

Método para la detección de la actividad dermonecrótica de cepas *Bordetella pertussis* en el modelo del ratón lactante

Yaima Martínez-Loredo, Anabel Delgado-Egozcue, Lourdes Proenza-Alfonzo y Rafael Fando-Calzada.

Departamento de Bioquímica, Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ave 25 y 158, Playa, La Habana
yaima.martinez@cnic.edu.cu

Recibido: 17 de octubre de 2012.

Aceptado: 18 de diciembre de 2012.

Palabras clave: *Bordetella pertussis*, toxina dermonecrótica, ratones, vacunas.

Key words: *Bordetella pertussis*, dermonecrotic toxin, mice, vaccines.

RESUMEN. La toxina dermonecrótica TD es un factor de virulencia de *Bordetella pertussis*, su actividad biológica estimula una cascada bioquímica que ocasiona lesiones necróticas y la muerte a animales de laboratorio. Este factor no está implicado en la generación de inmunidad protectora anti-pertúsica. En cambio, cepas mutantes del gen *dnt* son más seguras para formular vacunas vivas atenuadas y en el caso de las vacunas celulares y acelulares es mandatorio determinar la toxicidad residual debida a DNT en el ingrediente activo y la preparación antigénica final. En este trabajo, se estableció el modelo del ratón lactante para la evaluación de la actividad de la TD en *B. pertussis*. El extracto celular de *B. pertussis* se obtuvo mediante ultrasonificación de la suspensión celular. Mediante la determinación del contenido de proteínas en los extractos se demostró que el método de ruptura empleado produjo niveles de ruptura equivalentes entre diferentes cepas. La inoculación de ratones OF1 por vía intradérmica con el extracto de cepas de genotipo *dnt* salvaje produjo lesiones necróticas características y la muerte a las 24 h. En cambio, ratones similares inoculados con lisados celulares que contenían la TD inactivada por calor o con extractos de mutantes del gen *dnt* se mantuvieron vivos y sin lesiones necróticas. El biomodelo del ratón lactante pudiera ser empleado, bajo las condiciones señaladas, para la detección de la TD en extractos celulares de *Bordetella pertussis*.

ABSTRACT. The dermonecrotic toxin (DNT) is a virulence factor of *Bordetella pertussis*, its biological activity stimulates a biochemical cascade which results in necrotic lesions and death of laboratory animals. This factor is not involved in the generation of anti-pertussis protective immunity. However, *dnt* gene mutant strains are safer, just to formulate live attenuated vaccines and in the case of cellular and acellular vaccines, it is mandatory to determine residual toxicity due to DNT in the active ingredient and final antigen preparation. In this paper, the authors established the infant mouse model for the evaluation of DNT activity in *B. pertussis*. Cell extracts of *B. pertussis* was obtained after ultrasonication of cell suspensions. By determining the protein content of extracts, it was demonstrated that the method used to lyse cells yielded equivalent levels of rupture in the different strains. Intradermal inoculation of OF1 mice of extracts from wild type *dnt* genotype strains produced necrotic lesions and death at 24 h. In contrast, inoculation with heat inactivated cell lysates or extracts from *dnt* gene mutant strains produced no deaths and did not show necrotic lesions. The infant mouse biomodel might be employed, by using this protocol for the detection of DNT in cellular extracts of *B. pertussis*.

INTRODUCCION

La tosferina, causada por el agente etiológico *Bordetella pertussis*, es una enfermedad del tracto respiratorio marcadamente infecciosa en seres humanos, principalmente en lactantes que no han completado el esquema de vacunación.¹ Varios son los factores de

virulencia implicados en la inmunidad antipertúsica; de ellos, el principal antígeno generador de inmunidad protectora es la toxina pertúsica (PT). Entre otros, la hemaglutinina filamentosa (FHA), la proteína de membrana externa pertactina (PRN),² y las fimbrias de tipo 2 y 3 (FIM2 y FIM3) también desempeñan un papel importante en la inmunidad protectora.³ El toxoide pertúsico solo o mezclado con uno o más de los antígenos mencionados, constituye la materia prima fundamental de las vacunas acelulares antitosferina formuladas en la actualidad.⁴

La TD es una endotoxina termolábil⁵ y un factor de virulencia de *B. pertussis*⁶ que tiene propiedades biológicas similares en las diferentes especies del género *Bordetella*. Esta toxina no ha sido implicada en la inmunidad protectora anti-pertúsica.⁷

Es un polipéptido único de 140 kDa⁸ perteneciente a la familia de las proteínas inductoras de dermonecrosis. Contienen un dominio N-terminal de unión al receptor celular y un dominio C-terminal que le confiere la actividad bioquímica específica,⁷ transglutaminasa, la cual desamina o poliamina residuos específicos de glutamina de proteínas pertenecientes a la familia GTPasas Rho, rindiendo GTPasas constitutivamente activa, lo cual media varios efectos de la TD en las células dianas.⁸ La administración endovenosa de TD es letal para el ratón.^{5,9}

El nombre toxina dermonecrótica se debe a las lesiones características que provoca tras inyectarla en la piel de animales de laboratorio como el conejo, el ratón o el cobayo.¹⁰

Una dosis mínima de 0,40 pg produce una reacción intradérmica detectable.¹¹

Entre los efectos farmacológicos que se producen como consecuencia de dicha actividad se encuentra la inflamación, la vasoconstricción y las lesiones alrededor de las áreas de colonización de la bacteria.¹¹ En líneas celulares fibroblásticas, la TD causa inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina y la expresión de colágeno de tipo I y además, estimula la síntesis de proteínas y ADN en ausencia de la división celular, todo lo cual se traduce en una polinucleación. Se ha demostrado que la actividad dermonecrotizante *in vitro* de cepas del género *Bordetella* se incrementa después de la ruptura bacteriana.¹²

Muñoz *et al.* encontraron que después de la lisis celular la mayor parte de la actividad tóxica pasa la fracción soluble del lisado.¹³ También, asociado a la actividad bioquímica de esta toxina, se ha descrito su efecto adyuvante de la respuesta inmune mucosal.¹⁴

Todas estas características hacen de esta toxina una proteína atractiva para su estudio e inactivación, con lo cual cobran importancia los métodos para su detección.

La industria biofarmacéutica cubana ha iniciado el desarrollo de una nueva vacuna acelular contra la tosferina. Se persigue, como en reportes previos, reducir la toxicidad respecto a la vacuna celular actual,¹⁵ lograr una inmunidad de igual o mayor duración,⁴ integrar a la vacunación grupos susceptibles de adultos y niños mayores de siete años que por la reactogenicidad y toxicidad de las células completas inactivadas no se les administra refuerzo con la vacuna actual de células completas.¹⁶ La supresión de genes codificantes de toxinas como la TD evitaría la potencial contaminación de la preparación farmacéutica, lo que representa una fuente de valor agregado para la cepa y el proceso de producción.¹⁵ El objetivo de este trabajo consistió en detectar de modo preliminar, en el modelo del ratón lactante, la actividad dermonecrotizante intracelular de cepas de *B. pertussis*¹⁷ con genotipo TD salvaje y con genotipo TD mutante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y medios de cultivo utilizados

Se emplearon cepas de *Bordetella pertussis* tipo salvaje y genéticamente modificadas (Tabla 1) que poseían diferentes genotipos en cuanto a la expresión de TD. La cepa Bp165 es una de las tres cepas de producción certificadas por el Centro Estatal de

Control de los Medicamentos, Equipos y Dispositivos para la fabricación de la vacuna celular cubana.¹⁸ Las restantes cepas son microorganismos genéticamente modificados obtenidos en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

Tabla 1. Cepas de *B. pertussis*, características y origen.

Cepas de <i>B. pertussis</i>	Características	Fuente
Bp165	Tipo salvaje, serotipo 2	CIGB ^a
Bp165 Str ^R -4	Mutante espontáneo Str ^R de B165	Celso Pérez ^b
Clon d1	Mutante de supresión de la DNT	Lourdes Proenza ^b
Clon d7	Mutante de supresión de la DNT	Lourdes Proenza ^b

^aCentro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.

^bCentro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba.

Bordetella pertussis se cultivó en placa sobre agar de charcoal (Oxoid, Reino Unido) complementado con 10 % de sangre ovina desfibrinada. Una alícuota de 10 µL del banco de trabajo congelado de cada cepa de *Bordetella pertussis* con el equivalente a 10⁴ unidades formadoras de colonias (UFC/mL) se esparció sobre la superficie de agar de charcoal de una placa y se incubó durante 120 h a 35 °C. La biomasa se cosechó en 10 mL de caldo casaminoácidos (casaminoácidos 1 % y NaCl 0,9 %) y se inoculó el caldo Stainer Scholte (SS)¹⁹ a 0,1 unidades de densidad óptica (600 nm) inicial. El cultivo se incubó en zaranda orbital provista de termostato a 35 °C, con agitación de 200 ciclos/min, durante 24 h. Cuando fue necesario se usó suplemento de kanamicina (Kn) a 50 µg/mL y estreptomycin (Str) a 100 µg/mL.

Obtención de extractos celulares de cepas de *B. pertussis*

El cultivo de *Bordetella pertussis* en caldo SS se ajustó espectrofotométricamente (Biofotómetro Eppendorf, Alemania) a una densidad óptica de 1,0; Se empleó un rayo de luz con una longitud de onda de 600 nm. El contenido de 10 mL de cultivo se sedimentó en una centrífuga Janetzki, modelo K24, durante 5 min a 13 000 × g, a una temperatura de 2 a 10 °C. El sedimento se congeló a – 20 °C hasta su uso. Para obtener el lisado, la biomasa se resuspendió en el volumen original del cultivo y el extracto celular se obtuvo mediante ruptura por sonicación (sonicador MSE) en baño de agua helada mediante tres ciclos de 50 s de sonicado por 1 min de reposo en hielo y luego, tres ciclos de 30 s de sonicado por 1 min de reposo en hielo, similar a reportes previos.¹¹ El lisado celular se centrifugó (Minispin, Eppendorf) durante 5 min a 14 000 × g y el sobrenadante se congeló a – 20 °C hasta su uso.

Para la inactivación por calor de la actividad dermonecrotizante,²⁰ las muestras fueron calentadas a 90 °C durante 90 min en un baño seco. Una suspensión celular sin sonicar se usó como control y fue preservada a 4 °C para evitar la ruptura celular por congelación.

Evaluación de la actividad dermonecrotica de la DNT en el modelo del ratón lactante

Modelo animal. Se utilizaron ratones machos, OF1 lactantes, de cuatro días de nacidos, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, La Habana, Cuba. Estos animales fueron mantenidos durante todo el experimento junto a sus madres en condiciones de temperatura y humedad controladas, incluyendo ciclos de luz-oscuridad de 12 h, con alimentación y agua *ad libitum*. Todo el experimento fue realizado teniendo en cuenta los códigos éticos establecidos para la experimentación en animales de laboratorio.²¹

Diseño experimental. La actividad biológica dermonecrotizante de cada extracto se midió en el modelo del ratón lactante.^{20;22} Los animales se asignaron aleatoriamente a uno de siete grupos, a razón de cuatro animales por grupo; un grupo control con disolución salina fisiológica, dos grupos con los extractos celulares de *B. pertussis* Bp165 y Bp165 str^R-4 respectivamente. Otros dos grupos que recibieron los extractos de estas dos cepas inactivadas térmicamente Bp165 (-) y Bp165 str^R-4 (-) y dos grupos con los extractos celulares de los mutantes *dnt* d1 y d7. En un experimento independiente se inocularon muestras del extracto de la cepa Bp165 str^R-4 diluidas en PBS, dos, cinco y diez veces, a razón de un animal por dilución, con el objetivo de detectar el comportamiento de la actividad dermonecrotizante respecto a la dilución del extracto.

Determinación de la actividad biológica de la toxina dermonecrotizante. Los animales fueron inyectados por vía intradérmica con 0,1 mL del extracto celular de *B. pertussis* o disolución salina fisiológica en la zona dorsal entre el cuello y el lomo.²² A las 24 y 48 h después de la inyección, se registró la sobrevivencia del animal y la presencia o no de lesión hemorrágica necrótica y su diámetro longitudinal (d). Las lesiones se clasificaron acorde con una escala previamente reportada,¹⁷ lesión no detectable o de grado 0; lesión leve, $d < 0,5$ cm, lesión moderada, $5 \leq d \leq 1,0$ cm; lesión severa, $d \geq 1,0$ cm acompañada de muerte del animal.

Determinación de proteínas totales en los lisados celulares. Se realizó en alícuotas de los extractos mediante el micrométodo de Bradford.²³ Se evaluaron los extractos celulares de las cepas Bp165, Bp165 str^R-4 y d1. Se determinó la concentración de proteína total por triplicado a cada muestra y se obtuvo el valor promedio. Los resultados se expresaron como la media $\pm$ error estándar de la concentración de proteínas en cada extracto.

Análisis estadísticos. Para evaluar la significación estadística de los resultados obtenidos por micrométodo de Bradford para las diferentes cepas evaluadas, se utilizó el paquete estadístico STATISTICA 6.0, mediante la prueba de ANOVA factorial simple para la comparación de todos los grupos. El nivel de probabilidad utilizado para señalar la significación estadística fue de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Evaluación de los extractos celulares obtenidos mediante sonicación

Las suspensiones de células bacterianas, de las diferentes cepas de *B. pertussis* utilizadas en el estudio, se sometieron a ciclos de sonicación para la liberación al medio de extracción de la TD. Se obtuvo la fracción soluble y la homogeneidad de la ruptura celular entre grupos se verificó a partir de la cantidad de proteínas totales presentes en la fracción soluble del lisado celular, la cual fue similar en los extractos de d1 ($68,24 \pm 4,7$) y de Bp165 Str^R-4 [$(64,93 \pm 8,2)$ μ g]. Las proteínas totales en el lisado de la cepa Bp165 [$(91,77 \pm 9,8)$ μ g] resultaron ligeramente superiores, pero la diferencia no alcanzó significación estadística. Estudios previos han demostrado que la actividad de la TD se incrementa después de la ruptura celular,²⁴ y se obtiene entre un intervalo de 73 a 80 % de la actividad en la fracción soluble y solo de un 3 a un 6 % en la fracción de membrana. Se concluye que el método de disrupción empleado es adecuado, ya que genera extractos celulares equivalentes entre cepas diferentes de *B. pertussis* en cuanto

al contenido proteico de la fracción soluble, que es el material de partida para la detección de la máxima actividad dermonecrotizante.

Evaluación de la actividad dermonecrotizante en el extracto celular de cepas de *B. pertussis*.

La actividad biológica dermonecrotizante se identificó por inducción de lesiones visibles en la piel tras inyectar el extracto celular de *B. pertussis* por vía intradérmica. (Figuras 1 y 2) La instauración del daño se pudo apreciar por efectos farmacológicos como baja temperatura, letargo, aislamiento y sobrevivencia, del animal en caso de lesiones severas. (Tabla 2) Las lesiones observadas se caracterizaron por el enrojecimiento en la zona de aplicación, las cuales evolucionaron a lesiones necróticas de color oscuro, típicas de dermonecrosis a 24 h y muy similares a las observadas previamente por otros autores,^{8,17,25} y fueron visibles transcurridas dos horas a partir de la inyección. La ocurrencia de este tipo de lesiones se ha atribuido a la inducción de vasoconstricción en la región de la inyección²⁶ (Figuras 1 y 2).



Fig. 1. Imágenes de lesiones tipo obtenidas en la implementación del modelo de ratón lactante para la evaluación de actividad dermonecrotizante. Las lesiones se clasificaron acorde con una escala previamente reportada.¹⁷ A) Lisado celular de la cepa d7, lesión no detectable de grado 0. B) Lisado celular de la cepa Bordetella pertussis Bp165 str^R-4 lesión severa, $d \geq 1,0$ cm acompañada de muerte del animal.



Fig. 2. Imágenes de lesiones tipo producidas por la inyección intradérmica del lisado celular de la cepa Bp165 str^R-4 a diferentes concentraciones. A) Dilución 1 : 2; B) Dilución 1 : 5 C) Dilución 1 : 10. Todas las lesiones fueron severas, $d \geq 1,0$ cm.

En el grupo tratado con disolución salina fisiológica no se detectó actividad biológica dermonecrotizante, ni se observaron lesiones y hubo un 100 % de sobrevivencia a las 48 h. (Tabla 2) En los grupos que recibieron los extractos celulares de las cepas Bp165 y Bp165 Str^R-4 se detectaron lesiones necróticas caracterizadas de severas, con diámetros entre $(1,92 \pm 0,16)$ cm y $(1,63 \pm 0,27)$ cm, respectivamente y la muerte de todos los animales a las 24 h en ambos grupos, característico de la presencia de actividad TD en

estos extractos celulares. Este resultado indirectamente da una medida y aporta evidencia, aún no publicada, acerca de los niveles de expresión de la TD en la cepa Bp165, que es la de partida de los clones recombinantes en el programa biotecnológico cubano actual. En los grupos tratados con los extractos celulares inactivados térmicamente, Bp165 (-) y Bp165 Str^R-4 (-), su inyección no indujo lesiones detectables y 100 % de sobrevivencia de los animales de ambos grupos a las 48 h. Estos resultados están en concordancia con la termosensibilidad descrita para la toxina dermonecrotica.⁵

Tabla 2. Actividad TD del extracto celular de cepas de *B. pertussis* en el modelo del ratón lactante, en cuanto a tipo de lesión provocada y sobrevivencia animal.

Grupos	Sobrevivencia		Cantidad de animales con lesión del total (n/N) y características		
	24 h	48 h	n/N	Grado	Diámetro promedio (cm)
disolución salina	4/4	4/4	0/4	0	—
Bp165 str ^R -4	0/4	—	4/4	LS	1,63 ± 0,27
1:2	0/1	—	1/1	LS	1,51
1:5	1/1	0/1	1/1	LS	1,47
1:10	1/1	0/1	1/1	LS	1,53
Bp165 str ^R -4 (-)	4/4	4/4	0/4	0	—
Bp165	0/4	—	4/4	LS	1,92 ± 0,16
Bp165 (-)	4/4	4/4	0/4	0	—
d1	4/4	4/4	0/4	0	—
d7	4/4	4/4	0/4	0	—

La actividad biológica dermonecrotizante de cada cepa se midió en el modelo del ratón lactante. Se incluye además resultados de un experimento independiente donde se evaluó muestras del extracto de la cepa Bp165 str^R-4 diluidas en PBS, dos, cinco y diez veces, a razón de un animal por dilución. Se aplicó 0,1 ml del extracto celular sonificado de las cepas o disolución salina fisiológica en la zona dorsal entre el cuello y el lomo de forma intradérmica a los animales. A las 24 h y 48 h después de la inyección se registró la sobrevivencia del animal y la presencia o no de lesión hemorrágica necrótica y su diámetro longitudinal. Las lesiones se clasificaron acorde con una escala previamente reportada: ¹⁷ lesión no detectable o de grado 0; lesión leve, $d < 0,5$ cm; lesión moderada, $5 \leq d \leq 1,0$ cm; lesión severa, $d \geq 1,0$ cm acompañada de muerte del animal.

Los grupos tratados con los extractos celulares de los clones d1 y d7 respectivamente, se comportaron de forma similar al grupo tratado con disolución salina y los grupos tratados con los extractos celulares inactivados térmicamente, Bp165 (-) y Bp165 Str^R-4 (-), lesión no detectable y 100 % de sobrevivencia de los animales a las 48 h. Los extractos se obtuvieron de cultivos de 24 h en caldo SS, lo que coincidió con el momento de máxima acumulación de la TD¹². Lo anterior, sumado a que d1 y d7 son descendientes de Bp165 por inactivación insercional específica del gen *dnt*, confirma que la actividad dermonecrotica detectada en Bp165 y Bp165 Str^R-4 proviene específicamente de la TD presente en el extracto. Si bien este método tiene el inconveniente de usar animales de laboratorio, constituye la vía principal para evaluar la actividad de la toxina dermonecrotica de *Bordetella* debido a lo ilustrativo que resulta la observación de una lesión y a la sensibilidad de detección que le imparte al método la cascada de amplificación bioquímica que induce la acción de la toxina.

Los ratones inoculados con el extracto de la cepa Bp165 Str^R-4 diluido a diferentes concentraciones, 1 : 2, 1 : 5 y 1 : 10, presentaron lesiones dermonecroticas indistinguibles de las observadas en el extracto no diluido Bp165 Str^R-4. (Tabla 2, Fig. 2), lo que indic6 que el extracto diluido hasta 10 veces contiene una cantidad de TD que satura el efecto dermonecrotico detectable. Ello se corresponde con los resultados de Cowell y cols. (1979), quienes demostraron que la preparaci6n de un lisado de *B. pertussis* 114 cultivada por 24 h contiene 20×10^4 unidades de actividad TD por mililitro.¹² De igual forma, el extracto diluido a la mitad de la concentraci6n tambi6n tuvo efecto letal en el rat6n antes de las 24 h. En cambio, a las diluciones 1 : 5 y 1 : 10 el efecto letal fue detectable despu6s de las 24 h y antes de las 48 h. Estos resultados concuerdan con reportes previos en los que el extracto de una suspensi6n de 0,1 unidades de densidad 6ptica a 600 nm causaba lesiones grado 4+ en el rat6n lactante.¹¹ Ello sugiere que al diluir el extracto y reducir la dosis, el efecto letal tiene una cin6tica m6s lenta. Se ha reportado que dosis subletales de TD permiten la sobrevivencia del animal por al menos tres semanas aun en presencia de la lesi6n necr6tica.¹¹ En los experimentos de estandarizaci6n y validaci6n de este modelo, ser6 necesario incrementar la N y ajustar el dise1o para realizar estos an6lisis.

Por lo antes expuesto, este m6todo podr6a ser empleado para la determinaci6n de la actividad dermonecrotica de la TD en el extracto celular sin diluir de cepas de *B. pertussis*. Los resultados obtenidos para los controles positivos y negativos indicados arriba permiten inferir que este modelo es v6lido para evaluar clones recombinantes de *Bordetella pertussis* con el objetivo de determinar mutaciones de supresi6n del gen *dnt*, siempre que se contraste con los resultados de su cepa progenitora salvaje. El establecimiento de un modelo murino para detecci6n de la actividad biol6gica dermonecrotizante es un complemento para la caracterizaci6n de mutantes de supresi6n de TD.

CONCLUSIONES

La implementaci6n del modelo del rat6n lactante para la evaluaci6n de actividad TD es un m6todo muy ilustrativo, con gran sensibilidad de detecci6n. Las cepas salvajes evaluadas, Bp165 y Bp165 str^R-4, que expresan TD, causaron lesiones necr6ticas severas y muerte de los animales, dando una medida de los niveles de expresi6n de TD de ambas cepas. Las cepas salvajes inactivadas t6rmicamente y las cepas mutantes d1 y d7 no causaron lesiones ni muerte en los animales evaluados en esos grupos. La utilizaci6n del modelo del rat6n lactante, en las condiciones de obtenci6n de los extractos celulares de las cepas de *Bordetella*, podr6a emplearse en la determinaci6n de la actividad TD, en la caracterizaci6n de cepas recombinantes de *B. pertussis*.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Williamson YM, Moura H, Simmons K, Whitmon J, Melnick N, Rees J, *et al.* A gel-free proteomic-based method for the characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates. *J Microbiol Methods*. 2012; 90(2):119-133.
2. Buasri W, Impoolsup A, Boonchird C, Luengchaichawange A, Prompi boon P, Petre J, *et al.* Construction of *Bordetella pertussis* strains with enhanced production of genetically-inactivated Pertussis Toxin and Pertactin by unmarked allelic exchange. *BMC Microbiol*. 2012; 12:61.
3. Mooi FR. *Bordetella pertussis* and vaccination: The persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010; 10(1):36-49.

4. Robbins JB, Schneerson R, Keith JM, Miller MA, Kubler-Kielb J, Trollfors B. Pertussis vaccine: a critique. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(3):237-241.
5. Halperin SA, Gaston S. Pertussis. *Bacterial Infections of Humans*. 2009:577-595.
6. Loch C. Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *International Microbiology* 2.3. 2010:137-144.
7. Pullinger GD, Adams TE, Mullan PB, Garrod TI, Lax AJ. Cloning, expression, and molecular characterization of the dermonecrotic toxin gene of *Bordetella* spp. *Infect Immun*. 1996; 64(10):4163-4171.
8. Marzouqi I, Richmond P, Fry S, Wetherall J, Mukkur T. Development of improved vaccines against whooping cough: Current status. *Human vaccines*. 2010; 6(7):543-553.
9. Horiguchi Y. *Bordetella* dermonecrotizing toxin and *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors: bacterial toxins activating Rho family GTPases. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*. 2001; 46 Suppl 4:491-496.
10. Mattoo S, Cherry JD. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(2):326-382.
11. Walker KE, Weiss AA. Characterization of the dermonecrotic toxin in members of the genus *Bordetella*. *Infect Immun*. 1994; 62(9):3817-3828.
12. Cowell JL, Hewlett EL, Manclark CR. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun*. 1979; 25(3):896-901.
13. Muñoz J, Ribí E, Larson CL. Antigens of *Bordetella pertussis*. I. Activities of cell walls and protoplasm. *J Immunol*. 1959; 83:496-50.
14. Munro P, Flatau G, Anjuere F, Hofman V, Czerkinsky C, Lemichez E. The Rho GTPase activators CNF1 and DNT bacterial toxins have mucosal adjuvant properties. *Vaccine*. 2005; 23(20):2551-2556.
15. Siniashina LN, Siniashina LS, Semin EG, Amelina IP, Karataev GI. Construction of the genetically attenuated bacteria *Bordetella pertussis* devoid of dermonecrotic toxin activity and producing modified nontoxic pertussis toxin form. *Mol Gen Mikrobiol Virusol*. 2010; (3):31-36.
16. Diphtheria-Tetanus-Pertussis vaccine. (Adsorbed onto Aluminum Hydroxide gel). Intramuscular injection. julio 2005. [Consultado: 29 de noviembre de 2012]. Disponible en: http://www.finlay.sld.cu/cartera/dtp_ingles09.htm.
17. Endoh M, Nagai M, Burns DL, Manclark CR, Nakase Y. Effects of exogenous agents on the action of *Bordetella parapertussis* heat-labile toxin on guinea pig skin. *Infect Immun*. 1990; 58(5):1456-1460.
18. Vacuna- antidiftérica- antitetánica- antipertussis. CECMED Fecha de edición: Enero 2006 [Consultado: 29 de noviembre de 2012]. Disponible en: [http://www.cecmed.sld.cu/ Docs/ RegSan/ RCP/ Bio/ Vacs/ Vac Antipertusis.pdf](http://www.cecmed.sld.cu/Docs/RegSan/RCP/Bio/Vacs/VacAntipertusis.pdf)
19. Stainer DW, Scholte MJ. A simple chemically defined medium for the production of phase I *Bordetella pertussis*. *J Gen Microbiol*. 1970; 63(2):211-220.
20. Bárcenas MG, Molina G, Montaraz JA, Rosales ME. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bordetella bronchiseptica* de origen canino. *Veterinaria México*. 2006; 37(3):313-325.
21. Institute of Laboratory Animal Resources (US). Guide for the care and use of laboratory animals. National Academies Press. 1996.

22. Vaccines, Pertussis vaccine (acellular, component, adsorbed). In: Council of Europe, editor. European Pharmacopeia. 2005: 686-688.
23. Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases its sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. Analytical Biochemistry. 1996, 236: 302-308.
24. Alouf J, Popoff M. Bordetella protein toxins. The comprehensive sourcebook of bacterial protein toxins. Institute Pasteur de Lille, France and CNRS Anaerobie et botulisme Unite bacteries anaerobies et toxines Institute Pasteur France. 2005: 300.
25. Hewlett EL, Donato GM *Bordetella* toxins. In: Locht C, editor. *Bordetella* Molecular Microbiology. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2007. p. 97–118.
26. Endoh M, Nagai M, Nakase Y. Contractile action of heat-labile toxin of *Bordetella parapertussis* on aortic smooth muscles of pigs. Microbiol Immunol. 1988; 32(8):755-767.