

PCR alelo-específica para identificar los alelos *ptxA* K9/G129 vs. R9/E129 y *prn1* vs. *prn2* en *Bordetella pertussis*

Lourdes L. Proenza-Alfonzo*, Karen Marrero-Domínguez y Rafael Fando-Calzada.

Departamento de Biología Molecular, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. lourdes.proenza@cnic.edu.cu

Recibido: 4 de septiembre de 2012.

Aceptado: 19 de octubre de 2012.

Palabras clave: *Bordetella pertussis*, PCR alelo-específica, toxoide pertúsico, *prn2*.

Key words: allele-specific PCR, pertussis toxoid.

La bacteria *Bordetella pertussis* constituye el agente etiológico de la tos ferina, enfermedad aguda del tracto respiratorio superior que afecta principalmente a niños pequeños, y que ha sido controlada mediante el uso de vacunas celulares.¹ Sin embargo, la inducción frecuente de reacciones adversas, que pueden ser desde afectaciones locales en el lugar de la inyección como inflamación, dolor, hasta encefalopatías, trastornos de la coagulación, convulsiones; ha reducido continuamente la aceptación internacional de esas vacunas.²

El desarrollo de vacunas anti-pertúsicas acelulares de composición definida y mayor inocuidad ha estimulado la sustitución definitiva de las vacunas celulares por las acelulares, para las que se han construido cepas de *B. pertussis* modificadas genéticamente que producen las proteínas de interés vacunal.³ El componente principal de las vacunas acelulares es el toxoide pertúsico que se obtiene por modificación química o genética de la toxina pertúsica (TP), el principal factor de virulencia de *B. pertussis*.⁴ La TP posee una estructura del tipo A-B compuesta por los polipéptidos S1, S2, S4, S5 y S3, codificados por el operón *Optx*.⁵ El polipéptido S1, que es codificado por el gen *ptxA*, constituye la subunidad enzimáticamente activa de la TP. La administración del toxoide pertúsico en lugar de la TP no induce los efectos provocados por la TP y en cambio confiere protección contra la enfermedad.

Las variantes más utilizadas hasta la fecha para la inactivación genética de la TP,⁶ sustituyen o eliminan aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de la subunidad S1.⁷ Así, el toxoide que tiene cambiado la arginina 9 por lisina y el glutámico 129 por glicina (TP-S1-Lys9/Gly129) ha sido el más utilizado para la inmunización activa contra la tos ferina mediante componentes acelulares.⁸

Otro de los antígenos utilizados para inducir inmunidad protectora en la mayoría de las vacunas acelulares es la pertactina (Prn), proteína autotransportadora y polimórfica de aproximadamente 60 kDa. De esta proteína se han descrito 13 variantes diferentes,

cuyas modificaciones en las cadenas peptídicas están limitadas principalmente a las regiones 1 y 2 que contienen los fragmentos repetitivos Gly-Gly-X-X-Pro y Pro-Gln-Pro, respectivamente.⁹ De todas las variantes, la Prn1 y la Prn2 son dos de las más estudiadas. Las diferencias aminoacídicas entre estas dos variantes están localizadas en la región 1 de la proteína y consisten en el cambio de los aminoácidos 278 y 279, Ala-Val, en la Prn1 y Phe-Gly, en la Prn2, y la adición del pentapéptido Gly-Phe-Gly-Pro-Gly a partir del aminoácido 287, en el caso de la Prn2. Las cepas vacunales acelulares obtenidas hasta la fecha expresan exclusivamente la Prn1. Debido a la disminución de la inmunidad en adolescentes y adultos y a la adaptación y polimorfismo de las cepas circulantes de *B. pertussis*, se ha descrito el surgimiento de cepas que expresan variantes de pertactina diferentes a la Prn1, específicamente que expresan la Prn2¹⁰⁻¹² y se ha demostrado que la variante Prn2 induce una respuesta protectora contra la Prn1 y la Prn2.¹³

Uno de los métodos utilizados para la identificación rápida de diferentes variantes de un gen consiste en la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*), de tipo alelo-específica, que se basa fundamentalmente en el diseño de oligonucleótidos que contengan las bases específicas para cada alelo, lo que permite que solo haya amplificación cuando se encuentran las bases complementarias en el alelo de interés. Además, requiere la optimización de las condiciones de ejecución de la PCR para lograr un equilibrio entre su especificidad y eficiencia.¹⁴ Para la diferenciación de alelos de la PT y de la Prn, el presente estudio tuvo como objetivo desarrollar una PCR a punto final que permita la genotipificación de los alelos PTK9/G129 vs R9/E129 y *prn1* vs *prn2* en cepas de *B. pertussis*.

Diseño y optimización de una PCR para la identificación de cepas de *B. pertussis* salvajes y de mutantes que contengan la mutación PT-S1-Lys9/Gly129.

Para la realización de las PCR, se utilizó como molde el ADN cromosomal de las cepas de *B. pertussis* Bp165 (*ptxA* salvaje, *prn1*) y su derivada Bp2-1 (PT-S1-Lys9/Gly129, *prn2*). Para el aislamiento del ADN, las cepas de *B. pertussis* se cultivaron en placas de Agar de Bordet Gengou suplementadas con sangre de carnero desfibrinada al 15 % e incubadas a 35 °C durante 72 h en ambiente húmedo. El aislamiento de ADN cromosomal y la separación del ADN en geles de agarosa se realizaron según Ausubel y cols.¹⁵ Los oligonucleótidos utilizados se sintetizaron según la secuencia del genoma de *B. pertussis* Tohama I.¹⁶ Para la tipificación de *ptxA* se diseñaron los oligonucleótidos R9 (5'-GGCGGGAGTCATAGCG-3'), que complementa con la Arg9 y K9 (5'-GGGCGGGAGTCATACTT-3'), que complementa con la Lys9. Estos oligonucleótidos contienen tres bases en el extremo 3' terminal que no complementan la secuencia presente en los alelos que codifican para la Lys9 y la Arg9, respectivamente. De esta manera garantiza la ausencia de amplificación cuando se utilice el oligonucleótido R9 y esté presente el alelo Lys9, de igual manera ocurre con el oligonucleótido K9 y el alelo Arg9. Además, se diseñaron los oligonucleótidos E129 (5'-CCGGTGTGCCAGATATT-3') y G129 (5'-CCGGTGTGCCAGATACC-3') que contienen dos bases en el extremo 3' terminal que no complementan la secuencia presente en los alelos que codifican para la Gly129 y el Glu129, respectivamente. En cada reacción de amplificación se utilizó el oligonucleótido PT3 (5'-GCTACTGCAATCCAACACG-3') como complementario (Fig. 1).

La identificación de los alelos *ptxA* que contienen los nucleótidos codificadores para los aminoácidos Arg9 o Lys9 se realizó por PCR utilizando los pares de oligonucleótidos R9/PT3 (Fig. 1A) o K9/PT3 (Fig. 1B). Estos pares de oligonucleótidos deben generar un amplicón de 285 pb solo cuando están presentes sus alelos específicos. En el caso de la

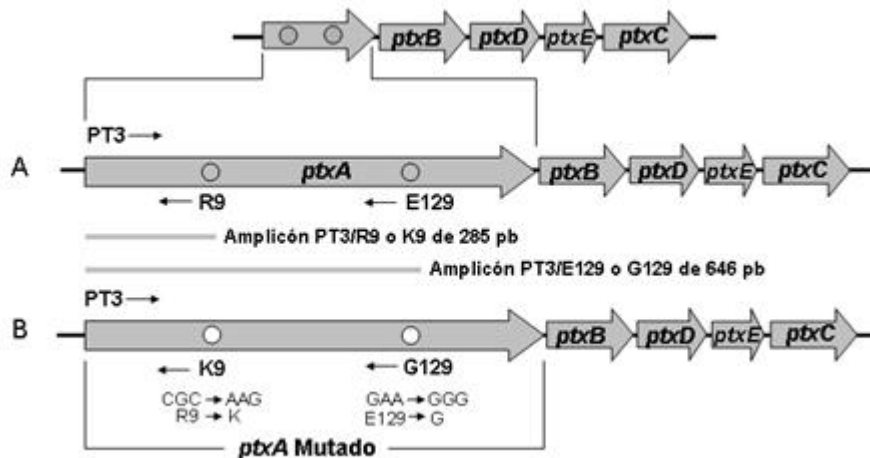


Fig. 1. Representación esquemática de la estrategia requerida para la identificación de los alelos Arg9, Lys9, Glu129 y Gly129 del gen *ptxA* mediante una PCR alelo-específica. **A)** Amplificación de los alelos salvajes codificantes para la Arg9 y el Glu129. **B)** Amplificación de los alelos mutantes Lys9 y Gly129. Las líneas grises corresponden a los amplicones de 285 y 646 pb que se deben obtener en cada caso.

identificación de los alelos de *ptxA* que contienen los nucleótidos codificadores para el Glu129 o la Gly129, se utilizaron las parejas de oligonucleótidos PT3/E129 (Fig.1A) y G129/PT3 (Fig.1B) para amplificar un amplicón de 646 pb. Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa (Promega) al 2 %. La técnica de PCR se optimizó para las variables siguientes: temperatura de alineamiento (58 y 60 °C), y concentración de dimetilsulfóxido (DMSO) al 5 %, en el caso de la PCR para la determinación de los alelos *prn* también se avaluó la adición de DMSO al 10 %.

Inicialmente, se utilizó un programa de PCR de 35 ciclos con una temperatura de alineamiento de 58 °C y en estas condiciones, la cepa Bp165 fue positiva para los alelos codificantes de los aminoácidos Arg9 y Glu129, bandas de 285 y 646 pb, respectivamente (Fig. 2A, carrileras 1 y 3) y la cepa Bp2-1 fue positiva para los alelos codificantes de los aminoácidos Lys9 y Gly129 (Fig. 2A, carrileras 6, banda de 285 y 8, banda de 646 pb). Aunque se amplificaron preferentemente las bandas alelo-específicas, también se produjeron bandas nítidas inespecíficas, en los casos en los que no debía ocurrir amplificación, menos en la reacción con el par PT3/G129 (Fig. 2 A, carrilera 4). Para mejorar la especificidad de la amplificación, se evaluó el aumento de la temperatura de alineamiento a 60 °C. En este caso, se afectó la eficiencia de las reacciones al disminuir su rendimiento en las reacciones con los oligonucleótidos PT3/R9 y PT3/G129 (Fig. 2B, carrileras 1 y 8, respectivamente), y en el caso de la reacción con PT3/K9, se amplificó inespecíficamente una banda con el ADN cromosomal de B 165 (Fig. 2B, carrilera 2).

A continuación, se evaluó el efecto de la adición del DMSO al 5 % sobre la especificidad de la PCR utilizando un programa de 35 ciclos y 58 °C de temperatura de alineamiento. La adición de DMSO mejoró el rendimiento de la PCR y la especificidad de la reacción con el par de oligonucleótidos PT3/K9, pero no la especificidad de la reacción con PT3/R9 (datos no mostrados). Por tal razón, en las reacciones con los oligonucleótidos PT3/R9 y PT3/K9 se evaluó en la PCR la adición de DMSO al 5 % y la utilización de una temperatura de alineamiento de 60 °C, en estas condiciones, los pares de oligonucleótidos PT3/R9 y PT3/K9 reconocen los alelos que codifican para la Arg9 y la Lys9, respectivamente, de manera específica y la presencia del DMSO no

afectó el rendimiento cuando se utilizó como molde el ADN de ambas cepas (Fig. 2 C, carrileras 2 y 6).

Desarrollo de una PCR alelo-específica para determinar la presencia de los alelos que codifican para la variante 1 y 2 de la PRN. La realización de la PCR para la identificación de los alelos *prn1* y *prn2* se utilizó el ADN cromosomal de las cepas de *B. pertussis* Bp 165 y Bp2-1, que expresan *prn1* y *prn2*, respectivamente. Como controles se utilizaron los plasmidios pET19b-*prn2* (vector pET con N-terminal His tag, Amp^r y el gen *prn2*) y pSS-*prn2* (plasmidio suicida, Gen^R, Amp^R, Str^S, *prn2*). El número de unidades Gly-Gly-X-X-Pro repetidas en la región 1 del gen *prn*, se determinó por la realización de una PCR usando una temperatura de alineamiento de 66 °C y los oligonucleótidos *prnE* (5'-GCGGTTCGCGGCTTC-3')/*prnD* (5'-CCACGCTGGAGCCCGATACG-3') (Fig. 3), que se diseñaron según Muyldermans y cols.¹⁷ aunque la secuencia de *prnD* reportada se cambió para eliminar una secuencia que formaba una estructura secundaria muy estable a 84 °C. Adicionalmente, se evaluó la adición del DMSO al 5 % y al 10 %.

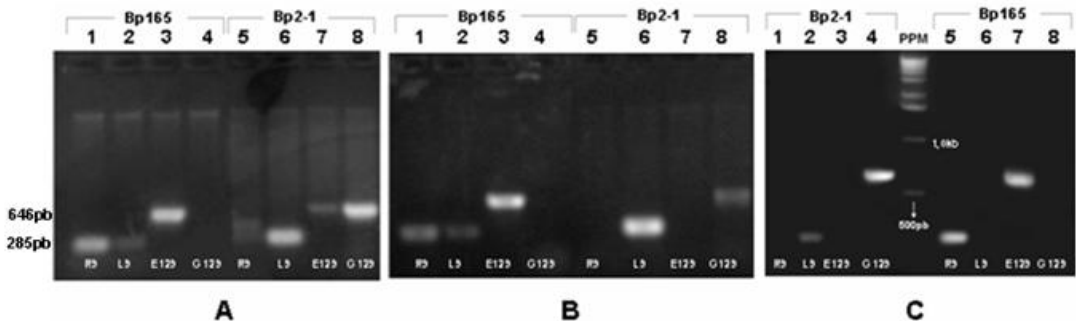


Fig. 2. Resultado obtenido en la PCR para la amplificación del gen *ptxA* que contiene los alelos Arg9 (carrilera 1 y 5), Lys9 (carrilera 2 y 6), Glu129 (carrilera 3 y 7) y Gly129 (carrilera 4 y 8). **A)** Productos de PCR obtenidos al utilizar una temperatura de alineamiento de 58 °C, **B)** 60 °C y **C)** 60 °C con la adición de dimetilsulfóxido al 5 %; en el centro se muestra el patrón de peso molecular ADN 1 kb Ladder de Invitrogen.

En las muestras que contenían el alelo *prn1* y *prn2* se obtuvieron fragmentos con los tamaños esperados, 86 (Fig. 4, carrileras 1, 5 y 9). y 116 pb (Fig. 4, carrileras 2-4, 6-8 y 10-12), respectivamente, que se corresponden con el número de unidades Gly-Gly-X-X-Pro repetidas. La adición de DMSO al 5 y 10 %, mejoró el rendimiento y la especificidad de las reacciones, aunque el rendimiento de amplificación fue mayor del 5 % de DMSO (Fig. 4, carrileras 5-8).



Fig. 3. Secuencias nucleotídicas y aminoacídicas parciales de los alelos *prn1* y *prn2*. En gris se muestra el cambio de Ala-Val por Phe-Gly y la adición del pentapéptido Gly-Phe-Gly-Pro-Gly en la proteína *Prn2*. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la identificación de los alelos se indica subrayada.

Por último, se evaluó la posibilidad de realizar el diagnóstico de los alelos *prn* en las mismas condiciones en que se realiza la PCR para diagnosticar los alelos *ptxA* y se

encontró que en presencia de DMSO al 5 % y temperatura de alineamiento de 60 °C, se obtienen las bandas esperadas con igual especificidad que las obtenidas a 66 °C.

La realización de una PCR alelo-específica para la identificación de los alelos *ptxA* 9R/129E y 9K/129G, así como *prn1* y *prn2* es posible utilizando los oligonucleótidos descritos en este estudio, una temperatura de alineamiento de 60 °C y en presencia de DMSO al 5 %.

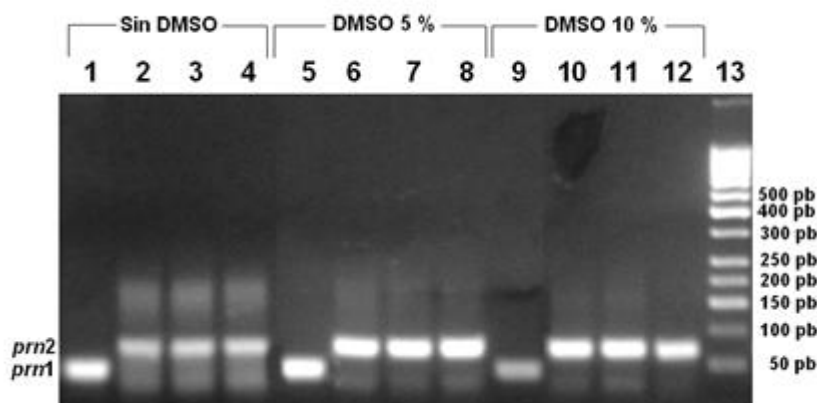


Fig. 4. Productos de la PCR realizada para determinar la presencia de los alelos *prn1* o *prn2*. **Carrileras 1, 5 y 9:** corresponden a la reacción de amplificación utilizando como molde el ADN de la cepa salvaje Bp165. **Carrileras 2, 6 y 10:** corresponden al mutante 2-1; **carrileras 3, 7 y 4:** corresponden al plasmidios pET19b-*prn2*. **Carrileras 4, 8 y 12,** plasmidio pSS-*prn2*. **Carrilera 13:** patrón de peso molecular ADN 50 pb Ladder de Invitrogen. Se especifica en cada caso la ausencia o presencia de dimetilsulfóxido al 5 y 10 %.

En este estudio, se reporta por primera vez en Cuba, la realización de una PCR alelo específica para la diferenciación de los alelos *ptxA* 9R/129E y 9K/129G, así como *prn1* y *prn2* mediante la utilización de los oligonucleótidos descritos en este estudio, una temperatura de alineamiento de 60 °C y en presencia de DMSO al 5 %. Esta PCR podría ser utilizada para la identificación rápida de mutantes de *B. pertussis* genéticamente modificados, en la caracterización de aislamientos ambientales de *B. pertussis*, así como en el control de la calidad de lotes vacunales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wood N, McIntyre P. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatr Respir Rev.* 2008; 9(3):201-11.
2. Hoonakker ME, Ruiterkamp N, Hendriksen CF. The cAMP assay: a functional - alternative to the in vivo Histamine Sensitization test. *Vaccine.* 2010; 28(5):1347-1352.
3. Pichichero ME, Edwards KM, Anderson EL, Rennels MB, Englund JA, Yerg DE *et al.* Safety and immunogenicity of six acellular pertussis vaccines and one whole-cell pertussis vaccine given as a fifth dose in four- to six-year-old children. *Pediatrics.* 2000; 105(1):e11.
4. Robbins JB, Schneerson R, Keith JM, Shiloach J, Miller M, Trollors B. The rise in pertussis cases urges replacement of chemically-inactivated with genetically-inactivated toxoid for DTP. *Vaccine* 2007; 25(15):2811-2816.
5. Camille L, Coutte L, Mielcarek N. The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS Journal* 2011; 278: 4668-4682.

6. Nicholas HC. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol.* 2010; 5: 455-469.
7. Nencioni L, Pizza M, Bugnoli M, De Magistris T, Di Tommaso A, Giovannoni F *et al.* Characterization of genetically inactivated pertussis toxin mutants: candidates for a new vaccine against whooping cough. *Infect Immun* 1990; 58(5):1308-1315.
8. Black SB, Shinefield HR, Bergen R, Hart C, Kremers R, Lavetter A, Lemesurier J, Morozumi PA y cols. Safety and immunogenicity of Chiron/Biocine recombinant acellular pertussis-diphtheria-tetanus vaccine in infants and toddlers. *Pediatr Infect Dis J.* 1997; 16(1): 53-58.
9. Mooi FR, Hallander H, Wirsing von Konig CH, Hoet B, Guiso N. Epidemiological typing of *Bordetella pertussis* isolates: recommendations for a standard methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; 19(3):174-181.
10. Mooi FR, Van Oirschot H, Heuvelman K, Van der Heide HG, Gastra W, Willems RJ. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun.* 1998; 66(2):670-675.
11. Litt DJ, Neal SE, Fry NK. Changes in genetic diversity of the *Bordetella pertussis* population in the United Kingdom between 1920 and 2006 reflect vaccination coverage and emergence of a single dominant clonal type. *J. Clin. Microbiol* 2009; 47:680-688.
12. Njamkepo E, Cantinelli T, Guigon G, Guiso N. Genomic analysis and comparison of *Bordetella pertussis* isolates circulating in low and high vaccine coverage areas. *Microbes Infect.* 2008; 10:1582-1586.
13. Komatsu E, Yamaguchi F, Abe A, Weiss AA, Watanabe M. Synergic Effect of Genotype Changes in Pertussis Toxin and Pertactin on Adaptation to an Acellular Pertussis Vaccine in the Murine Intranasal Challenge Model. *Clin Vaccin Immunol.* 2010; 17(5): 807-812.
14. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HE. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature.* 1986; 324(6093):163-166.
15. Ausubel F, Brent MR, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA *et al.* Short protocols in molecular biology. New York, USA: John Wiley & Sons Inc, 1995: pp
16. Caro V, Bouchez V, Guiso N. Is the Sequenced *Bordetella pertussis* strain Tohama I representative of the species? *J Clin Microbiol.* 2008; 46(6):2125-2128.
17. Muyldermans G, Pierard D, Hoebrex N, Advani R, Van Amersfoorth S, De S, I *et al.* Simple Algorithm for Identification of *Bordetella pertussis* Pertactin Gene Variants. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(4):1614-1619.