durante toda la noche en 50 mL de una solución de 25 mL de metanol, 6 mL de ácido acético, 25 µL de formaldehído en agua bidestilada. A continuación se realizan 3 lavados de 20 minutos cada uno con etanol al 30%. Se pretrata el gel durante un minuto con solución 0,02% Na₂S₂O₃.5H₂O y se lava 3 veces durante 20 segundos con H₂O bidestilada. Se trata el gel con AgNO₃ al 0,2%, 0,075% de formaldehído en agua bidestilada. Se lava 3 veces durante 20 segundos con H₂O bidestilada. Se desarrolla el gel con 6 g de NaHCO₃, 1 mL de la solución de tiosulfato, 50 µL de formaldehído y se lleva a volumen final de 50 mL con agua bidestilada. La reacción se detiene con una solución preparada con 50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético, 38 mL de agua bidestilada. Se utilizaron patrones de proteínas de distinto peso molecular que se corrieron junto a las muestras: fosforilasa b (94 kDa), albúmina de suero bovino (67 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de la tripsina (20,1 kDa) y α-lactoalbúmina (14 kDa) (Pharmacia).

b. Extracción y análisis de LPS. Para el aislamiento de LPS de *M. bovis*, se utiliza el método de Valverde y colaboradores (1997) que emplea resina polimixina B, la cual se

une selectivamente al lípido A (uno de los principales componentes del LPS). Se resuspenden las células a analizar en 100 μ L de Trietilamina 0,1 M/EDTA ácido, pH 7,09. Se mezcla para homogeneizar y se agita durante 15 minutos. Luego se centrifuga a 8000 x g durante 2 minutos a 4° C para remover las células enteras y grandes fragmentos celulares. Al sobrenadante se le adicionan 50 μ L de resina polimixina B y se agita durante 15 minutos manualmente. La mezcla se centrifuga durante 2 minutos a 8000 x g a 4° C, y se separa el sobrenadante. El pellet se resuspende en 80 μ L de buffer K_2HPO_4 100 mM, NaCl 0,15 M, se agita por inversión y se centrifuga nuevamente 2 minutos a 8000 x g a 4° C. El pellet obtenido de esta manera se trata con una suspensión de proteinasa K en PBS (200 μ g/ml), y se deja 1 hora a 60° C. A continuación se lava la muestra con PBS y se le agregan 80 μ L de buffer de carga preparado con Tris HCl 1 M (pH 6,8), SDS (2% P/V), glicerol (10% P/V), azul de bromofenol (0,001% P/V) y β -mercaptoetanol (5% P/V). La muestra así preparada se incuba a 100° C durante 10 minutos, se sonica 5 minutos y luego se centrifuga 2 minutos a 8000 x g a 4° C. Como resultado de este tratamiento la preparación se divide en dos fases, en la fase superior se encuentra el LPS.

Análisis de LPS por electroforesis en gel de poliacrilamida. La fase superior se extrae con micropipeta y se siembra en gel de poliacrilamida de 15% de 1 mm de espesor para ser analizada por electroforesis a pH 8,6 y a un voltaje constante de 100 V.

Revelado del gel. Una vez completada la corrida electroforética se sumerge el gel en solución fijadora (40% etanol, 5% ácido acético, 55% de H_2O) y se coloca en agitador circular donde se mantiene durante toda la noche. Se lava durante 1 minuto con H_2O bidestilada y se oxida con ácido periódico 0,7% en H_2O bidestilada agitando durante 10 minutos. Seguidamente se lava con H_2O bidestilada 5 veces durante 5 minutos (se controla el lavado mezclando en tubo separado 1 mL del lavado final y 1 mL de solución de plata); si se forma precipitado se debe continuar lavando, de lo contrario se tiñe con solución de plata al 10% (Bio-Rad *Silver concentrate*) durante 10 minutos en agitación. Se lava con H_2O bidestilada durante 1 minuto. Se enjuaga con el desarrollador (Bio-Rad *developer*) y se mantiene en agitación hasta que se forme precipitado oscuro, entonces se descarta el líquido y se agrega nuevamente solución desarrolladora. Para detener la reacción se usa ácido acético 5% durante 30 segundos, seguido de 2 lavados de 2 minutos cada uno en H_2O bidestilada.

III. 4. RESULTADOS

III. 4. 1. Propiedades de superficie de *M. bovis*

a. Índice y tiempo de autoaglutinación

Observación macroscópica y microscópica de la autoaglutinación. Se compararon suspensiones de poblaciones piliadas y no piliadas de *M. bovis* en H₂O bidestilada. Tal como se observa en la Figura III. 2. las bacterias piliadas autoaglutinaron en tanto que las no piliadas permanecieron en suspensión.

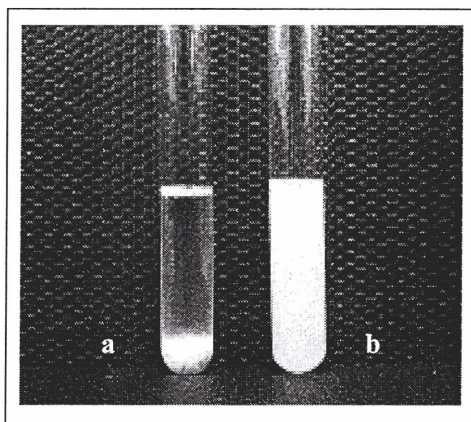


Figura III. 2. Aspecto macroscópico de suspensiones de *M. bovis* 1194-03 en agua bidestilada. Bacterias provenientes de cultivo en medio sólido de 18 horas: **a.** bacterias piliadas; **b.** bacterias no piliadas.

Los agregados de células piliadas de *M. bovis* son grandes y se rompen fácilmente por agitación en vortex a baja velocidad y al microscopio óptico se presentan como grandes acúmulos celulares. Las bacterias no piliadas permanecieron distribuidas en el seno del líquido durante largos períodos de tiempo (más de 24 horas) y al microscopio óptico se presentan como una suspensión homogénea. Además, se observa que en muestras extraídas en distintos momentos del cultivo en medio líquido de células piliadas esta característica se pierde progresivamente, en relación directa con la pérdida de piliación.

Índice de autoaglutinación (IA). El índice de autoaglutinación de suspensiones de células piliadas obtenidas de colonias seleccionadas de medio sólido (0,63 mg/mL) resultó ser mayor que el índice de autoaglutinación de la población de *M. bovis* no piliada (0,48 mg/mL). En la Figura III. 3. se muestran los valores del índice de autoaglutinación de suspensiones de *M. bovis* piliadas y no piliadas provenientes de medio de cultivo sólido y de distintas horas de cultivo en medio líquido.

Las bacterias piliadas crecidas en medio líquido muestran una reducción en su índice de autoaglutinación a medida que pasan las horas de cultivo y sus valores se aproximan a los de *M. bovis* no piliada lo cual estaría indicando que las células piliadas pierden pili durante su cultivo en medios líquidos. En el recuadro de la Figura III. 3. se muestran los resultados de las determinaciones de DO₆₅₀ de los cultivos de los que se toman las muestras¹⁰ a fin de poner en evidencia que los procesos son comparables en cuanto a las características de crecimiento.

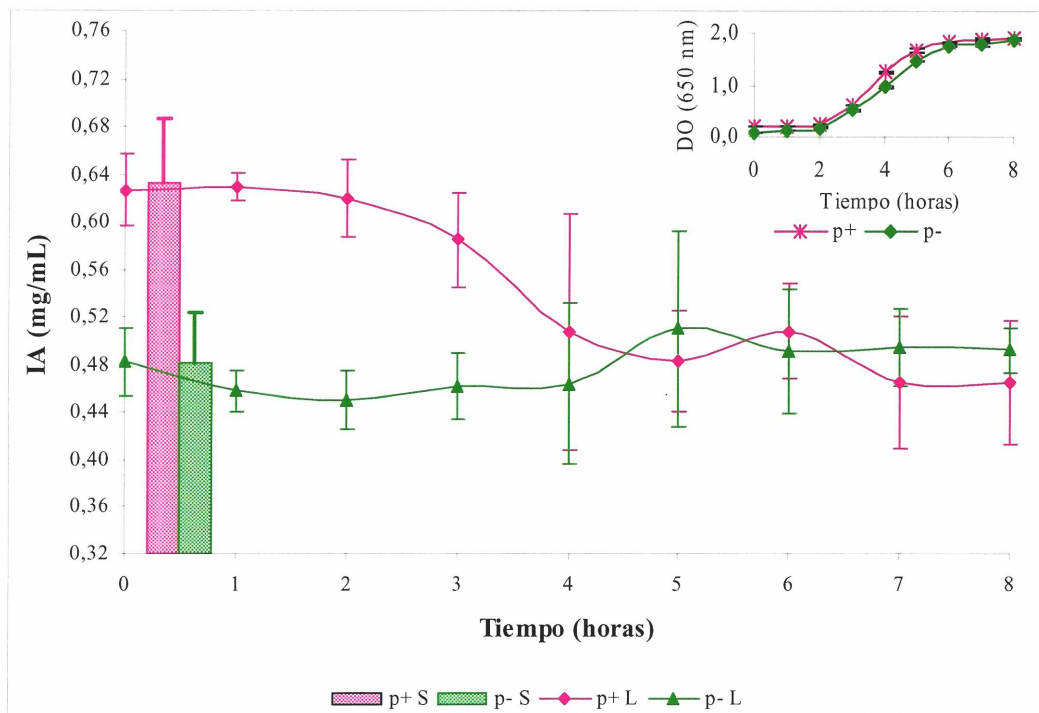


Figura III. 3. Evolución del índice de autoaglutinación (IA) de células piliadas y no piliadas de *M. bovis* durante el cultivo en medio líquido. En el recuadro de la derecha se observa la curva de crecimiento de *M. bovis* piliada y no piliada en medio de cultivo líquido. Se incluyen en barras los valores de IA obtenidos de poblaciones provenientes de medio sólido.

Tiempo de autoaglutinación (TA). El análisis del tiempo de autoaglutinación tanto para células piliadas como para células no piliadas se muestra en dos conjuntos de 3 gráficos cada uno. El primer conjunto pertenece a bacterias piliadas (Figura III. 4.) y el

¹⁰ En el caso de *M. bovis* piliada se realiza la medición de DO₆₅₀ con Cl₂Mg para evitar la autoaglutinación y obtener así un valor de DO₆₅₀ representativo del número de células de la suspensión.

segundo a bacterias no piliadas (Figura III. 5.). El tiempo de autoaglutinación promedio de las bacterias piliadas fue de 25 minutos. En el caso de las bacterias no piliadas el tiempo de autoaglutinación es indefinido y tiende a infinito porque, como muestra la Figura III. 5. c. las curvas no se superponen en ningún punto; estos resultados corroboraron los datos obtenidos de la determinación del índice de autoaglutinación.

En una etapa posterior se analizaron los perfiles de sedimentación de *M. bovis* piliada y no piliada provenientes de medios de cultivo líquido y se encontró que para las bacterias piliadas aumentaba el tiempo de autoaglutinación a medida que avanzaban las horas de cultivo y se perdía la piliación. El tiempo de autoaglutinación de las bacterias piliadas fue al inicio del cultivo líquido de 29 minutos y a partir de las 6 horas de cultivo no se pudo definir¹¹. El tiempo de autoaglutinación de las bacterias no piliadas provenientes de medio líquido tampoco se pudo definir ya que la población permanece en suspensión.

¹¹ Se decidió que cuando el tiempo de sedimentación superara las 24 horas se registraría como indefinido.

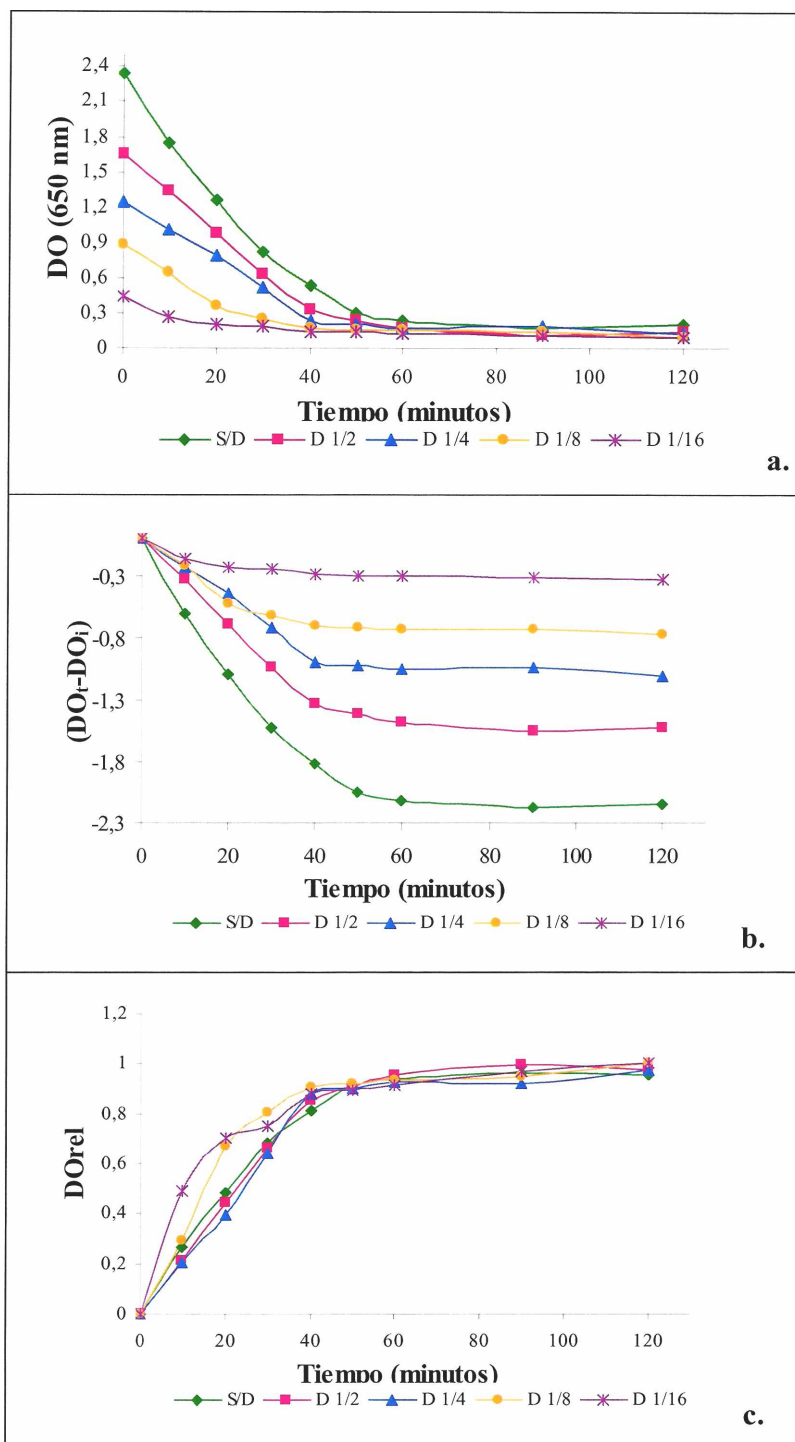


Figura III. 4. a. Perfil de sedimentación de suspensiones de *M. bovis* 1194-03 evaluada en el concentrado y en suspensiones diluidas en función del tiempo de sedimentación; b. $(DO_i - DO_j)$ calculada a partir de los datos obtenidos en a; c. DO_{rel} calculada con los datos obtenidos del gráfico b.; para las diluciones coincidentes en el valor 1 se calcula el tiempo de autoaglutinación (TA) para $DO_{rel} = 0,5$.

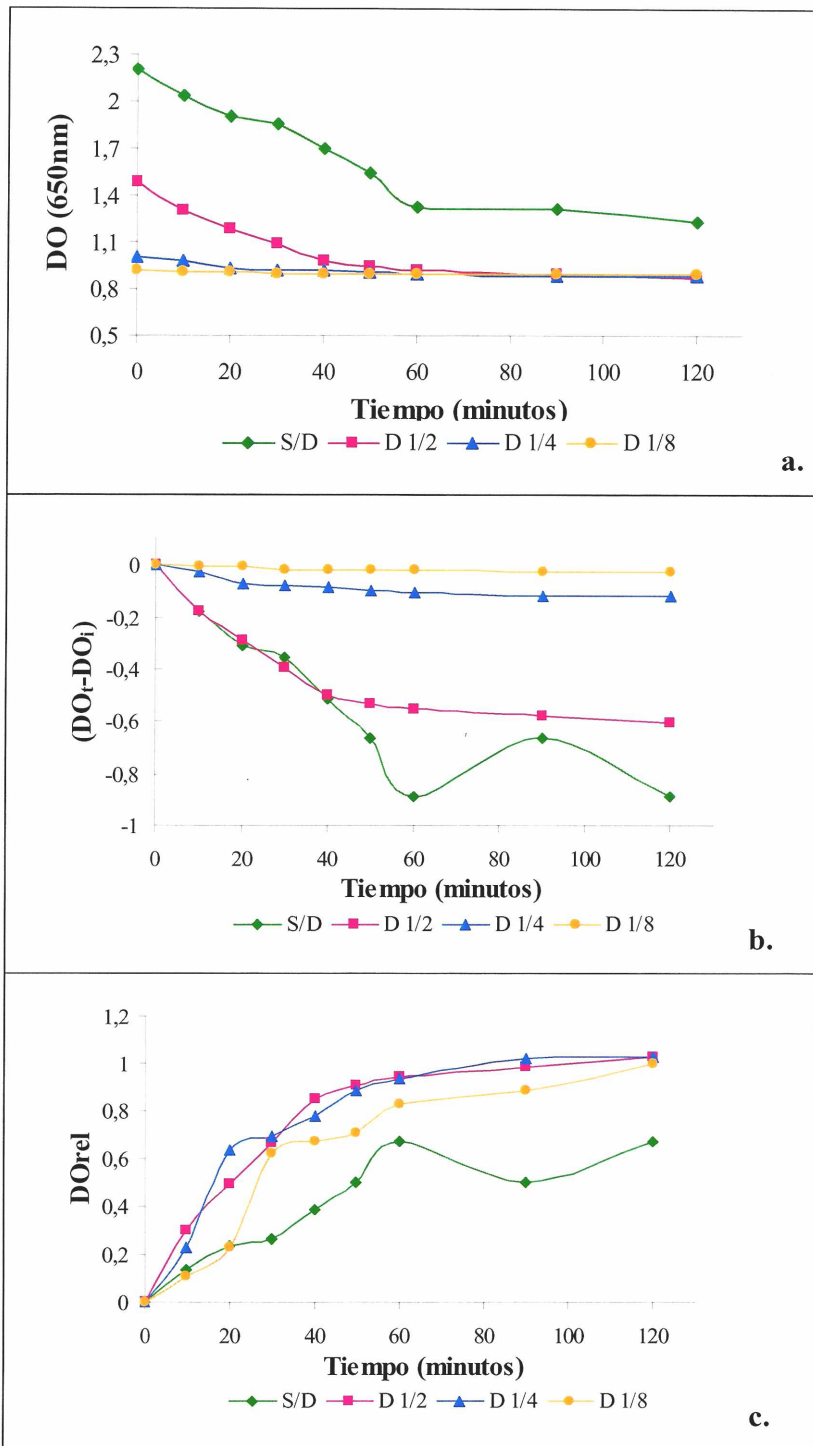


Figura III. 5. a. Perfil de sedimentación de suspensiones de *M. bovis* 1194-03 no piliada evaluada en el concentrado y en suspensiones diluidas en función del tiempo de sedimentación; b. (DO_i-DO_t) calculada a partir de los datos obtenidos en a.; c. DO_{rel} calculada con los datos obtenidos del gráfico b.; debido a que las curvas de DO_{rel} no son coincidentes no es posible calcular los tiempos de autoaglutinación (TA) para la variante no piliada de *M. bovis* sólo podemos decir que su valor tiende a infinito.

En la Figura III. 6. se muestra que existe una alta correlación entre el tiempo y el índice de autoaglutinación de *M. bovis* piliadas provenientes de cultivos en medios líquidos (0 a 6 horas). No se grafica la correlación para las bacterias no piliadas porque, como mencionamos, el valor de tiempo de autoaglutinación es indefinido (mayor a 24 horas).

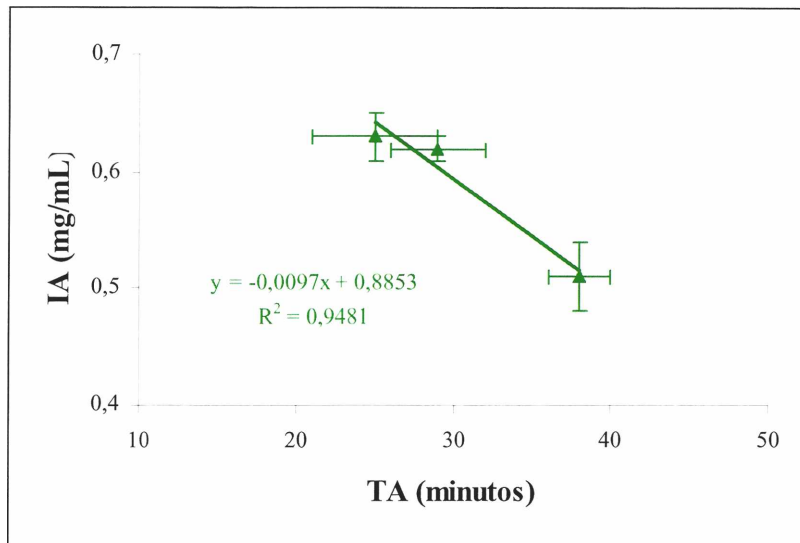


Figura III. 6. Correlación entre el tiempo y el índice de autoaglutinación de *M. bovis* piliada creciendo en medio líquido.

Por otra parte, se correlacionaron independientemente el índice y el tiempo de autoaglutinación con el porcentaje de piliación obtenido por ELISA y se halló que, como se muestra en la Figura III. 7., estos dos parámetros se encuentran fuertemente asociados con la piliación.

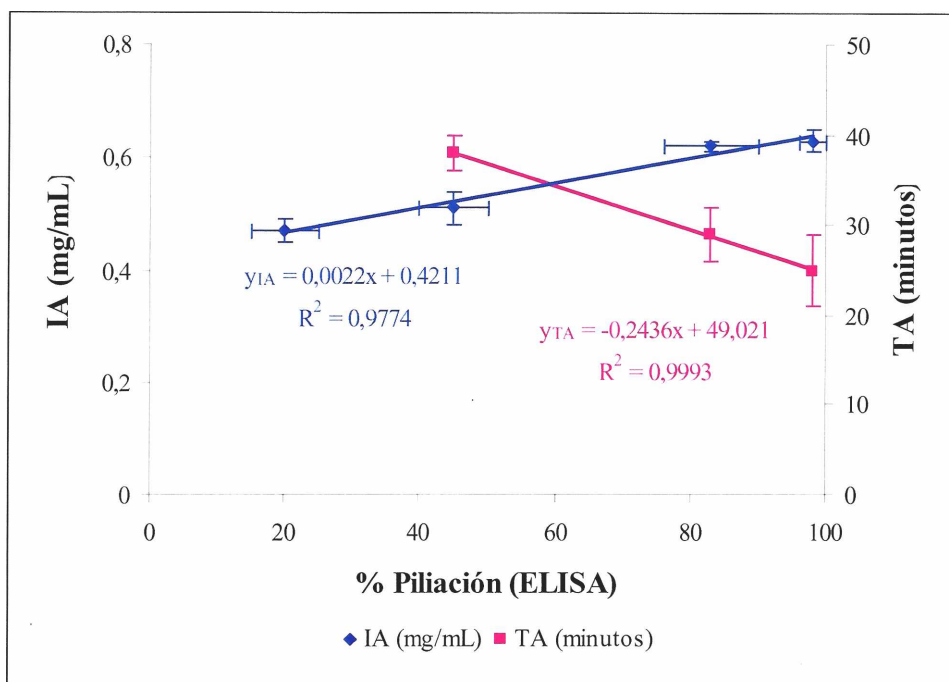


Figura III. 7. Correlación entre el índice y el tiempo de autoaglutinación y el porcentaje de piliación de *M. bovis* piliada creciendo en medio líquido.

b. Movilidad electroforética y potencial zeta

Al estudiar el potencial zeta de células piliadas de *M. bovis* 1194-03 provenientes de cultivos en medio sólido, se encontró que el valor obtenido fue de -43 y el de la variante no piliada era de -68.

Al igual que en la determinación de tiempo e índice de autoaglutinación se observan diferencias significativas en el potencial zeta de las bacterias piliadas y no piliadas provenientes de medio de cultivo sólido. En medio de cultivo líquido en Erlenmeyer, sin embargo, no se observan diferencias significativas a partir de las 4 horas de cultivo lo cual coincide con los resultados de pérdida de piliación en este sistema de cultivo (Figura III. 8.).

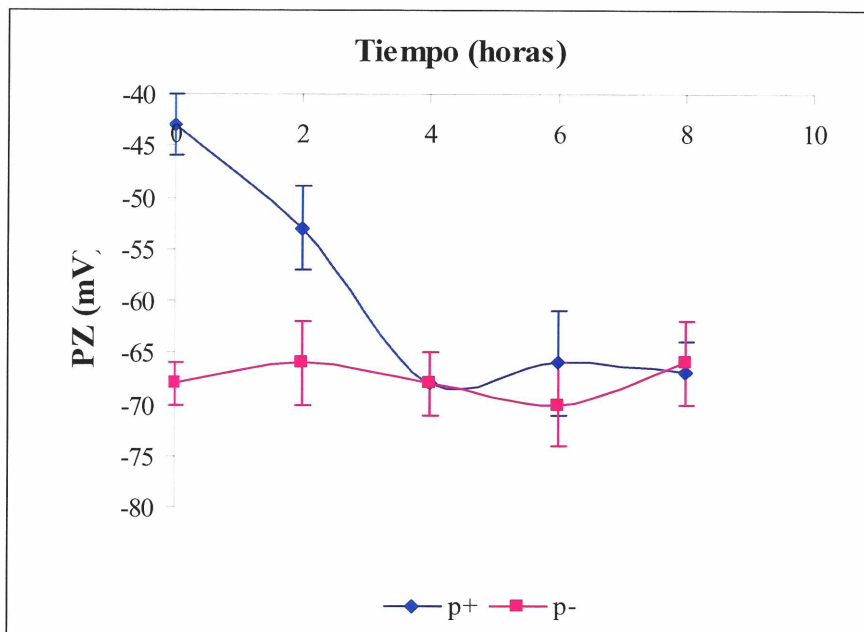


Figura III. 8. Evolución del potencial zeta de células de *M. bovis* piliadas y no piliadas a lo largo de cultivos en medio líquido.

Determinamos baja correlación ($R^2=0,878$) entre el potencial zeta y el porcentaje de piliación obtenido por ELISA en bacterias provenientes de medios de cultivo líquido en Erlenmeyer, a pesar de esto observamos que las bacterias con mayor grado de piliación fueron las menos electronegativas (Figura III. 9.).

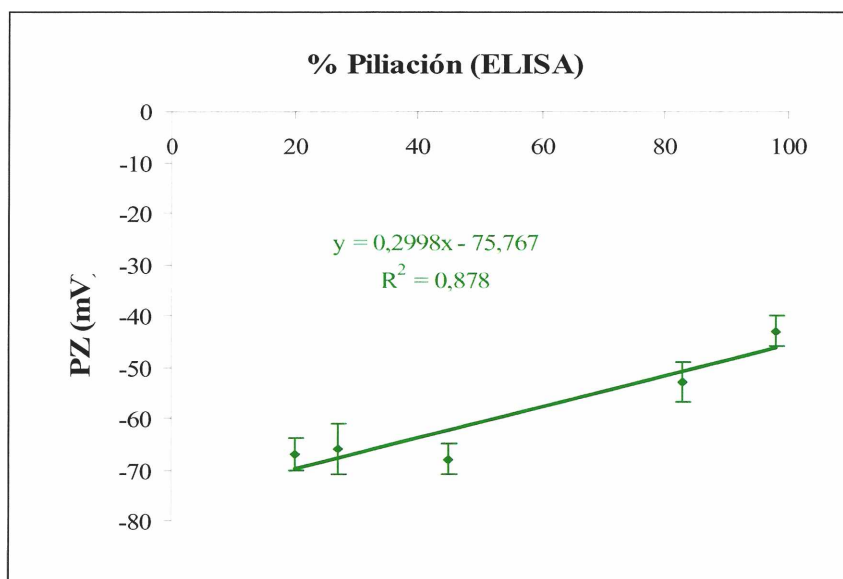


Figura III. 9. Correlación entre el potencial zeta (PZ) y el porcentaje de piliación de *M. bovis* piliada creciendo en medio líquido.

c. Adhesión a hidrocarburos

En la Figura III. 10. se presentan los resultados del estudio de adhesión de suspensiones de *M. bovis* piliada a hexadecano. Se empleó este hidrocarburo que no altera las células y no octano ya que como demostramos éste último produce lisis celular. Aunque la experiencia se diseñó con tubos que fueron agitados entre 0 y 180 segundos, los datos que se tienen en cuenta al momento de hacer los cálculos de la constante de remoción (k) son aquellos que pertenecen a cada dilución en el intervalo en el que la curva es lineal, es decir entre 0 y 50 segundos de agitación (en vórtex).

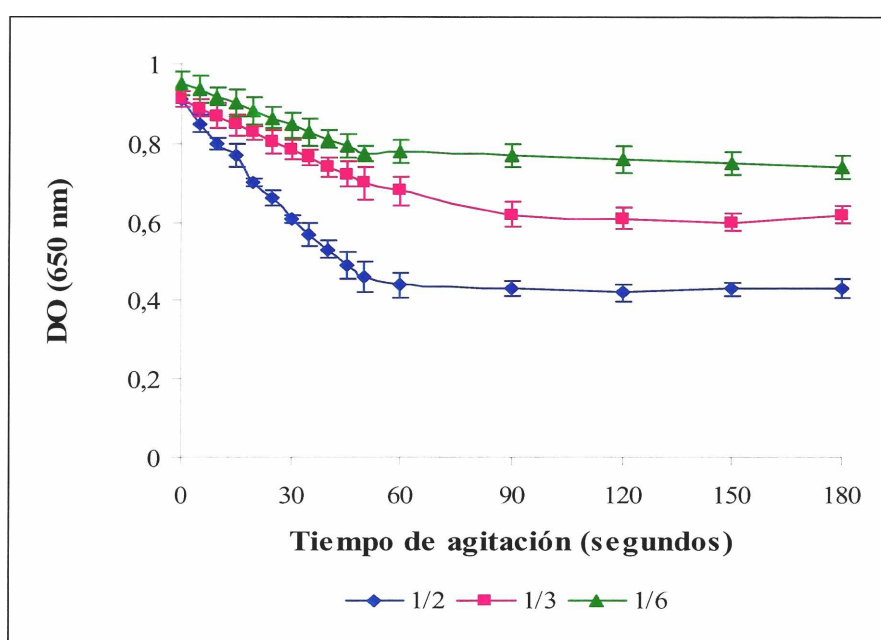


Figura III. 10. Adhesión de *M. bovis* 1194-03 piliada a hexadecano en función del tiempo de agitación, se indican las tres relaciones de volumen de hexadecano (VH) : volumen de suspensión bacteriana (VS) con que se trabajó.

En la Figura III. 11. se muestran los resultados de la cinética de primer orden para la adhesión de *M. bovis* a hexadecano. En el recuadro se observa la pendiente de las regresiones de primer orden en función de las tres relaciones de hexadecano a suspensión (VH : VS) que corresponde al coeficiente de remoción (K). Se encontró que una suspensión de *M. bovis* piliada tiene un $K = 0,0291$, en tanto que para *M. bovis* no piliada el valor determinado fue $K = 0,009$. Este último resultado debe ser tomado solo como una indicación de muy baja adhesión a hexadecano ya que de acuerdo con la metodología propuesta por Doyle y Rosenberg (1992) el coeficiente de remoción (K) para las bacterias

no hidrofóbicas, como es el caso las no piliadas, no se puede calcular debido a que los microorganismos quedan suspendidos en cantidad no significativa en un hidrocarburo como el hexadecano (Doyle *and* Rosenberg, 1992). En relación con estos resultados se puede decir que *M. bovis* piliada tiene mayor afinidad por el hexadecano que *M. bovis* no piliada, o que es más hidrofóbica. Estos resultados coinciden no solamente con la observación macroscópica de autoaglutinación sino también con los resultados hallados en las pruebas de índice y tiempo de autoaglutinación y de potencial zeta.

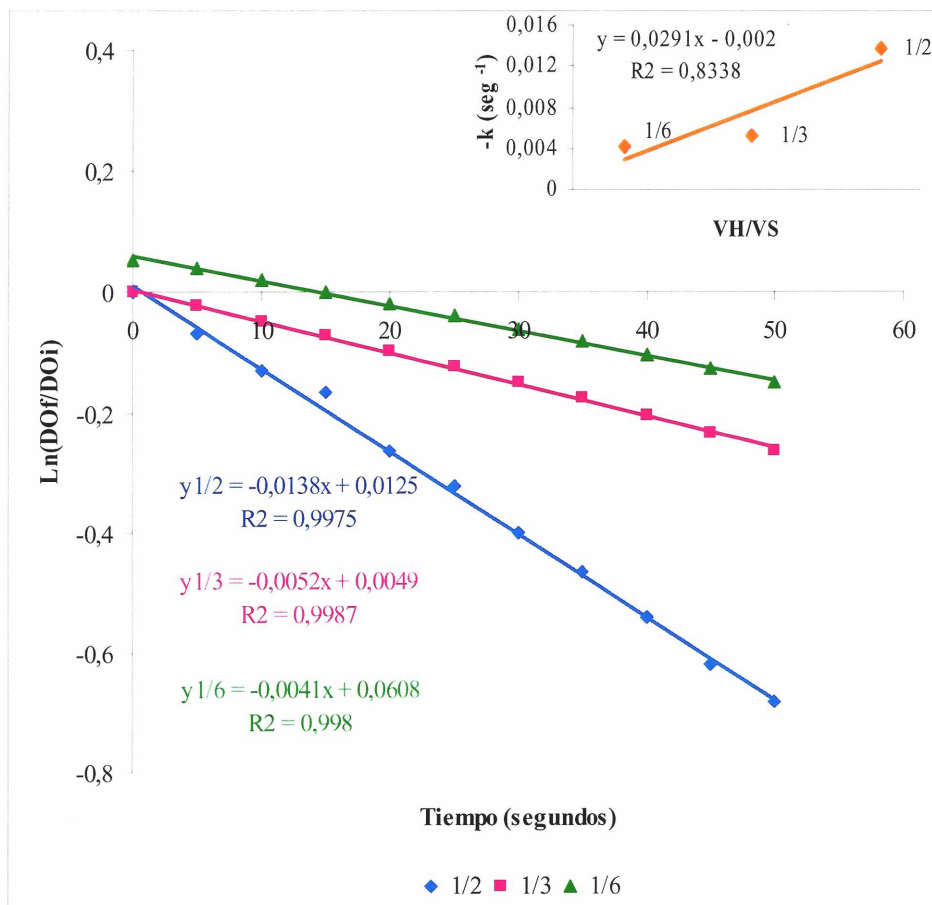


Figura III. 11. Representación de la cinética de primer orden de la adhesión de *M. bovis* 1194-03 piliada a hexadecano. Se muestran las tres relaciones VH:VS (1/2, 1/3, 1/6) con que se trabajó teniendo en cuenta los resultados derivados de la Figura III. 10. En el recuadro superior derecho se muestra la cinética de primer orden en función de dichas diluciones.

Determinamos que existe una correlación directa entre la capacidad de adhesión a hexadecano es decir de la hidrofobicidad bacteriana y el porcentaje de piliación obtenido

por ELISA en bacterias provenientes de medios de cultivo líquido en Erlenmeyer tal como se muestra en la Figura III. 12.

Del análisis de grado de piliación durante el cultivo de *M. bovis* piliada en cultivo líquido se pudo constatar que la población pierde su afinidad por el hexadecano, conjuntamente con la pérdida de piliación, es decir, que esta propiedad evoluciona en forma similar a las otras propiedades estudiadas anteriormente.

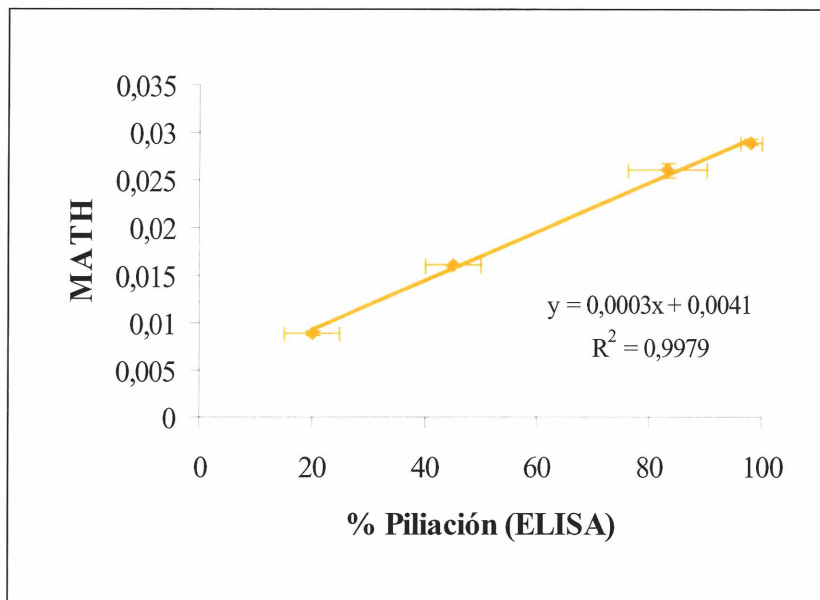


Figura III. 12. Correlación entre la adhesión a hexadecano y el porcentaje de piliación de *M. bovis* piliada creciendo en medio líquido.

d. Adhesión a soportes abióticos

Al estudiar *M. bovis* 1194-03 piliada proveniente de cultivos en medio sólido encontramos que la adhesión a vidrio fue del 97% y a polipropileno fue del 45%. Para la variante no piliada la adhesión a vidrio fue del 10% y a polipropileno del 2%.

La adhesión de *M. bovis* piliada y no piliada proveniente de medios de cultivo líquido en Erlenmeyer se muestran en la Figura III. 13. Como se puede observar, los porcentajes de adhesión de la variante piliada a vidrio son mayores que a polipropileno y disminuyen marcadamente entre las 2 y las 4 horas de cultivo; en cambio la adhesión a polipropileno es mucho menor y disminuye en menor proporción. Los porcentajes de adhesión de la variante no piliada de *M. bovis* fueron muy bajos, tanto para la adhesión a

vidrio como para la adhesión a polipropileno, permaneciendo estables y cercanos al 10% y al 2% respectivamente.

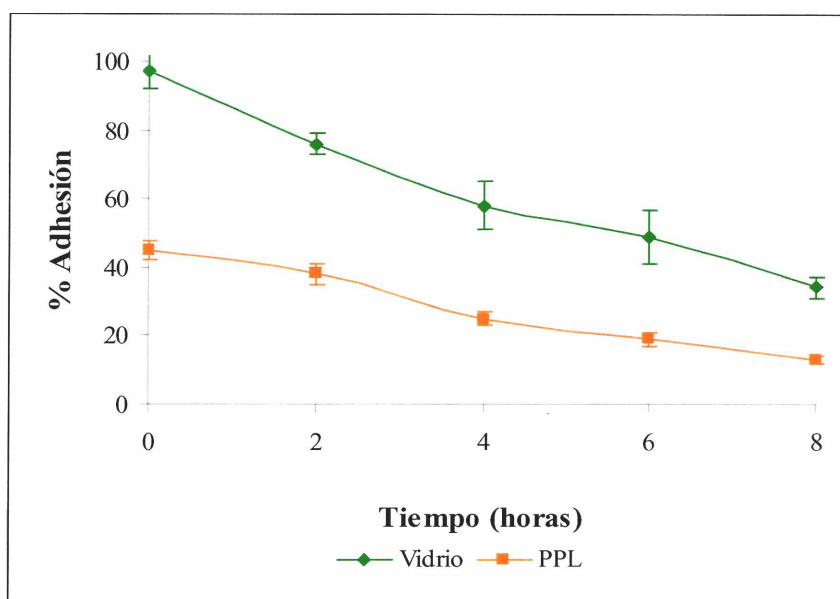


Figura III. 13. Adhesión de suspensiones celulares de *M. bovis* 1194-03 piliada proveniente de distintas horas de cultivo en medio líquido a vidrio y polipropileno (PPL).

Al analizar la evolución de la adhesión a vidrio y a polipropileno de células piliadas de *M. bovis* provenientes de cultivos en Erlenmeyer se encuentra una misma tendencia descendente. En función de estos resultados podemos establecer que conjuntamente a la pérdida de piliación se produce un cambio en la capacidad de adhesión a estas superficies. En el caso de la adhesión de células piliadas de *M. bovis* a polipropileno encontramos que durante el cultivo hay una tendencia a disminuir la adhesión a éste soporte pero esta disminución no es tan marcada como en el caso del vidrio.

En la Figura III. 14. se muestra que existe una buena correlación entre el porcentaje de piliación obtenido de células de *M. bovis* por métodos inmunológicos (ELISA) y el porcentaje de adhesión tanto a vidrio ($R^2=0,9674$) como a polipropileno ($R^2=0,9951$).

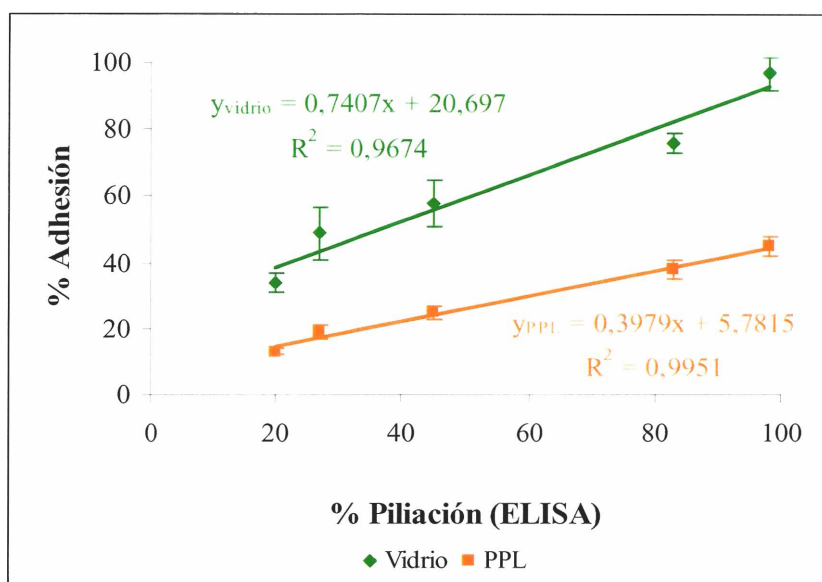


Figura III. 14. Correlación entre el porcentaje de piliación y el porcentaje de adhesión a vidrio y polipropileno de *M. bovis* piliada.

Estos resultados nos permitieron comprobar que mediante la medición de propiedades de superficie, específicamente el índice y el tiempo de autoaglutinación y la adhesión a hidrocarburos se puede estimar el porcentaje de piliación celular. Esto evidentemente puede tener muchos beneficios para el control de procesos de producción de vacunas, particularmente si no se cuenta con sueros para evaluaciones inmunológicas de pili.

III. 4. 2. Análisis de componentes de superficie de *M. bovis*

a. Extracción y análisis de PME

Se estudiaron los perfiles de proteínas de membrana externa de los siguientes aislamientos locales de *M. bovis*: 1194-03 y 1194-20 en sus variantes piliada y no piliada provenientes de medio de cultivo sólido y de distintas horas de cultivo en medio líquido. Las PME obtenidas se compararon sistemáticamente por tipo de sistema y tiempo de cultivo, por aislamiento y por piliación y se encontró que en todos los casos el perfil se mantenía constante. A modo de ejemplo se muestran, en la Figura III. 15., los perfiles de *M. bovis* 1194-03 y *M. bovis* 1194-20 en sus variantes piliada y no piliada.

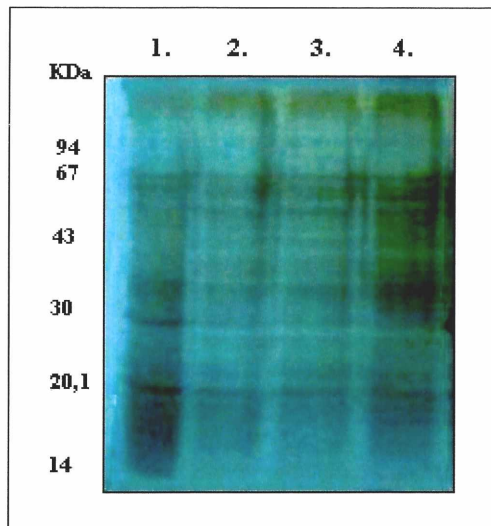


Figura III. 15. PME de distintos aislamientos de *M. bovis* en gel SDS-PAGE 12,5%. **1.** *M. bovis* 1194-03 piliada; **2.** *M. bovis* 1194-03 no piliada; **3.** *M. bovis* 1194-20 piliada y **4.** *M. bovis* 1194-20 no piliada.

b. Extracción y análisis de LPS

Se estudiaron posteriormente los perfiles de lipopolisacáridos extraídos de aislamientos locales de *M. bovis*: 1194-03, 1194-20, 295-177, SC3 y CM1b en sus variantes piliadas y no piliadas; todos ellos provenientes de medio de cultivo sólido y de distintas horas de cultivo en medio líquido. Se observó que los aislamientos de *M. bovis* 1194-20, 295-177, SC3 y CM1b muestran LPS de mayor movilidad electroforética que los de *M. bovis* 1194-03 (Figura III. 16.). Pero no se encontraron diferencias entre organismos piliados y no piliados de un mismo aislamiento, ni cuando las células provienen de distintos momentos del cultivo en medio líquido (datos no mostrados).

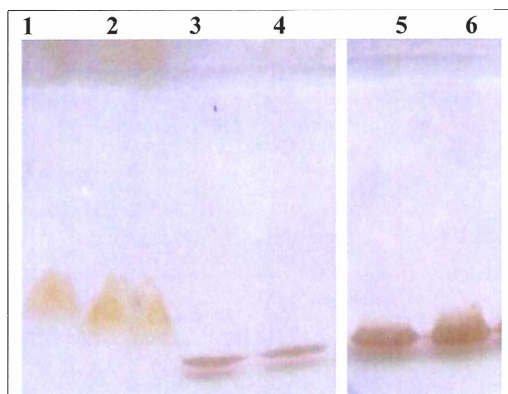


Figura III. 16. Perfil de LPS obtenidos en SDS-PAGE 15% de *M. bovis* provenientes de aislados piliados y no piliados de medio sólido. **1.** *M. bovis* 1194-03 piliada; **2.** *M. bovis*

1194-03 no piliada; 3. *M. bovis* 1194-20 piliada y 4. *M. bovis* 1194-20 no piliada; 5. *M. bovis* 295-177 piliada y 6. *M. bovis* SC3 piliada

Finalmente para corroborar que las diferencias en las propiedades de superficie del fenotipo piliado y no piliado de *M. bovis* se correspondían con la presencia de piliación se aplicó a las células piliadas provenientes de cultivo sólido un tratamiento de ruptura de pili por efecto de *shear* mecánico en vortex. A continuación se comprobó la eliminación de pili mediante una técnica inmunológica (ELISA) y microscopía electrónica. Las células resultantes se ensayaron finalmente respecto de las propiedades analizadas y se encontraron resultados comparables a los de las bacterias no piliadas.

III. 5. DISCUSIÓN

En la Tabla III. 2. se presenta un resumen de las propiedades de superficie estudiadas en este Capítulo para facilitar la discusión.

Tabla III. 2. Propiedades de superficie de suspensiones de *M. bovis* piliada y no piliada obtenida de colonias seleccionadas en medio sólido y de células recuperadas de distintas horas de cultivo en Erlenmeyer. **IA:** índice de autoaglutinación; **TA:** tiempo de autoaglutinación; **PZ:** potencial zeta; **MATH:** adhesión a hexano; **Adh vidrio:** adhesión a vidrio; **Adh PPL:** adhesión a polipropileno.

<i>M. bovis</i>			IA (mg/mL)	TA (minutos)	PZ (mV)	MATH	Adh vidrio	Adh PPL
Piliada	Sólido	18-24	0,63	25	-43	0,029	97	45
		2	0,62	29	-53	0,026	90	38
	Líquido	4	0,51	38	-68	0,016	58	25
		8	0,47	indef	-67	0,009	34	13
No piliada	Sólido	18-24	0,48	indef	-68	0,009	10	2
		2	0,45	indef	-66	0,011	10	5
	Líquido	4	0,47	indef	-68	0,008	9	5
		8	0,49	indef	-76	indef	10	1
Shereada	Sólido	18-24	0,45	indef	-67	0,008	12	3

Las técnicas de determinación de índice y tiempo de autoaglutinación demostraron ser de fácil implementación y de baja complejidad experimental. A pesar de no ser extensamente usadas en la caracterización bacteriana, permitirían en el caso particular de *M. bovis* discriminar entre variantes piliadas y no piliadas. En concordancia con lo reportado por Pérez y colaboradores (1997) para el estudio del *Bifidobacterium sp.* en este estudio se encontró que las bacterias piliadas forman agregados, mientras que las no piliadas permanecen en suspensión. Las bacterias piliadas muestran valores de índice de autoaglutinación más altos que las bacterias no autoaglutinantes, no piliadas. El tiempo de autoaglutinación de las bacterias autoaglutinantes es mucho más corto que el de las no autoaglutinantes.

También se comprobó que durante el transcurso del cultivo de *M. bovis* en medio líquido las bacterias originalmente piliadas muestran un valor de índice de autoaglutinación que tiende a asemejarse al de las bacterias no piliadas al final del proceso. Esto fue asociado a la pérdida de piliación que ha sido reportada en cultivo en medio líquido (Prieto *et al.*, 1999). Aunque es muy clara la diferenciación entre bacterias autoaglutinantes y no autoaglutinantes y la relación con la piliación fue directa al usar este método para diferenciar células piliadas de no piliadas, debe puntualizarse que el manejo de muestras con células piliadas exige procedimientos muy cuidadosos para evitar, por ejemplo, que durante la centrifugación en etapas de lavado, se pierdan pili por efectos del corte mecánico (*shear*).

En lo referente al estudio de potencial zeta se encontró que los valores hallados en este trabajo están en el mismo rango que los hallados por diferentes autores en estudios con una gran variedad de bacterias (Van der Mei *et al.*, 1987; Ganon *et al.*, 1991; Harkes *et al.*, 1992, Pérez *et al.*, 1998; Matz and Jürgens, 2001) y que al igual que la mayoría de las propiedades estudiadas en este Capítulo, están asociadas con la piliación. Los valores de potencial zeta de las bacterias piliadas provenientes de cultivo sólido fueron mayores que los de las no piliadas. En medio líquido se observó que el potencial zeta de las bacterias piliadas fue disminuyendo aproximándose al valor mostrado por las no piliadas a medida que transcurrió el cultivo.

Los resultados presentados muestran que en nuestras condiciones de trabajo la adhesión de *M. bovis* a hidrocarburos, específicamente a hexadecano está asociada al

fenotipo piliado. Las bacterias piliadas mostraron ser hidrofóbicas y las no piliadas hidrofílicas. Además, *M. bovis* piliada es menos electronegativa, por lo tanto, más hidrofóbica, más autoaglutinante y más adherente a hexadecano.

En el caso de *M. bovis* se observó que la adhesión a hidrocarburos se correlacionó con la pérdida de piliación lo cual es comparable con los resultados obtenidos por distintos autores. Herpay y colaboradores (1991) establecieron en *E. coli* que las proteínas de las fimbrias que son los componentes bacterianos de superficie que le aportan sus características hidrofóbicas. Teniendo en cuenta que las fimbrias tienen una estructura comparable con la de los pili tipo IV es que podemos suponer que en el caso de *M. bovis* los componentes hidrofóbicos podrían ser los pili.

Los resultados presentados hasta aquí, en conjunto muestran una correlación entre los valores de autoaglutinación, potencial zeta y MATH. Mientras más bajos son los tiempos de autoaglutinación (es decir, las bacterias son más autoaglutinantes), más altos son los valores de potencial zeta y más alta es la hidrofobicidad. Estos resultados están en concordancia con lo reportado por Pérez y colaboradores (1998) para distintas cepas de *Bifidobacterium*. Sin embargo, Matz y Jürgens (2001) no hallaron correlación entre los valores de potencial zeta y los de MATH al estudiar *Spumella putida* y distintas especies de bacterias flageladas de vida libre del género *Ochromonas* sp. En relación con estos resultados, es importante decir que es un problema común encontrar una baja correlación entre distintos parámetros que deberían medir propiedades similares de la superficie celular (Rosenberg, 1984; Dillon *et al.*, 1986; Mozes *and* Rouxhet, 1987; Donlon *and* Colleran, 1993; Pembrey *et al.*, 1999). La explicación a lo mencionado puede asignarse a que la dirección y la tasa de movimiento que se registran con la movilidad electroforética es dependiente de una variedad de factores tales como la fuerza iónica, la temperatura y el pH del medio, así como de la fuerza eléctrica del campo junto a la carga neta de superficie de una bacteria (Wilson *et al.*, 2001).

En cuanto a la adhesión de las bacterias a superficies abióticas de vidrio y polipropileno los resultados obtenidos aquí mostraron que el número de bacterias que se adhirió a cada una de ellas está relacionado con la carga de superficie y el grado de hidrofobicidad del sustrato. Las bacterias piliadas mostraron mayor adherencia a vidrio y a polipropileno que las no piliadas.

Estos resultados son similares a los hallados por Ista y colaboradores (1996) quienes encontraron que la adhesión de *S. epidermidis* está directamente relacionada con la hidrofiliidad del sustrato. Por otra parte, estos resultados se oponen a los hallados por Fletcher y Loeb (1979) que encontraron que gran cantidad de *Pseudomonas sp.* (*National Collection of Marine Bacteria* [NCMB] 2021) se adhirieron a plásticos hidrofóbicos con poca o ninguna carga de superficie (Teflón, polietileno, poliestireno, polietileno-tereftalato); una cantidad moderada de bacterias se adhirieron a metales hidrofóbicos con carga de superficie positiva (platino) o neutra (germanio) y una cantidad muy baja de las mismas se adhirió a sustratos negativamente cargados (vidrio, mica, plásticos oxidados). En algunos casos, la situación puede tornarse más complicada aún, como ocurre con la adhesión a soportes abióticos de *Vibrio proteolytica* que parecería poseer mecanismos separados de adhesión para sustratos hidrofílicos y para sustratos hidrofóbicos (Paul and Jeffrey, 1985).

Nuestros resultados no muestran variación significativa en los patrones de PME de los aislados locales estudiados lo cual está en coincidencia con los resultados hallados por Horsnell y Teale (1987) y por Ostle y Rosenbusch (1986). Además, coinciden parcialmente con los resultados obtenidos por Prieto y colaboradores (1999) para otros aislamientos de Argentina.

Los perfiles de lipopolisacáridos se compararon por aislamiento, por medio de cultivo y por piliación y se encontró que los aislamientos de *M. bovis* 1194-20, 295-177, SC3 y CM1b tienen mayor movilidad que los de *M. bovis* 1194-03. En un mismo aislamiento no se observaron diferencias cuando *M. bovis* proviene de medios de cultivo sólido o distintos momentos del cultivo en medio líquido en Erlenmeyer; ni cuando *M. bovis* es piliada o no piliada. Los LPS mostraron perfiles característicos de LPS rugoso lo cual coincide con los resultados de Johansen y colaboradores (1990) y también con los de Prieto y colaboradores (1999).

Las PME y los LPS son componentes importantes de las capas externas de las bacterias por lo que pueden influir en las propiedades de superficie. Sin embargo, su influencia, en este caso particular y en nuestras condiciones de cultivo, puede ser considerada despreciable ya que logramos establecer por medio de las experiencias de *shereado* de *M. bovis* piliada que la modificación en las propiedades de superficie está fuertemente asociada con la piliación.

III. 6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este Capítulo podemos concluir lo siguiente.

1. a. La variante piliada de *M. bovis* es autoaglutinante en tanto que la variante no piliada no lo es. Bacterias piliadas creciendo en medio líquido muestran una reducción en su índice de autoaglutinación a medida que pasan las horas de cultivo y sus valores se aproximan a los de la variante no piliada. El tiempo de autoaglutinación de las bacterias piliadas fue significativamente menor que el de las bacterias no piliadas que permanecen en suspensión.

1. b. El potencial zeta de bacterias piliadas provenientes de colonias seleccionadas de medio sólido es mayor que el de las correspondientes no piliadas. Esta característica se mantiene al inicio de los cultivos líquidos con inóculos piliados, sin embargo, a medida que transcurren las horas de proceso el potencial zeta de las bacterias piliadas se aproxima al de las no piliadas.

1. c. *M. bovis* piliada tiene mayor capacidad de adhesión a hexadecano que la variante no piliada, es decir que es más hidrofóbica. La variante piliada en cultivos líquidos pierde su capacidad de adhesión a hexadecano y se aproxima a los valores bajos de la variante no piliada que permanecen estables durante el crecimiento. Las determinaciones preliminares realizadas con octano mostraron que este solvente destruye las bacterias y por lo tanto no fue empleado en este tipo de análisis.

1. d. El porcentaje de adhesión de la variante piliada de *M. bovis* a vidrio es del orden del 100% mientras que a polipropileno es de aproximadamente 50%. En cambio la adhesión de la variante no piliada a estas superficies es sumamente baja. En las bacterias provenientes de medios líquidos los porcentajes de adhesión de la variante piliada (empleada como inóculo) a vidrio disminuyen con el tiempo de cultivo y se aproximan a los de la no piliada. La adhesión a polipropileno es, también, mayor en las bacterias piliadas y disminuye durante el cultivo aproximándose a los valores de la no piliada. Existe una alta correlación entre el porcentaje de piliación obtenido por ELISA y la adhesión de *M. bovis* piliada a vidrio y a polipropileno.

1. e. Los resultados de las pruebas de índice y tiempo de autoaglutinación, potencial zeta, adhesión a hexadecano y adhesión a soportes abióticos en *M. bovis* piliada y no

piliada creciendo en medio sólido muestran que la variante piliada es más aglutinante, tiene un mayor potencial zeta, mayor hidrofobicidad en hexadecano y mejor adhesión a vidrio y polipropileno que la variante no piliada. Mientras que cuando crecen en medio líquido todas las pruebas muestran una misma tendencia, que es que los valores de la variante piliada tienden a aproximarse a los de la no piliada a medida que transcurren las horas de cultivo. Esto estaría relacionado con la pérdida de piliación ya que existe una alta correlación entre el porcentaje de piliación determinado por ELISA y la evolución de cada una de estas propiedades, lo cual daría la máxima relevancia a la presencia de pili en la superficie celular.

2. Los perfiles de proteínas de membrana externa se compararon sistemáticamente teniendo en cuenta el sistema y el tiempo de cultivo, el aislamiento y la piliación y no se observaron diferencias significativas. Los perfiles de lipopolisacáridos se compararon de la misma manera y se observó que los aislamientos de *M. bovis* 1194-20, 295-177, SC3 y CM1b muestran mayor movilidad que los de *M. bovis* 1194-03. En un mismo aislamiento no se observaron diferencias cuando *M. bovis* proviene de medios de cultivo sólido o distintos momentos del cultivo en medio líquido, ni cuando es piliada o no piliada.

3. Teniendo en cuenta que es posible correlacionar el porcentaje de piliación con las propiedades de superficie especialmente el índice y tiempo de autoaglutinación y la hidrofobicidad es que proponemos diferenciar mediante estudios de estas propiedades de superficie poblaciones de *M. bovis* piliadas de poblaciones no piliadas. Esto es importante porque cualquiera de estas metodologías podría ser empleada para monitorear de manera económica, rápida y sencilla el nivel de piliación de cultivos de *M. bovis*, en lugar de utilizar una técnica de ELISA que requiere de personal entrenado y que es más costosa e insume más tiempo.

III. 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absolom, D. R. 1988. The role of bacterial hydrophobicity in infection: bacterial adhesion and phagocytic ingestion. *Canadian Journal of Microbiology*, **34**(3):287-98.
- Annuar, B. O.; G. E. Wilcox. 1985. Adherence of *Moraxella bovis* to cell cultures of bovine origin. *Research in Veterinary*, **39**:241-246.

- Araujo, F.; C. S. Alviano; J. Angluster; I. D. Ricciardi. 1989. Chemical composition of lipopolysaccharide from *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology*, **20**:165-171.
- Bagge, D.; M. Hjelm; C. Johansen; I. Huber; L. Gram. 2001. *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**:2319-2325.
- Barenkamp, S. J.; R. S. Jr. Munson; D. M. Granoff. 1981. Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer membrane protein profiles. *Journal of Infection Diseases*. **143**:668-676.
- Bibiloni, R. 2001. Características probióticas de *Bifidobacterium*: estudio, selección de cepas y desarrollo. Capítulo II, páginas 68-135. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Briandet, R.; T. Meylheuc; C. Maher; M. N. Bellon-Fontaine. 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:5328-5333.
- Bunt, C. R.; D. S. Jones; I. G. Tucker. 1993. The effects of pH, ionic strength and organic phase on the bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test. *Intern Journal of Pharmacy (Amsterdam)*, **9**:93-98.
- Busscher, H. J.; G. I. Geertsema; H. C. van der Mei. 1993. On mechanisms of oral microbial adhesion. *Journal of Applied Bacteriology*, **74**:136S-146S.
- Crittenden, R.; A. Laitila; P. Forssell; J. Mättö; M. Saarela; T. Mattila-Sandholm; P. Myllärinen. 2001. Adhesion of Bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(8):3469-3475.
- Crow, D. R. 1994. Principles and Applications of Electrochemistry, 4th ed. Blackie Academic and Professional, p. 76-77.
- Davies, R. L.; M. Quirie. 1996. Intra-specific diversity within *Pasteurella trehalosi* based on variation of capsular polysaccharide, lipopolysaccharide and outer-membrane proteins. *Microbiology*, **142**(3):551-560.
- Dickson, J. S.; M. Koohmaraie. 1989. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**:832-836.
- Dillon, J. K.; J. A. Fuerst; A. C. Hayward; G. H. G. Davis. 1986. A comparison of five methods for assaying bacterial hydrophobicity. *Journal Microbiological Methods*, **6**:13-19.
- Donlon, B.; E. Colleran. 1993. A comparison of different methods to determine the hydrophobicity of acetogenic bacteria. *Journal Microbiology Methods*, **17**:27-37.
- Doyle, R. J. 2000. Review. Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, **2**(4):391-400.
- Doyle, R. J.; M. Rosenberg. 1992. Measurement of microbial adhesion to hydrophobic substrata. *Methods in Enzymology*, **253**:542-550.
- Fattom, A.; M. Shilo. 1984. Hydrophobicity as an Adhesion Mechanism of Benthic Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**:135-143.

- Fletcher, M.; G. I. Loeb. 1979. Influence of Substratum Characteristics on the Attachment of a Marine *Pseudomonas* to Solid Surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, **37**(1):67-72.
- Gallardo-Moreno, A. M.; M. L. González-Martín; J. M. Bruque; C. Pérez-Giraldo; A. C. Gómez-García. 2002. Temperature influence on the physicochemical surface properties and adhesion behaviour of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *Journal of Adhesion Science and Technology*, **16**(9):1215-1223.
- Gallardo-Moreno, A. M.; M. L. González-Martín; J. M. Bruque; C. Pérez-Giraldo; R. Sánchez-Silos; A. C. Gómez-García. 2003. Influence of the growth medium, suspending liquid and measurement temperature on the physico-chemical surface properties of two enterococci strains. *Journal of Adhesion Science and Technology*, **17**(14):1877-1887
- Gallot-Lavallee, T.; M. S. Zygmunt; A. Cloeckaert; G. Bezar; G. Dubray. 1995. Growth phase-dependent variations in the outer membrane protein profile of *Brucella melitensis*. *Research in Microbiology*, **146**(3):227-236.
- Gannon, J. T.; V. B. Manilal; M. Alexander. 1991. Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Applied and Environmental Microbiology*; **57**:190-193.
- Geertsema-Doornbusch, G. I.; H. C. van der Mei; H. J. Busscher. 1993. Microbial cell surface hydrophobicity. The involvement of electrostatic interactions in microbial adhesion to hydrocarbons (MATH). *Journal of Microbiology Methods*, **18**:61-68.
- Geertsema-Doornbusch, G. I.; J. Noordmans; A. W. Bruce; G. Reid; A. E. Khoury; H. C. van der Mei; H. J. Busscher. 1994. Quantitation of microbial cell surface heterogeneity by microelectrophoresis and electron microscopy—application to lactobacilli after serial passaging. *Journal of Microbiology Methods* **19**:269-277.
- Gilbert, P.; D. J. Evans; M. R. W. Brown. 1993. Formation and dispersal of bacterial biofilms *in vivo* and *in situ*. *Journal of Applied Bacteriology*, **74**:67S-78S.
- Gordon, A. S.; F. J. Millero. 1984. Electrolyte Effects on Attachment of an Estuarine Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**(3):495-499.
- Gu, X-X.; J. Chen; S. J. Barenkamp; J. B. Robbins; C-M. Tsai; D. J. Lim; J. Battey. 1998. Synthesis and Characterization of Lipooligosaccharide-Based Conjugates as Vaccine Candidates for *Moraxella (Branhamella) catharrhalis*. *Infection and Immunity*, **66**:1891-1897.
- Gupta, R. K.; S. C. Szu; R. A. Finkelstein; J. B. Robbins. 1992. Synthesis, characterization, and immunological properties of detoxified lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba bound to cholera toxin. *Infection and Immunity*, **60**:3201-3208.
- Harkes, G.; H. C. van der Mei; P. G. Rouxhet; J. Dankert; H. J. Busscher; J. Feijen. 1992. Physicochemical Characterization of *Escherichia coli*. A comparison with Gram-Positive Bacteria. *Cell Biophysics*, **20**:17-32.
- Hernandez A., Mellado R. P., Martinez J. L. 1998. Metal accumulation and vanadium-induced multidrug resistance by environmental isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. *Applied Environmental Microbiology*, **64**(11):4317-20.

- Herpay, M.; E. Czirok; E. Szollosy; J. Fekete; I. Gado; H. Milch. 1991. Relative surface hydrophobicity, antigen K1 and haemagglutinating activity are associated in *Escherichia coli*. *Acta Microbiologica Hungarica*, **38**(1):17-28.
- Horisberger, M.; E. Dentan. 1980. Chemical Composition and Ultrastructure of Cellular and Extracellular *Moraxella glucidolytica* Lipopolysaccharides. *Archives of Microbiology*, **132**:12-18.
- Horsnell, J. M.; C. M. Teale. 1987. Characterisation of the outer membrane protein antigens of British field isolates of *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology*, **15**:181-189.
- Inzana, T. J.; M. E. Pichichero. 1984. Lipopolysaccharide Subtypes of *Haemophilus influenzae* Type b from an Outbreak of Invasive Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, **20**(2):145-15.
- Ista, L. K.; H. Fan; O. Baca; G. P. Lopez. 1996. Attachment of bacteria to model solid surfaces: oligo(ethylene glycol) surfaces inhibit bacterial attachment. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*, **142**(1):59-63.
- Jeong, D. K.; J. F. Frank. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *Journal Food Processing*, **57**:576-586.
- Johansen, K. A.; M. J. Wannemuehler; R. F. Rosenbusch. 1990. Biological reactivity of *Moraxella bovis* Lipopolysaccharide. *American Journal of Veterinary Research*, **1**:46-51.
- Kihlstrom, E.; Magnusson K. E. 1983. Haemagglutinating, adhesive and physico-chemical surface properties of different *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica. Section B, Microbiology*, **91**(2):113-119.
- Kim, K. Y.; J. F. Frank. 1994. Effect of growth nutrients on attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Journal Food Protection*, **57**:720-726.
- Kodjikian, L; C. Burillon; C. Chanloy; V. Bostvironnois; G. Pellon; E. Mari; J. Freney; T. Roger. 2002. In Vivo Study of Bacterial Adhesion to Five Types of Intraocular Lenses. *Association for Research in Vision and Ophthalmology, Ophthalmology & Visual Science*, **43**(12):3717-3721.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lichtenberg, D. M.; M. Rosenberg; N. Sharfman; I. Ofek. 1985. A kinetic approach to bacterial adherence to hydrocarbon. *Journal Microbiological Methods*, **4**:141-146.
- Lindsay, D.; von Holy, A. 1997. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. *Food Microbiology*, **14**:383-390.
- Little, B.; P. Wagner; K. Hart; D. Lavoie; K. Nealson; C. Aguilar. 1998. The role of biomineralization in microbiologically influenced corrosion. *Biodegradation*, **9**:1-10.
- Loeb, M. R.; D. H. Smith. 1980. Outer membrane protein composition in disease isolates of *Haemophilus influenzae*: pathogenic and epidemiological implications. *Infection and Immunity*, **30**:709-717.

- Lüderitz, O.; C. Galanos; V. Lehman; M. Purnimem; E. T. Rietschel; G. Rosenfelder; M. Simon; Westphal. 1973. Lipid A chemical structure and biological activity. *Journal Infectious Diseases*, **128**:17-29.
- Makin, S. A.; T. J. Beveridge. 1996. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology*, **142**:299-307.
- Matz, C.; K. Jurgens. 2001. Effects of hydrophobic and electrostatic cell surface properties of bacteria on feeding rates of heterotrophic nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(2):814-820.
- Morrissey, J. H. 1981. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Analytical Biochemistry*, **117**(2):307-310.
- Mozes, N.; P. G. Rouxhet. 1987. Methods of measuring hydrophobicity of microorganisms. *Journal Microbiology Methods*, **6**:99-112.
- Mozes, N.; P. Rouxhet. 1990. A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Biophysics*, **17**:93-106.
- Muruga, R.; J. M. Miller; R. M. Donlan. 2001. Biofilm formation by gram-negative bacteria on central venous catheter connectors: effect of conditioning films in a laboratory model. *Journal of Clinical Microbiology*, **39**(6):2294-2297.
- Nikaido, H.; M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiology Reviews*, **49**:1-32.
- Ostle, A. G.; R. F. Rosenbusch. 1986. Outer membrane protein antigens of *Moraxella bovis*. *American Journal Veterinary Research*, **47**:1419-1421.
- Palomar, J.; M. Puig; R. Montilla; J. G. Loren; M. Vinas. 1995. Lipopolysaccharide recovery restores susceptibility levels towards beta-lactams in *Serratia marcescens*. *Microbios*, **82**(330):21-26.
- Paul, J. H.; W. H. Jeffrey. 1985. Evidence for Separate Adhesion Mechanisms for Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces in *Vibrio proteolytica*. *Applied and Environmental Microbiology*, **50**(2):431-437.
- Pembrey, R. S. 1999. PhD Thesis. University of New South Wales, Sydney, New South Wales, Australia.
- Pembrey, R. S.; K. C. Marshall; R. P. Schneider. 1999. Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Applied and Environmental Microbiology*, **65**(7):2877-2894.
- Pérez, P. F.; Y. Minnaard; E. A. Disalvo; G. L. De Antoni. 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**:21-26.
- Pérez, S. E.; G. Bretschneider; H. Y. Terzolo; A. R. Moreira. 1997. Evolución en el desarrollo de inmunógenos contra la Queratoconjuntivitis Infecciosa Bovina: tipos y características. *Therios*, **26**:292-303.
- Poulsen, V. L. 1999. Microbial biofilm in food processing. *Lebensmittel-Wissenschaft + [i.e. und] Technologie. Food science + Technology. Science + Technologie Alimentaire*, **32**:321-326.

- Prieto, C. I.; O. M. Aguilar; O. M. Yantorno. 1999. Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins and DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in *Moraxella bovis* isolated in Argentina. *Veterinary Microbiology*, **70**:213-223.
- Reid, G.; P. L. Cuperus; A. W. Bruce; H. van der Mei; L. Tomeczek; A. H. Khoury; H. Busscher. 1992. Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital, dairy, and poultry lactobacilli: effect of serial culture passages. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**:1549-1553.
- Robbins, J. B.; R. Scheerson. 1990. Polysaccharide-protein conjugates: a new generation of vaccines. *Journal Infection Diseases*, **161**:821-832.
- Rosenberg, M. 1984. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*, **22**:289-295.
- Rosenberg, M.; D. Gutnik; E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *Federation of European microbiological Societies, Microbiology Letters*, **9**:29-33.
- Schneider, D. R.; C. D. Parker. 1982. Purification and characterization of the mucinase of *Vibrio cholerae*. *Journal of Infection Diseases* **145**:474-482.
- Stenstrom, T. A. 1989. Bacterial hydrophobicity, an overall parameter for the measurement of adhesion potential to soil particles. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**(1):142-147.
- Svenson, S. B.; A. A. Lindberg. 1981. Artificial *Salmonella* vaccines: *Salmonella typhimurium* O-antigen-specific oligosaccharide-protein conjugates elicit protective antibodies in rabbits and mice. *Infection and immunity*, **32**:490-496.
- Tan, L.; P. S. Grewal. 2003. Characterization of the First Molluscicidal Lipopolysaccharide from *Moraxella osloensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**:3646-3649.
- Taylor, P. W. 1983. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against Gram – negative bacteria. *Microbiology Review*, **47**:46-83.
- Valverde, C; D. F. Hozbor; A. Lagares. 1997. Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques*, **22**(2):230-236.
- Van Alphen, L., T. Riemens, J. Poolman, H. C. Zaren. 1983. Characteristics of outer membrane proteins of *Haemophilus influenzae*. *Journal of Bacteriology*, **155**:878-885.
- Van der Mei, H.; A. H. Weerkamp; H. J. Busscher. 1987. A comparison of various methods to determine hydrophobic properties of streptococcal cell surfaces. *Journal Microbiological Methods* **6**:277-287.
- Van der Mei, H.; H. Busscher. 2001. Minireview. Electrophoretic mobility distributions of singles-strain microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**:491-494.
- Van der Mei, H.; M. Rosenberg; H. Busscher. 1991. Assessment of microbial cell surface hydrofobicity, p. 263-287. En N. Mozes, P. S. Handley, H. J. Busscher, P. G.

- Rouxthet (ed.), *Microbial cell surface analysis: structural and physicochemical Methods*. VCH Publishers, New York, N.
- van Loosdrecht, M. C. M.; J. Lyklema; W. Norde; G. Schraa; A. J. B. Zehnder. 1987a. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**(8):1893-1897.
- van Loosdrecht, M. C. M.; J. Lyklema; W. Norde; G. Schraa; A. J. B. Zehnder. 1987b. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*, **54**:75-87.
- van Loosdrecht, M. C.; J. Lyklema; W. Norde; G. Schraa; A. J. Zehnder. 1987c. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial steps of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**(8):1898–1901.
- van Loosdrecht, M. C.; W. Norde; A. J. Zehnder. 1990. Review. Physical chemical description of bacterial adhesion. *Journal of Biomaterials Applications*, **5**(2):91-106.
- Vanhaecke, E.; P. Pijck. 1988. Bioluminescence assay for measuring the number of bacteria adhering to the hydrocarbon phase in BATH test. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**:1436-1439.
- Walan, A.; E. Kihlstrom. 1988. Surface charge and hydrophobicity of *Campylobacter jejuni* strains in relation to adhesion to epithelial HT-29 cells. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, **96**(12):1089-1096.
- Wilson, W. W.; M. M. Wade; S. C. Holman; F. R. Champlin. 2001. Review. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*, **43**(3):153-164.

Capítulo IV

ESTABILIDAD DEL FENOTIPO PILIADO DE *MORAXELLA BOVIS* DURANTE EL CRECIMIENTO EN REACTORES AGITADOS

IV. 1. INTRODUCCIÓN

En este Capítulo se describen experimentos llevados a cabo con *M. bovis* creciendo en distintos tipos de reactores. Los cultivos en medio líquido representan, como señala Neidhardt (1999), una condición de desarrollo celular rápida, en la cual es posible medir y controlar parámetros del ambiente bacteriano que pueden resultar esenciales para la optimización del crecimiento. Muchos bacteriólogos contribuyeron en esta área, sin embargo, fue Monod quién en 1945 inspiró los modernos estudios sobre el crecimiento bacteriano.

Para cultivar adecuadamente un microorganismo se debe seleccionar el tipo de reactor que resulte más adecuado a las necesidades de la población bacteriana y el modo en que el mismo será operado. Según su tipo, los reactores tradicionales para el cultivo de organismos aeróbicos son: Erlenmeyers, tanques agitados, columnas de burbujeo, sistemas *airlift* y sistemas híbridos que combinan el principio del *airlift* con la agitación mecánica (Moo-Young and Chisti, 1988). Según el modo de operación los reactores pueden ser operados en sistemas de tipo continuo, batch y batch alimentado. Los Erlenmeyers y las columnas de burbujeo en general se usan para cultivo batch y los reactores agitados son útiles para cultivo batch, batch alimentado y continuo.

En la figura IV. 1. se muestran las configuraciones básicas de los reactores diseñados para cultivos bacterianos aeróbicos en suspensión. La elección de la configuración óptima de un reactor para un proceso dado depende de distintos factores que incluyen la población microbiana a desarrollar, la transferencia de oxígeno, los requerimientos de mezclado y la magnitud de las tasas aceptables de estrés mecánico

(*shear*). Algunos de estos factores pueden tener efectos contrarios; por ejemplo, mientras que para un proceso dado, como la producción de ciertas proteínas, una población puede requerir alta transferencia de oxígeno –que se consigue con un aumento en la turbulencia (agitación y aereación) y que se traduce en un aumento del estrés mecánico– la tolerancia a este tipo de estrés por algunos tipos celulares puede ser baja. Por estos motivos es que el diseño de un reactor exitoso involucra un balance entre factores potencialmente conflictivos (Moo-Young *and* Chisti, 1988).

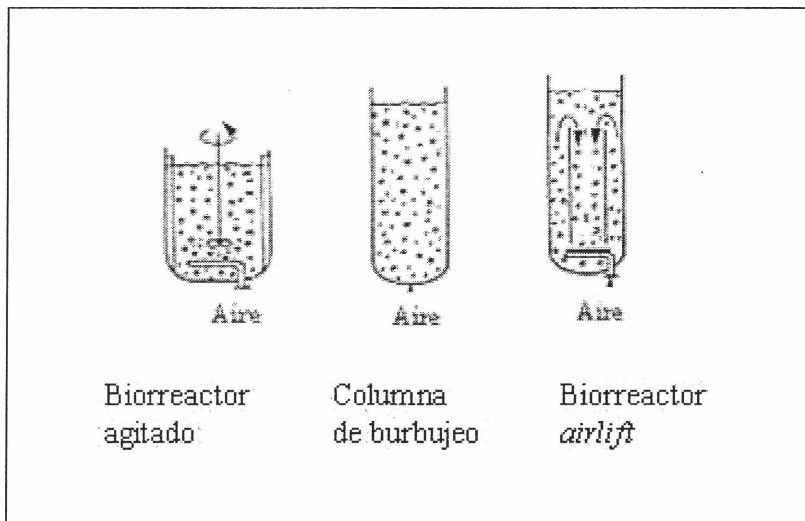


Figura IV. 1. Esquema de los distintos reactores tomado de Moo-Young y Chisti, 1988 con modificaciones.

Durante todo proceso de producción de bacterias es importante el monitoreo y control del ambiente físico y químico. En procesos aeróbicos es esencial controlar la concentración de oxígeno disuelto, el pH, la temperatura y el mezclado en el sistema debido a que estos parámetros pueden afectar significativamente el rendimiento del proceso y la expresión fenotípica (Mutharasan, 1996).

Como ya se ha mencionado, para la producción industrial de *M. bovis* se emplean a nivel industrial reactores agitados mecánicamente. Sin embargo, se ha comprobado que estas vacunas son muy poco efectivas en el control de QIB debido a que probablemente los principales factores de virulencia de *M. bovis* (pili y hemolisina) no estén presentes en tales formulaciones. A nivel nacional, el organismo estatal encargado del control de vacunas veterinarias no realiza la cuantificación de estos antígenos al momento de aprobar una

vacuna. Si la pérdida de piliación se debe a las fuerzas de corte mecánicas generadas en reactores agitados o a otros factores propios de este tipo de reactores, es todavía un tema que no ha sido estudiado en detalle.

Las bacterias cultivadas en medios líquidos están sometidas a las fuerzas asociadas a la dinámica del fluido que lo contiene. Generalmente para organismos sensibles al shear se asocia el estrés hidrodinámico con injurias o muerte celular en bioprocesos agitados y aerados (Thomas, 1990) sin un control preciso. Los efectos subletales (injurias) pueden ser considerados como parte de un mecanismo basado en la respuesta de las células al estrés por esfuerzo de corte o a otros tipos de estrés, como por ejemplo los cambios de temperatura o estrés oxidativo (Sahoo *et al.*, 2003; Sahoo *et al.*, 2004; Sahoo *et al.*, 2006) y en muchos casos pueden llegar a tener mayor relevancia que los letales (Kieran *et al.*, 2000). Los parámetros usados para determinar el daño celular dependen de cada cultivo, pueden involucrar velocidades de crecimiento, producción y de consumo de nutrientes y rendimientos celulares y de productos (Märk *et al.*, 1991; Prokop y Bajpai, 1992; Peter *et al.*, 2006); viabilidad celular y morfología de las partículas biológicas (García-Briones *and* Chalmers, 1994; Rodríguez-Monroy *and* Galindo, 2003), permeabilidad dieléctrica de la membrana o la unión de anticuerpos específicos a proteínas de la membrana (Trujillo-Roldán *and* Valdez-Cruz, 2006).

El esfuerzo de corte o estrés de corte o “*shear stress*” (τ) es la fuerza por unidad de área aplicada en forma paralela a la superficie de cada partícula biológica. Este τ es proporcional a la diferencia de las velocidades (dv) entre las líneas de flujo del medio de cultivo superior e inferior, respecto a la distancia entre las líneas de flujo (dy). La constante de proporcionalidad es la viscosidad (μ). Así podemos expresar τ por la siguiente expresión:

$$\tau = \mu \frac{dv}{dy} = \mu\gamma$$

dv/dy es la velocidad o gradiente de deformación (γ) (Bennet *and* Myers, 1962) y puede entenderse como los cambios de velocidades que generarían una deformación a una determinada partícula. Esta ecuación se cumple siempre y cuando la viscosidad sea

constante, no importando la velocidad de deformación a la que es sometido el fluido, y cuando esto se cumple es conocido como fluido Newtoniano como sería el caso de los cultivos líquidos utilizados (Figura IV. 2.).

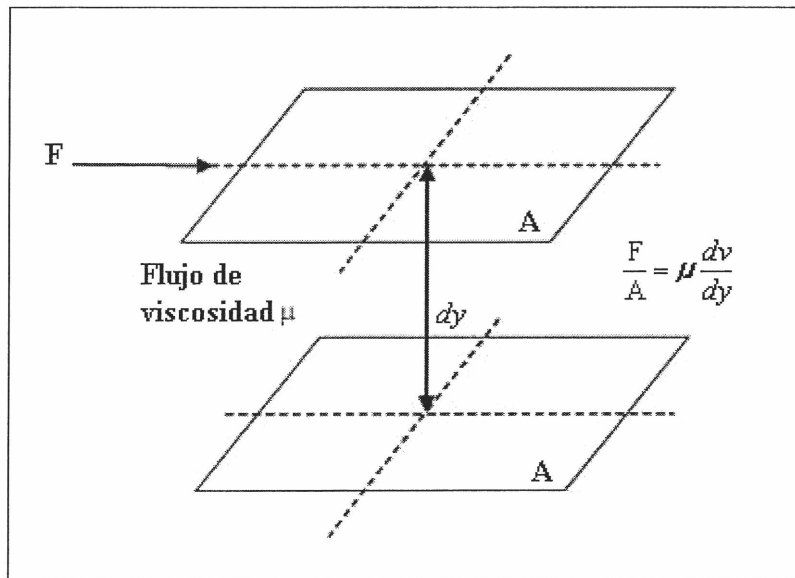


Figura VI. 2. Representación de las fuerzas viscosas de un fluido en un reactor agitado. La figura se tomó con modificaciones de Trujillo-Roldán y Valdez-Cruz, 2006.

En un reactor agitado existen patrones típicos de agitación que provocan que las velocidades de deformación no sean constantes, de esta manera la energía cinética suministrada por algún elemento mecánico, aparece en el movimiento turbulento en mayores escalas (grandes remolinos) y esta energía es transmitida a escalas cada vez menores (pequeños remolinos), hasta que en las escalas más pequeñas según Richardson (1922) es disipada por la acción de la viscosidad en forma de calor. Este autor consideró que la turbulencia puede estar compuesta de distintos remolinos donde cada uno se identifica por su tamaño, velocidad de movimiento y tiempo de duración y se les podrá asociar un número adimensional característico del nivel de turbulencia (número de Reynolds que relaciona fuerzas inerciales con fuerzas viscosas). Si este número adimensional es elevado el remolino será inestable y se romperá transfiriendo energía a remolinos más pequeños. Este proceso de cascada de energía de unos remolinos a otros continuará hasta que el número de Reynolds del remolino más pequeño sea lo suficientemente bajo como para que éste sea estable y la energía cinética se disipe en forma de calor (Trujillo-Roldán and Valdez-Cruz, 2006). En sistemas agitados, la teoría de

Kolmogorov (Kolmogorov 1941; Kolmogorov 1962) identifica al remolino más pequeño, o remolino de Kolmogorov existente, en función de la energía de disipación y de la viscosidad cinemática del fluido. Thomas (1990) sugirió que las especies biológicas no serían afectadas por el estrés dinámico de los fluidos, si estas tuvieran tamaños menores a aquellos tamaños de los remolinos más pequeños que se pueden formar en un sistema agitado por ejemplo. Cuando se tienen energías promedio de disipación (agitación y aereación) cercanas a las utilizadas en reactores industriales en fermentaciones bacterianas de $1,0 \text{ W kg}^{-1}$ se llega a tener valores del remolino de Kolmogorov de $30 \mu\text{m}$, usando la viscosidad cinemática del agua (Hewitt *et al.*, 1998). Se considera que el mayor daño a la partícula biológica es ocasionado por remolinos de un tamaño comparable con el de las partículas (Thomas 1990). Los remolinos más grandes arrastran a las partículas biológicas en su movimiento, mientras que los remolinos más pequeños que las partículas biológicas, tienen suficiente energía y pueden actuar sobre las células sometiéndolas a estrés (Thomas, 1990; Prokop *and* Bajpai, 1992). La energía de disipación volumétrica promedio en reactores puede calcularse con base en la definición de número de potencia de un agitador, que esta directamente relacionado con el diseño del impulsor y la velocidad de agitación (Oldshue, 1983), debido a que en los reactores industriales, en las zonas de mayor agitación (cercanas a los impulsores), se encuentran los mayores valores locales de energía de disipación y los menores tamaños de los remolinos de microescala (Buchs *and* Zoels, 2001; Maier *and* Buchs, 2001; Peter *et al.*, 2006). En Erlenmeyers agitados, la energía de disipación depende de la velocidad de agitación del agitador, el diámetro mayor del erlenmeyer y de la viscosidad del medio de cultivo (Buchs *et al.*, 2000a; Buchs *et al.*, 2000b). En sistemas agitados, los remolinos más pequeños que se pueden encontrar están en el intervalo de 10 a $100 \mu\text{m}$, que está en el rango de tamaño de los hongos filamentosos, células animales y células vegetales. Sin embargo, encontrar remolinos de tamaños menores de $10 \mu\text{m}$, los cuales podrían afectar a las bacterias, requiere energías de disipación en extremo altas, valores difíciles de encontrar en los sistemas de cultivo agitados hasta ahora diseñados (Peter *et al.*, 2006).

Cuando se hacen estudios en reactores, no es fácil encontrar una relación entre muerte celular y estrés hidrodinámico, principalmente por las diferencias entre los tamaños de los diferentes remolinos de micro-escala y el tamaño del elemento biológico. No existen en la literatura reportes que presenten muerte celular como un efecto directo de las fuerzas hidrodinámicas, al menos en bacterias (Trujillo-Roldán *and* Valdez-Cruz, 2006). Sin

embargo, si existe en la literatura un número importante de artículos que presentan efectos subletales en las bacterias por efectos hidrodinámicos (Jolliffe *et al.*, 1981; Wecker y Onken, 1991; Markl *et al.*, 1991; Joshi *et al.*, 1996; Hewitt *et al.*, 1998; Peña *et al.*, 2000; Peña and Galindo, 2002; Sahoo *et al.*, 2003; Sahoo *et al.*, 2004; Sahoo *et al.*, 2006).

IV. 2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la necesidad de encontrar un sistema de cultivo que resulte apropiado para la producción de una vacuna contra QIB que permita el mantenimiento del fenotipo piliado de *M. bovis* es que nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar la producción de biomasa, velocidad específica de crecimiento, y niveles de piliación de *M. bovis* creciendo en reactores agitados y columnas de burbujeo. Establecer una correlación con el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_La).

2. Comparar rendimientos de biomasa y estabilidad de los factores de virulencia de *M. bovis* crecida en reactores agitados mecánicamente y en columnas de burbujeo.

IV. 3. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. 3. 1. Organismos, medios y sistemas de cultivo

En estos estudios se empleó *M. bovis* 1194-03 piliada que es cultivada y seleccionada en medio sólido como se indicó en el Capítulo II, para preparar inóculos de los distintos sistemas de cultivo que se describen en este Capítulo.

Los cultivos en *Erlenmeyer* se realizaron en las condiciones descritas previamente en el Capítulo II y además se ensayaron distintas velocidades de agitación entre 100 y 200 rpm.

Los cultivos en *reactores agitados* se iniciaron transfiriendo bacterias de 13 a 15 cajas de cultivo. Las colonias de 18 a 24 horas de crecimiento fueron seleccionadas por sus

características fenotípicas como piliadas y resuspendidas en 80–160 mL de medio de cultivo líquido BHI. Se emplearon reactores LKB 1601 (Ultoferm, Bromma) de 6 L de capacidad con un volumen final de medio de cultivo de 4 L.

Se realizaron experiencias en las que el aire se suministró a un volumen de 0,75 VVM y la velocidad de agitación se mantuvo a 350 rpm y otras experiencias en las que la aereación se mantuvo en 0,75 y 0,5 VVM y el oxígeno disuelto en 10% de saturación por medio de una agitación variable de entre 250 y 500 rpm. En todos los casos la temperatura del proceso se mantuvo constante a 37° C. La DO₆₅₀ inicial determinada en un espectrofotómetro UV-visible (Pye Unicam SP6-250) se ajustó entre 0,2 y 0,3.

Los cultivos en *columnas de burbujeo* se iniciaron de manera similar a los reactores tanque agitado transfiriendo bacterias recolectadas de 2 a 3 cajas medio sólido TSA sangre a medio de cultivo líquido BHI (5 a 10 mL). Esta suspensión se utilizó para inocular columnas de burbujeo con un volumen final de 350 mL de medio. Se ensayaron distintos caudales de aire: 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 VVM que se mantuvieron constantes a lo largo de todo el proceso. La DO₆₅₀ inicial de los cultivos se fijó entre 0,2 y 0,3. Los detalles de la columna de burbujeo se pueden observar en la Figura IV. 3.

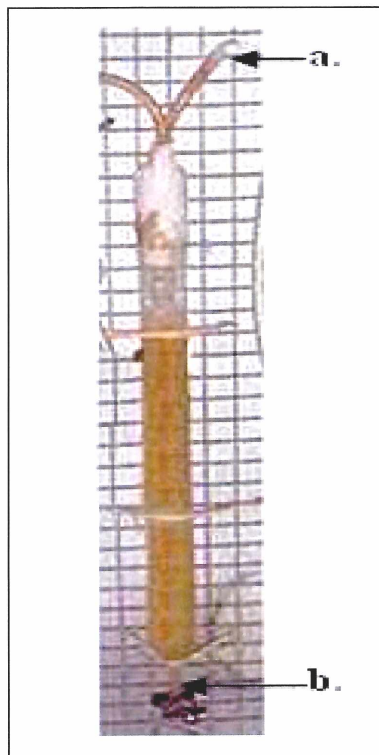


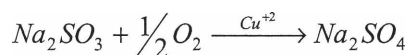
Figura IV. 3. Columna de burbujeo para el cultivo de *M. bovis*. **a.** salida de aire; **b.** entrada de aire.

Control de producción de espuma. Debido a que en los cultivos en medios líquidos en reactor agitado y columna de burbujeo se produce gran cantidad de espuma es que se adicionaron al medio entre 0,35 y 3 mL de antiespumante siliconado comercial respectivamente, preparado en dilución de 1:5000. Previamente se había constatado que el antiespumante no produjera modificaciones en el crecimiento de *M. bovis*.

IV. 3. 2. Coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno

El término $k_L a$ representa el producto del coeficiente de transferencia de masa (k_L) y el área interfacial (a) disponible para la transferencia de masa. La determinación del $k_L a$ por el método del sulfito se puede realizar de distintas maneras de acuerdo a las características de los reactores. En el caso de los cultivos en Erlenmeyers y columnas de burbujeo se calculó por iodometría y en el caso de los reactores agitados se calculó teniendo en cuenta la velocidad de consumo de oxígeno en la reacción de oxidación del sulfito por balance en la fase gaseosa.

Esta determinación se basa en que el sulfito de sodio (Na_2SO_3) en presencia de iones cobre (Cu^{2+}) o cobalto (Co^{2+}) reacciona con el oxígeno (O_2) según la reacción:



Cuando la concentración de Cu^{2+} está en el orden de 0,5 a 2×10^{-3} M y el pH es neutro o ligeramente alcalino, esta reacción es suficientemente rápida como para que en todo momento la concentración del oxígeno en el seno del líquido (C_L) sea prácticamente nulo, pero no tan rápida como para que afecte el espesor de la película que se forma en la interfase gas-líquido. Además se debe cumplir que i. la velocidad de la reacción no dependa de la concentración de SO_3^- (reacción de orden cero) para lo cual se agrega cobre en exceso en una concentración mayor que 0,015 M; ii. el volumen ocupado por la película líquida sea pequeño en comparación con el volumen total de la fase líquida para que el O_2 luego de difundir a través de la película pueda reaccionar con la solución de Na_2SO_3 garantizando así que C_L es nulo. En estas condiciones la reacción de oxidación ocurrirá totalmente en el seno del líquido, y la velocidad de la reacción de oxidación del sulfito en el seno del líquido (r) estará controlada por la velocidad de difusión de O_2 o sea:

$$r = k_L a \times C^*$$

r es la velocidad de la reacción de oxidación del sulfito

C^* es la solubilidad del oxígeno en el líquido a una temperatura dada

Este método, si bien simple, presenta el inconveniente de que soluciones salinas concentradas provocan una disminución en la coalescencia de las burbujas, aumentando, por tanto, el área por unidad de volumen. De este modo el $k_L a$ que se obtiene suele ser mayor que el que se tendrá con líquidos no coalescentes, como lo son, en general, los medios de cultivo. Conociendo C^* podemos estimar $k_L a$ a partir de r .

Determinación del $k_L a$ en Erlenmeyers y columnas de burbujeo. El medio de cultivo es reemplazado por el mismo volumen de una solución de Na_2SO_3 0,5 N a la cual se le agrega 1 mL/L de solución de CuSO_4 1 M que actuará como catalizador de la reacción de oxidación del sulfito a sulfato. Antes de cada análisis se deja estabilizar el sistema durante una hora y luego se inicia la aereación, que en el caso del Erlenmeyer se proporciona colocándolo en un agitador orbital y en el caso de las columnas de burbujeo permitiendo la entrada de aire al sistema.

Para el caso de los Erlenmeyers se hicieron las determinaciones de $k_L a$ a distintas velocidades de agitación entre 100 y 200 rpm. En el caso de las columnas de burbujeo se hicieron las determinaciones de $k_L a$ para 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50 y 2,00 VVM. La aereación en el caso de Erlenmeyers y las columnas de burbujeo se mantuvo durante 20 minutos y después se tomaron las muestras a intervalos de media hora. A cada muestra de 2 mL se le adicionaron 3 mL de una solución de I_2 0,5 N. El exceso de I_2 se tituló por retorno con Na_2SO_3 0,075 N usando una solución de almidón como indicador. Con los datos obtenidos se graficó el volumen de Na_2SO_3 utilizado en función del tiempo y con la pendiente de dicho gráfico se calculó el valor de $k_L a$ empleando la siguiente ecuación:

$$k_L a = \frac{1}{C^*} \times \frac{m \times N}{4 \times V_m}$$

C^* es la solubilidad del O_2

N es la concentración de Na_2SO_3

V_m es el volumen de Na_2SO_3

m es la pendiente de la gráfica

Determinación del k_La en reactores agitados. Estudios preliminares: construcción de curvas de $\log k_La$ en función de $\log rpm$ ¹². En el caso de los reactores agitados los niveles de oxígeno y dióxido de carbono en el gas de entrada y salida del reactor se determinaron con un detector Servomex de tipo paramagnético y con un detector Horiba Pir 2000 con sensor infrarrojo. Como en los casos anteriores el medio de cultivo es reemplazado por el mismo volumen de una solución de Na_2SO_3 0,5 N a la cual se le agrega 1 mL/L de solución de $CuSO_4$ 1 M. Antes de cada análisis se deja estabilizar el sistema durante una hora. Las condiciones utilizadas fueron aereación de 0,50 VVM con agitaciones de 280; 350 y 500 rpm y aereación de 0,75 VVM y agitaciones de 280; 350 y 500 rpm que se mantuvieron constantes durante 20 minutos antes de tomar las muestras.

$$r_{O_2} = -\frac{F}{V} \times 0,79 \times \frac{T_0}{T} \times \frac{60}{22,4} \times \left[\frac{pO_{2s}}{1 - pO_{2s}} - \frac{0,21}{1 - 0,21} \right]$$

r_{O_2} = velocidad de consumo de oxígeno

F = flujo de aire

V = volumen de solución de Na_2SO_3

T_0 = temperatura de referencia (25° C)

T = temperatura de trabajo (37° C)

pO_{2s} = presión parcial de oxígeno a la salida del reactor

El valor de k_La se calcula a partir de la ecuación:

$$k_La = \frac{r_{O_2}}{C^*}$$

El valor de C^* de 7,5 mg/mL que se utiliza sólo vale cuando el gas que está en equilibrio con el líquido es aire (presión parcial de O_2 de 0,21 atmósferas) por lo cual debe corregirse teniendo en cuenta que el gas que está en contacto con el líquido es O_2 por lo tanto:

¹² En reactores grandes, de tipo industrial, estos valores de velocidad deberían estar corregidos por la temperatura y por la diferencia de presión que existe entre la entrada de gases y la presión atmosférica. Sin embargo, para reactores pequeños como los usados en estas experiencias puede despreciarse dicha corrección.

$$C^* = C^*_{21} \times \frac{\%O_2}{21}$$

Con estos datos se construye un gráfico del $\log k_L a$ en función del $\log \text{rpm}$ a partir del cual se determina el $k_L a$ para las condiciones de trabajo (datos no mostrados).

Para los cultivos en reactores se determina el $k_L a$ en las siguientes condiciones i. con aereación de 0,75 VVM y agitación de 350 rpm, ii. con aereación de 0,75 VVM y agitación variable entre 250 y 500 rpm y iii. con aereación de 0,5 VVM y agitación variable entre 250 y 500 rpm. En ii. y iii. la agitación se reguló por computadora para mantener un 10% de oxígeno disuelto.

IV. 3. 3. Crecimiento celular

En el caso de los cultivos en Erlenmeyers y reactores agitados las curvas de crecimiento se obtuvieron a partir de la determinación del peso seco de muestras tomadas a intervalos regulares de 1 hora. Cada una de las muestras se centrifugó a 8000 x g durante 10 minutos, el pellet celular se resuspendió en agua destilada estéril; este proceso se repitió 2 veces. El último pellet se resuspendió en 2 mL de agua bidestilada estéril y se traspasó a pesa filtros previamente pesados que se colocaron en estufa de secado a 100° C hasta obtener un peso constante, finalmente, se construyeron curvas de biomasa en función del tiempo.

En el caso de las columnas de burbujeo las curvas de crecimiento se obtuvieron a partir de determinaciones de DO_{650} de muestras tomadas a intervalos regulares de 1 hora. Estos valores se convirtieron en valores de biomasa utilizando la tabla de correlación entre densidad óptica y biomasa que se confeccionó como se describe más abajo.

Estudios de correlación entre densidad óptica (DO_{650}) y biomasa (mg/mL). Se realizaron cultivos en Erlenmeyer de los cuales se tomaron muestras a intervalos de 1 hora. Con una muestra se determinó la DO_{650} y con la otra se determinó el peso seco; las determinaciones se realizaron por triplicado. A partir de estas determinaciones se correlacionaron las medidas de peso seco con las determinaciones de DO_{650} (Figura IV. 4.).

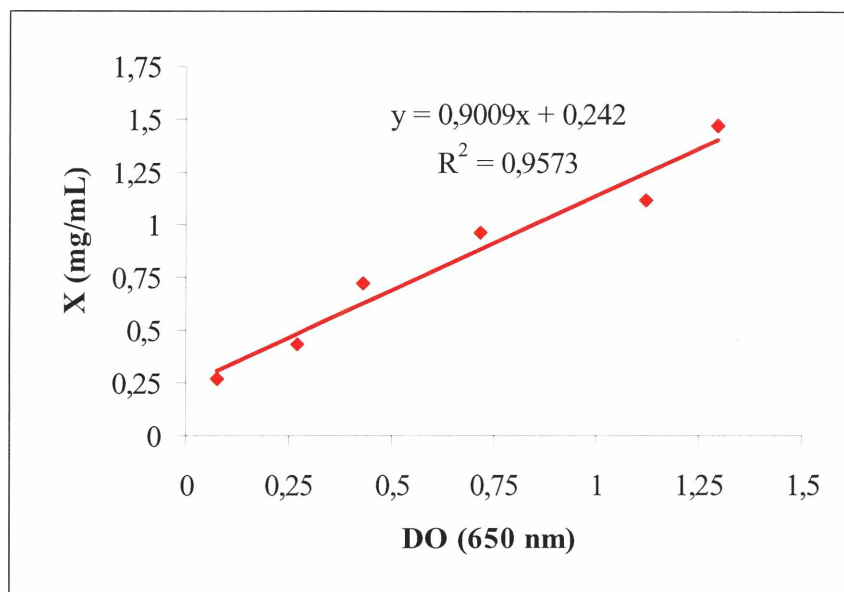


Figura IV. 4. Correlación entre DO y peso seco de *M. bovis*.

Para todas las condiciones de cultivo se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) mediante la determinación de la biomasa a distintos tiempos de cultivo.

IV. 3. 4. Monitoreo de piliación

El seguimiento de la piliación se realizó por la técnica de ELISA descrita en el Capítulo II.

IV. 3. 5. Análisis estadísticos

Se emplearon los programas Microsoft Excel y Systat (Systat, Inc.).

IV. 4. RESULTADOS

IV. 4. 1. Cultivos en Erlenmeyer

Cuando se trabaja con Erlenmeyers agitados el suministro de oxígeno no presenta grandes inconvenientes, sin embargo, es importante determinar el k_{La} de este sistema de cultivo operando en distintas condiciones para establecer un valor de referencia que será trasladado a otros sistemas de cultivo.

Para los cultivos de *M. bovis* piliada en Erlenmeyer se ensayaron velocidades de agitación entre 100 y 200 rpm en agitador orbital y se determinó en cada caso **a.** el k_{La} ; **b.** la producción de biomasa a las 8 horas de cultivo y **c.** la piliación a las 8 horas de cultivo.

a. Encontramos que el k_{La} aumenta marcadamente entre 100 y 140 rpm y permanece sin diferencias significativas desde 160 a 200 rpm (Figura IV. 5.).

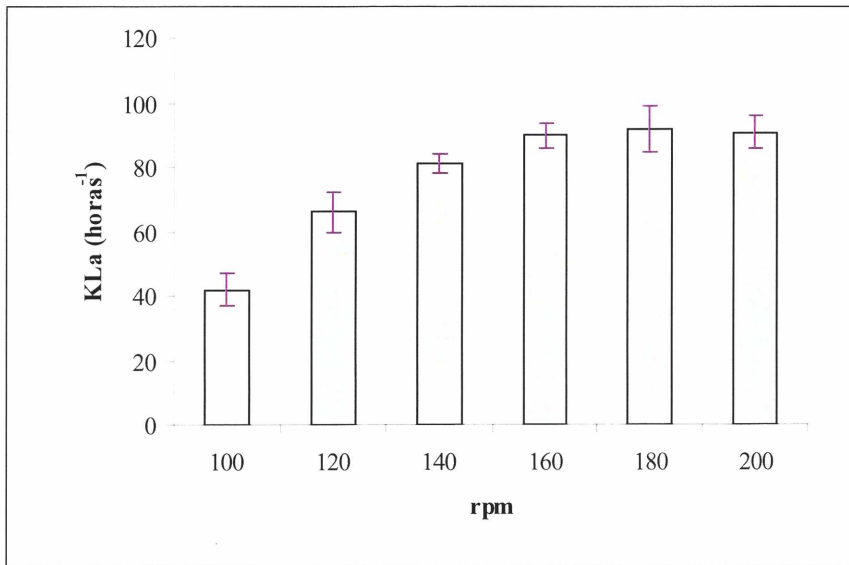


Figura IV. 5. k_{La} de Erlenmeyers a distintas velocidades de agitación (n=3 para cada velocidad de agitación).

b. El valor promedio de biomasa a las 8 horas de cultivo aumenta lentamente cuando la agitación varía entre 100 y 140 rpm y permanece prácticamente sin modificaciones entre 160 y 200 rpm (Figura IV. 6.).

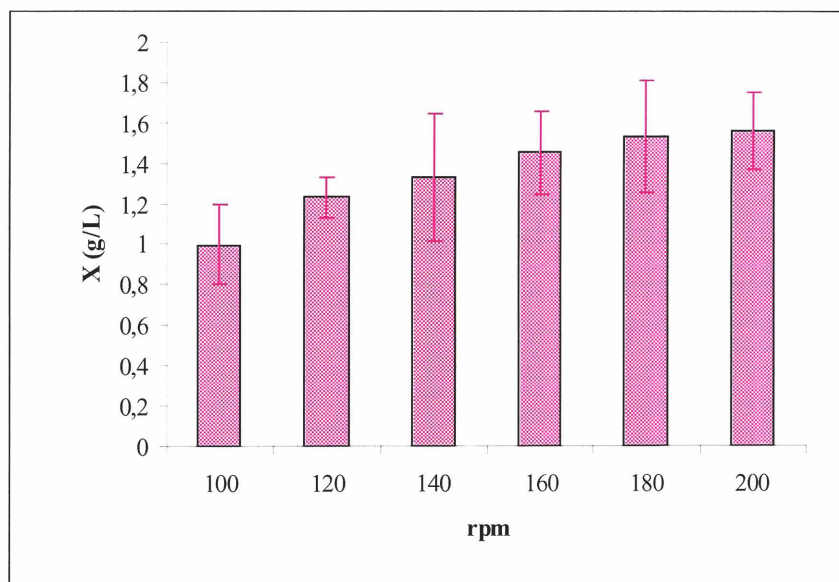


Figura IV. 6. Biomasa de *M. bovis* a las 8 horas de cultivo en Erlenmeyers con distinta agitación (n=3 para cada velocidad de agitación).

c. La piliación determinada por ELISA a las 8 horas de cultivo cae desde el 30% a 100 rpm hasta valores próximos al 20% a 200 rpm. Entre 160 y 200 rpm no muestra diferencias significativas (Figura IV. 7.).

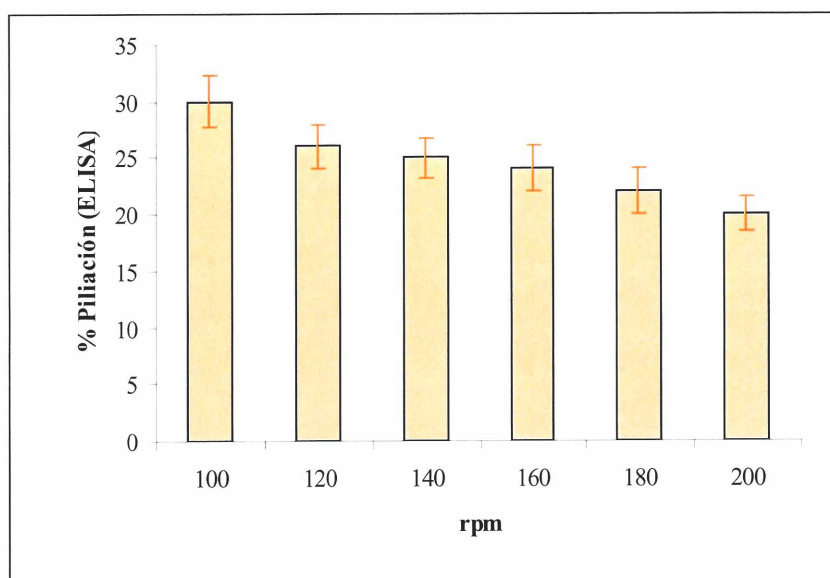


Figura IV. 7. Porcentaje de piliación de *M. bovis* determinado por ELISA a las 8 horas de cultivos en Erlenmeyers con distinta velocidad de agitación (n=3 para cada velocidad de agitación).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores podemos decir que una condición relativamente apropiada para obtener adecuada cantidad de biomasa en cultivos en Erlenmeyer es aquella proporcionada por un k_{La} de 90 h^{-1} que se corresponde con una agitación de 160 rpm. En esta condición se realizó el monitoreo sistemático del crecimiento de la bacteria lo cual nos permitió establecer que la producción de biomasa alcanza valores máximos a las 6 horas de cultivo cuando la piliación es próxima al 30%, como se muestra en la Figura IV. 8.

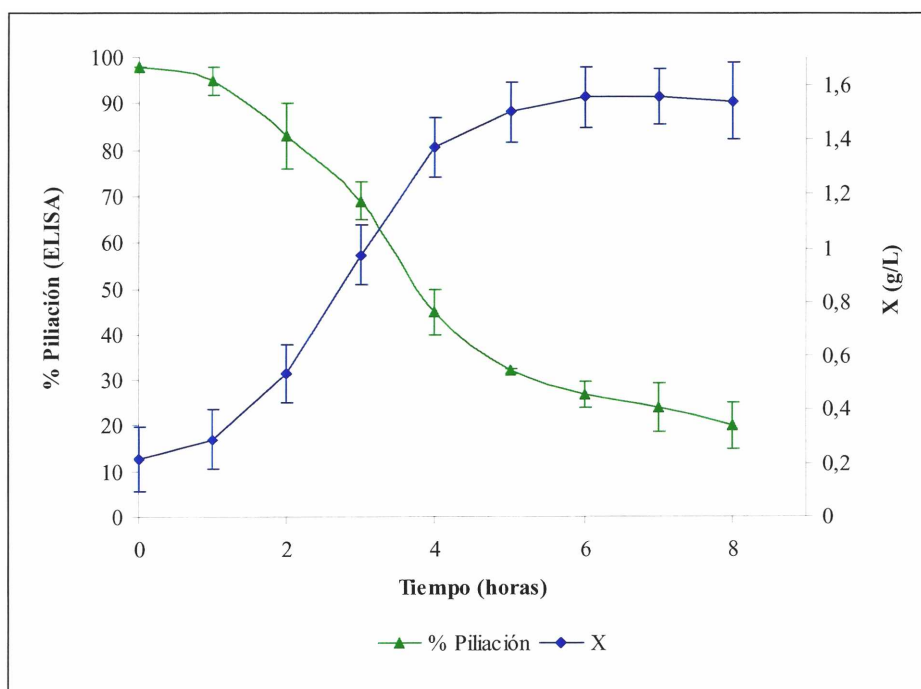


Figura IV. 8. Evolución del porcentaje de piliación y de la biomasa de *M. bovis* en cultivo en medio líquido en Erlenmeyer con k_{La} de 90 horas^{-1} y agitación de 160 rpm ($n=5$).

IV. 4. 2. Cultivos en reactores agitados.

Debido a que el k_{La} al que encontramos mayor producción de biomasa en Erlenmeyer fue de 90 h^{-1} es que para los estudios en reactor agitado fijamos el k_{La} en ése valor, el cuál se logró en condiciones de 350 rpm de agitación y 0,75 VVM de aereación. Aunque este sistema tiene el mismo coeficiente de transferencia de oxígeno tiene mayores fuerzas de corte. En estas condiciones analizamos la producción de biomasa y el porcentaje de piliación por ELISA durante cultivos de 8 horas de duración.

Como se muestra en la Figura IV. 9. la biomasa obtenida fue similar a la alcanzada en Erlenmeyers, sin embargo, el nivel de piliación cayó rápidamente hasta aproximadamente el 1% entre las 6 y las 8 horas de cultivo.

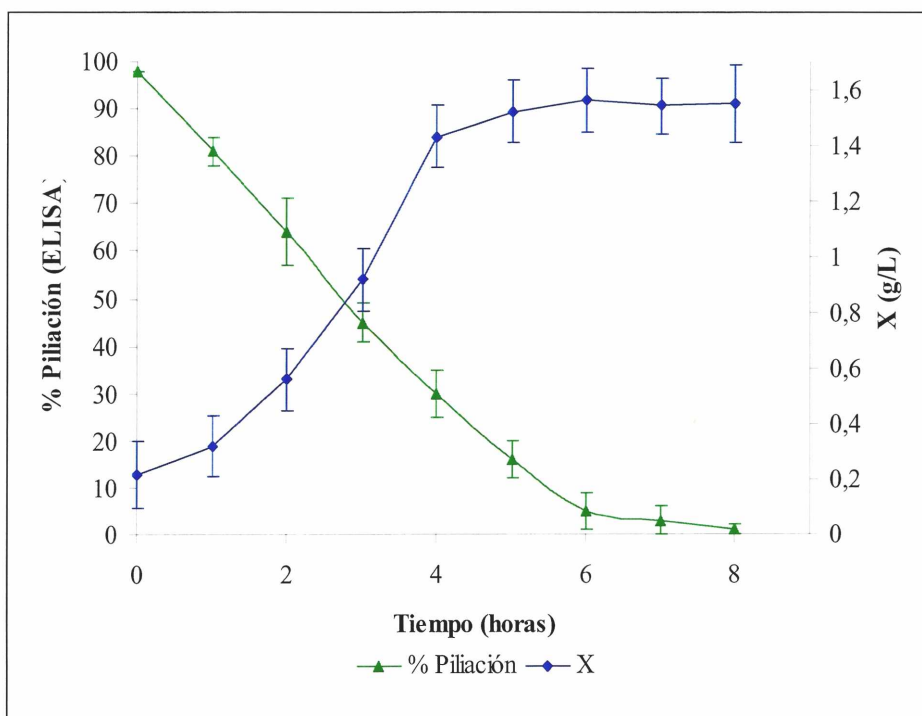


Figura IV. 9. Evolución del porcentaje de piliación y de la biomasa de *M. bovis* en cultivo reactor agitado a 350 rpm y con aireación de 0,75 VVM (n=4).

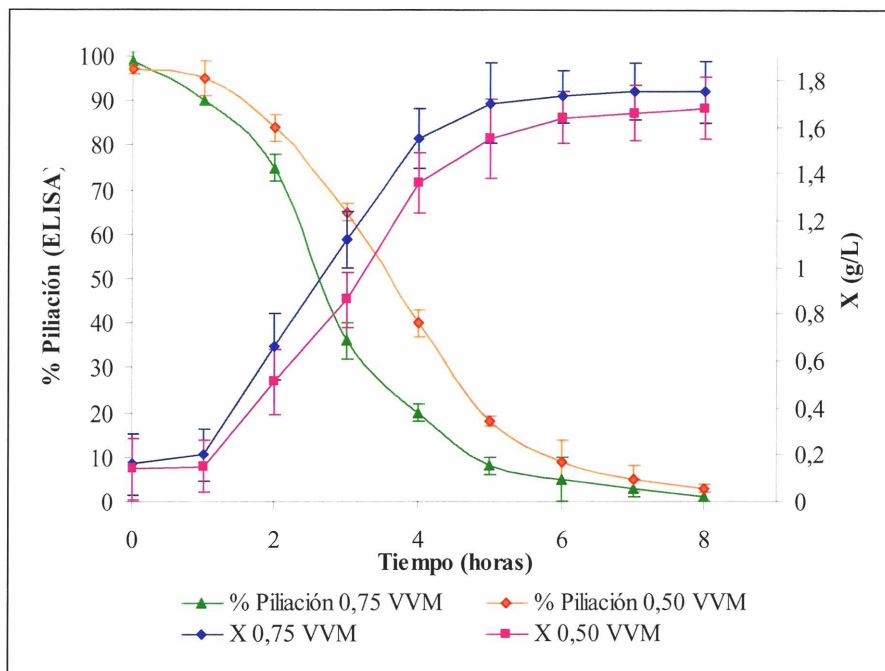


Figura IV. 10. Evolución del porcentaje de piliación y la biomasa de *M. bovis* en cultivos en reactores agitados con aeración de 0,75 VVM (n=4) y 0,50 VVM (n=2).

Encontramos que la producción de biomasa es algo mayor que la obtenida en Erlenmeyer, sin embargo, la piliación cae hasta ser nula a las pocas horas de cultivo.

IV. 4. 3. Cultivos en columnas de burbujeo

Las columnas de burbujeo son reactores agitados neumáticamente por una corriente de aire u otro gas que se inyecta desde el fondo de la misma. La ausencia de agitación mecánica determina características fluidodinámicas muy distintas a las del tanque agitado, la velocidad del líquido es uniforme en todo el sistema, lo que determina la ausencia de gradientes de esfuerzos cortantes. Esta característica las hace atractivas para mantener niveles de piliación más elevados que los obtenidos en los otros sistemas de cultivo con agitación mecánica. Por otra parte, las columnas de burbujeo son sistemas fáciles de escalar a nivel industrial por lo cual representan una alternativa interesante desde el punto de vista de la productivo.

En vista de los resultados obtenidos con reactores agitados mecánicamente decidimos estudiar el crecimiento y estabilidad de la piliación en reactores de bajo shear tales como

las columnas de burbujeo. En este sistema de cultivo analizamos **a.** k_{La} , **b.** la producción de biomasa a las 8 horas de cultivo y **c.** el porcentaje de piliación.

a. Se determinó el k_{La} de columnas de burbujeo con aereación de 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50 y 2,00 VVM y se encontró que aquellas que tenían aereación menor a 1,00 VVM no alcanzaban el k_{La} de 90 h^{-1} señalado como adecuado para el crecimiento de *M. bovis* en Erlenmeyers y obtenido sin dificultad en el reactor agitado. El k_{La} encontrado en las columnas de burbujeo con aereación de 1,00 VVM fue menor al hallado en Erlenmeyer y en reactor agitado a 350 rpm y 0,75 VVM de aereación. El k_{La} de las columnas de burbujeo con aereación de 1,50 VVM fue similar y el de la columna de burbujeo con aereación de 2,00 VVM fue un 12% mayor que el hallado para Erlenmeyers y reactores agitados a 350 rpm (Figura IV. 11.).

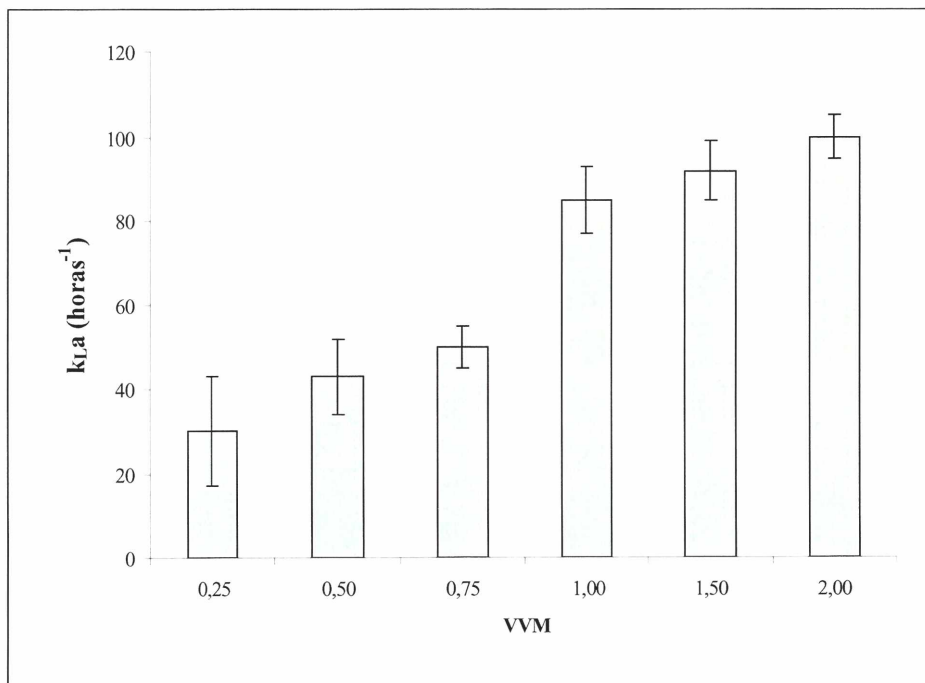


Figura IV. 11. K_{La} de columnas de burbujeo con distinta aereación ($n=3$ para cada caudal de aereación).

b. Se determinó la producción de biomasa a las 8 horas de cultivo en columnas de burbujeo con aereación entre 0,25 y 2,00 VVM y se halló que en las columnas con agitaciones menores a 1,00 VVM la misma fue poco significativa. Al comparar las columnas de burbujeo con aereación de 1,00 y 1,50 VVM no se observan diferencias importantes en la biomasa máxima alcanzada y a su vez estos valores son comparables a

los obtenidos en cultivos en Erlenmeyer y en reactor agitado a 350 rpm con aireación de 0,75 VVM. En cambio la columna de burbujeo con aireación de 2,00 VVM muestra una producción de biomasa algo mayor a la de los cultivos en Erlenmeyer y comparable al reactores agitados regulados teniendo en cuenta el porcentaje de oxígeno disuelto y con aireación de 0,50 y 0,75 VVM (Figura IV. 12.).

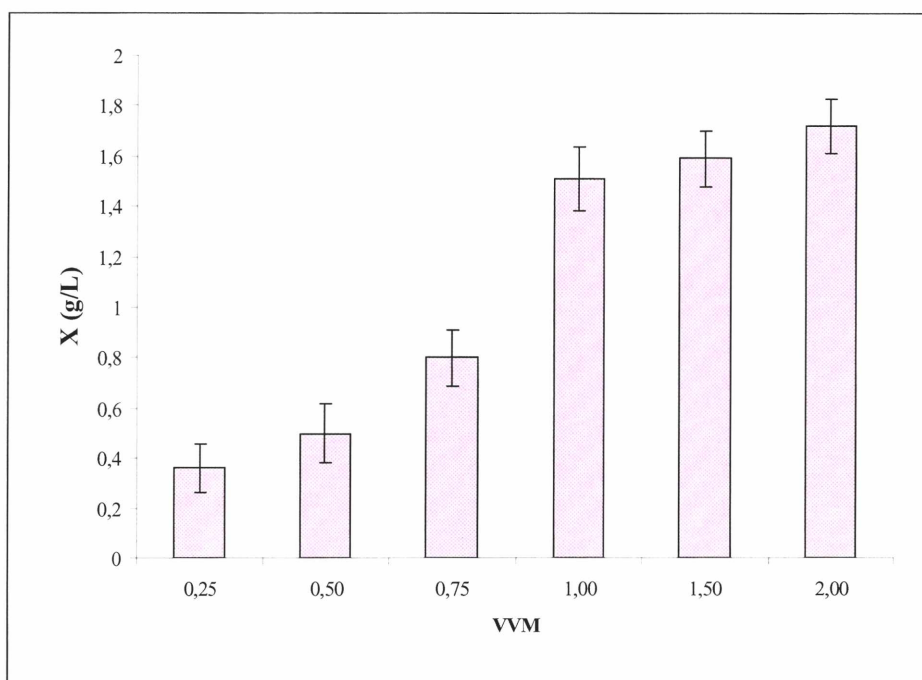


Figura IV. 12. Biomasa de *M. bovis* a las 8 horas de cultivo en columnas de burbujeo con distinta aireación 0,25 VVM (n=2); 0,50 VVM (n=2); 0,75 VVM (n=3); 1,00 VVM (n=3); 1,50 VVM (n=4) y 2,00 VVM (n=4).

c. Se determinó el porcentaje de piliación de *M. bovis* en columnas de burbujeo con aireación de 1,00; 1,50 y 2,00 VVM, no se realizan estas determinaciones para las columnas de burbujeo de 0,25; 0,50 y 0,75 VVM porque en esos cultivos los rendimientos son muy bajos. Se encontró que cuando la aireación fue de 1,00 VVM el porcentaje de piliación fue 50% mayor que el obtenido en cultivos en Erlenmeyers y que cuando la aireación fue de 1,50 VVM y 2,00 VVM el porcentaje de piliación fue igual y 40% menor que el obtenido en cultivos en Erlenmeyers respectivamente. En los tres casos el porcentaje de piliación hallado fue mayor que el hallado en cultivos en reactores agitados.

Se siguió la producción de biomasa y el porcentaje de piliación durante los cultivos con aireación de 1,00; 1,50 y 2,00 VVM con el fin de determinar el momento del cultivo en que se obtiene la más alta biomasa con el más alto porcentaje de piliación, los

resultados se muestran en la Figura IV. 13. Se encontró que en las columnas de 1,00 y 1,50 VVM la biomasa máxima se obtiene aproximadamente a las 6 horas de cultivo, en este momento la piliación se encuentra aproximadamente entre 30 y 45%. En el caso de las columnas de burbujeo con aereación de 2,00 VVM la máxima biomasa se obtiene aproximadamente a las 4 horas de cultivo cuando el porcentaje de piliación es aproximadamente del 50%.

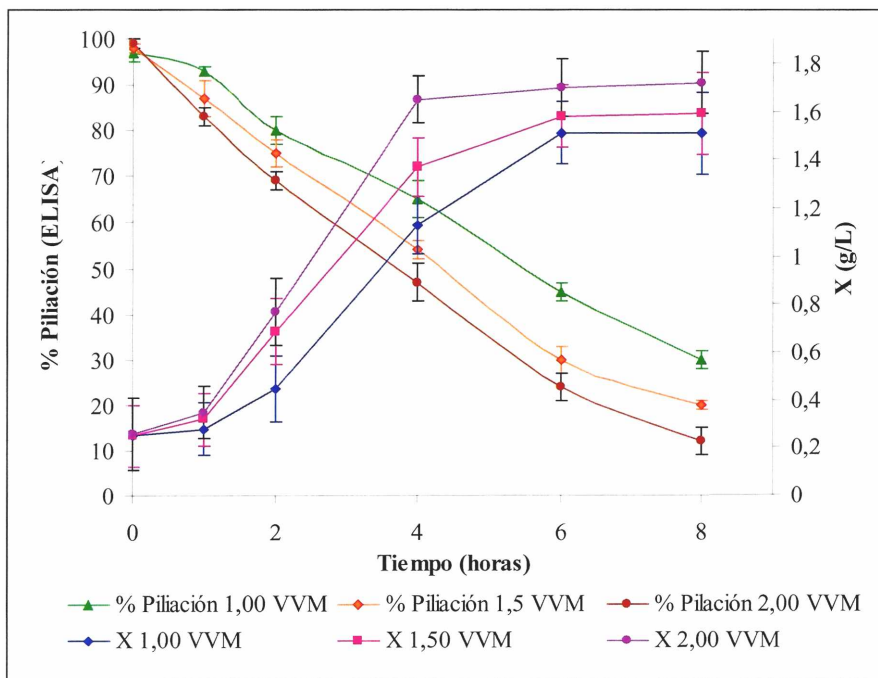


Figura IV. 13. Evolución del porcentaje de piliación y de la biomasa de *M. bovis* en cultivos en columnas de burbujeo con distinta aereación 1,00 VVM (n=3); 1,50 VVM (n=2) y 2,00 VVM (n=3).

IV. 5. DISCUSIÓN

En este Capítulo se describió el comportamiento de *M. bovis* en distintos sistemas de cultivo: Erlenmeyer, reactores agitados y columnas de burbujeo. Para esto se analizaron el coeficiente volumétrico de transferencia de oxígeno (k_{La}), la producción de biomasa y el porcentaje de piliación y los resultados obtenidos se compararon a fin de determinar cual de los sistemas de cultivo es el más adecuado para la producción de *M. bovis*. En la Tabla IV. 1. se muestra un resumen de los resultados obtenidos previamente para facilitar la comparación entre los distintos sistemas de cultivo analizados.

Tabla IV. 1. Comparación de los parámetros analizados en los distintos sistemas de cultivo analizados. *Representa el porcentaje de piliación obtenido por ELISA a las 8 horas de cultivo.

Sistema de cultivo	rpm	VVM	k_{La} (h^{-1})	X (g/L)	% Piliación (ELISA)*	μ_{max} (h^{-1})	t_g (h)
Erlenmeyer	160	---	90	1,54	20	0,5257	1,337
	350	0,75	90	1,55	1	0,4829	1,4829
Reactor agitado	variable	0,75	s/determinar	1,75	1	0,6672	1,1098
	variable	0,50	s/determinar	1,68	3	0,5652	1,2637
Columnas de burbujeo	s/agitación	1,00	85	1,5	30	0,336	1,7909
	s/agitación	1,50	92	1,59	20	0,4645	1,4599
	s/agitación	2,00	110	1,72	12	0,4971	1,3913

K_{La}. En los Erlenmeyers seleccionamos un k_{La} de $90 h^{-1}$ como apropiado para el desarrollo celular. De allí que en reactores agitados y en columnas de burbujeo se buscara mantener este k_{La} . En el primer caso se logró con una agitación de 350 rpm y aereación de 0,75 VVM y en el caso de las columnas de burbujeo con aereaciones de 1,00 y 2,00 VVM.

Crecimiento. Es importante conocer la velocidad específica de crecimiento y rendimiento en biomasa de los sistemas de cultivo en estudio para seleccionar cuál de ellos resulta ser el más apropiado para la producción industrial de *M. bovis*. En nuestras condiciones experimentales la máxima biomasa se obtuvo en los cultivos en reactores agitados con aereación de 0,75 VVM y agitación variable y en columnas de burbujeo de 2,00 VVM¹³. Los restantes sistemas de cultivo mostraron una producción entre un 6% y un 15% menor que la anterior.

Piliación. En las columnas de burbujeo las bacterias mantuvieron un mayor porcentaje de piliación que en cultivos en Erlenmeyer y reactores agitados. Si analizamos la piliación a las 6 horas de cultivo que es el momento en que el cultivo alcanza la fase estacionaria, encontramos que cuando la aereación de las columnas fue de 1,00 VVM la

¹³ Encontramos que en las columnas de burbujeo de 0,25; 0,50 y 0,75 VVM las bacterias no lograron completar la fase lag esto probablemente se deba a que se encontraban en condiciones de limitación de oxígeno y/o a que un alto porcentaje de bacterias autoaglutinaron. Estas dos causas tienen efectos en el mismo sentido: la baja aereación produce limitación en oxígeno y una rápida autoaglutinación de las bacterias, por lo que no se alcanza la disgregación de los flóculos del inóculo.

piliación se mantuvo en valores del 45%, cuando la aereación fue de 1,50 VVM la piliación estuvo aproximadamente en el 30% y cuando la aereación fue de 2,00 VVM la piliación se mantuvo en valores del 24%.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos aquí es que podemos decir que, de los analizados, el sistema de cultivo más apropiado a escala de laboratorio corresponde a las columnas de burbujeo. Las columnas de burbujeo, proveen biomasa similar a la obtenida en reactores agitados en adecuadas condiciones de transferencia de oxígeno y con la ventaja de permitir alcanzar niveles de piliación celular mayores que los otros sistemas ensayados.

En las experiencias presentadas aquí no se observa correlación entre el k_{La} de los distintos sistemas de cultivo y el porcentaje de piliación de *M. bovis*, sin embargo otros autores encuentran relación entre el k_{La} de un sistema de cultivo y la producción de algún factor de patogenicidad. Chen y colaboradores (1999) encontraron que al aumentar el k_{La} , sea por aereación o por agitación, se produce un aumento en la producción de lipasa alcalina de *Acinetobacter radioresistens*. También Mao y Zhong (2004) hallaron que la producción de cordicepina por *Cordyceps militaris* aumenta cuando el k_{La} está entre 11,5 y 54,5 horas⁻¹ y disminuye cuando está entre 54,5 y 113,8 horas⁻¹.

IV. 6. CONCLUSIÓN

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este Capítulo es que podemos concluir que de los sistemas de cultivo analizados el más adecuado para la producción de *M. bovis* de fenotipo piliado es la columna de burbujeo con aereación de 1,00 VVM. Este tipo de reactor permitió alcanzar un adecuado rendimiento de biomasa en cortos tiempos de cultivo y niveles de piliación que si bien todavía resultan bajos mejoran notoriamente lo obtenido en los otros sistemas.

Las columnas de burbujeo son fáciles de escalar con lo cual los resultados obtenidos en este trabajo podrían servir de base para una futura mejora de producción pensando en una escala industrial.

IV. 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- An, Y. H., R. J. Friedman, Editors. 2000. Handbook of Bacterial Adhesion- Principles, Methods, and applications Humana Press, Totowa, NJ, 2000.
- Bayles KW. 2003. Are the molecular strategies that control apoptosis conserved in bacteria?. Trends Microbiology, **11**: 306–311.
- Bellgardt, K.H., 2000. Bioprocess models; Baker's yeast production. In: Schügerl, K., Bellgardt, K.H. (Eds.), Bioreaction Engineering: Modeling and Control. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Bennet CO, Myers JE. 1962. Momentum, heat and mass transfer. McGraw Hill, Inc. pg 15-23.
- Brunskill EW, Bayles KW. 1996. Identification and molecular characterization of a putative regulatory locus that affects autolysis in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. **178**(3): 611-618.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000a. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. Biotechnol Bioeng. **68**(6): 589-593.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B. 2000b. Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. Biotechnol Bioeng. **68**(6): 594-601.
- Büchs J, Zoels B. 2001. Evaluation of the ratio of the maximum to specific power consumption in shaking bioreactors. Proceedings of the Third International Symposium on Mixing in Industrial Processes, J Chem Eng Jpn. **34** (5): 647–653.
- Cavalitto, S. F. 2003. Crecimiento de *Geotrichum klebahnii* y expresión de protopectinasa S-E. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Chen, J. Y.; C. M. Wen; T. L. Chen. 1999. Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radioresistens*. Biotechnology and Bioengineering, **62**(3):311-316.
- Chisti, M. Y. 1988. Hydodynamic gas-liquid mass transfer considerations for the design of airlift bioreactors. PhD Thesis, University of Waterloo, Ontario, Canadá.
- Chisti, M. Y.; M. Moo-Young. 1987. Airlift reactors: characteristics, applications, and design considerations. Chemical Engineering Communications **60**:195.
- Cooper, C. M.; G. A. Fernstrom; S. A. Miller. 1944. Performance of agitated gas-liquid contactors. Industrial and Engineering Chemistry Research, **36**(6):504-509.
- Dalgaard, P.; T. Ross; L. Kamperman; K. Neumeyer; T. A. McMeekin. 1994 Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. International Journal Food Microbiology, **23**(3-4):391-404.
- Dunlop E, Namdev P. 1993. Effect of fluid forces on plant cell suspension. Procc. 3rd Int. Conf. on Bioreactor and Bioprocess Fluid Dynamics, Nienow, A. (Ed.) Mechanical Eng. Pub. Ltd. London, pg. 447-455. García-Briones M, Chalmers JJ. 1994. Flow

- parameters associated with hydrodynamic cell injury. *Biotechnol Bioeng.* 44:1089-1098.
- Garcia-Ochoa, F.; E. Gomez. 2005. Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **92**(6):761-772.
- Gautam S, Sharma A. 2002. Involvement of caspase-3-like protein in rapid cell death of *Xanthomonas*. *Mol Microbiol.* **44**: 393–401.
- Han RB, Yuan YJ. 2004. Oxidative burst in suspension culture of *Taxus cuspidata* induced by a laminar shear stress in shortterm. *Biotechnol Prog.* **20**(2): 507-513.
- Heidrich C, Templin MF, Ursinus A, Merdanovic M, Berger J, Schwarz H, dePedro MA, Holtje JV. 2001. Involvement of N-acetylmuramyl-l-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **41**:167–178.
- Henzler HJ. 2000. Particle stress in bioreactors. In: *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* T. Scheper (Ed.) Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, p. 35-82.
- Hewitt CJ, Boon LA, McFarlane CM, Nienow AW. 1998. The use of flow cytometry to study the impact of fluid mechanical stress on *Escherichia coli* W3110 during continuous cultivation in an agitated bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* **59**: 612-620.
- Hochman A. 1997. Programmed cell death in prokaryotes. *Crit Rev Microbiol.* **23**: 207–214.
- INA (Instituto Nacional del Agua). Cartilla Educativa N° 2. Química básica del agua. 2005. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la República Argentina. http://www.ina.gov.ar/cartillas_edu/cartilla_2.htm.
- Jolliffe LK, Doyle RJ, Streips UN. 1981. The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis*. *Cell* **25**:753–763.
- Joshi J, Elias C, Patole M. 1996. Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. *Biochem Eng J.* **62**: 121-141.
- Kieran PM, Malone DM, MacLoughlin PF. 2000. Effects of hydrodynamic and interfacial forces on plant cell suspension systems. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **67**: 139-177.
- Koch, A. 1971. The adaptive responses of *Escherichia coli* to a feast and famine existence. *Advances in Microbial Physiology*, **6**:147–217.
- Kolmogorov AN. 1941. The local structure of turbulence in incompressible viscous fluid for very large Reynolds numbers. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 30. Translated by V. Levin. Reprinted in *Proc. R. Soc. Lond A* 434, 9-13. 1991.
- Kolmogorov AN. 1962. A refinement of previous hypotheses concerning the local structure of turbulence in viscous incompressible fluid at high Reynolds number. *J. Fluid Mech.* **13**: 82.
- Kolter, R. 1999. Growth in studying the cessation of growth. *Journal of Bacteriology*, **181**:697–699.
- Leite, F. P. L.; C. Gil-Turnes. 1995. Influence of culture media and air supply on the production of adhesins by *Moraxella bovis*. *Reviews Microbiology*, **26**:135-139.

- Lloyd D, Hayes AJ. 1995. Vigor, vitality and viability of microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* **133**: 1-7.
- Maier U, Büchs J. 2001. Characterization of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochem Eng J.* **7**(2): 99-106.
- Mao. X. B.; J. J. Zhong. 2004. Hyperproduction of cordycepin by two-stage dissolved oxygen control in submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* in bioreactors. *Biotechnology Progress*, **20**(5):1408-1413.
- Märkl H, Bronnenmeier R, Wittek B. 1991. The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress. *Int Chem Eng.* **31**(2): 185-196.
- Meneses-Acosta A, Mendonça RZ, Merchant H, Covarrubias L, Ramírez OT. 2001. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnol Bioeng.* **72**: 441-457.
- Merchuk, J. C. 1990. Why use airlift bioreactors? *Tibtech*, Elsevier Science Publishers L. **8**:67-71.
- Moo-Young, M.; Y. Chisti 1988. Considerations for designing bioreactors for shear-sensitive culture. *Bio/technology*, 1291-1296.
- Mutharasan, Raj. 1996. Engineering Biotechnology, Gateway Project, *Bioreactors*. Drexel University.
- Neidhardt, F. C. 1999. Guest commentary. Bacterial Growth: Constant Obsession with dN/dt . *Journal of Bacteriology*, **181**(24):7405–7408.
- Novick, A.; L. Szilard. 1950. Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **36**:708–719.
- Ogston AG, Stanier JE. 1953. A Couette viscosimeter. *Biochem J.* **053**: 4–10.
- Peña C, Galindo E. 2002. Las condiciones de cultivo determinan las características moleculares de los polisacáridos microbianos. *Biología.* **7** (3): 22-38.
- Peña C, Trujillo-Roldán MA, Galindo E. 2000 Influence of dissolved oxygen tension and agitation speed on alginate production and its molecular weight in cultures of *Azotobacter vinelandii*. *Enzyme Microb Technol.* **27**: 390-398.
- Peter CP, Suzuki Y, Büchs J. 2006. Hydromechanical stress in shake flasks: Correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnol Bioeng.* **93**(6): 1164-1176.
- Prokop A, Bajpai R. 1992. The sensitivity of biocatalysts to hydrodynamic shear stress. *Advances Appl Microbiol.* **37**: 165-232.
- Richardson LF. 1922. Weather prediction by numerical process. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rodríguez, M. E. 1995. Estudio de los efectores que modifican el crecimiento y la expresión antigénica de *Bordetella pertussis*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Rodríguez-Monroy M, Galindo E. 2003. Las células vegetales. ¿Frágiles para crecer en biorreactores?. *Biología.* **8** (2): 6-17.

- Sahoo S, Rao KK, Suraishkumar GK. 2006. Reactive oxygen species induced by shear stress mediate cell death in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Bioeng.* **94**(1): 118-127.
- Sahoo S, Rao KK, Suresh AK, Suraishkumar GK. 2004. Intracellular reactive oxygen species mediate suppression of sporulation in *Bacillus subtilis* under shear stress. *Biotechnol Bioeng.* **87**(1): 81-89.
- Sahoo S, Verma RK, Suresh AK, Rao KK, Bellare J, Suraishkumar GK. 2003. Macro-level and genetic-level responses of *Bacillus subtilis* to shear stress. *Biotechnol Prog.* **19**(6):1689-1696.
- Shi ZD, Yuan YJ, Wu JC, Shang GM. 2003. Biological responses of suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei* to shear stresses in the short term. *Appl Biochem Biotechnol.* **110**(2): 61-74.
- Soni Abhishek. 2002. A Multi-Scale Approach to Fed-Batch Bioreactor Control, Thesis of Master of Science in Chemical Engineering. University of Pittsburg, Pittsburg, United States.
- Takesono, S.; M. Onodera; K. Toda; M. Yoshida; K. Yamagiwa; A. Ohkawa. 2006. Improvement of foam breaking and oxygen-transfer performance in a stirred-tank fermenter. *Bioprocess Biosystems Engineering*, **28**(4):235-242.
- Thomas C. 1990. Problems of shear in biotechnology. In: *Chem. Eng. Problems Biotechnol.* Winkler M. (Ed.), Elsevier Sci. Pub., England, p. 25-93.
- Thomas CR, al-Rubeai M, Zhang Z. 1994. Prediction of mechanical damage to animal cells in turbulence. *Cytotechnol.* **15**(1-3): 329-335.
- Thomas CR, Zhang Z. 1998. The effects of hydrodynamics on biological materials. In: *Adv. Bioprocess Eng. II.* Galindo E. and Ramírez OT. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, p 137-170.
- Todar, K. 2002. Growth of Bacterial Populations, *Todar's Online Textbook of Bacteriology.* University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Octubre 2005. <http://textbookofbacteriology.net/growth.html>
- Trujillo-Roldán, M. A.; N. A. Valdez-Cruz. 2006. Artículo de Revisión. El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista Latinoamericana de Microbiología* Vol. **48**(3-4):269 - 280
- Wecker A, Onken U. 1991. Influence of dissolved oxygen concentration and shear rate on the production of pullulan by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol Lett.* **13**: 155-160.
- Wittmann, C; H. M. Kim; G. John; E. Heinzle. 2003. Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks. *Biotechnol Letters*, **25**(5):377-380.
- Wu J, Ge X. 2004. Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. *Biotechnol Bioeng.* **85**(7): 714-721.
- Zwietering, M. H.; F. M. Rombouts; K. van't Riet. 1992. Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *Journal Applied Bacteriology*, **72**(2):139-145.

Capítulo V

CRECIMIENTO DE *MORAXELLA BOVIS* EN BIOFILM

V. 1. INTRODUCCIÓN

Si bien la mayoría de los estudios sobre crecimiento y fisiología de microorganismos se han llevado a cabo tradicionalmente en sistemas de cultivo líquido, es ampliamente reconocido que la generalidad de las bacterias que se encuentran en el ámbito natural, clínico e industrial persisten en asociación con superficies; incluso las bacterias que se encuentran naturalmente en ambientes acuáticos crecen adheridas a superficies (Costerton *et al.*, 1986). Kievit y colaboradores (2001) reportaron que la biomasa bacteriana presente en la naturaleza tiene una propensión innata a adherirse a superficies y crecer sobre ellas. Esta forma de crecimiento se denomina crecimiento en biofilm.

Los biofilms se definen como poblaciones bacterianas embebidas en una matriz extracelular, donde las células se encuentran adheridas entre sí y/o a superficies y/o interfaces. Esta definición incluye agregados, flóculos microbianos y también poblaciones adherentes en espacios entre poros y en medios porosos (Costerton *et al.*, 1995). Debido a que una forma de vida unida a superficie es ubicua, es probable que este tipo de existencia sea una característica crítica para la persistencia de las bacterias. Los organismos si bien pueden existir como unidades independientes en un ambiente, proliferan con más eficacia formando comunidades. La mayoría de los biofilms exhiben un importante nivel de heterogeneidad que se aprecia en los agregados celulares que los componen y en la disposición de las células que no están en capas ordenadas sino que se disponen entremezcladas en una matriz de exopolímeros. Esta matriz presenta áreas abiertas, donde se forman canales para permitir el pasaje de líquido (Davey *and* O'Toole, 2000).

Jefferson (2004) indica que la forma natural de crecimiento de las bacterias sería en biofilm mientras que la vida libre sería un artefacto, inclusive reporta que existen incentivos potenciales para el crecimiento de las bacterias en biofilms, tales como: i) protección contra las condiciones adversas del medio ambiente, ii) asentamiento en un área rica en algún nutriente, iii) aprovechamiento de ventajas que ofrece la vida cooperativa.

La medicina y la veterinaria moderna se enfrentan a los problemas relacionados con las infecciones producidas por microorganismos formadores de biofilm. Los biofilms bacterianos son difíciles de detectar en diagnósticos de rutina y son inherentemente tolerantes a las defensas del hospedador y a las terapias con antibióticos (Abdi-Ali *et al.*, 2006). Además, los biofilms facilitan la diseminación de la resistencia a antibióticos por transferencia horizontal de genes (Fux *et al.*, 2005).

De las propiedades mencionadas, la característica más importante de las infecciones producidas por biofilms es la resistencia a agentes antimicrobianos. Como resultado de esto, las infecciones causadas por biofilms bacterianos son persistentes y muy difíciles de erradicar. Si bien han sido postulados distintos mecanismos para explicar la baja susceptibilidad del biofilm a agentes antimicrobianos, es evidente que la resistencia a antibióticos es un proceso multifactorial (Drenkard, 2003). En las pruebas de laboratorio se observa que los mecanismos por los que se produce la resistencia a antibióticos son, entre otros, la resistencia a la penetración de drogas, la alteración de los sitios blanco de las drogas, la inactivación de las mismas y la baja velocidad de crecimiento (Smith, 2005).

Los microorganismos sufren profundos cambios durante su transición desde una vida libre a biofilm. Estos complejos cambios ocurren en respuesta a una variedad de señales medioambientales. Investigaciones recientes han identificado genes y circuitos regulatorios importantes para los pasos iniciales de las interacciones entre la célula y la superficie, la maduración del biofilm y el retorno de los microorganismos a vida libre (O'Toole *and* Kolter, 1998; O'Toole, 2003).

Condiciones tales como las características de la superficie y la interfase, la disponibilidad de nutrientes, composición de la comunidad microbiana y la hidrodinámica del sistema pueden afectar la estructura del biofilm (De Vuyst *and* Vandamme, 1992). Así, la composición del medio de cultivo tiene efecto en el crecimiento del biofilm determinando por ejemplo, su espesor, que en el caso particular de los estreptococos orales es dependiente de la cantidad de sacarosa en el medio de cultivo (Burne *et al.*, 1999). Otro

efecto observado es que la hidrodinámica del sistema también afecta la arquitectura de mismo; bajo altas tensiones de agitación, el biofilm es estratificado y condensado, bajo flujo laminar es irregular y constituido por agregados celulares separados por vacíos intersticiales, bajo flujos turbulentos son también irregulares pero muestran prolongaciones alargadas (Davey *and* O'Toole, 2000). En relación con esto Battin y colaboradores (2003) reportaron que la heterogeneidad microestructural es dinámica y que los biofilms que se desarrollan en bajas velocidades de flujo son más delgados, tienen una superficie más grande y sinuosa y una densidad más alta que su contraparte expuesta a altas velocidades de flujo. Además, la sinuosidad de superficie y la fragmentación del biofilm aumentan con su delgadez, reduciendo también la resistencia a la transferencia de masa de los solutos a los biofilms.

La formación de un biofilm maduro en una superficie requiere de cinco pasos secuenciales: i. el transporte de los microorganismos hasta la superficie; ii. la adhesión a la superficie y la formación de una monocapa de células; iii. la producción de exopolisacáridos y estructuras propias de la superficie celular que aseguran la unión a la superficie y la formación de microcolonias; iv. formación de una estructura particular con canales de circulación de líquido propia de un biofilm maduro (Busscher *et al*, 1995) y v. desprendimiento o muerte del biofilm. Otros autores llaman a estas fases: (i) adhesión reversible, (ii) adhesión irreversible, (iii) maduración-1, (iv) maduración-2, y (v) dispersión (Sauer *et al.*, 2002).

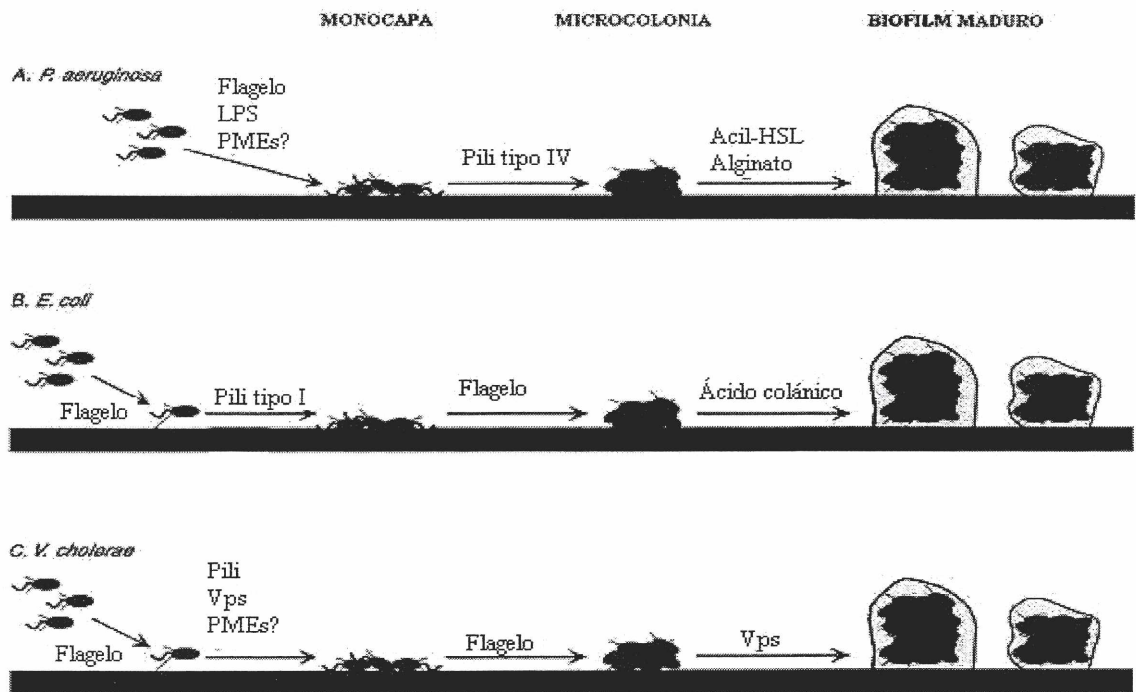


Figura V. 1. Pasos de formación de biofilm de *P. aeruginosa*, *E. coli* y *V. cholerae*. La figura se tomó de Davey y O'Toole (2000).

En la figura V. 1 se muestran los estadios tempranos de la formación de biofilm en tres especies bacterianas Gram-negativas tomadas como modelo: *P. aeruginosa*, *E. coli* y *V. cholerae*.

En *P. aeruginosa* los flagelos son necesarios para llevar a las bacterias hasta la proximidad de la superficie donde luego los lipopolisacáridos (LPS) median las interacciones tempranas, con un rol adicional posible para las proteínas de membrana externa (PME). Una vez que las bacterias se posicionaron sobre la superficie forman una monocapa utilizando su capacidad para desplazarse por *twitching* por ejemplo (mediada por pili tipo IV) transformando posteriormente los agregados de células en microcolonias. La producción de pili, para algunas bacterias es regulada, por lo menos en parte, por un conjunto de señales propias de cada organismo en particular; entre ellas, el sistema de transmisión de señales denominadas *quórum sensing* (hallado en muchas bacterias Gram-negativas), que permite la “comunicación” célula-célula mediante un efector químico difusible derivado en general de moléculas del tipo de las N-acil homoserin lactonas (Acil-HSL), también conocido como autoinductor y activador transcripcional. La expresión de genes es regulada, en gran variedad de especies bacterianas, en forma acoplada con la

densidad celular y la fase de crecimiento; de esta manera la activación no ocurre a bajas densidades celulares porque el nivel de autoinductores es muy bajo. Y por otra parte, se ha visto que tales señales influyen en la estructura física del biofilm bacteriano (Brown *and* Barker, 1999).

En *E. coli* el flagelo es requerido para la aproximación y para el movimiento inicial de la bacteria en la superficie. Las interacciones entre el microorganismo y la superficie requieren la presencia de un pili de tipo I, de PME específicas y de exopolisacáridos (EPS) para la formación de la estructura del biofilm.

En *V. cholerae* la adhesión a la superficie es similar a la de *E. coli* porque ambas especies bacterianas utilizan el flagelo para aproximarse y movilizarse en la superficie, ambas necesitan de un pilus y una o más PME modificada/s para lograr la adhesión a la superficie y EPS para estabilizar los estadios iniciales de la adhesión (Davey *and* O'Toole, 2000). Las diferencias radican en el tipo particular de PME y LPS que ellas producen durante la adhesión.

En este sentido también encontramos los resultados de van Loosdrecht (1987) que demostró la importancia de los pili tipo IV en la adhesión y los de Froeliger y Fives-Taylor (2001) que lograron asociar la presencia de las fimbrias de *Streptococcus parasanguis* con la formación de biofilms en superficies sólidas de poliestireno. Además, al estudiar la genética del microorganismo vieron que mutantes defectivas en el gen que codifica una proteína encargada de ensamblar las subunidades de la fimbria son incapaces de formar el biofilm. Sin embargo, mutantes defectivas en el gen que codifica para proteínas encargadas de la reparación del ADN, para proteínas asociadas a fimbrias y para enzimas con actividad endopeptidasa fueron aún capaces de adherirse y formar el biofilm. Resultados similares fueron hallados por Heydorn y colaboradores (2002) que identificaron genes esenciales para la producción de biofilms en *P. aeruginosa*. Estos autores confrontaron el biofilm producido por: i) una cepa salvaje, ii) una mutante incapaz de producir el autoinductor *N*-oxododecanoil L-homoserin lactona, iii) una mutante defectiva en la expresión del factor sigma que regula el crecimiento del biofilm y iv) una mutante defectiva en el gen de la pilina. El estudio mostró que los biofilms producidos por las dos primeras cepas fueron uniformes, densamente empaquetados e indistinguibles en todos los instantes de tiempo. La cepa mutante en la producción de factor sigma produjo biofilms densamente empaquetados pero que fueron significativamente más delgados que los de la

cepa salvaje. La cepa mutante en el gen de la pilina produjo microcolonias espaciadas regularmente y de tamaño casi uniforme.

En relación con la composición química de la matriz que envuelve las células en los biofilms microbianos se observó que en la mayoría de los casos está compuesta de EPS altamente hidratados (White, 1984; Costerton *et al.*, 1986). La producción de EPS por las células sésiles facilita la adhesión de las bacterias a las superficies, la formación y mantenimiento de las microcolonias, la estructura del biofilm y el aumento de la resistencia al estrés ambiental y a agentes antimicrobianos (Allison *and* Sutherland, 1987; Caron, 1987; Brown *and* Gilbert, 1993; Ophir *and* Gutnick, 1994). El EPS es altamente heterogéneo y ha sido demostrada su variación espacial y química (Costerton *et al.*, 1995). Otros componentes reportados en la matriz incluyen LPS, proteínas y ácidos nucleicos.

M. bovis coloniza la córnea del ojo produciendo queratoconjuntivitis mediante un proceso que implica una primera etapa de adhesión seguido por multiplicación y colonización. Es evidente entonces que cualquier estudio que intente conocer el comportamiento de esta bacteria *in vivo*, debe necesariamente considerar el modelo de crecimiento en biofilm. Sin embargo, de acuerdo a nuestros conocimientos, no se reportan en la bibliografía internacional resultados obtenidos del cultivo de esta bacteria en biofilm. Además, como vimos previamente los cultivos en Erlenmeyers, biorreactores agitados y columnas de burbujeo si bien pueden proporcionar rendimientos en biomasa adecuados, no permiten el mantenimiento del principal factor de patogenicidad de *M. bovis* los pili como para ser utilizados a escala industrial, para la producción de vacunas contra QIB. Por estos motivos es que se decidió iniciar estudios sobre el crecimiento y formación de biofilm de *M. bovis*. Aquí hacemos una presentación de resultados preliminares obtenidos en este sentido.

V. 2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta que esta enfermedad ocurre como consecuencia de la colonización de la superficie de la córnea bovina por *M. bovis*, nos planteamos el estudio de la bacteria creciendo en biofilm que es la forma de crecimiento que más se aproxima al

comportamiento real de esas células *in vivo*. Específicamente los objetivos planteados fueron los siguientes:

1. Implementar un sistema experimental que permita el estudio del crecimiento de las bacterias en biofilm.

2. Monitorear el crecimiento celular por microscopia electrónica y de epifluorescencia y caracterizar las células sésiles por sus propiedades y componentes de superficie.

3. Comparar las propiedades y componentes de superficie de *M. bovis* creciendo en biofilm con los de *M. bovis* creciendo en cultivos en medio sólido y líquido.

V. 3. MATERIALES Y MÉTODOS

V. 3. 1. Organismos, medios y sistemas de cultivo

Se empleó *M. bovis* 1194-03 piliada proveniente de medios de cultivo sólido TSA sangre de 18 a 24 horas de crecimiento obtenida como se explica en el capítulo II.

Se estudió el crecimiento en biofilm empleando biorreactores tipo columna rellenos con perlas de vidrio, en lugar de utilizar placas multipocillo (como se estudia más comunmente este tipo de crecimiento) debido a que según reporta Gottschal (1992) en columnas se puede observar la actividad fisiológica de una población bacteriana bajo condiciones de crecimiento relativamente más controladas y además se obtienen mayores rendimientos en biomasa que los obtenidos en placas multipocillo.

Los cultivos en biofilm se realizaron teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo III de esta tesis acerca de: i. la adhesión de *M. bovis* a distintos soportes inertes; ii. el método de cuantificación de la adhesión y iii. el método de desadhesión. Teniendo en cuenta dichos resultados adoptamos como soporte inerte al vidrio; se cuantificó la adhesión mediante disminución de la densidad óptica y recuento viable de células adheridas y se removieron las células adheridas por agitación.

Estudios preliminares. Antes de iniciar los cultivos en biofilm se hicieron estudios para establecer: a. el diámetro de las perlas de vidrio que se usarían en las experiencias y b. el tiempo de adhesión de *M. bovis* a las perlas de vidrio seleccionadas.

a. *Efecto del diámetro de las perlas de vidrio.* Este estudio se realizó a fin de analizar si el empaquetamiento o compactación de las perlas de vidrio en las columnas afectaba la adhesión inicial de *M. bovis* al soporte y adicionalmente ver como influía en la transferencia de oxígeno. Para esto las bacterias fueron tratadas como se indica en el Capítulo III y puestas en contacto con perlas de vidrio redondas de 3 diámetros diferentes (3, 4 y 5 mm). El número de perlas de vidrio colocadas en cada frasco se calculó de manera tal que la superficie total de adhesión fuera lo más similar posible y utilizando el método directo de disminución de la DO se encontró que las perlas de 4 mm son las que permitieron la mayor adhesión por lo que se usaron como patrón del 100% de adhesión. Las perlas de 5 mm permitieron una adhesión bacteriana del 96,41% y las perlas de 3 mm una adhesión del 84,59% con respecto a las de 4 mm. Aunque no hay diferencia significativa entre la adhesión a perlas de 4 y 5 mm se decidió realizar estos cultivos en perlas de 4 mm porque son las que a la inspección ocular muestran un empaquetamiento más regular dentro de la columna lo que permite una aereación del sistema más homogénea.

b. *Determinación del tiempo de adhesión a perlas de vidrio.* El tiempo de adhesión de *M. bovis* a perlas de vidrio de 4 mm en columnas se determinó preparando suspensiones bacterianas a partir de 2 a 3 cajas de cultivo en medio TSA sangre de 18 a 24 horas de incubación en 130 ml de medio BHI; se midió la DO de la suspensión ($\approx 0,6$) que se usa como inóculo para la columna rellena con perlas de vidrio. El sistema se mantuvo sin agitación y se tomaron muestras de sobrenadante cada hora durante 4 horas. El máximo porcentaje de adhesión obtenido correspondió a aproximadamente un 60% de las bacterias inoculadas. La mayor adhesión se alcanzó a las 3 horas de incubación por lo que quedó establecido este tiempo de adhesión para nuestras condiciones experimentales (Figura V. 2.).

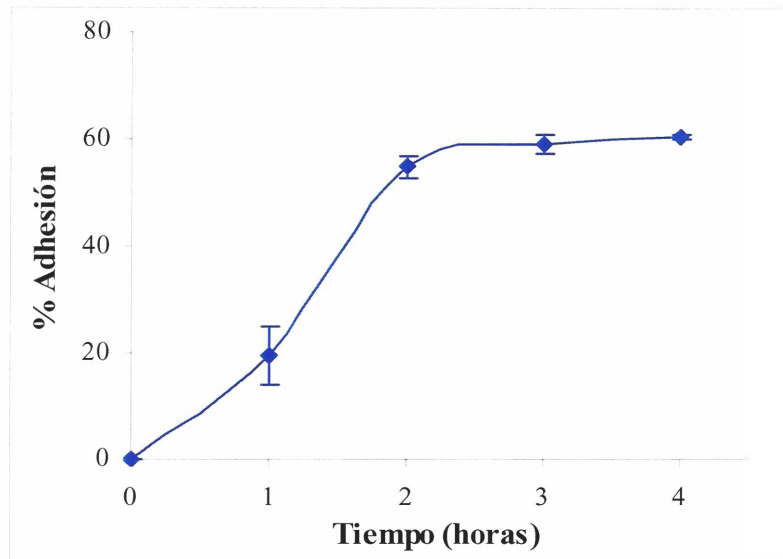


Figura V. 2. Curva de adhesión de *M. bovis* a perlas de vidrio de 4 mm (n=3).

Cultivos en biofilm usando perlas de vidrio como soporte. Los cultivos en biofilm se iniciaron colectando bacterias piliadas obtenidas de 5 a 7 cajas de cultivos en medio sólido de 18 a 24 horas de crecimiento. Las columnas rellenas con perlas de vidrio de 4 mm de diámetro se inocularon con una suspensión de células en 130 ml de medio BHI (Figura V. 3.). Una vez inoculadas las columnas se mantuvieron sin aereación durante 3 horas para permitir la adhesión de las bacterias a las perlas. Cuando finalizó esta etapa se drenó el medio de cultivo que contenía las bacterias no adheridas, se agregó medio de cultivo fresco y 0,35 mL de antiespumante (preparado como se indica en el capítulo IV) y se inició la aereación que se mantuvo entre 0,20 y 0,30 VVM. Cada 24 horas se cortó la aereación y se procedió a la renovación del medio de cultivo. Para el seguimiento de la esterilidad se estudiaron las bacterias recuperadas del drenaje diario y para las pruebas específicas de células sésiles se utilizaron las bacterias removidas de las perlas al final de cada ensayo, es decir de columnas cosechadas a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas de cultivo.

Al cumplirse cada tiempo de cultivo se drenó el sobrenadante, se lavó la columna haciendo pasar suavemente 2 volúmenes de agua destilada estéril para retirar las células no adheridas y se colectaron las perlas. Se removieron de células sésiles de las perlas de vidrio por agitación para lograr la mayor recuperación bacteriana y el mantenimiento de las características de las células. Para esto se colocaron las perlas en un erlenmeyer al que se le adicionaron 100 mL de agua destilada estéril (se comprobó previamente que los resultados

eran comparables con los obtenidos al recuperarlas en buffer o en PBS) y se colocaron en un agitador orbital durante 25 minutos. Luego se retiró la suspensión celular que se centrifugó a baja velocidad y se lavó 2 veces, las células así obtenidas se analizaron por distintas metodologías.

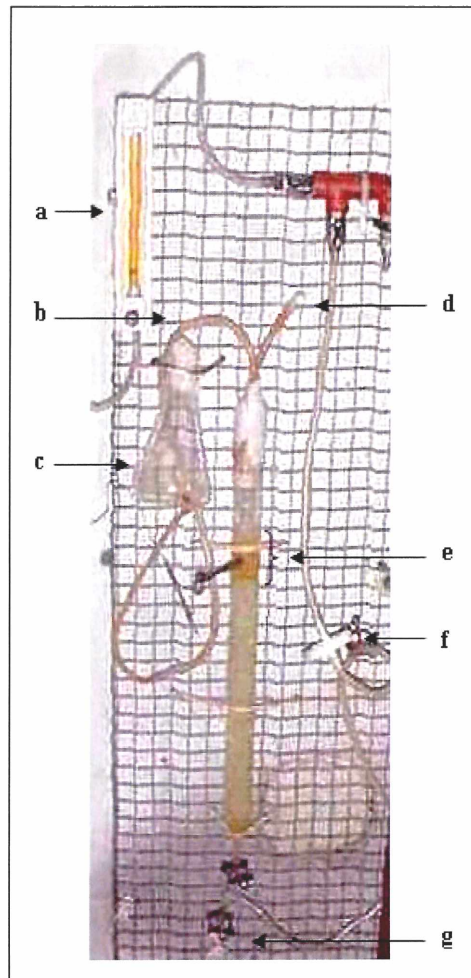


Figura V. 3. Columna rellena con perlas de vidrio de 4 mm durante el cultivo de *M. bovis* en biofilm. **a.** caudalímetro; **b.** entrada de medio (inóculo y medio fresco); **c.** receptáculo de inóculo (tiempo 0) y de medio fresco (24 a 120 horas); **d.** salida de aire; **e.** medio sobrenadante; **f.** filtro de aire; **g.** salida de medio.

Cultivos en biofilms en portaobjetos. Se hicieron ensayos haciendo crecer bacterias adheridas a portaobjetos para posteriormente evaluar el mismo mediante tinción con naranja de acridina (ver descripción más abajo). Para esto se colocan portaobjetos suspendidos en el sobrenadante de la parte superior de la columna de cultivo (**e.** en la Figura V. 3.) y se retiran al finalizar el cultivo, antes de remover las perlas.

V. 3. 2. Crecimiento celular

En este tipo de cultivos existen dificultades para obtener curvas de crecimiento totalmente reproducibles debido a que como reportaron Davey y O'Toole (2000) aunque se mantengan las condiciones de cultivo los biofilms formados generalmente no son estrictamente comparables dada la variabilidad que ofrecen estos sistemas. Por esto es que para describir el crecimiento de *M. bovis* en biofilm se usó el método cualitativo de observación por microscopía electrónica y para determinar la evolución del biofilm se usó la tinción con naranja de acridina.

Microscopía electrónica. Las perlas de vidrio en las que se realizó el cultivo en biofilm se observaron y fotografiaron con el microscopio del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de La Plata. Este servicio cuenta con un microscopio JEOL JSM T100 con metalizador JEOL JFC 1100. Previo a la observación de las muestras las bacterias adheridas a la superficie de las perlas fueron fijadas y deshidratadas. Para ello, se colocaron 5 perlas, obtenidas de cultivos de distinta duración en biofilm, en un tubo Eppendorf de 1,5 mL de capacidad a los que se les agregó una solución de alcohol etílico al 50% en agua destilada y se lo colocó a 4° C durante 2 horas. Este proceso se repite con soluciones al 70% y al 90% del mismo alcohol; finalmente las perlas se conservan a 4° C en alcohol etílico absoluto hasta su secado por punto crítico y observación.

Microscopía de epifluorescencia (tinción con naranja de acridina). El fluorocromo naranja de acridina se une al ácido nucleico dando fluorescencia verde si la bacteria está viva (ácido nucleico nativo) y roja si el microorganismo está muerto (ácido nucleico desnaturalizado). Aquí se usó la técnica propuesta por Kawamoto (1991) con adaptaciones para el biofilm de *M. bovis*. A los biofilms en portaobjetos se les agrega glutaraldehído 0,2% (p-formaldehído 2% y metanol 50% o etanol 3%) que se deja actuar durante 10 a 30 minutos a 4° C para lograr la rigidez de las estructuras. A continuación se los lava con agua destilada estéril al menos 3 veces y se procede a la tinción. Para la coloración se cubre el preparado con 100 µL de solución de naranja de acridina 10 mg/mL se deja actuar durante 2 minutos y luego se lava 3 veces con agua destilada estéril, a continuación se observa con microscopio de epifluorescencia y se fotografía.

V. 3. 3. Caracterización de las células sésiles

Estos experimentos, salvo que se indique otra manera de proceder, se hicieron con las bacterias que se recuperaron del biofilm por agitación mecánica. En cada caso estudiamos **a.** la piliación por una técnica de ELISA (Prieto *et al.*, 2003) y por morfología de colonias; **b.** las propiedades de superficie de *M. bovis* (autoaglutinación, potencial zeta y adhesión a hexadecano) por medio de las técnicas descritas en el capítulo III y **c.** los componentes de superficie como PME y LPS por medio de las técnicas descritas en el capítulo III.

V. 4. RESULTADOS

V. 4. 1. Crecimiento celular

Microscopia electrónica. En las micrografías electrónicas obtenidas a las 24 horas de cultivo, se observó que se había comenzando a formar monocapas celulares distribuidas en toda la superficie de las perlas. A las 48 horas de cultivo estas monocapas se habían extendido y en algunos casos se mostraban coalescentes (Figura V. 4. a.). A las 72 horas de cultivo se observan microcolonias (Figura V. 4. b.). A las 96 horas se observa la estructura tridimensional característica de los biofilms maduros. A las 120 horas de cultivo comenzó a observarse el desprendimiento del biofilm de las perlas, por este motivo es que los cultivos se evaluaron hasta las 120 horas.

Figura V. 4. a. Micrografía electrónica de *M. bovis* creciendo adherida a perlas de vidrio al cabo de 48 horas de cultivo.

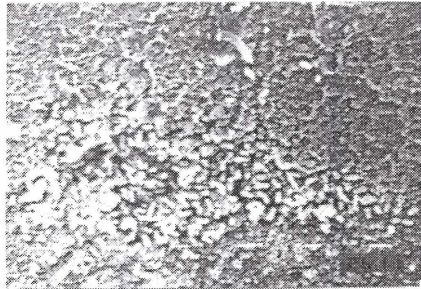
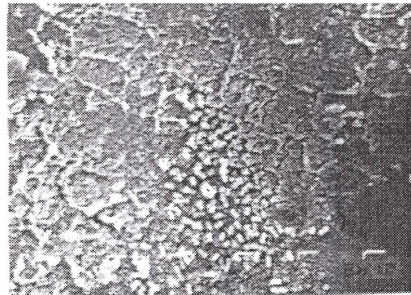


Figura V. 4. b. Micrografía electrónica de *M. bovis* creciendo adherida a perlas de vidrio al cabo de 72 horas de cultivo.



Microscopia de epifluorescencia (tinción con naranja de acridina). Las monocapas celulares de cultivos de 24 horas son sumamente débiles y mostraron poca resistencia a los pasos de lavado implicados en la tinción con naranja de acridina, por lo que esta tinción se realizó en biofilms de 48 a 120 horas (Figura V. 5.). Como se observa, en la figura mencionada, a las 48 horas de cultivo todas las bacterias del biofilm están en crecimiento activo (fluorescencia verde). A las 72 horas de cultivo comienzan a aparecer bacterias muertas (puntillado rojo sobre la fluorescencia verde). A las 96 horas se observan algunas bacterias vivas en una mayoría de bacterias muertas (puntillado verde sobre fluorescencia roja). Y a las 120 horas de cultivo todas las bacterias están muertas (fluorescencia roja) lo que se asoció con el desprendimiento del biofilm del soporte.

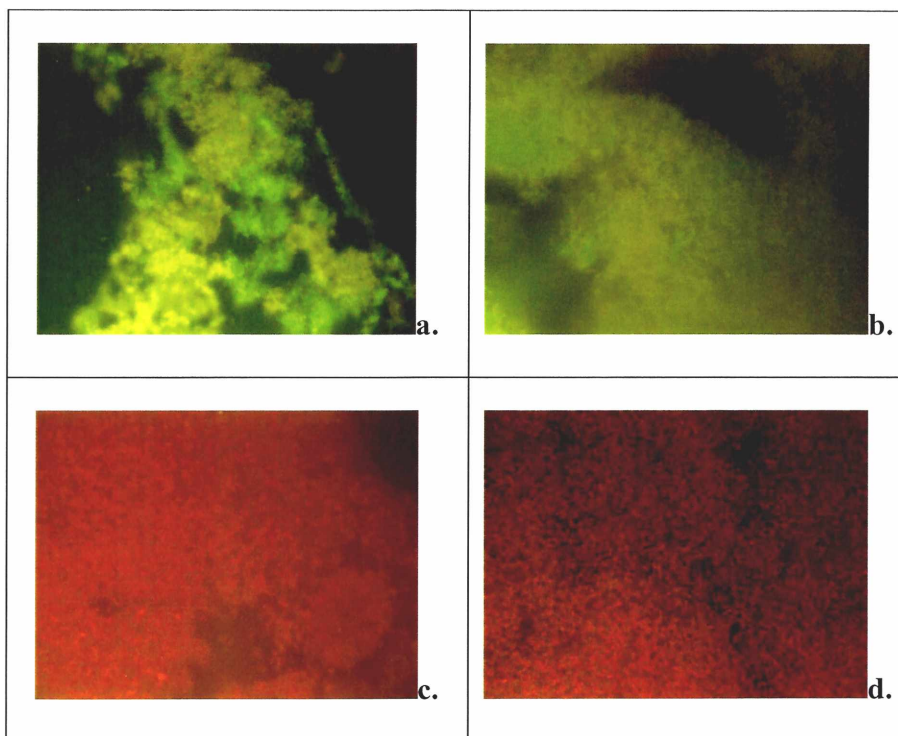


Figura V. 5. Tinción con naranja de acridina del biofilm de *M. bovis* a. 48; b. 72, c. 96 y d. 120 horas de crecimiento.

Los resultados hallados por microscopía electrónica y por microscopía de fluorescencia, en las condiciones experimentales seguidas en este estudio, son coincidentes en cuanto a la evolución de un biofilm: adhesión, formación de monocapa, microcolonias, formación de biofilm maduro y finalmente fase de muerte.

V. 4. 2. Caracterización de las células sésiles

Estas experiencias se hicieron con *M. bovis* proveniente de cultivos en biofilm de 24, 48, 72, 96 y 120 horas.

a. Piliación. Se llevaron a cabo las determinaciones de porcentaje de piliación por el método de ELISA (Prieto *et al.*, 2003) y por análisis de morfología de colonias descrito en el Capítulo II. Se halló en las determinaciones por ELISA que los valores de piliación fueron inferiores al 40% a partir de las 24 horas de cultivo (Figura V. 6.); en oposición a esto, al realizar las pruebas de morfología de colonia se encontró que el porcentaje de colonias piliadas (pequeñas, secas, de bordes nítidos y con doble halo) fue mayor al 90%.

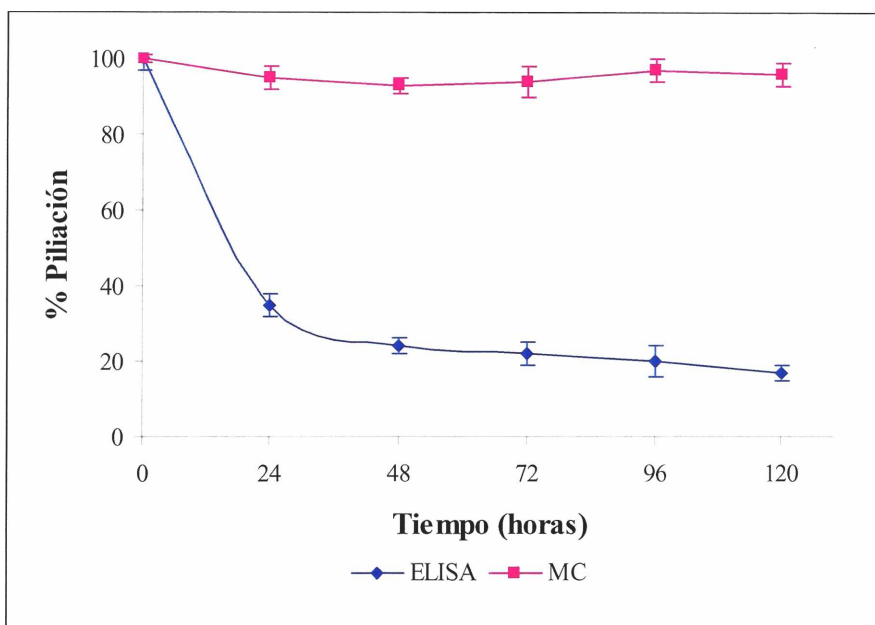


Figura V. 6. Evolución del porcentaje de piliación de *M. bovis* 1194-03 creciendo en biofilm en función del tiempo de cultivo (n=3).

En este caso encontramos una marcada diferencia entre los resultados obtenidos por ELISA y los provenientes de morfología de colonias; cosa que no se observa en los análisis realizados con bacterias provenientes de medios de cultivo sólido y líquido, esto puede deberse a distintas razones como por ejemplo la abundancia de componentes extracelulares que enmascaran la presencia de los pili. Teniendo en cuenta esta discrepancia en los métodos de determinación de piliación es que cobran mayor relevancia los estudios de propiedades de superficie que pueden ayudar a establecer cuál de los dos ensayos es el que provee la mejor información acerca de la piliación de las células sésiles.

b. Propiedades de superficie. i. Observación macroscópica, índice y tiempo de autoaglutinación. En la observación macroscópica, las suspensiones de células desadheridas de las perlas de vidrio y colocadas en agua bidestilada muestran características típicas de las bacterias piliadas, es decir que autoaglutinan rápidamente formando agregados visibles que se rompen fácilmente por agitación en vortex a baja velocidad y al microscopio óptico se observan como agregados celulares.

Índice de autoaglutinación (IA). Como se puede observar en la Figura V. 7. el índice de autoaglutinación aumenta a medida que pasa el tiempo de cultivo entre las 24 y las 72 horas, a continuación alcanza un valor constante y próximo a la unidad que se mantiene estable; esto quiere decir que la capacidad de las células sésiles de formar

agregados aumenta hasta que la DO_{650} y la biomasa se hacen comparables lo cual ocurre a las 72 horas de cultivo.

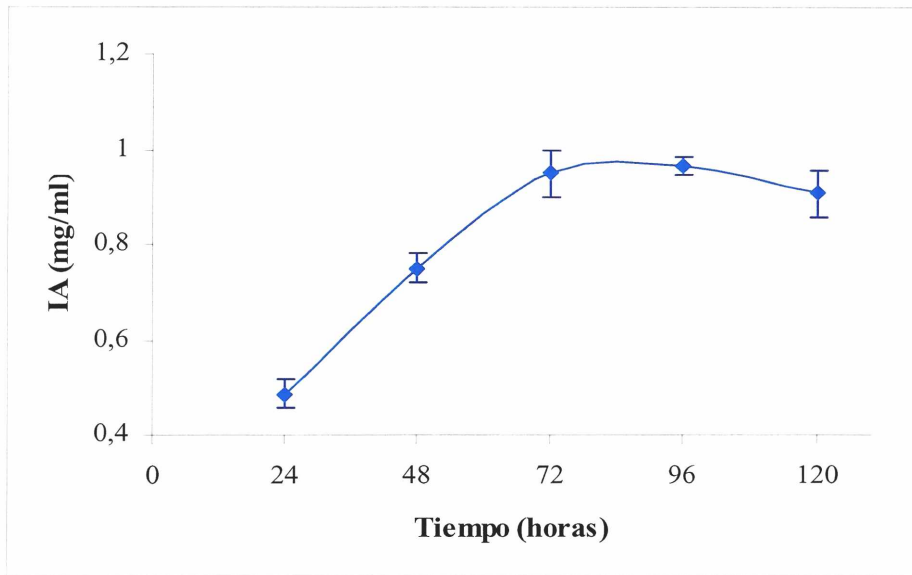


Figura V. 7. Evolución del índice de autoaglutinación en cultivos en biofilm de *M. bovis* (n=3).

El índice de autoaglutinación de los cultivos en biofilm varió aproximadamente entre 0,5 mg/mL a las 24 horas de cultivo y 1 mg/mL después de las 72 horas de cultivo (Figura V. 7.). *M. bovis* piliada proveniente de cultivos en medio sólido mostró un índice de autoaglutinación de 0,63 mg/mL y en medio líquido en erlenmeyer los valores variaron entre 0,62 mg/mL al inicio del cultivo y 0,47 mg/mL a las 8 horas de cultivo. De manera que la tendencia observada en los cultivos en biofilm, donde los valores aumentaron, es opuesta a la observada en los cultivos en medios líquidos.

Tiempo de autoaglutinación (TA). El tiempo de autoaglutinación de las bacterias provenientes de cultivos en biofilm disminuye con el tiempo de cultivo desde 22 minutos en los biofilms de 24 horas hasta 15 minutos en los de 120 horas (Figura V. 8.).

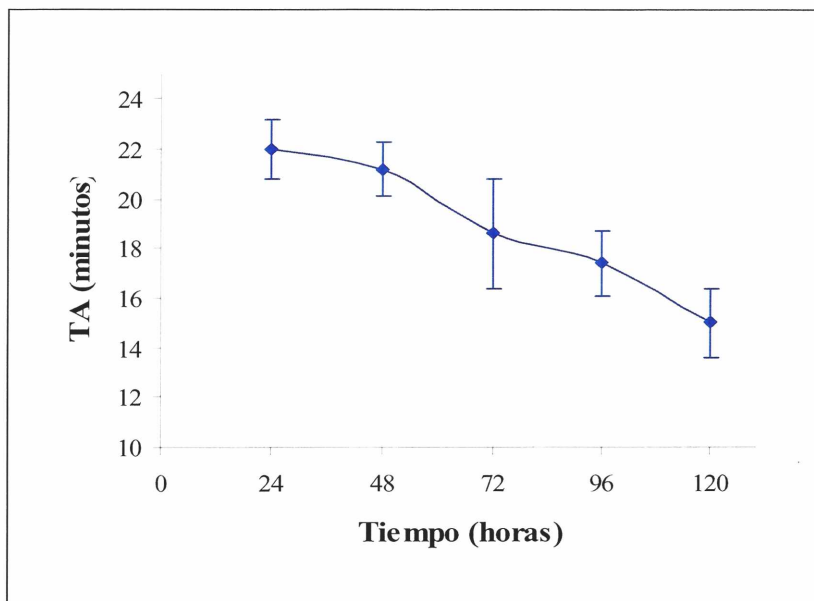


Figura V. 8. Evolución del tiempo de autoaglutinación de células de *M. bovis* obtenidas a distintas horas de crecimiento en biofilm.

Los tiempos de autoaglutinación obtenidos para los cultivos en biofilm son menores a los obtenidos para *M. bovis* piliada creciendo de medio sólido (25 minutos) y en medio líquido en erlenmeyer a las 2 horas de cultivo (29 minutos). No solamente los valores son menores, sino que además, la tendencia es a disminuir, es decir que el tiempo de autoaglutinación disminuye con el número de horas de cultivo. Esta tendencia es opuesta a la observada en los cultivos en medios líquidos de *M. bovis* piliada donde el tiempo de autoaglutinación aumenta con las horas.

ii. Potencial zeta. Los resultados obtenidos al estudiar el potencial zeta de *M. bovis* creciendo en biofilm muestran una variación entre -22,8 mV a las 24 horas de cultivo y -16,7 mV a las 96 horas de cultivo. Se observa un aumento en el potencial zeta con el aumento del tiempo de crecimiento en biofilm, sin embargo, las diferencias observadas durante el cultivo no son significativas (Figura V. 9.).

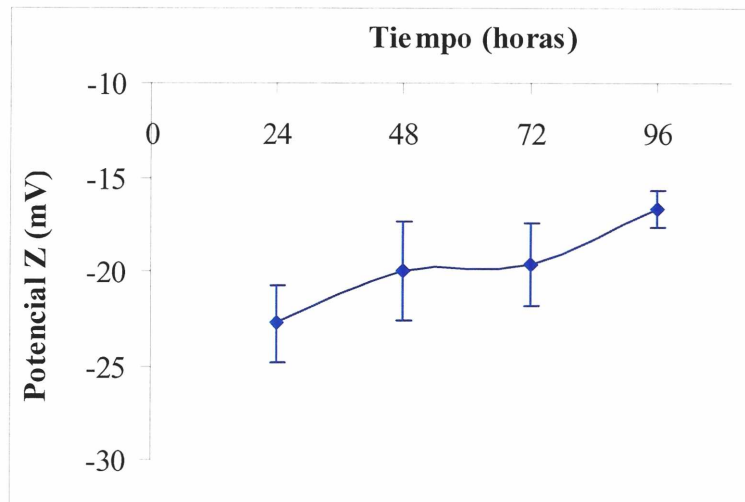


Figura V. 9. Evolución del potencial zeta de *M. bovis* obtenida de cultivos de distintos tiempos en biofilm (n=5).

Los valores obtenidos aquí son más altos que los hallados para los cultivos en medios sólidos y líquidos en erlenmeyer para la variante piliada. Recordemos que el potencial zeta de *M. bovis* obtenida de medio sólido es de -43 mV y cuando proviene de medio líquido es de -68 mV (a partir de las 4 horas de cultivo).

iii. Adhesión a hidrocarburos. La capacidad de adhesión a hexadecano mostró un aumento con el tiempo de cultivo en biofilm; si bien el aumento durante las primeras 48 horas de cultivo no es muy marcado, más tarde el aumento es significativo y constante hasta al fin del cultivo (Figura V. 10.).

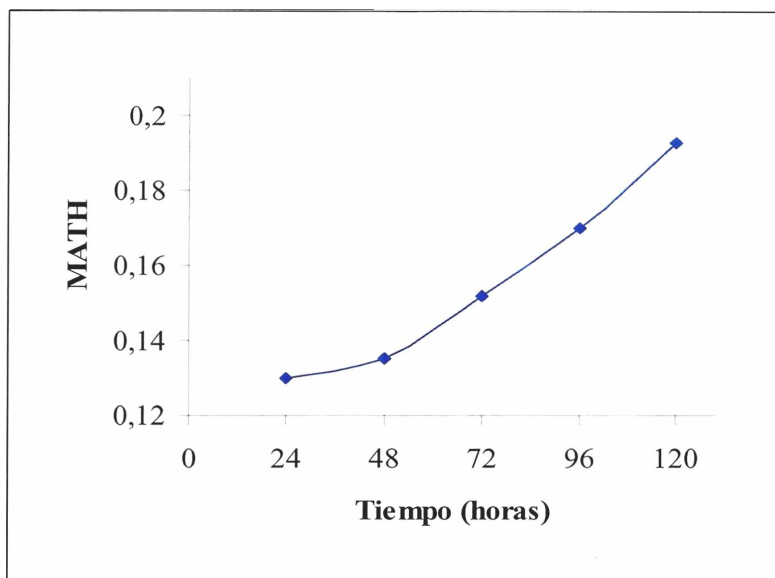


Figura V. 10. Evolución de la adhesión a hexadecano de células de *M. bovis* obtenidas de distintos tiempos de crecimiento en biofilm.

La comparación de los resultados de adhesión a hexadecano de *M. bovis* proveniente de distintos tiempos de cultivo en biofilm con la adhesión a hexadecano de los cultivos de *M. bovis* piliada proveniente de medio sólido (0,029) y de distintos tiempos de cultivo en medio líquido en erlenmeyer (0,026 a las 2 horas y 0,009 a las 8 horas) permitió observar que desde el primer día la adhesión al hidrocarburo de las células sésiles es marcadamente mayor que la adhesión de las bacterias provenientes de los otros sistemas de cultivo.

Los resultados hallados en las pruebas de índice y tiempo de autoaglutinación; de potencial zeta y de hidrofobicidad muestran que *M. bovis* proveniente de cultivos en biofilm es más autoaglutinante, menos electronegativa y más hidrofóbica que las bacterias piliadas obtenidas de medio sólido.

c. Patrones de PME y LPS. Los perfiles de PME de los cultivos de *M. bovis* en biofilm de distintas horas fueron comparados entre sí y con las muestras obtenidas de cultivos en medio sólido y líquido en Erlenmeyer. Esta comparación no mostró diferencias importantes entre los mismos, es decir que se pueden observar 11 proteínas mayores de 71; 60; 47; 39; 35; 28; 25; 20; 17, 15,8 y 15 kDa respectivamente (Figura V. 11.).

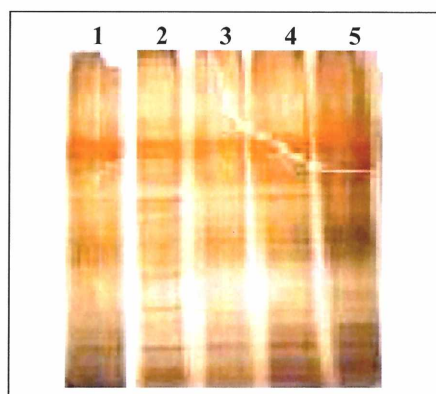


Figura V. 11. PME de biofilm 1. 24; 2. 48; 3. 72; 4. 96 y 5. 120 horas de cultivo.

Los perfiles de LPS de los cultivos de *M. bovis* en biofilm de distintas horas fueron comparadas entre sí y con las muestras obtenidas de cultivos en medio sólido y líquido en Erlenmeyer de esta cepa y se observó el mismo perfil (Figura V. 12.).

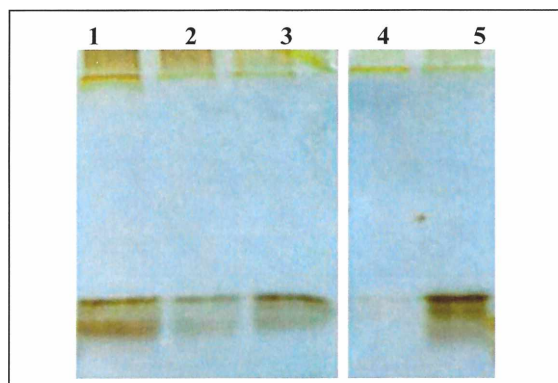


Figura V. 12. LPS de biofilm 1. 24; 2. 48; 3. 72; 4. 96 y 5. 120 horas de cultivo.

V. 5. DISCUSIÓN

En relación con el crecimiento celular se puede decir que el biofilm de *M. bovis* muestra los siguientes estadios de crecimiento **i.** transporte de los microorganismos a la superficie de las perlas, **ii.** adhesión y formación de monocapa, **iii.** crecimiento y formación de microcolonias, **iv.** formación del biofilm maduro y **v.** desprendimiento y muerte; estos estadios se presentan a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas respectivamente. Estas etapas de crecimiento se observan también en biofilms desarrollados por gran variedad de bacterias

entre ellas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae* y *S. mutans* (Busscher *et al.*, 1995; Sauer *et al.*, 2002; Davey and O'Toole 2000).

En relación con la caracterización de las células sésiles encontramos que el porcentaje de población piliada hallado por método de ELISA fue inferior al 10%, en contraste, se halló que el porcentaje de colonias piliadas obtenido por morfología de colonias fue mayor al 90%. Esta diferencia en los porcentajes de piliación puede deberse a características propias del microorganismo creciendo en biofilm. En relación con esto ha sido reportado que la variante piliada de distintas bacterias es el fenotipo que más comunmente se encuentra en biofilms. Kikuchi y colaboradores (2005) al estudiar *E. coli* observaron que las bacterias sésiles muestran diferencias fenotípicas, bioquímicas y morfológicas respecto de las planctónicas y que el pili es importante para la formación del biofilm. Cuando *E. coli* K-12 crece en vida libre sólo produce pili a 30° C (no a 37° C) pero cuando crece en biofilm también lo hace a 37° C. Haase y colaboradores (2006) mostraron que los aislados clínicos de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* tienen una variedad de colonia piliada adherente y rugosa (RVs) y otra mínimamente adherente y lisa (SVs) y que la primera produce biofilms más grandes, más tolerantes a los cambios en la concentración de sales y pH y más resistentes a cloroheximida que la segunda.

Al analizar las propiedades de superficie de *M. bovis* creciendo en biofilm se encuentran las siguientes características: el índice de autoaglutinación aumenta marcadamente durante las primeras 72 horas de cultivo y después permanece estable y el tiempo de autoaglutinación disminuye con el paso del tiempo de cultivo permaneciendo entre 18 y 15 minutos durante los últimos tres días de la experiencia. Este resultado indica que las bacterias provenientes del biofilm son aún más autoaglutinantes que las variantes piliadas de *M. bovis* provenientes de medio de cultivo sólido.

El potencial zeta muestra una leve tendencia, no estadísticamente significativa, a aumentar durante todo el cultivo en biofilm; al compararlo con el de las bacterias piliadas provenientes de medios de cultivo sólido y en nuestras condiciones de fuerza iónica, temperatura y pH podemos decir que las células sésiles muestran menor carga neta negativa que las bacterias piliadas provenientes de medios sólidos.

La adhesión a hexadecano aumenta lentamente durante las primeras 48 horas de cultivo para luego hacerlo rápidamente; al comparar estos resultados con los de células

piliadas provenientes de medios sólidos encontramos que son mucho mayores lo cual indica una mayor hidrofobicidad.

Como mencionáramos en el Capítulo III, existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos por distintos autores en lo que se refiere al potencial zeta y la adhesión a solventes orgánicos en diferentes bacterias; más aún si las bacterias estudiadas tienen la capacidad de formar biofilm. Nosotros encontramos que existe igual correlación entre los valores de autoaglutinación, potencial zeta y MATH obtenidos para bacterias sésiles que para aquellas provenientes de medios de cultivo sólido y líquido. Mientras más bajos son los tiempos de autoaglutinación, más altos son los valores de potencial zeta y los de hidrofobicidad. Como vimos, estos resultados están en concordancia con lo reportado por Pérez y colaboradores para distintas cepas de *Bifidobacterium* (Pérez *et al.*, 1998) y en oposición a los informados por Matz y Jürgens, (2001) para distintas especies de *Ochromonas*. Otros autores hallaron que la correlación puede variar en un sentido u otro de acuerdo a los microorganismos y los soportes que se estudien (Fletcher *and* Loeb, 1979).

Los perfiles de las PME no muestran diferencias importantes respecto de los perfiles obtenidos de las bacterias creciendo en los sistemas de cultivo analizados previamente, sin embargo se observa que su expresión está aumentada. Los resultados hallados aquí en relación con las PME coinciden con los de Pearson (2004) que para el caso del biofilm de *M. catarrhalis* encuentra que aunque aparecen diferencias entre los perfiles de PME de cultivos en biofilm y de medio líquido en erlenmeyer éstas no son muy prominentes. Los resultados presentados aquí se oponen a las observaciones hechas en *E. coli* y en distintas especies de *Pseudomonas* por distintos autores (Makin *and* Beveridge, 1996; Prigent-Combaret *et al.*, 1999; Sauer *and* Camp, 2001; Sauer *et al.*, 2002) quienes encuentran marcadas diferencias en las PME obtenidas de bacterias creciendo en medios líquidos y en biofilm.

En este trabajo encontramos que los LPS producidos en biofilm son muy similares a los hallados en *M. bovis* proveniente de medios de cultivo sólido y líquido. Sin embargo, otros autores, entre ellos Seok Chae y colaboradores (2006) encontraron diferencias cuando analizaron distintas cepas de *Listeria monocytogenes*. Estos autores hallaron que las células adheridas producen significativamente más tipos y cantidad de carbohidratos extracelulares que las de vida libre; esto mismo ocurre en el caso de la variante rugosa de *V. cholerae* (Afsar *et al.*, 2000) y los casos descritos en la recopilación de Sutherland

(2001) donde queda establecido que los biofilms proporcionan un rango casi infinito de EPS y que es improbable que cualquiera de éstos sea específico y singularmente sintetizado en el biofilm, aunque, le confieren su habilidad de interactuar con otros polisacáridos, macromoléculas y células.

En los estudios presentados en este capítulo observamos inconsistencia entre los resultados de porcentaje de piliación obtenidos por ELISA y los hallados por morfología de colonia de las células sésiles. Esta inconsistencia podría explicarse si analizamos en conjunto los resultados obtenidos de los estudios de propiedades y componentes de superficie de las células sésiles y los de células piliadas y no piliadas de medios de cultivo sólidos y líquidos en erlenmeyer (Capítulo III). Los resultados nos permiten suponer que, en las condiciones de estudio, las bacterias del biofilm son piliadas y que la subestimación dada por la técnica de ELISA puede deberse a distintos factores entre ellos la producción aumentada de polisacáridos podría interferir en la determinación de pili por ELISA disminuyendo la sensibilidad del ensayo (Peterfi *and* Kocsis, 2000).

Es importante recordar que los estudios presentados en éste capítulo tienen carácter de preliminares por lo que se continuarán los estudios tendientes a esclarecer los puntos contradictorios que se han presentado.

V. 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos aquí nos permiten concluir que:

1. *M. bovis* puede crecer en biofilm *in vitro* usando como soporte perlas de vidrio.
2. El crecimiento de *M. bovis* en biofilm sigue las mismas etapas que los biofilms descritos para otras bacterias similiares: transporte de lo microorganismos a la superficie de la bolilla, adhesión y formación de monocapa, crecimiento y formación de microcolonia, formación del biofilm maduro y desprendimiento y muerte.
3. El análisis de las propiedades de superficie de las células sésiles de *M. bovis* muestra altos índices de autoaglutinación y bajos tiempos de autoaglutinación, altos valores de potencial zeta y alta adhesión a hexadecano. Al analizar los componentes de

superficie de *M. bovis* obtenidas de cultivos de distintas horas de duración en biofilm no se observaron diferencias.

4. El análisis comparativo de las propiedades de superficie de *M. bovis* obtenidas del biofilm y obtenidas en sistemas de cultivos en medios sólidos y líquidos en erlenmeyers nos indican que las bacterias presentes en estos cultivos en biofilm son piliadas.

V. 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdi-Ali, A.; M. Mohammadi-Mehr; Y. A. Alaei. 2006. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. International Journal of Antimicrobial Agents, (27)3:196-200.
- Afsar, A.; J. A. Johnson; A. A. Franco; D. J. Metzger; T. D. Connell; J. G. Morris Jr.; S. Sozhamannan. 2000. Mutations in the Extracellular Protein Secretion Pathway Genes (eps) Interfere with Rugose Polysaccharide Production in *and* Motility of *Vibrio cholerae*. Infection and Immunity, 68(4):1967–1974.
- Allison, D. G.; I. W. Sutherland. 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. Journal of General Microbiology, 133:1319-1327.
- Battin, T. J.; L. A. Kaplan; J. D. Newbold; X. Chen; C. Hansen. 2003. Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilm. Applied and Environmental Microbiology, 69(9):5443-5452.
- Bibiloni, R. 2001. Características probióticas de *Bifidobacterium*: estudio, selección de cepas y desarrollo. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Brown, M. R.; J. Barker. 1999. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. Trends in Microbiology, 46(7):46-50.
- Brown, M. R.; P. Gilbert P. 1993. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. Journal of Applied Bacteriology, 74:87S-97S.
- Burne, R. A.; R. G. Quivey Jr.; R. E. Marquis. 1999. Physiologic homeostasis and stress responses in oral biofilms. Methods in Enzymology, 310:441-460.
- Busscher, H. J.; R. Bos; H. C. van der Mei. 1995. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters 128:229-234.
- Caron D. A. 1987. Grazing of attached bacteria by heterotrophic microflagellates. Microbial Ecology, 13:203-218.
- Costerton, J.W.; J.C. Nickel; T. L. Ladd. 1986. Suitable methods for the comparative study of free-living and surface-associated bacterial populations. In: Leadbetter, E.R. and J.S. Poindexter (eds.), *Bacteria in Nature: Methods and Special Applications in Bacterial Ecology*. Plenum Publ., New York, 49-84.

- Costerton, W.; Z. Lewandowski; D. E. Caldwell; D. R. Korber; M. Lappin-Scott. 1995. Microbial Biofilms. *Annual Review Microbiology*, **49**:711-745.
- Davey, M. E.; G. A. O'Toole. 2000. Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64**(4):847-867.
- De Vuyst, L.; E. J. Vandamme. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology*, **138**:571-578.
- Djordjevic D.; M. Wiedmann; L. A. McLandsborough. 2002. Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation Applied and Environmental Microbiology, **68**(6):2950-2958.
- Drenkard, E. 2003. Review. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*, **58**(13):1213-1219.
- Froeliger, E.; P. Fives-Taylor. 2001. *Streptococcus parasanguis* fimbria-associated adhesion Fap1 is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*, **69**(4):2512-2519.
- Fux, C.A.; J. W. Costerton; P. S. Stewart; P. Stoodley. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, **13**(1):34-40.
- Gagniere H.; P. Di Martino. 2004. Effects of antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* NK125502 and *Pseudomonas fluorescens* MF0 biofilm formation on immobilized fibronectin. *Journal Chemotherapy*, **16**(3):244-247.
- Gannon, J. T.; V. B. Manilal; M. Alexander. 1991. Relationship between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Applied and Environmental Microbiology*; **57**:190-193.
- Gottschal, J. C. 1992. Continuous culture, vol. 1. Academic Press Inc. New York, N.Y.
- Harkes, G.; H. C. van der Mei; P. G. Rouxhet; J. Dankert; H. J. Busscher; J. Feijen. 1992. Physicochemical Characterization of *Escherichia coli*. A comparison with Gram-Positive Bacteria. *Cell Biophysics*, **20**:17-32.
- Heydorn, A.; B. Ersbøll; J. Kato; M. Hentzer; M. R. Parsek; T. Tolker-Nielsen; M. Givskov; S. Molin. 2002. Statistical Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Development: Impact of Mutations in Genes Involved in Twitching Motility, Cell-to-Cell Signaling, and Stationary-Phase Sigma Factor Expression. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(4):2008-2017.
- Jefferson, K. 2004. What drives bacteria to produce a biofilm? *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*, **236**(2):163-173.
- Kawamoto, F. 1991. Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy and interference filter. *Lancet*, **337**:200-202.
- Kievit, T. R.; R. Gillis; S. Marx; C. Brown; B. H. Iglewski. 2001. Quorum-Sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(4):1865-1873.
- Makin, S. A.; T. J. Beveridge. 1996. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology*, **142**:299-307.

- Matz, C.; K. Jurgens. 2001. Effects of hydrophobic and electrostatic cell surface properties of bacteria on feeding rates of heterotrophic nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(2):814-820.
- O'Toole, G. A. 2003. To build a biofilm. *Journal of Bacteriology*, **185**(9):2687-2689.
- Ophir, T. A.; Gutnick DL. 1994. Role for Exopolysaccharides in the Protection of Microorganisms from Desiccation. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(2):740-745.
- O'Toole, G. A.; Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, **28**(3):449-461.
- Pearson, M. M. 2004. Biofilm Formation by *Moraxella catarrhalis*. ThD Thesis, University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, Texas.
- Pérez, P. F.; Y. Minnaard; E. A. Disalvo; G. L. De Antoni. 1998. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**:21-26.
- Prigent-Combaret, C.; O. Vidal; C. Dorel; P. Lejeune. 1999. Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, **181**:5993-6002.
- Sauer, K.; A. K. Camper. 2001. Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *Journal of Bacteriology*. **183**:6579-6589.
- Sauer, K.; A. K. Camper; G. D. Ehrlich; J. W. Costerton; D. G. Davies. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, **184**(4):1140-1154.
- Seok Chae, M.; H. Schraft; L. T. Hansen; R. Mackereth. 2006. Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiology*, **23**(3)250-259
- Serrano-Granger J., D. Herrera. 2005. Dental plaque as a biofilm: How to eliminate it? *Ilustre Consejo General de Colegios de Odontólogos y Estomatólogos de España*, **10**(4): 431-439. <http://www.scielo.isciii.es/scielo.php>.
- Smith, A. W. 2005. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Mechanisms of Antimicrobial Resistance: Opportunities for New Targeted Therapies. Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**(10):1539-1550.
- Sutherland I. W. 2001. Minireview. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, **147**:3-9.
- Van der Mei, H.; A. H. Weerkamp; H. J. Busscher. 1987. A comparison of various methods to determine hydrophobic properties of streptococcal cell surfaces. *Journal Microbiological Methods* **6**:277-287.
- White, D. C. 1984. Chemical characterization of films. *Microbial Adhesion and Aggregation* K. C. Marshall, (ed.) pp. 159-176, Dahlem Konferenzen Life Sciences research Report 31, Springer-Verlag, Berlin, and New York.

Capítulo VI

Conclusiones generales

VI. Conclusiones generales

El principal objetivo de este trabajo estuvo dirigido a tratar de dilucidar los mecanismos que ocasionan el bajo nivel de protección que presentan las vacunas contra QIB actualmente disponibles en el mercado, y que se traducen en importantes pérdidas económicas para el sector ganadero.

La principal causa de la baja protección de estas vacunas, se asoció a los procedimientos tecnológicos que normalmente se emplean en su producción a escala industrial lo cual se suma a la falta de controles en cuanto a la presencia de los principales factores de virulencia celular, que deberían estar presentes, en la formulación vacunal. A partir del análisis de vacunas del mercado hemos detectado que las formulaciones carecen de pili, principal factor de adhesión e inmunógeno de *M. bovis*. Evidentemente estas vacunas no son controladas de manera adecuada como para descartar partidas donde los factores de patogenicidad estén por debajo de valores considerados de corte. Las vacunas comerciales se formulan a partir de bacterias crecidas en biorreactores agitados mecánicamente lo cual puede producir la ruptura de pili. En cuanto al otro factor de virulencia, la hemolisina, como demostramos se pierde en fase exponencial de crecimiento.

Conclusiones obtenidas a partir del trabajo experimental realizado:

1. a. Se demostró la importancia de mantener el fenotipo piliado en el inóculo de cualquier proceso, como primera condición para garantizar producir una vacuna adecuada. Nuestros resultados mostraron que es posible mantener el fenotipo piliado de *M. bovis* en medios de cultivo sólidos durante al menos 5 pasajes, luego de lo cual el número de

colonias intermedias y no piliadas aumenta. El número de pasajes durante los cuales se mantiene el fenotipo piliado se ve sensiblemente disminuido si la selección de colonias no se hace apropiadamente. Las colonias no piliadas de *M. bovis* mantienen su fenotipo tanto cuando provienen de cultivos en medios sólidos como cuando se obtienen a partir de cultivos en medios líquidos. Una manera de recuperar colonias piliadas partiendo de cultivos con fenotipos mixtos es repicar células de los bordes de las colonias intermedias, iniciando de esta forma crecimientos con poblaciones piliadas. Se comprobó que en la zona de expansión de las colonias piliadas e intermedias, *M. bovis* muestra movilidad por *twitching*, cosa que no ocurre recuperando células del centro de las colonias intermedias, así como de colonias no piliadas. Adicionalmente se demostró que el porcentaje de piliación, obtenido por una técnica de ELISA, de las bacterias provenientes de colonias seleccionadas de medio sólido por sus características fenotípicas y tintoriales como piliadas, fue mayor al 95%; en tanto que para las colonias intermedias varió entre el 8% y el 30% y el de las colonias no piliadas fue inferior al 5%.

1. b. En cultivos en medios líquidos en Erlenmyer agitados, iniciados con células de *M. bovis* piliadas, observamos una marcada pérdida de piliación durante las primeras horas de cultivo, en tanto que en los cultivos iniciados con células no piliadas el fenotipo se mantiene, no revirtiendo a la forma piliada.

1. c. En relación con la actividad hemolítica comprobamos que las colonias piliadas, no piliadas e intermedias de *M. bovis* presentan halo de hemólisis en cultivos en medio sólido, en tanto que el título hemolítico en sobrenadantes de cultivos de Erlenmeyer agitados muestra un máximo durante la fase exponencial de crecimiento para luego disminuir rápidamente.

2. a. A efectos de avanzar en el conocimiento de los mecanismos que podrían estar involucrados en la pérdida de piliación de *M. bovis*, se estudió en primer lugar si el cambio de fenotipo piliado a no piliado era debido a la pérdida del gen de la pilina. Los estudios realizados demostraron que dicho gen se mantiene presente tanto en bacterias piliadas como no piliadas.

2. b. A partir de los resultados indicados previamente se buscó establecer si la presencia de piliación estaba asociada a un determinado perfil de plásmidos. Los análisis realizados permitieron concluir que en nuestras condiciones experimentales y dentro de

aislados obtenidos en nuestro País (INTA, Márcos Juárez, Córdoba), el número y tipo de plásmidos (tamaño) se mantiene estable tanto en las variantes piliadas como no piliadas. Los estudios se llevaron a cabo con células provenientes de medios de cultivo sólido y de distintas horas de cultivos en medios líquidos. El perfil de plásmidos de las cepas analizadas es diferente a los perfiles reportados en aislamientos de otras regiones, por lo que esta metodología podría ser propuesta como herramienta epidemiológica.

3. a. Teniendo en cuenta que no existían en bibliografía descripciones de las propiedades de cubierta de células piliadas y no piliadas de *M. bovis*, se implementaron una serie de técnicas (índice y tiempo de autoaglutinación, movilidad electroforética y potencial zeta, adhesión a hidrocarburos, adhesión a soportes inertes, perfiles de proteínas de membrana externa y de lipopolisacáridos), que permitieron caracterizar fisicoquímicamente la cubierta de ambas poblaciones bacterianas.

3. b. Se demostró que las propiedades fisicoquímicas de superficie varían según se trate de poblaciones piliadas o no piliadas. Del análisis de correlación entre los distintos datos obtenidos se pudo comprobar que existía una buena correlación entre algunos parámetros característicos de cubierta celular y el porcentaje de piliación celular. Hallamos que *M. bovis* fenotipo piliado proveniente de colonias seleccionadas de medio de cultivo sólido es más aglutinante, tiene mayor potencial zeta, mayor hidrofobicidad y mayor adhesión a vidrio y polipropileno que la variante no piliada del mismo origen.

3. c. Se pudo constatar que durante el crecimiento de *M. bovis* en medio líquido, las propiedades fisicoquímicas de cubierta de las células se modifican a lo largo del proceso. Se estudió el grado de piliación celular de estas poblaciones y se constató que las características de cubierta de células inicialmente piliadas varían hacia el valor correspondiente a células no piliadas. Estos estudios mostraron una alta correlación entre el porcentaje de piliación determinado por ELISA y la evolución de cada una de las propiedades. El análisis de componentes de superficie como PME y LPS mostró que los mismos no se modifican entre células piliadas y no piliadas.

3. d. En conjunto estos resultados demostraron que es posible diferenciar mediante estudios de propiedades de superficie poblaciones de *M. bovis* piliadas y no piliadas, lo cual implica que es posible reemplazar la técnica de ELISA que requiere de personal entrenado, mayor equipamiento y tiempo de preparación por cualquiera de las

metodologías mencionadas para monitorear de manera económica, rápida y sencilla el nivel de piliación de cultivos de *M. bovis*.

4. Considerando la necesidad de encontrar un sistema de cultivo que resulte apropiado para la producción de una vacuna efectiva contra QIB es que nos planteamos analizar el crecimiento y la piliación de *M. bovis* en sistemas de cultivo tales como Erlenmeyers, biorreactores agitados y columnas de burbujeo en distintas condiciones operativas. Hallamos que el sistema de cultivo más apropiado para la producción de *M. bovis* de fenotipo piliado resulta ser el de columnas de burbujeo, con aereación de 1,00 VVM ya que conserva aceptables porcentajes de piliación y de producción de biomasa en cortos tiempos de cultivo. Sin embargo estos resultados no son suficientemente apropiados para la producción a gran escala de *M. bovis* piliada para ser utilizada como antígeno vacunal.

5. Como consecuencia de que los sistemas de cultivo analizados previamente no aportan una solución al problema de la producción industrial de la bacteria de fenotipo piliado para ser utilizada en preparados vacunales y que esta enfermedad ocurre como consecuencia de la colonización de la superficie de la córnea bovina por *M. bovis* es que iniciamos el estudio de la bacteria creciendo en biofilm. Una vez puesto a punto el sistema de cultivo analizamos las bacterias sésiles obtenidas del proceso en función de su piliación, propiedades y componentes de superficie. Hallamos que el crecimiento de *M. bovis* en biofilm sigue las mismas etapas que los biofilms descritos para otras bacterias similares: transporte de los microorganismos a la superficie, adhesión y formación de monocapa, crecimiento y formación de microcolonia, formación del biofilm maduro desprendimiento y muerte. Al comparar las propiedades y componentes de superficie de *M. bovis* creciendo en biofilm con los de *M. bovis* creciendo en cultivos en medios sólidos y líquidos observamos que las células sésiles muestra altos índices de autoaglutinación, altos valores de potencial zeta y alta adhesión a hexadecano los que pueden asociarse al fenotipo piliado. Al analizar comparativamente los componentes de superficie (PME y LPS) de estas bacterias sésiles con las provenientes de cultivos en medio sólido y líquido no se observaron diferencias significativas. Esto nos permite proponer los cultivos en biofilm

como estrategia industrial para la obtención de bacterias piliadas que aporten niveles significativos de protección frente a QIB.