**INSP**
**Instituto Nacional de Salud Pública**

**Birmex**
**Laboratorios de Biológicos y Reactivos de México S.A. de C.V.**

# Purificación de *Hemaglutinina Filamentosa y Toxina Pertussis* como componentes de una vacuna pertussis acelular

## PRESENTA

**Biol. Paulo Cesar Rivero García**

**Tesis para obtener el Título de Maestría en Ciencias de la Salud en Área de Concentración en Vacunología**

**Directora: Dra. Lizbel León Solís**

**Asesores:** **QFB: Antonio Sánchez Sánchez**
**M en C. Nelson Jesús Álvarez Anell**
**M. en C. Verónica Pérez Enríquez**

# Purificación de *Hemaglutinina Filamentosa y Toxina Pertussis* como componentes de una vacuna pertussis acelular

**INDICE**


| | | | |
|---|---|---|---|
| 1. | Introducción | | 1 |
| | 1.1 | Características morfológicas de *Bordetella pertussis* | 2 |
| | 1.2 | Aislamiento y cultivo | 2 |
| | 1.3 | Patogénesis | 3 |
| | 1.4 | Epidemiología | 3 |
| | 1.4.1. | Edad | 3 |
| | 1.4.2. | Sexo | 3 |
| | 1.4.3. | Inmunización | 3 |
| | 1.5. | Prevención | 4 |
| | 1.5.1 | Vacunas de primera generación | 4 |
| | 1.5.2 | Vacunas de segunda generación | 5 |
| | 1.6. | Factores de virulencia | 7 |
| | 1.6.1. | Hemaglutinina filamentosa | 7 |
| | 1.6.2. | Pertactina | 8 |
| | 1.6.3. | Fimbrias | 8 |
| | 1.6.4. | Toxina pertussis | 8 |
| | 1.6.5. | Citotoxina traqueal | 9 |
| | 1.6.6. | Toxina dermonecrótica | 9 |
| | 1.6.7. | Adenilato ciclasa | 9 |
| | 1.6.8. | Lipopolisacárido | 9 |
| | 1.6.9. | Hemolisina | 9 |
| | 1.7. | Cuadro Clínico | 10 |
| | 1.7.1. | Etapa catarral ó Prodrómico | 10 |
| | 1.7.2. | Etapa paroxística | 10 |
| | 1.7.3. | Etapa de convalecencia | 10 |
| | 1.8. | Complicaciones | 10 |
| | 1.9. | Diagnóstico | 11 |
| | 1.10. | Tratamiento | 12 |
| 2. | Justificación | | 13 |
| 3. | Objetivos | | 14 |
| 4. | Material y Métodos | | 15 |
| | 4.1 | Apertura de vial a nivel matraz | 15 |
| | 4.2 | Pase de matraz a matraz en medio Verwey | 15 |
| | 4.3 | Pase de matraz a matraz en medio FGP-1 | 15 |
| | 4.4 | Cultivo a nivel de Garrafón en medio FGP-1 | 15 |
| | 4.5 | Análisis Estadístico | 16 |
| | 4.6 | Pruebas de Control y Pureza | 16 |
| | 4.7 | Centrifugación para obtener sobrenadante libre de células | 16 |
| | 4.8 | Aislamiento y purificación de PT y FHA del sobrenadante | 16 |
| | 4.8.1 | Corrimiento de muestra en columna de CM-Sepharosa | 16 |
| | 4.8.2 | Corrimiento de muestra en Columna de Sephacryl | 17 |
| | 4.8.3 | Aislamiento de PT y FHA en Columna de Hidroxiapatita | 17 |
| | 4.8.4 | Corrimiento de muestra en Columna de Afinidad | 17 |
| | 4.8.5 | Aislamiento de PT en columna de Afinidad | 17 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 4.9 | Perfil Electroforético SDS-Page por Phast System | 18 |
| | 4.9.1 | Tinción con Plata | 18 |
| 5 | Resultados | | 21 |
| | 5.1 | Crecimiento y Producción de Toxina Pertussis | 21 |
| | 5.2 | Pruebas de pureza del cultivo celular | 25 |
| | 5.3 | Purificación de Toxina pertussis y Hemaglutinina filamentosa por Cromatografía | 26 |
| | 5.4 | Perfil electroforético SDS-Page por Phast System | 30 |
| 6 | Discusión | | 32 |
| 7 | Conclusiones | | 36 |
| 8 | Recomendaciones | | 37 |
| 9. | Implicaciones Bioéticas | | 37 |
| 10. | Implicaciones de Bioseguridad | | 37 |
| 11 | Anexos | | 38 |
| 12. | Bibliografía | | 41 |

**Índice de Tablas:**


| | | |
|---|---|---|
| Tabla 1 | Resultados de U.O., pH y D.O. de la Apertura de Vial de *B. pertussis* en los tres lotes experimentales | 21 |
| Tabla 2 | Resultados de U.O., pH y D.O. del pase de matraz a matraz en Medio Verwey | 22 |
| Tabla 3 | Resultados de U.O., pH y D.O. del pase de matraz a matraz en Medio FGP-1 | 23 |
| Tabla 4 | Resultados de las Pruebas de Pureza nivel matraz y garrafón de los tres lotes experimentales de *B. pertussis* cepa 509 | 26 |
| Tabla 5 | Resultados de la Prueba de ELISA para FHA | 28 |
| Tabla 6 | Resultados de la Prueba de ELISA para FHA y PT | 29 |
| Tabla 7 | Muestras obtenidas del Cromatograma de la Columna de Hidroxiapatita | 29 |

**Índice de Gráficas:**


| | | |
|---|---|---|
| Gráfica 1 | Crecimiento y Producción de Toxina pertussis en la Apertura de Vial en Medio de Cultivo Verwey en Tiempo final, promedio de 3 lotes experimentales | 21 |
| Gráfica 2 | Crecimiento y Producción de Toxina pertussis en matraz con Medio de Cultivo Verwey en Tiempo final, promedio de 3 lotes experimentales | 22 |
| Gráfica 3 | Crecimiento y Producción de Toxina pertussis en Medio de Cultivo FG-1 en Tiempo final, promedio de 6 matraces por cada lote experimental | 24 |
| Gráfica 4 | Curva Promedio de Promedios de la Producción de Toxina pertussis y crecimiento de 3 lotes experimentales de *B. pertussis* cepa 509 | 24 |

## Índice de Figuras


| | | |
|---|---|---|
| Figura 1 | Resultados de la prueba de Pureza | 25 |
| Figura 2 | Cromatograma en Columna de CM Sepharosa | 27 |
| Figura 3 | Cromatograma en Columna de sephacryl | 28 |
| Figura 4 | Cromatograma en Columna de Hidroxiapatita | 29 |
| Figura 5 | Hemaglutinación de eritrocitos para FHA | 29 |
| Figura 6 | Cromatograma en la Columna de Afinidad | 30 |
| Figura 7 | Perfil electroforético de PT y FHA | 31 |

## Signos y abreviaturas

| | |
|---|---|
| **CT** | Citotoxina traqueal. |
| **AC** | Adenilato ciclasa |
| **AFI** | Agua para Fabricación de Inyectables |
| **ADN** | Ácido Desoxiribonucleíco |
| **ADP** | Adenosina difosfato |
| **AMPc** | Adenosina Mono Fosfato cíclico |
| **BGA** | Agar Bordet-Gengou |
| **BCA** | Ácido bicinconínico |
| **BPa** | *B. pertussis* acelular |
| **BPc** | *B. pertussis* celular |
| **CHT** | Hidroxiapatita Cerámica |
| **D.O.** | Densidad óptica. |
| **DNT** | Toxina dermonecrótica o Toxina Termolábil. |
| **DT** | Difteria, Tétanos |
| **DTP** | Difteria, Tétanos y Pertussis |
| **DTaP** | Difteria, Tétanos y Pertussis acelular |
| **ELISA** | Inmuno ensayo enzimático *("Enzyme Linked Immunosorbant Assay")* |
| **FHA** | Hemaglutinina Filamentosa |
| **FDA** | Agencia para la Administración de Alimentos y Medicamentos |
| **FNT-α** | Factor de necrosis tumoral alfa |
| **FGP-1M** | Fermentación Glutamato Prolina Modificado |
| **HPLC** | Cromatografía Liquida de Alta Resolución. |
| **kDa** | Kilodalton. |
| **LPS** | Lipopolisacárido. |
| **Nm** | Nanómetros. |
| **PBS** | Solución Salina de Fosfatos |
| **mM** | Milimolar |
| **NaCL** | Cloruro de Sodio |
| **PCR** | Reacción en cadena de la polimerasa. |
| **pH.** | Potencial de Hidrogeno |
| **PT** | *Toxina pertussis.* |
| **SDS-PAGE** | Electroforesis en gel de poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio ("*polyacrylamide gel electrophoresis*") |

**Resumen**

La tosferina es una enfermedad de distribución mundial ocasionada por la bacteria *Bordetella pertussis*. Las cifras indican que en todo el mundo hay aproximadamente entre 20-50 millones de casos de tos ferina y de 20-40 mil muertes anuales. Esta enfermedad continúa siendo una importante causa de muerte en niños aún en países con una cobertura alta de vacunación. La aplicación de programas de vacunación ha permitido la disminución de la incidencia y la letalidad de esta enfermedad.

La inmunización con vacunas de células completas es efectiva y la vacuna tiene un bajo costo, pero se ha asociado frecuentemente con reacciones adversas menores, las cuales se ven incrementadas con la edad y el número de inoculaciones, por lo que, no se recomienda para la inmunización de adolescentes y adultos. Con la finalidad de evitar estas reacciones, se desarrollaron las vacunas acelulares que contienen componentes bacterianos purificados como la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosa, entre otros. Cada vez son más el número de países que utilizan la vacuna DPT con multi antígenos en las campañas de vacunación, como es el caso de México,

Por lo que en este trabajo, se propuso obtener y purificar dos componentes bacterianos que han demostrado ser buenos inmunógenos y que son empleados en otros países para la elaboración de vacunas acelulares como son la toxina pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA).

Como parte de este trabajo se estandarizó el proceso de producción de *B. pertussis* hasta nivel de garrafón, determinándose la Densidad Óptica (D.O.),Unidades de Opacidad (U.O.), pH de los cultivos, así como también se implementó la metodología para la cuantificación de la cantidad de PT y FHA mediante la técnica de ELISA. A partir del sobrenadante de los cultivos se realizaron ensayos para el aislamiento y purificaron de ambos antígenos utilizando cromatografía en columna, las columnas utilizadas fueron CM-sepharosa FF, Sephacryl S-100, Hidroxiapatita y Afinidad (Fetuina adsorbida a sepharosa), de los picos obtenidos correspondientes a PT y FHA se realizaron pruebas de ELISA, hemaglutinación con eritrocitos de pollo al 0.1% y perfil electroforético en gel de poliacrilamida para comprobar la presencia de PT y FHA.

Se demostró que con el empleo de una combinación de las columnas de hidroxiapatita y afinidad se logró purificar PT y FHA a partir de los sobrenadantes obtenidos de cultivos de *B. pertussis,*

## 1. INTRODUCCIÓN:

La tos ferina es una enfermedad de distribución mundial, de tipo endémico con elevaciones epidémicas que afecta fundamentalmente a niños, especialmente al lactante y es ocasionada por la bacteria *Bordetella pertussis*. Esta enfermedad era considerada como la principal causa de mortalidad y morbilidad en infantes a nivel mundial hasta la introducción de las primeras vacunas en 1940. Sin embargo en la actualidad a pesar de la alta cobertura de vacunación la tos ferina es una de las principales causas de muertes prevenibles en todo el mundo (Black y cols., 1997).

Las cifras indican que en todo el mundo hay aproximadamente entre 20-50 millones de casos de tos ferina y de 20,000-40,000 muertes anuales, de las cuales el 90% ocurre en países en desarrollo, la mayoría en lactantes de edad muy temprana, que no presentan el esquema completo (Beltrán y cols., 2011).

Los índices de ataque y mortalidad son variados tanto por género como por razas ya que se tienen indicios de que es significativamente mayor en las niñas, siendo más susceptible la población indígena (6 veces más alta) y la raza negra (de 2 a 3 veces mayor) en comparación con la raza blanca (Nascimento y cols., 2008).

La tos ferina en el adolescente y adulto se puede manifestar únicamente como un cuadro catarral, e inclusive algunos estudios seroepidemiológicos han demostrado que puede ser subclínica. Las complicaciones incluyen hemorragias conjuntivales, epistaxis, edema facial, neumonía (asociada frecuentemente a otros patógenos como *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus).* A nivel del sistema nervioso central puede haber daño cerebral de grado variable debido a hipoxia y encefalopatía tóxica (Keil y cols., 2000).

En años recientes se han reportado numerosos casos que señalan la aparición de cuadros clínicos relacionados con la tos ferina en adolescentes y adultos y que estos se han convertido en la principal fuente de transmisión de pertussis. Existen varios factores que complican el conocimiento de la incidencia real de *B. pertussis*, entre los que podemos mencionar se encuentran el que los adolescentes y adultos con un cuadro de tos persistente rara vez acuden a consulta; sistemas de vigilancia epidemiológica deficientes; que la enfermedad puede confundirse con otra infección respiratoria alta o baja y que no se cuente con técnicas de laboratorio diagnóstico sensibles y estandarizadas (Beltrán y cols., 2011).

En México, en el 2009, se reportaron 95 casos confirmados en Sonora, 25 en Jalisco, 20 en Nuevo León y 7 en Durango y en el Estado de México. La mayoría de los casos fueron en niños menores de 1 año (Beltrán y cols., 2011). Es importante mencionar que el país carece de un buen programa de registro epidemiológico.

El Departamento de Salud Pública en el año del 2010 en California, E.U., reportó que el número de casos de pertussis se han incrementado sustancialmente. El aumento de estos casos se presentaron a finales de Marzo entre los pacientes admitidos en un hospital infantil durante enero y junio del 2010 se reportaron 1,337 casos, un incremento del 418 % en relación a los 258 casos reportados en el mismo periodo en el 2009 (Winter y cols., 2010).

## 1.1 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE *Bordetella pertussis*

Los primeros reportes de la enfermedad datan del siglo XVI, pero fue hasta 1906 cuando Jules Bordet y Octave Gengou aislaron al agente etiológico.

*Bordetella pertussis* es una bacteria Gram negativa que se caracteriza por presentar forma de cocobacilo o bacilo corto. Mide de 0.2-0.5 µm de diámetro y de 0.5-2 µm de largo. Son microorganismos aerobios estrictos. Dentro de su perfil bioquímico se observa que son microorganismos catalasa y oxidasa positiva, indol y ureasa negativos. No forman esporas y poseen flagelos perítricos. Es una bacteria altamente contagiosa con un porcentaje de ataque mayor al 90% en individuos que no han sido inmunizados (Licari y cols., 1991).

## 1.2 AISLAMIENTO Y CULTIVO

Para su aislamiento y cultivo en medio sólido el más empleado es el agar de Bordet-Gengou cuya formulación esta compuesta de una base que contiene infusión de papa, cloruro de sodio y agar. Además este medio base es enriquecido con glicerol y sangre desfibrinada de caballo ó de borrego.

Se ha reportado que la presencia de ácidos grasos insaturados o detergentes residuales en los recipientes donde se cultiva la bacteria inhiben su crecimiento. El uso de dimetil-β-ciclodextrina es recomendado para secuestrar los ácidos grasos y revertir la inhibición en el crecimiento de la bacteria (Frohlich y cols.,1996).

La temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 35 y 37 ℃, el pH óptimo de crecimiento de *B. pertussis* se encuentra en el intervalo de 6 a 8 aunque se ha reportado un mejor crecimiento del microorganismo a pH 7.0 (Licari y cols., 1991).

En 1939 Hornibrook describió el uso de un medio de cultivo líquido para la propagación de *B pertussis*. Este medio incluye sales, factores de crecimiento, y resinas aniónicas (Stainer y cols.,1970). Hornibrook propuso modificaciones al medio en donde se incluía la caseína hidrolizada, cisteína y ácido nicotínico que resultaron en un mejor crecimiento de la bacteria, por lo que el autor propuso que sería adecuado para la elaboración de vacunas de *B. pertussis* (Verwey y cols., 1949).

En cuanto al cultivo de *B. pertussis* en medio líquido, existen nuevas formulaciones que se basan en la utilización de aminoácidos (ácido glutámico y prolina) para proporcionar las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para su crecimiento, sin embargo, ocasionan la formación de grandes cantidades de amoniaco. Para solucionar esto, se ha propuesto la utilización de un medio que contenga glutamato y lactato como sustratos principales, los cuales al ser metabolizados por la bacteria garantizan la conversión total del carbono en biomasa, así como posible aumento en la producción de algunos factores de virulencia como lo es la toxina pertussis (PT). (Thalen y cols., 2006).

Por otro lado, la adición de componentes como las ciclodextrinas a los medios de cultivo puede estimular la producción de hemaglutininas, lo cual podría ser de gran utilidad para aumentar los rendimientos en la elaboración de las vacunas acelulares. (Imaizumi y cols., 1985).

### 1.3. PATOGENESIS

El desarrollo de la infección inicia con la entrada de *B. pertussis* al tracto respiratorio del hospedero. El organismo se adhiere a la mucosa ciliar a través de varios factores de adhesión presentes en la superficie de la bacteria o por algunas toxinas liberadas que causan daño al epitelio respiratorio. Los daños causados por las toxinas culminan con ciliostasis, inflamación y eventual descamación de las células ciliadas que es la patología central de pertussis. A su vez, el microorganismo es capaz de evadir los mecanismos de defensa del hospedero al inhibir la quimiostasis (Paddock y col., 2008).

Durante el proceso inflamatorio hay infiltración de linfocitos y leucocitos de la pared bronquial que puede ser seguido por necrosis de algunas capas de la mucosa respiratoria. Algunos restos celulares se pueden combinar con el moco que se secreta produciendo obstrucción bronquial y atelectasias (Paddock y cols., 2008).

### 1.4. EPIDEMIOLOGÍA

Es una enfermedad que se presenta en todo el mundo, principalmente en el verano y otoño. El humano es el único reservorio de la enfermedad, y como se mencionó con anterioridad, los adolescentes y los adultos son actualmente la principal fuente de infección para los infantes. Se transmite por vía aérea, por contacto directo con las secreciones de las personas infectadas o por gotas de saliva dispersas por vía aérea. El periodo de incubación es de 7-14 días. La transmisión ocurre principalmente durante la fase catarral. No se ha reportado la existencia de portadores asintomáticos (Cofré, 1999). Los factores de riesgo a considerar son:

**1.4.1. Edad**: En los Estados Unidos, antes de las primeras vacunaciones la incidencia de la enfermedad se presentaba principalmente en infantes de 1 a 5 años. Para 1983 la mayoría de los casos se presentaron en niños menores de 1 año. Actualmente el 87% de las muertes causadas por pertussis ocurren en infantes menores de 6 meses (Vitek y cols., 2003).

**1.4.2. Sexo:** Las niñas son las más susceptibles a la enfermedad, además, los casos de mortalidad son más altos que en los hombres (Vitek y cols., 2003).

**1.4.3. Inmunización:** Los infantes que no han recibido las tres dosis de vacunación son los que se encuentran más susceptibles de presentar complicaciones asociadas a *B. pertussis.* (Madell y cols., 2002).

## 1.5. PREVENCIÓN

El desarrollo de la vacunación ha permitido la disminución de la incidencia y la letalidad de esta enfermedad. Las vacunas que existen son:

### 1.5.1. Vacunas de primera generación:

La introducción de la vacuna elaborada a partir de células muertas de *B. pertussis* en la mitad del siglo pasado tuvo un rol muy importante en la prevención de la enfermedad en muchos países. La vacuna se distribuyó ampliamente con resultados muy buenos, no obstante las reacciones adversas asociadas con esta vacuna presentaron varios problemas sociales, como el que los padres se negaran a aplicar la vacuna a sus hijos dando como resultado un incremento en los casos de tos ferina (Luttinger, 1985).

Para producir esta vacuna, lo usual es inactivar las células con formalina. Posteriormente, se realizan pruebas para evaluar la potencia, la toxicidad asociada y el número de unidades de opacidad para asegurar que la vacuna tiene el número adecuado de bacterias (Ellen y cols., 2008).

Este tipo de vacunas proporcionan una mejor respuesta inmune que las vacunas acelulares, ya que contiene todos los componentes necesarios para inducir protección.

Las vacunas de células completas ya no se encuentran disponibles en los Estados Unidos, pero se siguen utilizando en algunos países como México. Las reacciones adversas por este tipo de vacunas incluyen: fiebre que no suele ser muy alta y reacciones locales en el sitio de aplicación de la vacuna como pueden ser enrojecimiento, edema y dolor. Estos síntomas suelen aparecer entre las 12-24 h posteriores a la aplicación de la vacuna y se presenta por lo general en la mitad de la población infantil que recibe esta vacuna (Vitek y cols., 2003).

En los 70's se hizo una gran publicidad para informar de posibles reacciones severas ocasionadas por la vacuna, especialmente el riesgo de desarrollar una encefalopatía aguda con posible daño cerebral. Otros riesgos asociados son espasmos, síndrome de la muerte infantil y desórdenes de aprendizaje (Muñoz, 2002).

En un estudio realizado en el 2007 en los Estados Unidos, se comparó las reacciones que presentaron un grupo de niños a los que se les aplicó la vacuna DTP (difteria-pertussis-tétanos) y la vacuna DT (difteria y tétanos). En su mayoría las reacciones fueron más frecuentes en los que recibieron la DTP. Las reacciones que se presentaron en este estudio fueron: dolor, tumefacción, fiebre, anorexia, malestar general, vómitos y algunos casos de encefalopatía y secuelas neurológicas permanentes. Estas reacciones no se presentaron en el grupo de niños que se le aplico la vacuna DT (Paddock y cols., 2008)

En Chile en 2005, se reportaron las reacciones adversas más frecuentes que se presentan entre los niños de 18 meses a 4 años, los cuales recibieron la vacuna DTP. Los resultados mostraron que un total de 141 niños (13,9%) presentaron reacciones adversas post-vacunación, 89 (16,5%) correspondientes a niños de 4 años y 52 (10,9%) a niños de 18 meses (Ledermann, 2004).

### 1.5.2. Vacunas de segunda generación:

En 1981 en Japón se empleó la primera vacuna acelular, la cual fue desarrollada por Sato y colaboradores. Este tipo de vacunas están compuestas de subunidades purificadas o inactivadas de *B. pertussis*. Las vacunas de *pertussis* acelulares se desarrollaron con la esperanza de que fueran tan efectivas como las de células enteras y menos reactogénica (Mandell, 2002).

La vacuna acelular desarrollada en Japón en los 80's tenía como antígenos principales a la toxina pertussis y a la hemaglutinina filamentosa. En esa época los fabricantes japoneses lograron la producción en masa de esta vacuna y se observó que era efectiva para prevenir la enfermedad en la población infantil en un 77– 95% (Sato y cols, 1981).

Las vacunas acelulares de uso pediátrico combinan igualmente el toxoide diftérico-toxoide tetánico- pertussis acelular y se conoce como vacuna combinada DTaP y es recomendado su uso en niños de 2 meses a 6 años (Vitek y cols., 2003).

Las vacunas empleadas en adolescentes y adultos Tdap fueron autorizadas a partir del 2005. Una de las vacunas utilizadas para este grupo de edad es la vacuna de nombre Boostrix producida por la farmacéutica Glaxo Smith Kline, esta vacuna fue aprobada inicialmente para su uso en personas de 10 a 18 años, sin embargo, en un comunicado de la FDA publicado en Diciembre de 2008, se expandió el rango de edad de 10 a 64 años ya que se comprobó su eficacia y su seguridad para este grupo. En trabajos realizados en Alemania en el 2009, se propone la aplicación de las vacunas Tdap al grupo de adolescentes y adultos en todo el mundo, debido a que al llevar a cabo esta estrategia se podrá reducir el número de casos y con ello eliminar el riesgo de la transmisión de la infección a la población infantil (Bamberger y Srugo, 2008).

Se ha observado un mayor uso de las vacunas acelulares en países desarrollados, donde la mortalidad por tos ferina es baja y los efectos adversos importan más, mientras que en los países subdesarrollados estas vacunas pueden ser prohibitivamente caras. El principal motivo para emplear vacunas celulares en los países subdesarrollados es que existe una alta morbi-mortalidad por tos ferina, importando más la efectividad que los eventos secundarios que se pudieran presentar (André y cols., 2000).

En las últimas décadas se han desarrollado varias vacunas acelulares de pertussis. La mayoría están compuestas de antígenos individuales o co-purificados. La cantidad y calidad de la composición de las vacunas acelulares disponibles en la actualidad varía entre productores, pero en general, todos contienen el principal factor de virulencia que

es la toxina pertussis (PT) destoxificada química o genéticamente, sola o combinada con otros factores de virulencia de *B. pertussis* como la hemaglutinina filamentosa (FHA), pertactina y un serotipo de fimbria (Fim 2, Fim 3) (André y cols., 2000).

En 1991 en los Estados Unidos se introdujeron dos tipos de vacunas acelulares, una conteniendo la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosa que tuvo una eficacia del 69 % y la otra vacuna constituida por toxina pertussis, hemaglutinina filamentosa, pertactina y fimbria tipo 2 con una eficacia de 81 %. Todas las vacunas mostraron ser inmunogénicas para sus respectivos antígenos y se comprobó que se producían menos reacciones adversas en comparación con las vacunas celulares (Ozcengiz y cols., 2004).

En lo que respecta a la vacuna acelular existen varios métodos para la obtención de los componentes purificados de pertussis. En el caso de la toxina pertussis (PT) y la hemaglutinina filamentosa (FHA), las técnicas empleadas para su purificación incluyen el uso de matrices de afinidad que seleccionan características específicas de la toxina (Sekura y cols.,1983) ó la cromatografía de intercambio catiónico (Ozcengiz y cols., 2004).

Los trabajos realizados por Ozcengiz se basaron en los trabajos de Tamura y cols., quienes señalaron que la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosa se pueden unir a una resina de intercambio iónico. Ozcengiz y cols. determinaron que cuando se empleaba un medio de cultivo que contenía 2,6-O-dimetil-beta-ciclodextrina se obtenían altos porcentajes de ambos factores de virulencia a partir del sobrenadante del cultivo, así como su purificación mediante cromatografía de afinidad, además señalan que este método es rápido y nada costoso (Ozcengiz y cols., 2004).

Chong y Klein, en 1988 reportaron que la PT puede ser purificada empleando una cromatografía que utilice junto con la resina un ligando llamado fetuina, el cual por su estructura ha demostrado una alta afinidad a la PT y esta unión no se ve afectada por el calor. La fetuina es de bajo costo comercial por lo que permite la obtención de PT a gran escala. En dicho trabajo se obtuvieron los componentes B y A (S1) de la toxina, los cuales indujeron altos niveles de anticuerpos.

Skelton y Wong en 1989 indicaron que se puede purificar eficientemente a la toxina pertussis y a la hemaglutinina filamentosa al incrementar la interacción hidrofóbica., agregaron un volumen de sulfato de amonio a un cultivo filtrado de *B. pertussis*, posteriormente el filtrado se pasó por una columna de sepharosa logrando que la PT y la FHA se unan a los sitios hidrofóbicos de la resina. En el mismo año estos investigadores propusieron el empleo de la cromatografía en hidroxiapatita, obteniendo altos niveles de FHA en el sobrenadante.

Otro tipo de vacunas que se encuentran en desarrollo son las producidas a base de DNA. Se han reportado trabajos que indican que las vacunas de DNA que comprenden principalmente a la fracción S1 inducen una respuesta humoral cuando son aplicadas intradérmicamente (Fry., 2008).

Por otro lado, se inactivó genéticamente la fracción S1 de PT y se elaboró una vacuna que fue probada en un modelo murino. Se determinó que la vacuna aplicada por vía intramuscular desencadena una respuesta celular muy fuerte, además de producirse altos niveles de interferón gamma e interleucina 2. Sin embargo, no se observó producción de IgG (Fry., 2008).

En años recientes se ha observado que a pesar de los programas de vacunación ha reemergido nuevamente la tos ferina. Para Mooi y cols., 2001 esto se debe a que existe divergencia antigénica entre las cepas vacunales y las cepas aisladas de casos recientes.

## 1.6 FACTORES DE VIRULENCIA

Los factores de virulencia de *Bordetella pertussis* pueden ser divididos en dos grupos principales: las adhesinas y las toxinas. La función principal de las adhesinas es permitir que la bacteria se una a la superficie ciliada del tracto respiratorio superior, y las toxinas son las responsables de evadir al sistema inmune del hospedero y así ocasionar el cuadro clínico de la enfermedad.

Dentro del grupo de las adhesinas se encuentran la hemaglutinina filamentosa, la pertactina y las fimbrias. Mientras que en el grupo de las toxinas se tiene la toxina pertussis, la adenilato ciclasa, la toxina dermonecrótica y la citoxina traqueal (Weiss y Hewlett, 1986).

**1.6.1. Hemaglutinina filamentosa (FHA)**: Su nombre deriva de la capacidad de aglutinar eritrocitos. Esta proteína juega el papel más importante dentro de los factores de adherencia. Mediante microscopia electrónica podemos observar que la hemaglutinina filamentosa posee un filamento de 2 nm de diámetro y de 40-100 nm de largo. Inicialmente es sintetizada como una proteína de 370 kDa, para posteriormente ser procesada y dar una proteína final de 220 kDa que se encuentra asociada a la superficie de la bacteria, la cual es secretada al exterior en grandes cantidades. La hemaglutinina está implicada en la colonización traqueal, la adherencia celular, la invasión a macrófagos y células epiteliales por *B. pertussis*. Los sitios de unión para la hemaglutinina son los receptores de integrinas y lectinas dependientes de galactosa como $\alpha_M\beta_2$ and $\alpha_v\beta_3$ (Abramson y cols., 2008).

La FHA posee varios dominios que interactúan con las células del hospedero, estos dominios se caracterizan por ser tripletes de Arg-Gly-Asp que pueden unirse a integrinas. Asimismo, la región carboxilo terminal posiblemente se encarga de mediar la adherencia a los macrófagos y es requerida para la colonización del epitelio respiratorio, además, modula la respuesta inflamatoria al estimular la producción de citocinas por macrófagos, así como también induce a los linfocitos T (Julio y cols**.,** 2009).

Por otro lado, se ha observado que induce la apoptosis de varios tipos de líneas celulares incluyendo las del epitelio respiratorio; parece que la muerte celular es

iniciada por la liberación del factor de necrosis tumoral alfa (FNT-α) (Abramson y cols., 2001).

Otros trabajos señalan que la FHA posee una alta especificidad con el colesterol, el cual es uno de los componentes presentes en las secreciones traqueales, lo que contribuye a la efectividad de la colonización del tracto respiratorio. (Lamberti y cols., 2009)

Después de una infección o de la vacunación contra pertussis se pueden encontrar anticuerpos séricos contra la FHA. Hay trabajos que señalan que la aplicación de la FHA en mucosa respiratoria aumenta los niveles de inmunoglubulinas tanto en suero como en mucosas (Poulain y cols., 2008).

**1.6.2. Pertactina:** Es una proteína de 69 KDa considerada como un autotransportador involucrado en la adherencia de *B. pertussis* al epitelio del pulmón, por lo que es un componente muy importante de las vacunas acelulares. Al igual que la hemaglutinina filamentosa, la unión de la pertactina se realiza por la interacción de una secuencia tri-peptídica (Arg-Gly-Asp) que se une a integrinas. (Diavatopoulos y cols., 2006).

**1.6.3. Fimbrias: Pertussis** produce 6 aglutinógenos de superficie, de los cuales los aglutinógenos 1,2 y 3 se consideran como “aglutinógenos mayores” porque causan protección inmunológica y los aglutinógenos 4,5 y 6 se consideran “menores” porque dan una respuesta débil (Alison y cols., 1996).

Existen dos tipos de fimbrias las cuales son antigénicamente distintas y corresponden a los aglutinógenos serotipo 2 y serotipo 3 que están compuestos de dos subunidades con un peso de 22.5 y 22 kDa respectivamente.

Se ha determinado que la unión de las fimbrias es a través de azúcares sulfatados presentes en la superficie de las células del hospedero. Por otra parte, se ha descubierto que existe una relación muy importante entre las fimbrias y la hemaglutinina, ya que las fimbrias ayudan a que se active al receptor CR3 necesario para que la hemaglutinina se pueda unir a monocitos. Por otro lado, la estrecha relación entre ambas adhesinas se observa también a nivel genético, ya que los genes *fha* y *fim* se expresan al mismo tiempo (Cecile, y cols., 1996).

**1.6.4. Toxina pertussis (PT):** Es responsable de promover la leucocitosis, linfocitosis, además de causar sensibilidad a la histamina, letalidad, mitogenicidad y estimular la secreción de insulina. Fue descrita por Muñoz y Bergman en el 2006 como una exotoxina que posee un arreglo de tipo A-B. Es una proteína oligomérica de 117 KDa, compuesta por seis subunidades denominadas S1-S5 con un porcentaje molar de 1:1:1:2:1, lo cual significa que existe dos subunidades S4.

La fracción A conformada por la subunidad S1 tiene un peso de 28 kDa y es la región activa, la fracción B compuesta por las otras subunidades es la porción que se une a los receptores de las células del epitelio respiratorio (Fry y cols., 2008).

La toxina es liberada por la bacteria en forma inactiva, una vez que se une a los receptores presentes en la membrana de las células respiratorias por medio de la subunidad B, la subunidad A se activa y ocasiona la ribosilación del ADP de la proteínas G, lo que provoca que se altere la comunicación intracelular. La proteína G modificada por la acción de la toxina es incapaz de inhibir la enzima adenilato ciclasa manteniendo niveles elevados de esta y de AMPc *(*Burns y cols., 1988).

Son numerosos los trabajos que demuestran la importancia de la toxina pertussis en la inmunidad. El empleo de anticuerpos específicos contra la toxina protege contra exposiciones de *B. pertussis* (Pootong y cols., 2007).

**1.6.5. Citotoxina traqueal:** Es una glicoproteína que deriva del peptidoglicano de la pared celular, fue descrita inicialmente por Goldman en 1982 en sobrenadantes de cultivos. Está compuesta por ácido diaminopimélico, ácido murámico, alanina, ácido glutámico y residuos de glucosamina. Posee un peso molecular de 1.4 KDa. Esta toxina inhibe la síntesis del DNA causando ciliostasis y eventualmente la muerte de las células, ocasiona las lesiones locales en mucosa y como consecuencia de esto inicia la tos. La citotoxina no es inmunogénica y por eso no se incluye en la elaboración de vacunas acelulares ( Frohlich y cols., 1996).

**1.6.6. Toxina dermonecrótica:** Fue la primera toxina reportada de *B. pertussis*. Es responsable de la inflamación y las lesiones necróticas observadas. Aparentemente actúa en las células endoteliales causando vasoconstricción (Salyers y cols., 1994).

Es una proteína termolábil compuesta por una sola cadena con un peso de 190 KDa que se localiza intracelularmente. Posiblemente la toxina se exponga parcialmente en la superficie de la bacteria para causar daño (Hewlett, 1990).

**1.6.7. Adenilato ciclasa (AC):** La adenilato ciclasa juega un papel muy importante en la patogénesis de *B. pertussis* al inhibir las defensas del hospedero en el espacio traqueobronquial, permitiendo que la bacteria sobreviva, se multiplique y cause la enfermedad.

Este factor de virulencia se puede presentar de dos formas: una que tiene actividad enzimática y otra que posee tanto la capacidad enzimática como la habilidad de entrar a las células eucariotas (Paccani y cols., 2008).

Es una toxina compuesta por un solo polipéptido, penetra enzimáticamente a las células eucariotas al activar la calmodulina lo que provoca un aumento en el AMPc celular de las células inmunes (leucocitos, macrófagos, monocitos, NK) limitando sus funciones (Trends y cols., 1989).

**1.6.8 Lipopolisacárido (LPS):** También conocido como endotoxina, es uno de los constituyentes principales de alto peso molecular en la mayoría de las bacterias Gram negativas. El LPS está compuesto de dos tipos de LPS: el LPS-1 que contiene el lípido

X que tiene las propiedades tóxicas y el LPS-2 que contiene el lípido A y dos polisacáridos PS1 y PS2.

En estudios moleculares realizados por Geurtsen y cols. en 2009, se señala que entre los genes relacionados con la síntesis de moléculas presentes en el LPS se encuentran glicotransferasas y deacetilasa. Mutaciones en los genes del LPS modifica la actividad de las glicotransferasas y reduce la actividad endotóxica del LPS (Guertsen y cols., 2009).

**1.6.9. Hemolisina:** Cuando las cepas de *B. pertussis* son crecidas en placas de medio agar Bordet-Gengou, se observan zonas de beta hemólisis alrededor de las colonias.

## 1.7. CUADRO CLÍNICO

*B. pertussis* requiere un tiempo de incubación en el hospedero que va de 7 a 21 días. La aparición de los síntomas puede ir de forma leve hasta llegar a formas más graves que puedan ocasionar la muerte del paciente. En general, las manifestaciones clínicas pueden presentarse en tres etapas:

**1.7.1. Etapa catarral ó prodrómico:** Dura de 1 a 2 semanas después de adquirir el microorganismo, este periodo es altamente contagioso. Se caracteriza por estornudos leves, congestión nasal, en algunos casos febrícula y la aparición de tos seca e inespecífica. Conforme pasen los días se presentará la tos, la cual se agravará y dará inicio a los paroxismos. En los adultos, puede acompañarse de dolor faríngeo (Picazzo y cols., 2002)

Durante la fase catarral tardía y la fase paroxística temprana, puede observarse el cuadro hematológico característico de la tos ferina, es decir, una leucocitosis con predominio linfocítico. El recuento de glóbulos blancos a veces supera las 50,000 células /$mm^3$ y la fórmula diferencial revela una linfocitosis relativa compuesta por células T y B (Picazzo y cols., 2002).

**1.7.2. Etapa paroxística:** Aparece después de los 7-14 días. Es la fase representativa de la tosferina debido a que se presentan los accesos de tos seguidos por una boqueada de aire que provoca una inspiración ruidosa y convulsiva típica que da nombre a la enfermedad (Rojas, 2003).

Esta etapa puede durar de semanas a meses y es en ella donde se pueden presentar las muertes debidas a esta enfermedad. Durante las primeras dos semanas de este periodo es cuando se presentan los paroxismos con más frecuencia y con mayor intensidad y van disminuyendo poco a poco.

**1.7.3. Etapa de convalecencia**: Se presenta en el curso de 4 semanas, después de la instalación de la enfermedad. La recuperación es gradual, aún pueden presentarse paroxismos pero estos desaparecen en dos a tres semanas. En algunos casos, durante

este periodo la exposición a otros patógenos respiratorios puede ocasionar que se vuelva a repetir la tos paroxística (Rojas, 2003).

## 1.8. COMPLICACIONES

La bronconeumonía representa la complicación respiratoria más común asociada con *B. pertussis* en infantes menores de un año (17%). También puede presentarse daño neurológico o incluso la muerte a consecuencia de la falta de oxígeno al cerebro durante los paroxismos ó por la liberación de las toxinas de *B. pertussis* presentándose ataques en el 2.1% de los casos y encefalopatía en el 0.2%.

También se han reportado otras complicaciones menos serias como son la otitis media (usualmente asociada con *Haemophilus influenzae*), anorexia, desnutrición y deshidratación a consecuencia del vómito o por la imposibilidad de llevar una alimentación adecuada (Madell y cols., 2002).

El aumento de las presiones intratorácica e intrabdominal durante los accesos de tos pueden provocar hemorragias subconjuntivales y esclerales, petequias faciales y troncales, epitaxis, enfisema subcutáneo, hernias umbilicales e inguinales y prolapso rectal. También se puede desgarrar el frenillo sublingual.

En adolescentes y adultos también se puede presentar incontinencia urinaria, fracturas costales, hipoacusia unilateral, hernia de disco y angina de pecho.

## 1.9. DIAGNÓSTICO

Existen varios métodos para el diagnóstico de la tos ferina, los cuales se clasifican en: métodos directos ó métodos indirectos. Dentro de los métodos directos podemos mencionar el cultivo del microorganismo, las pruebas de PCR, la detección de algún compuesto o componente perteneciente a la bacteria.

Dentro de los métodos indirectos están principalmente todas las pruebas (ELISA, Western blot e Inmunofluorescencia) enfocadas al reconocimiento de anticuerpos específicos contra la enfermedad (Bernard y cols., 1998).

Para llevar a cabo cualquiera de las pruebas suele tomarse una muestra del paciente de la zona nasofaríngea utilizando un hisopo de algodón, dacrón o de alginato de calcio estéril (estos dos últimos parecen ser los más adecuados porque se encuentran libres de ácidos grasos que puedan inhibir el crecimiento de pertussis). Una vez tomadas las muestras se pueden emplear diferentes medios para transportarlas como pueden ser los medios de Aimes, Stuart, Jones-Kendrick y Regan-Lowe. (Elmer y cols., 2002).

El cultivo de muestras de *B. pertussis* debe realizarse lo más pronto posible en los medios de selección como lo es el Agar Bordet-Gengou. Sin embargo, la sensibilidad de esta prueba se ve afectada por diversos factores como pueden ser la edad, la

inmunización o si el paciente está en terapia antimicrobiana, la forma en que son recolectadas las muestras o por la falta de experiencia en reconocer a la bacteria.

Las pruebas de inmunofluorescencia pueden proporcionar un diagnóstico más rápido, sin embargo, la gran desventaja que poseen es que para su realización se utilizan anticuerpos policlonales los cuales carecen de sensibilidad y especificidad, resultando en muchos falsos positivos (6.7- 40%) debido a las reacciones cruzadas que se pueden presentar con algún otro microorganismo. Para confirmar una prueba de inmunofluorescencia es necesario hacer un cultivo (Bamberger y cols., 2008).

Las pruebas serológicas incluyen la aglutinación, las pruebas de fijación del complemento, ensayos bactericidas, la hemaglutinación indirecta y las pruebas de ELISA, para la cual se emplean anticuerpos monoclonales contra antígenos específicos de la bacteria como son la hemaglutinina filamentosa purificada (FHA), la toxina pertussis purificada (PT) y extractos celulares obtenidos a base de sonicación . Para asegurar un buen diagnóstico se recomienda la utilización de por lo menos dos tipos de antígenos (FHA y PT). Una prueba de ELISA empleando los dos antígenos ha demostrado un 80% de sensibilidad y un 100% de especificidad (Koneman y cols., 2002)

Los métodos moleculares, principalmente el PCR y más recientemente el RT-PCR o el PCR en tiempo real, han mostrado gran sensibilidad, especificidad y rapidez en el diagnóstico de pertussis, no obstante, no existe un método estandarizado (William y cols., 2011).

En varias pruebas de identificación para *B. pertussis* se ha utilizado la secuencia IS481, pero se ha observado que puede dar falsos positivos si las muestras se contaminan, por lo que actualmente se han propuesto dos nuevas secuencias: BP283 y BP485 que han demostrado gran sensibilidad y especificidad (William y cols., 2011).

## 1.10. TRATAMIENTO

Para los niños menores de 6 meses de edad y para pacientes con enfermedad grave se debe realizar un monitoreo estrecho de signos vitales, lo cual implica hospitalización, para recibir cuidados de apoyo en los paroxismos de tos como la aspiración nasotraqueal frecuente, la provisión de oxígeno, líquidos y nutrición por vía parenteral.

La aplicación de macrólidos tempranamente puede reducir la severidad y la duración de los síntomas. Se recomiendan antibióticos como la azitromicina, eritromicina o la claritromicina, los cuales interfieren en la síntesis de proteínas bacterianas a nivel del ribosoma, además, se recomiendan ampliamente por su elevada capacidad de penetrar los tejidos del tracto respiratorio. Sin embargo, la resistencia de *B. pertussis* a estos antibióticos va en aumento por lo que se están aplicando nuevos antibióticos como trimetroprima-sulfametoxazol y cloranfenicol (Keil y cols., 2000).

## 2. JUSTIFICACION

A pesar de la amplia cobertura de vacunación contra la tos ferina, la incidencia de pertussis ha aumentado en los últimos años. Se han realizado estudios en los cuales se ha reportado que los responsables de la transmisión de *B. pertussis* en los infantes son personas adolescentes y adultas que estuvieron en contacto con ellos, se ha pensado que estos podrían ser reservorios del microorganismo, por lo que se ha sugerido la vacunación de las personas adolescentes y adultas que estén en contacto con ellos con la finalidad de disminuir este riesgo.

La vacuna pertussis convencional esta elaborada a base de células completas, la cual incluye componentes innecesarios para generar una respuesta inmune protectora. Gran parte de estos componentes pueden ser los responsables de las reacciones adversas provocadas por la vacuna, las cuales en algunas ocasiones pueden ser muy severas. Actualmente se conoce el papel que juegan la mayor parte de los factores de virulencia de *B. pertussis*. Este conocimiento ha llevado a proponer la elaboración de vacunas que contengan alguno o varios de estos factores para evitar que se presenten estas reacciones indeseables, dentro de su elección se debe tomar en cuenta la actividad y efectos que provoquen, que sean buenos inmunógenos, entre los que podemos mencionar a la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosa de manera purificada.

Una de las principales ventajas de la introducción de vacunas pertussis de tipo acelular es que en éstas se obtienen al eliminar muchos de los componentes tóxicos no protectores que contiene la célula, durante un proceso de purificación de los materiales antigénicos solubles, como el lipopolisacárido (LPS),por lo que el desarrollo de una vacuna pertussis acelular podría permitir la elaboración de vacunas combinadas como DPaT o Tdpa, las cuales por sus bajos efectos adversos pueden no solo proteger a los individuos en etapa infantil, sino también a los individuos adolescentes y adultos, de tal forma que se puedan aplicar refuerzos a éstos con la finalidad de establecer un mayor control sobre la enfermedad.

En México, para cumplir con el Programa Nacional de Vacunación, se requiere de importar la vacuna pentavalente formulada con vacuna pertussis acelular, la cual posee un costo elevado. Si se logra producir una vacuna pertussis acelular en el país y se formulara con otras vacunas, como lo es el caso de la vacuna pentavalente, se podría tener un ahorro considerable de divisas, el costo de la vacuna sería menor y se tendría una disponibilidad del biológico para su distribución y aplicación a la población infantil, sin tener que depender del producto importado. Así mismo, la inmunización con vacuna pertussis acelular permitiría tener un mayor costo beneficio ya que se reduciría la necesidad de hospitalización y otros gastos médicos que actualmente se determinan para los casos en donde *B. pertussis* está involucrada.

## 3. OBJETIVO GENERAL

Implementar un Desarrollo Tecnológico mediante el empleo de Métodos Cromatográficos para la purificación de Toxina pertussis (PT) y Hemaglutinina filamentosa (FHA).

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer la metodología requerida para la determinación y cuantificación de PT y FHA, mediante el uso de pruebas químicas, inmunológicas y biológicas para su aplicación como un Control en Proceso y Control de Calidad.

Realizar el aislamiento de PT y FHA a partir de sobrenadantes de cultivos estacionarios y en agitación de *B. pertussis* utilizando cromatografía en columna para su purificación.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS:

### Cultivo de *Bordetella pertussis*

Se realizaron tres lotes experimentales hasta nivel de Garrafón con la finalidad de obtener toxina pertussis (PT) y hemaglutinina filamentosa (FHA). El procedimiento que se siguió fue:

### 4.1 Apertura de vial a nivel matraz

Se utilizó la cepa de producción de *Bordetella pertussis* cepa 509 lote CTH. BP2.8L4 la cual fue proporcionada por el Departamento de Fermentaciones del Instituto Nacional de Higiene BIRMEX la cual es utilizada dentro de la producción de los lotes de Vacuna antipertussis de células completas.

Se realizó la apertura de un criotubo conservado en congelación que contenía la cepa 509 de *B. pertussis*, del cual se utilizó todo el contenido de la suspensión (1.0 mL) y se sembraron 0.5 mL de la suspensión de la cepa en 2 matraces que contenían 200 mL de medio Verwey (ver anexo 1) y se incubaron en las siguientes condiciones: 35 ±1℃/200rpm/48hr.

### 4.2 Pase de matraz a matraz en medio Verwey

De los 2 matraces inoculados para la apertura de Vial se seleccionó el matraz con mayor crecimiento celular (Determinación de Unidades de Opacidad (U.O. /ml) y densidad óptica (D.O)) con prueba de pureza y morfología colonial satisfactoria. A partir de este cultivo se hizo la propagación de matraz a matraz conteniendo el mismo medio de cultivo y volumen, inoculando 4 matraces con 10 mL de la suspensión microbiana y se incubaron a las siguientes condiciones: 35 ±1℃/ 200rpm/22h.

### 4.3 Pase de matraz a matraz en medio FGP-1

De los 4 matraces inoculados, se seleccionó el matraz que presentó mayor crecimiento celular (U.O. /ml y D.O) en medio Verwey, con prueba de pureza y morfología colonial satisfactoria. De esta suspensión se inocularón 10 mL a cada uno de los 8 matraces conteniendo 200 mL de medio FGP-1 (ver anexo 2) y se incubaron a las siguientes condiciones: 35 ±1℃/200rpm/22h.

### 4.4 Cultivo a Nivel Garrafón en medio FGP-1

Después del periodo de incubación de los 8 matraces sembrados se seleccionaron 6 matraces que presentaron mayor crecimiento (U.O / mL y D.O) se utilizo todo el volumen de la suspensión contenida en los matraces y se inocularon 6 garrafones conteniendo 800 mL de medio FGP-1. Los garrafones inoculados se separaron en dos grupos: el primer grupo de 3 garrafones el cual perteneció al cultivo estacionario y se

incubaron a 35±1℃/ 4 días y el segundo grupo de 3 garrafones el cual perteneció al cultivo agitado y se incubaron a 35±1℃/200rpm/30h.

## 4.5 Análisis estadístico

De los datos obtenidos de los 3 lotes experimentales, se elaboró un análisis estadístico descriptivo (promedio y desviación estándar) de los datos obtenidos desde la apertura de vial hasta nivel de garrafón utilizando el programa de EXCEL versión 2007.

## 4.6 Pruebas de control y pureza

En todas las etapas mencionadas (nivel matraz y garrafón) se tomo una muestra de 4 mL en tiempo cero para realizar pruebas de pureza sembrando en placas de gelosa Bordet-Gengou y gelosa sangre, además se inocularon tubos que contenían medio líquido de tioglicolato y caldo soya tripticaseína y tubos con agar soya tripticasa. Se incubaron a 35℃ y se verificaron diariamente las p ruebas y así como antes de realizar los pases.

Al finalizar el tiempo de incubación se tomó una muestra de 10 ml de cada uno de los matraces y/o garrafones para realizar: morfología microscópica, U.O./ml, densidad óptica (D.O.) 550 nm y determinación de pH.

## 4.7 Centrifugación para obtener el sobrenadante libre de células

En condiciones asépticas se dosificó en botellas de 1 L estériles, 800 ml del cultivo y se centrifugaron a 3000 rpm/30 min/ 5ºC. Posteriormente, el sobrenadante se recolectó en botellas de polipropileno de 1 L y se congeló a -20ºC hasta su utilización en la siguiente etapa, las células obtenidas se esterilizaron y se desecharon como Residuos Peligrosos Biológicos Infecciosos (RPBI´s).

## 4.8 Aislamiento y purificación de PT y FHA del sobrenadante

La separación de la Toxina pertussis y la Hemaglutinina Filamentosa se realizó por medio de Cromatografía en columna, pasando el sobrenadante de los lotes experimentales por resinas de Intercambio Iónico (CM-Sepharosa Fast Flow, Sephacryl, Hidroxiapatita y de Fetuina acoplada a sepharosa activada con CNBr) utilizando un equipo HPLC AKTA EXPLORER empleando soluciones reguladoras de fosfato a diferente concentración, de igual forma se utilizaron diferentes pH y varias concentraciones de cloruro de sodio que permitieron la separación de PT y FHA de las proteínas no deseadas (Ver anexo 3).

### 4.8.1 Corrimiento de muestra en columna de CM Sepharosa Fast Flow.

Se acondicionó la columna de CM-Sepharosa al equipo HPLC, la cual es una columna preparativa y posee un volumen de cama de 1 mL.

La columna posee un volumen de cama de 1 mL y se equilibró con 5 volúmenes de columna de una solución reguladora de Fosfatos 50mM / Urea 2M a pH 6.0, se inyectó una muestra de 2 mL a una velocidad 1.0 mL / min., automáticamente el equipo realiza un llenado de toda la tubería con el siguiente regulador antes de continuar, el cual es una solución reguladora de Fosfatos 50mM / Urea 2M a pH 7.4 para continuar con el proceso a una velocidad de 1.5 mL / min., enseguida el equipo realiza nuevamente el llenado de tuberías con el ultimo regulador que es una solución reguladora de Fosfatos 50mM / Cloruro de sodio 500mM a pH 8.0 (Ozcengie y cols., 2004). El equipo fue programado de tal manera que durante todo el proceso colectara fracciones de 5.0 mL del eluido de la columna.

### 4.8.2 Corrimiento de muestra en columna de Sephacryl

Se equilibró la columna con 5 volúmenes de columna de una solución reguladora de Fosfatos 5mM a pH 6.8 a una velocidad de flujo de 1.5 mL / min., hasta que la columna obtuvo un pH de 6.8. Con ayuda del mismo regulador de equilibrio se inyecto una muestra de 10 mL y este regulador se utilizo durante toda la corrida para la elución de FHA (Askelöf y cols. en 1982).

El equipo fue programado de tal manera que durante todo el proceso colectará fracciones de 5.0ml cada una del eluído de la columna.

### 4.8.3 Aislamiento de PT y FHA en columna de Hidroxiapatita

La columna de hidroxiapatita es de aproximadamente 5 X 15 cm y se equilibro con una solución reguladora de fosfatos 0.01M pH 8.0 a una velocidad de flujo de 500 mL / h a 5℃. Posteriormente a la muestra se ajusto a un pH de 8.7 antes de introducirla a la columna, para la separación de FHA se aplicó el sobrenadante a la columna a una velocidad de flujo de 500-1000 mL / h, al finalizar esta solución reguladora automáticamente el equipo mete 2 volúmenes de la solución reguladora de fosfatos 0.01M pH 8.0 y para la elusión de FHA el equipo mete automáticamente la solución reguladora de fosfato 0.1 M con NaCl 0.5 M pH 7.0 a una velocidad de flujo de 50-100 mL / h) (Sato y cols., 1983). El equipo fue programado de tal manera que durante todo el proceso colectara fracciones de 10 mL cada una del eluido de la columna. A las muestras correspondientes al pico de interés se determino la actividad de FHA y PT a través de ELISA y aglutinación con eritrocitos de pollo.

### 4.8.4 Corrimiento de muestra en columna de Afinidad

Del corrimiento de la columna de hidroxiapatita se recolectaron las fracciones del segundo pico conteniendo la actividad de FHA se juntaron y se aplicaron a la columna de Fetuina-Sepharosa a una velocidad de flujo de 45 mL / h previamente equilibrada con regulador de fosfato 0.1 M con NaCl 0.5 m pH 7.0.

### 4.8.5 Aislamiento de PT en columna de Afinidad:

Para el aislamiento y purificación de PT, se recolectaron las fracciones correspondientes al primer pico que se eluyó de la columna de hidroxiapatita y se precipito con sulfato de amonio a un 74% de saturación y se deja reposar durante 4℃/16h. Se centrifugó a 10,000xg/30 min., se desec hó el sobrenadante y al precipitado se le hicieron 5 extracciones con pequeños volúmenes (1-2 mL) con una solución reguladora de Tris 50 mM/NaCl 1M pH 8.0, a las extracciones se les realizó hemaglutinación con eritrocitos de pollo al 1% y se reunieron las extracciones que tuvieran actividad de hemaglutinación y se utilizó una columna de desalación (Sephadex G-25 ó G-50) con el mismo regulador. El volumen de las fracciones correspondientes al pico obtenido de la columna, se aplicaron a una columna de Fetuin-Sepharosa previamente equilibrada con solución reguladora de fosfatos 0.01M con NaCl 0.05M pH 7.4, se introdujo todo el volumen de las fracciones a una velocidad de flujo de 30 mL / h posteriormente se inicio la etapa de lavado con un volumen de columna con una solución reguladora de Tris-HCl 0.05M con NaCl 1M pH 7.4 a una velocidad de flujo de 100 mL / h. La PT se eluye de la columna con una solución reguladora de Tris-HCl 0.05M con $MgCl_2$ 4M pH 7.4, se colectaron las fracciones del pico que sale con esta última solución reguladora y se pasa por una columna de desalación (Skelton et al. 1990).

Con los cromatogramas obtenidos de cada columna, se determinó la eficiencia de cada una de estas columnas y se seleccionó la que ofreció mejor separación. Se colectaron las fracciones que correspondieron a los picos de PT y FHA, se concentraron por ultrafiltración y se realizaron las siguientes pruebas: Cuantificación de TP y FHA por el método de ELISA, Perfil Electroforético (SDS-PAGE en condiciones no reductoras), prueba de hemaglutinación utilizando eritrocitos de Pollo al 1%.

### 4.9 Perfil electroforético SDS-Page por PhastSystem™

De las muestras purificadas en la columna de afinidad, se realizaron pruebas electroforéticas en geles de poliacrilamida SDS-Page, para lo cual, se utilizó el kit comercial de electroforesis llamado PhastSystem ™, el cual incluye a los geles y los buffers necesarios para llevar a cabo la separación e identificación de las proteínas en base a su peso molecular.

Para esto, se tomaron geles de poliacrilamida al 7.5 %. La separación de proteínas por este sistema se llevó a cabo en tres pasos que corresponden al Método 3 del equipo PhastSystem™ que establece como condiciones de corrimiento las siguientes:

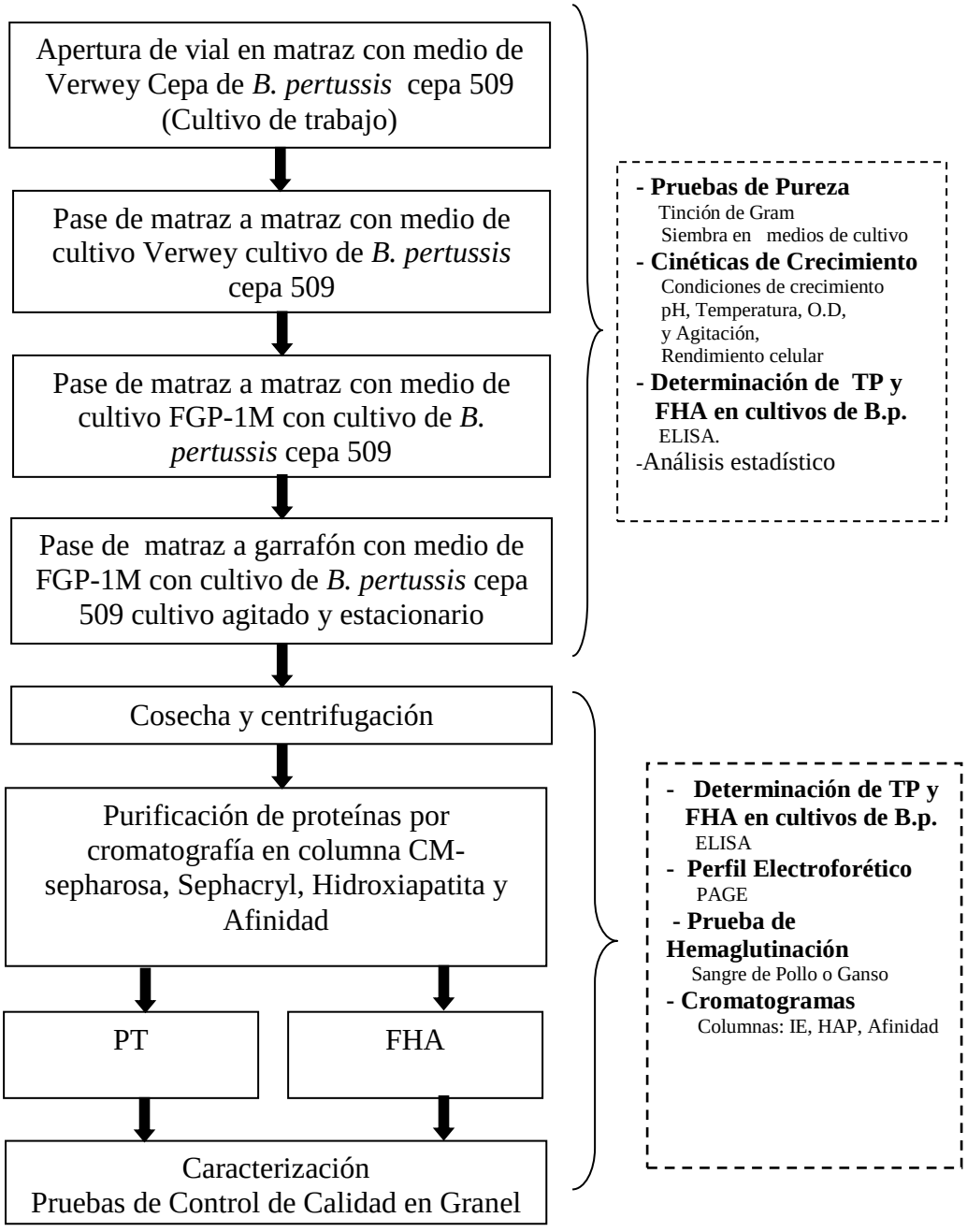
a) Se acondiciona la cámara electroforética a una temperatura de 15ºC.
b) Se agregó en el carril 1 la muestra obtenida de la columna de afinidad junto con el regulador de muestra (4 µl de muestra más 2 µl de regulador). Se colocaron además en el carril 2 estándar de FHA, carril 3 estándar de PT y en el carril 4 marcador de peso molecular de 220kDa (HMW-SDS). Las muestras se corrieron a 200V/0.8 mA/0.1 W/80AVh.
c) Después de 4 min. las condiciones cambian a 670 V/4.8 mA/3.3 W/ 90AVh.

### 4.9.1 Tinción en plata

Una vez que termina la corrida, el gel se tiñó en el mismo equipo empleando un Kit comercial de Tinción de plata, en el equipo se utiliza el protocolo del Método 1 que establece los siguientes pasos:

a) Fijación con solución TCA (ácido tricloroacético más agua) 5min/20ºC.
b) Fijación con solución de etanol al 10% (etanol, ácido acético glaciar y agua) 4 min/50ºC.
c) Sensibilización con solución sensibilizadora (etanol, triosulfato de sodio, acetato de sodio y agua). A esta solución se le agrega glutaraldehído al 25%w/v 6min/50ºC.
d) Lavado del gel con agua 4min/50ºC.
e) Tinción con solución de plata (nitrato de plata más agua) 10min/40ºC.
f) Lavado del gel con agua 1 min/20ºC.
g) Revelado con solución reveladora (carbonato de sodio más agua) 1-5min/20ºC.
h) Fin del revelado con la solución Stop (ácido acético glaciar y agua) 10 min/50ºC.
i) Al finalizar el gel se coloca en agua.

## Diagrama de Flujo



## 5. RESULTADOS

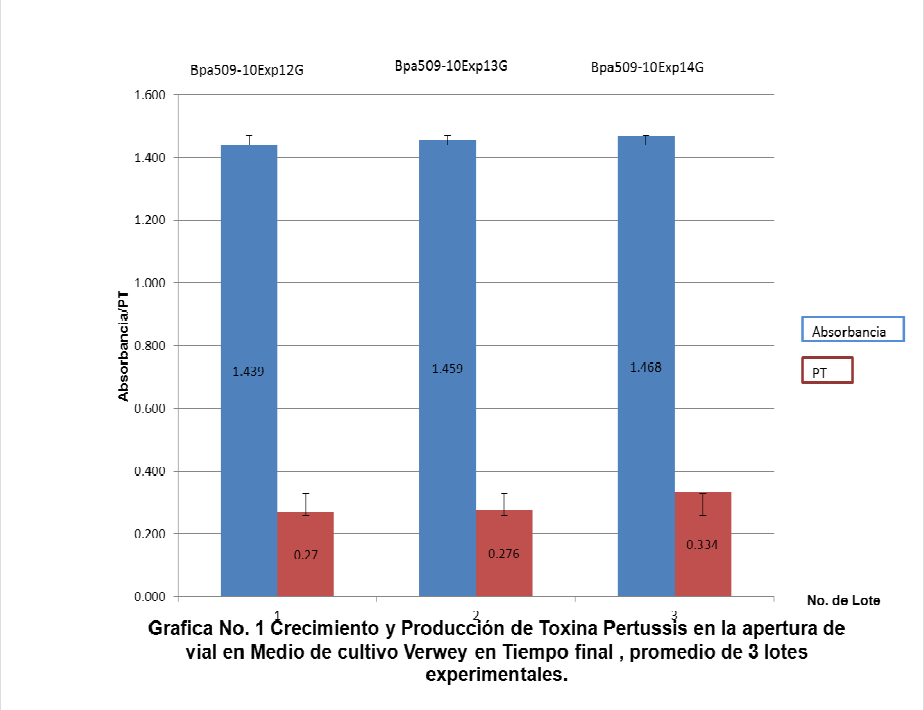
### 5.1. Crecimiento y producción de toxina pertussis

De los dos matraces inoculados en la apertura de vial por lote experimental, se seleccionó el que tuvo mayor valor de U.O. y de D.O. que se observan en color amarillo (ver tabla 1)

**Tabla 1. Resultados de U.O., pH y D.O. de la Apertura de Vial de *B. pertussis* en los tres lotes experimentales.**

| ETAPA | LOTE | NIVEL | U.O. | pH | D.O. |
|---|---|---|---|---|---|
| APERTURA DE VIAL EN MEDIO DE VERWEY | Bpa509-EXP-12G (Lote 1) | MATRAZ 1 | 32.5 | 8.35 | 1.427 |
| | | MATRAZ 2 | 35 | 8.37 | 1.439 |
| | Bpa509-EXP-12G (Lote 1) | MATRAZ 1 | 35 | 8.35 | 1.456 |
| | | MATRAZ 2 | 40 | 8.33 | 1.459 |
| | Bpa509-EXP-12G (Lote 1) | MATRAZ 1 | 36 | 8.36 | 1.468 |
| | | MATRAZ 2 | 32 | 8.24 | 1.466 |

En la **Gráfica 1** se presentan los resultados de crecimiento y producción de toxina pertussis de los tres lotes experimentales de *B. pertussis* durante la apertura de vial después de 48 h de incubación (tiempo final) en medio Verwey.




**Grafica No. 1 Crecimiento y Producción de Toxina Pertussis en la apertura de vial en Medio de cultivo Verwey en Tiempo final , promedio de 3 lotes experimentales.**

En azul están representados los datos del crecimiento del microorganismo el cual fue determinado por espectofotometría obteniéndose los siguientes resultados: Del lote 1 (BPa509-10Exp12G) se obtuvo un valor de absorbancia de 1.439, el lote 2 (BPa509-10Exp13G) fue de 1.459 y por último el lote 3 (BPa509-10Exp14G) el valor fue de 1.468. Las pruebas estadísticas descriptivas señalan que el promedio de los tres lotes es de 1.455 unidades de absorbancia con una desviación estándar de 0.015.

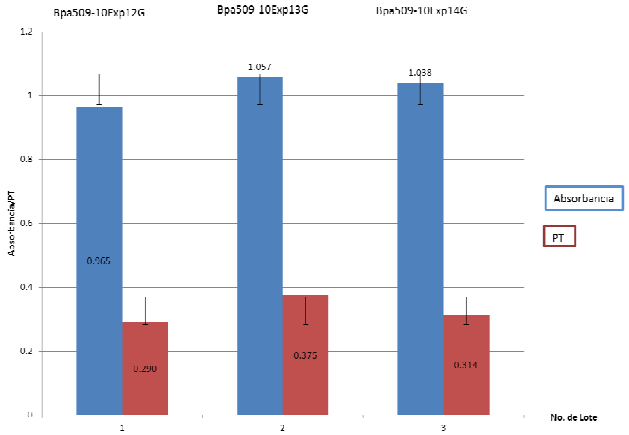
En cuanto a la producción de toxina pertussis la cual se presenta en la **Gráfica 1** en las barras de color rojo. Se cuantificó la producción de toxina pertussis por medio de la técnica de ELISA. Al finalizar la incubación los valores que se obtuvieron fueron muy similares: para el lote 1 se obtuvieron 0.270 µg/ml, para el lote 2 se cuantificó 0.276 µg/ml y el lote 3 presentó un valor de 0.334 µg/ml. El promedio fue de 0.293 µg/ml. El valor de la desviación estándar fue de 0.035.

En la **tabla 2** se muestran los resultados de las pruebas de U.O., pH y D.O. del pase de matraz a matraz en medio Verwey a las 24h de incubación. Los matraces seleccionados son los marcados en amarillo.

**Tabla 2. Resultados de U.O., pH y D.O. del pase de matraz a matraz en medio Verwey.**

| ETAPA | LOTE | NIVEL | U.O. | pH | D.O |
|---|---|---|---|---|---|
| PASE DE MATRAZ A MATRAZ EN MEDIO DE VERWEY | Bpa509-EXP-12G (Lote 1) | MATRAZ 1 | 15 | 7.69 | 0.533 |
| | | MATRAZ 2 | 18 | 7.78 | 0.427 |
| | | MATRAZ 3 | 20 | 7.96 | 0.965 |
| | | MATRAZ 4 | 18 | 7.77 | 0.525 |
| | Bpa509-EXP-12G (Lote 1) | MATRAZ 1 | 25 | 7.89 | 1.057 |
| | | MATRAZ 2 | 20 | 7.94 | 0.937 |
| | | MATRAZ 3 | 20 | 7.95 | 0.875 |
| | | MATRAZ 4 | 20 | 7.98 | 0.931 |
| | Bpa509-EXP-12G (Lote 1) | MATRAZ 1 | 25 | 7.94 | 1.238 |
| | | MATRAZ 2 | 20 | 7.85 | 0.987 |
| | | MATRAZ 3 | 20 | 7.77 | 0.909 |
| | | MATRAZ 4 | 23 | 7.92 | 0.875 |

En la **Gráfica 2** se muestra en barras azules el valor de crecimiento de cada uno de las 3 propagaciones de la semilla en pase de matraz a matraz en medio Verwey en tiempo final (después de 24 h de incubación), presentando un promedio de 1.02 unidades de absorbancia y una desviación estándar de 0.546.




Grafica No. 2 Crecimiento y Producción de Toxina Pertussis en Matraz con Medio de cultivo Verwey en Tiempo final , promedio de 3 lotes experimentales.

También en la **Gráfica 2** se observa en barras de color rojo la producción de toxina pertussis, al término de las 24 h de incubación. El valor promedio fue de 0.328 µg/ml y la desviación estándar de 0.260.

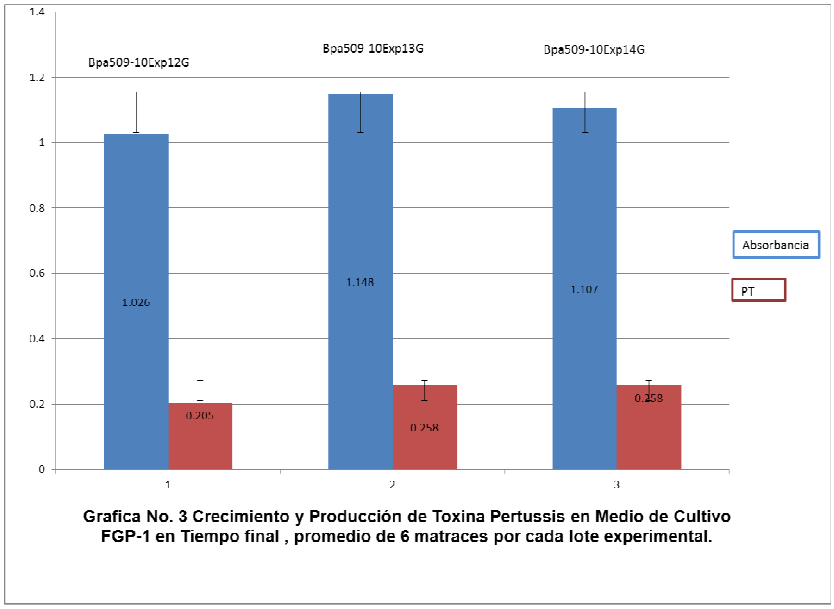
En la **tabla 3** se muestran los resultados de las pruebas de U.O., pH y D.O del pase de matraz en matraz en medio FGp-1 a la 22h de incubación. Los matraces seleccionados fueron los de color verde y color rosa.

**Tabla 3: Resultados de U.O., pH y D.O. del pase de matraz a matraz en medio FGP-1.**

| ETAPA | LOTE | NIVEL | UNIDADES DE OPACIDAD (U.O) | pH | D.O |
|---|---|---|---|---|---|
| PASE DE MATRAZ A MATRAZ MEDIO FGP-1 | Bpa509-EXP-12G (Lote 1) | MATRAZ 1 | -10 | 7.0 | 0.234 |
| | | MATRAZ 2 | 30 | 7.94 | 1.049 |
| | | MATRAZ 3 | 27.5 | 7.76 | 0.991 |
| | | MATRAZ 4 | 37.5 | 7.84 | 1.104 |
| | | MATRAZ 5 | -10 | 6.9 | 0.356 |
| | | MATRAZ 6 | 35 | 7.73 | 1.045 |
| | | MATRAZ 7 | 32 | 7.80 | 1.003 |
| | | MATRAZ 8 | 30 | 7.74 | 0.948 |
| | Bpa509-EXP-12G (Lote 1) | MATRAZ 1 | 25 | 7.95 | 1.041 |
| | | MATRAZ 2 | 31 | 7.94 | 1.118 |
| | | MATRAZ 3 | 15 | 7.65 | 0.810 |
| | | MATRAZ 4 | 35 | 8.01 | 1.155 |
| | | MATRAZ 5 | 25 | 7.75 | 1.023 |
| | | MATRAZ 6 | 34.5 | 8.06 | 1.332 |
| | | MATRAZ 7 | 25 | 7.96 | 1.105 |
| | | MATRAZ 8 | 27.5 | 7.99 | 1.196 |
| | Bpa509-EXP-12G (Lote 1) | MATRAZ 1 | 32.5 | 7.95 | 1.166 |
| | | MATRAZ 2 | 22 | 8.1 | 1.098 |
| | | MATRAZ 3 | 33.5 | 7.9 | 1.164 |
| | | MATRAZ 4 | -10 | 7.22 | 0.122 |
| | | MATRAZ 5 | 34.5 | 7.97 | 1.120 |
| | | MATRAZ 6 | 33.5 | 7.73 | 1.009 |
| | | MATRAZ 7 | 29.5 | 7.96 | 1.088 |
| | | MATRAZ 8 | 29 | 7.94 | 1.115 |

De igual forma, de estos matraces se seleccionaron 6 que presentaron mejor crecimiento (tabla 3). Los matraces en color verde se usaron para inocular a los garrafones que pertenecen a cultivo estacionario y en color rosa los de cultivo agitado.

De estos 6 matraces seleccionados se realizó un promedio tanto de crecimiento como de producción de toxina pertussis con la finalidad de ver la variabilidad entre los lotes. Los resultados se muestran en la **Gráfica 3.** En barras azules se representa el valor promedio de crecimiento de cada uno de los 3 matraces en la propagación de la semilla en medio de FGP-1 en tiempo final, los valores de crecimiento del lote 1 fueron de 1.1026 unidades de absorbancia, para el lote 2 de 1.148 unidades de absorbancia y para el lote 3 de 1.107 unidades de absorbancia.

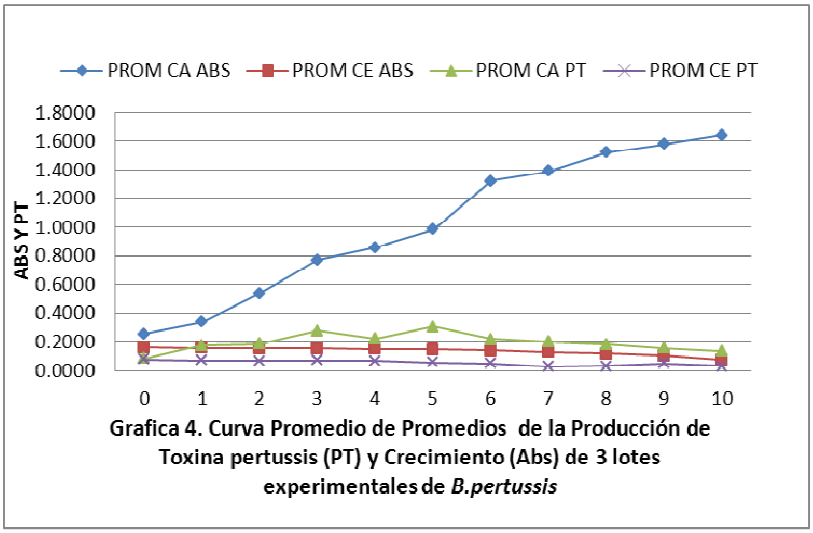



**Grafica No. 3 Crecimiento y Producción de Toxina Pertussis en Medio de Cultivo FGP-1 en Tiempo final , promedio de 6 matraces por cada lote experimental.**

En cuanto a la producción de toxina pertussis, se observan los promedios de los 3 matraces en la propagación de la semilla en medio FGP-1, en barras de color rojo. Al término de las 22 h de incubación se obtuvo: 0.205 µg/ml en el lote 1; 0.258 µg/ml en el lote 2 y 0.258 µg/ml en el lote 3.

Con estos 6 matraces por cada lote experimental se inocularon 6 garrafones conteniendo medio FGP-1 y se dividieron en dos grupos: 3 garrafones de cultivo agitado (se empleó agitadora orbital a 35ºC/200 rpm/ 30h) y 3 garrafones de cultivo estacionario (cuarto estufa y/o agitadora a 35ºC/99h). Durante la incubación de estos garrafones se seleccionó el garrafón 1 de cada lote y de cada grupo, del cual se tomaron muestras cada 3 h para elaborar una cinética de crecimiento y determinación de la producción de toxina pertussis

En la **Gráfica 4** se muestran los promedios de promedios de los tres lotes experimentales de la cinética de crecimiento y producción de toxina pertussis.




**Grafica 4. Curva Promedio de Promedios de la Producción de Toxina pertussis (PT) y Crecimiento (Abs) de 3 lotes experimentales de *B.pertussis***

| ESPECIFICACIÓN MORFOLOGIA | ESPECIFICACIÓN MORFOLOGIA COLONIAL | MORFOLOGIA MICROSCÓPICA CARACTERÍSTICA DE *B pertussis* |
|---|---|---|

En rombos color azul se observan los resultados correspondientes al promedio de los tres lotes experimentales pertenecientes al cultivo agitado (se tomaron muestras cada 3 h de un garrafón por lote); en cuadros color rojo se muestran los resultados del promedio de los tres lotes del cultivo estacionario (se muestreo un garrafón por lote cada 3 h, pero en la gráfica se presentan los datos obtenidos cada 9 h).En el cultivo agitado podemos observar que el crecimiento fue mayor que en el cultivo estacionario.

En cuanto a producción de toxina pertussis podemos observar en triángulos de color verde los resultados correspondientes al promedio de los tres lotes del cultivo agitado, que como puede apreciarse es mayor en comparación al cultivo estacionario presentado en asteriscos de color morado.

## 5.2 Pruebas de pureza del cultivo celular

Durante todas las etapas de producción de los 3 lotes experimentales se determinaron pruebas de pureza del cultivo de *B. pertussis* en tubos con medio
Agar Sangre (AS), Agar Soya Tripticasa (AST), Medio Líquido de Tioglicolato (MLT) y Caldo Soya Tripticasa (CST), siguiendo las especificaciones señaladas en la Fig. 1.

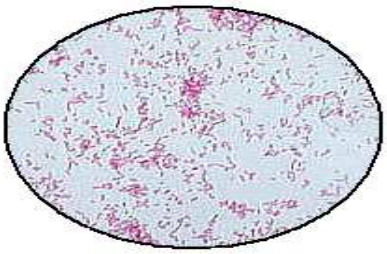
| MICROSCÓPICA | | |
|---|---|---|
| **Satisfactorio (S):** Bacilos cortos o cocobacilos Gram (-) aislados. **No Satisfactorio (NS):** otra forma bacteriana diferente a la de *B pertussis* | **Satisfactorio (S):** **AST, CST, MLT:** no se observó ningún desarrollo microbiano. **AS, BG:** Se observaron colonias pequeñas de forma circular con elevación convexa de borde entero, cremoso y suave de color blanco con apariencia húmeda. |  |

**Figura 1. Resultados de las pruebas de pureza.**

Los resultados de las pruebas de pureza después de 48 hr. de incubación se muestran en la **Tabla 4**; se incluyen todos los pases realizados en los diferentes niveles, matraz y/o garrafón de los lotes experimentales.

De los tres lotes sólo se contaminó un garrafón perteneciente al lote 1(BPa509-10EXP12G), el cual fue detectado de tal forma que no afectó a los resultados de este trabajo.

**Tabla 4. Resultados de las pruebas de pureza nivel matraz y garrafón de los tres lotes experimentales de *B.pertussis* cepa 509. Resultado satisfactorio (S) y Resultado no satisfactorio (NS).**

| Etapa | Nivel | Bpa509-10Exp12G | Bpa509-10Exp 13G | Bpa509-10Exp14G |
|---|---|---|---|---|
| Apertura de Vial | Matraz 1 | S | S | S |
| | Matraz 2 | S | S | S |
| Nivel Matraz medio de Verwey | Matraz 1 | S | S | S |
| | Matraz 2 | S | S | S |
| | Matraz 3 | S | S | S |
| | Matraz 4 | S | S | S |
| Nivel Matraz medio FGP-1 | Matraz 1 | S | S | S |
| | Matraz 2 | S | S | S |
| | Matraz 3 | S | S | S |
| | Matraz 4 | S | S | S |
| | Matraz 5 | S | S | S |
| | Matraz 6 | S | S | S |
| | Matraz 7 | S | S | S |
| | Matraz 8 | S | S | S |
| Nivel Garrafón medio FGP-1 | Garrafón 1 Agitado | S | S | S |
| | Garrafón 2 Agitado | S | S | S |
| | Garrafón 3 Agitado | S | S | S |
| | Garrafón 1 Estacionario | NS | S | S |
| | Garrafón 2 Estacionario | S | S | S |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Garrafón 3 Estacionario | S | S | S |

## 5.3 Purificación de toxina pertussis y hemaglutinina filamentosa por cromatografía

Los cultivos agitados y estacionarios se centrifugaron a 3000 rpm/30 min para obtener el sobrenadante y utilizarlo para realizar pruebas de cromatografía en cuatro diferentes tipos de columna: CM -Sepharosa; Sephacryl, Hidroxiapatita y Sepharosa-Fetuina.

En la **Figura 2** se muestra el cromatograma realizado en la columna de CM-Sepharosa. Se metió una muestra de 2 ml del lote experimental 1 (Bpa509-10Exp12G) del cultivo agitado ajustada a pH de 6.0 con ácido clorhídrico. En la **Figura 2** se muestran 2 picos en color azul, en el primer pico se representan las proteínas no deseadas que se eluyeron con un buffer de fosfatos de 50mM, urea 2 M a pH 6.0 y el segundo pico corresponde a la proteína pertussis (PT) que se obtuvo con buffer de fosfatos 50 mM, urea 2 M y pH 7.4. Posteriormente se confirmó por prueba de ELISA que efectivamente correspondía a la toxina pertussis pero en cantidades muy pequeñas 0.055 µg/mL. En esta columna no eluyó la hemaglutinina filamentosa.

Se observó el mismo comportamiento para los lotes 2 (Bpa509-10Exp13G) y 3 (Bpa509-10Exp14G) del cultivo agitado. Con respecto a las muestras pertenecientes a los tres lotes experimentales del cultivo estacionario se obtienen resultados similares.

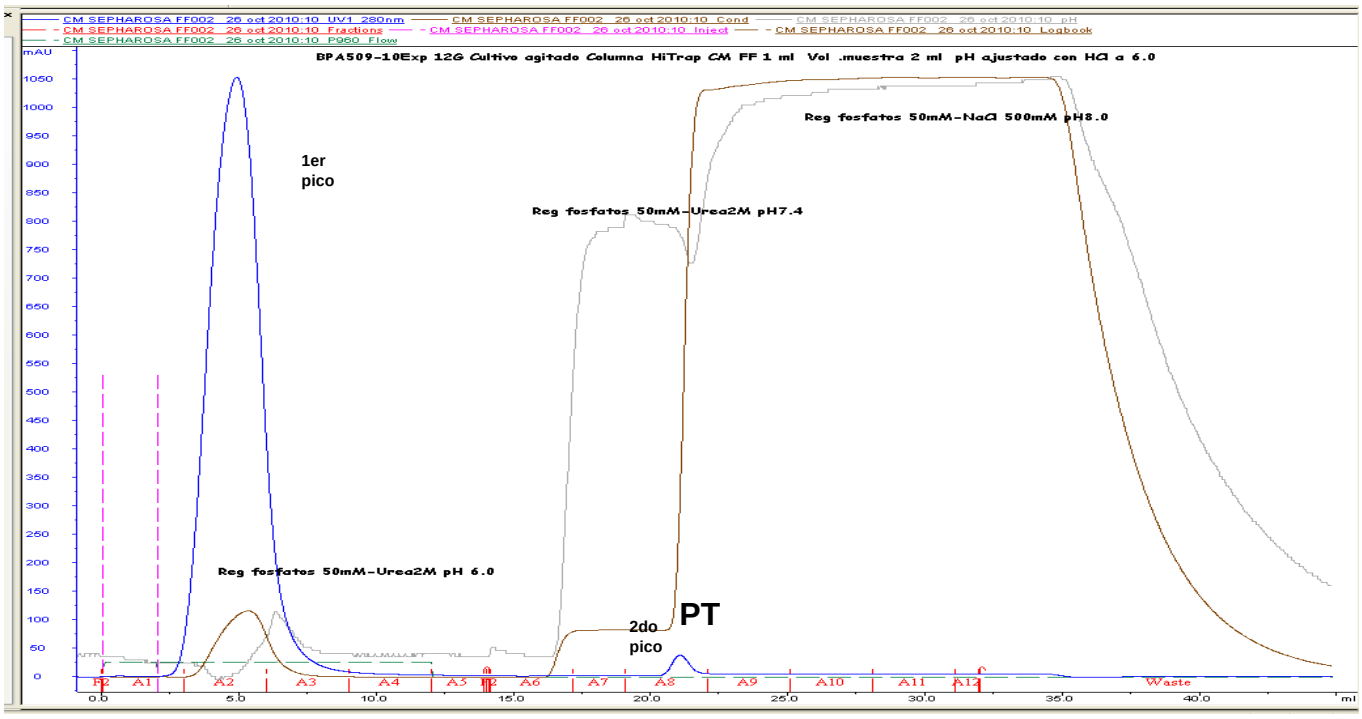


**Figura 2. Cromatograma en Columna de CM Sepharosa**

En la **Figura 3** se muestra el cromatograma realizado en la columna de Sephacryl, en donde se logró purificar a la hemaglutinina filamentosa. Se corrió una muestra de 10 ml del lote experimental 1 (Bpa509-10Exp12G) del cultivo agitado ajustada a pH de 6.8 con fosfato de sodio 5 mM. En la **Figura 3** se muestran 6 picos en color azul, que representan fragmentos de la hemaglutinina filamentosa. Estos datos se corroboraron con los reportados en la bibliografía. Posteriormente, se confirmó por prueba de ELISA que efectivamente se tenían varios fragmentos de la hemaglutinina filamentosa de pertussis, en las cantidades descritas, en la tabla adjunta se puede observar que el pico 1 presenta mayor cantidad de hemaglutinina filamentosa (0.236mg/mL) y mientras que el pico 2 presenta menor cantidad (0.103mg/mL).

Se obtuvieron resultados similares para los lotes 2 (Bpa509-10Exp13G) y 3 (Bpa509-10Exp14G) del cultivo agitado. Con respecto a las muestras pertenecientes a los tres lotes experimentales del cultivo estacionario se observaron resultados similares.

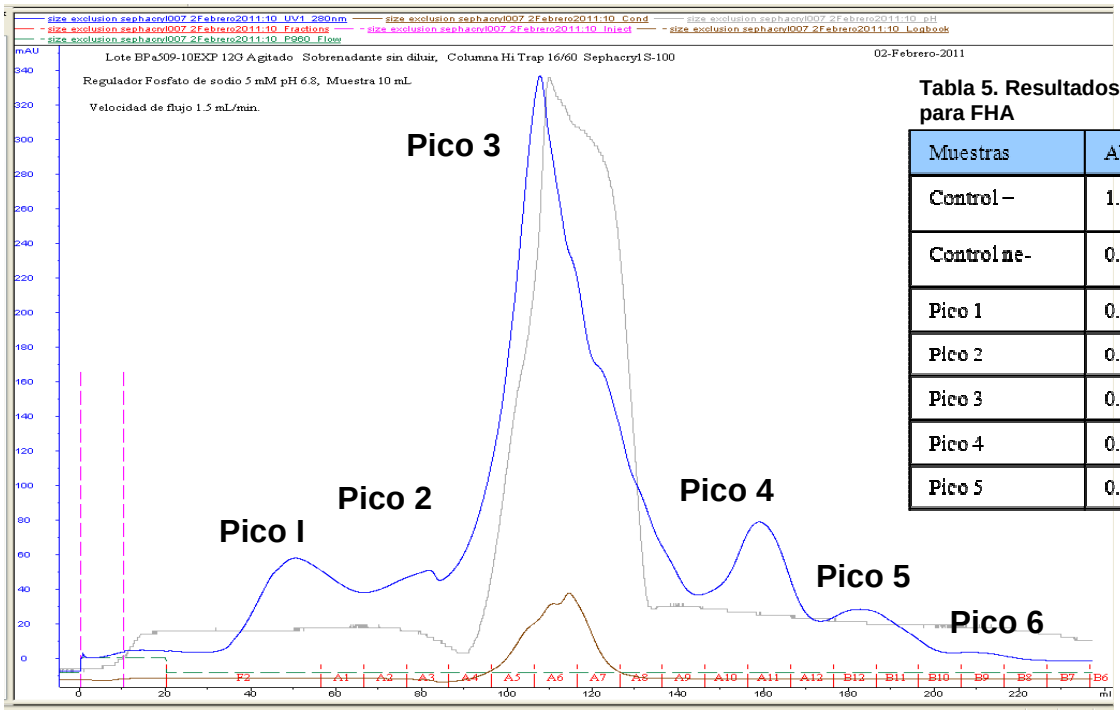



**Figura 3. Cromatograma en Columna de Sephacryl**

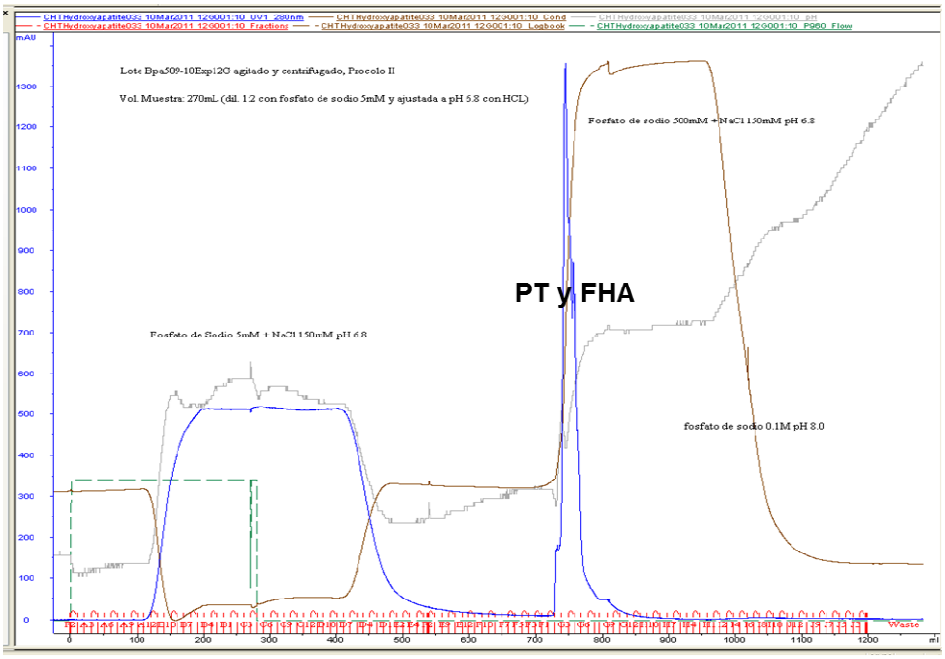
**Tabla 5. Resultados de la Prueba de ELISA para FHA**

| Muestras | Absorbancia (mg/mL) |
|---|---|
| Control – | 1.9 |
| Control ne- | 0.25 |
| Pico 1 | 0.236 |
| Pico 2 | 0.103 |
| Pico 3 | 0.136 |
| Pico 4 | 0.147 |
| Pico 5 | 0.109 |

En la **Figura 4** se muestra el cromatograma realizado en la columna de Hidroxiapatita. Se metió una muestra de 270 ml del lote experimental 1 (Bpa509-10Exp12G) del cultivo agitado, ajustando el sobrenadante a pH de 6.0 con ácido clorhídrico. En la **Figura 4** se muestran 2 picos en color azul, en el primer pico se representan las proteínas no deseadas que se eluyeron con un regulador de fosfatos de 5mM/NaCl 50 mM, a pH 6.8 y el segundo pico que se obtuvo usando un regulador de fosfato 500 mM/NaCl 150 mM a pH 6.8. Posteriormente, se uso un regulador de fosfato 0.1M a pH 8.0 para ver si se obtenía otro pico relacionado con las proteínas de interés, lo cual no ocurrió. Se confirmó por prueba de ELISA que había una mezcla de toxina pertussis y hemaglutinina filamentosa correspondiente al segundo pico (fracciones de la G2 a la H7) de 0.370 mg/mL de hemaglutinina filamentosa y de toxina pertussis de 0.549 mg/mL.

Se observó el mismo comportamiento para los lotes 2 (Bpa509-10Exp13G) y 3 (Bpa509-10Exp14G) del cultivo agitado. Con respecto a las muestras pertenecientes a los tres lotes experimentales del cultivo estacionario se obtiene resultados similares.

**Tabla 6 Resultados de la Prueba de ELISA para FHA y PT**




| Muestras | Titulo de FHA (µg/mL) | Titulo de PT (µg/mL) |
|---|---|---|
| Control Positivo | 1.817 | 2.272 |
| Control negativo | 0.028 | 0.026 |
| B12 | 0.0.60 | 0.031 |
| B5 | 0.100 | 0.026 |
| B12 | 0.087 | 0.031 |
| C9 | 0.067 | 0.028 |
| C10 | 0.045 | 0.036 |
| D6 | 0.102 | 0.028 |
| D10 | 0.123 | 0.032 |
| E1 | 0.085 | 0.031 |
| E5 | 0.091 | 0.032 |
| G2 a H7 | 0.370 | 0.549 |

**Figura 4. Cromatograma en Columna de Hidroxiapatita**

Todas las fracciones obtenidas durante la corrida en la columna de Hidroxiapatita fueron utilizadas para realizar pruebas de hemaglutinación con eritrocitos de pollo al 1%. En la **Fig. 5** se muestra una fotografía de la prueba utilizando una placa de aglutinación; en cada pozo se colocaron 200µL de la fracción proteica y se le agregaron 200 µL de eritrocitos de pollo 1%. Se mezclaron y se incubaron 1 h a 35ºC en una incubadora con agitación. Los resultados obtenidos mostraron que todas las fracciones aglutinaron a los eritrocitos de pollo al 1%, sin embargo, la penúltima y última fila que corresponden a las fracciones G1 hasta la H7 mostraron mayor hemaglutinación.

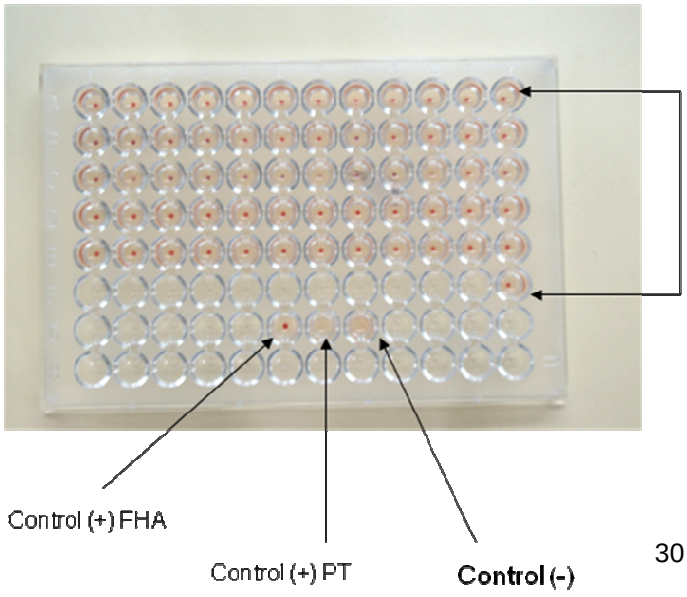



**Tabla 7. Muestras obtenidas del Cromatograma de la columna de Hidroxiapatita**

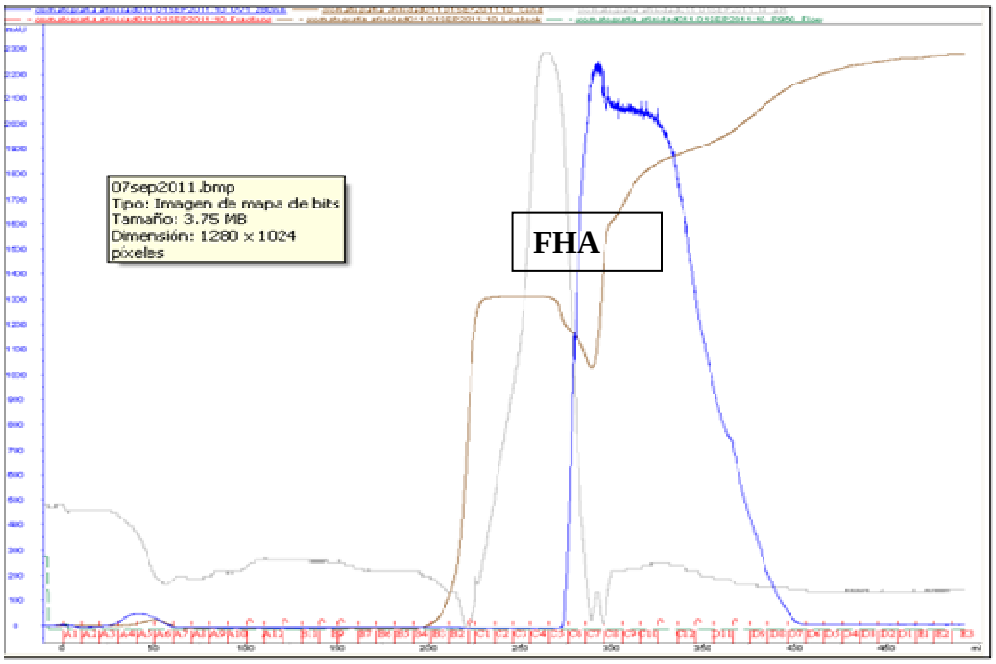
| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| E7 | E8 | E9 | E10 | E11 | E12 | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 |
| D7 | D8 | D9 | D10 | D11 | D12 | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | E6 |
| E7 | E8 | E9 | E10 | E11 | E12 | F1 | F2 | F3 | F4 | F5 | F6 |
| F7 | F8 | F9 | F10 | F11 | F12 | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 |
| G7 | G8 | G9 | G10 | G11 | G12 | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 |
| | | | | | | | | | | | H7 |
| | | | | | FHA + | PT+ | (-) | | | | |
| | | | | | | | | | | | |

**Fig. 5 Hemaglutinación de Eritrocitos para FHA**

En la **Fig. 6** se muestra el cromatograma de la columna de afinidad de fetuina-sepharosa. Las muestras obtenidas en el segundo pico de la columna de hidroxiapatita que contenían trazas de PT y FHA se pasaron por esta columna para la purificación de PT.

La PT se eluyó de la columna con una solución reguladora de Tris-HCl 0.05M con $MgCl_2$ 4M pH 7.4, se colectaron las fracciones del pico que sale con esta última solución reguladora.

**Figura 6. Cromatograma en Columna de Afinidad.**




## 5.4 Perfil electroforético SDS-Page por PhastSystem ™

En la **fig. 7** se muestra un gel de poliacrilamida SDS-Page a una concentración de 7.5%, teñido con plata coloidal. La fracción obtenida en la columna de afinidad (Sepharosa-fetuina), se dializó contra una solución reguladora de Tris-HCl 0.05M con NaCl 0.5M pH 8.0. Posteriormente, se utilizó el sistema PhastGel™ para identificar a PT por medio de su peso molecular, por lo que se utilizó un marcador de peso molecular (220 kDa) y un estándar de PT y un estándar de FHA para realizar la identificación.

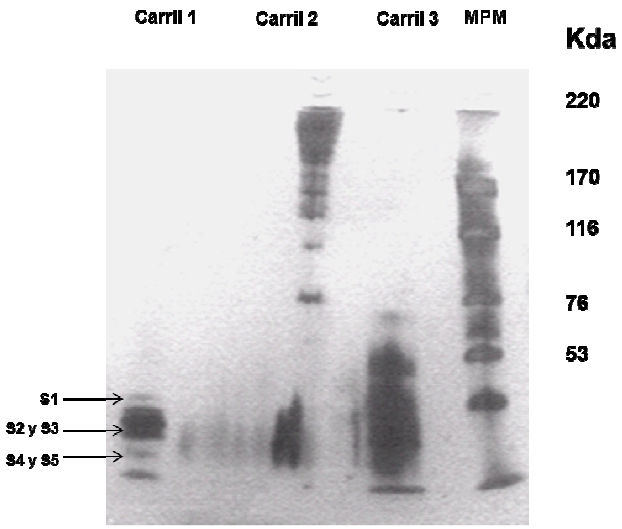



**Fig. 7 Perfil electroforético PT y FHA**

En el carril 1 esta la muestra obtenida en la columna de afinidad, en el carril 2 el estándar comercial de FHA, en el carril 3 el estándar comercial de PT y en el carril 4 el marcador de peso molecular de 220KDa.

En los resultados se observa que la muestra (carril 1) sólo hay presencia de PT en las subunidades que la componen (S1-S5). La subunidad S1 corresponde a la banda de 28 a 30 KDa; las subunidades S2 y S3 poseen un peso molecular aproximado de 24 a 26 KDa y por último las subunidades S4 y S5 con un peso molecular de 14.2 KDa. Si se compara el carril 1 con el carril 2 (estándar de FHA) no se observa que ninguna de las bandas corresponda con FHA, ya que las bandas de FHA están presentes por encima de los 116 kDa.

Con respecto a la comparación entre la muestra y el estándar de PT, podemos observar que muchas bandas presentes en la muestra (carril 1) también lo están en el estándar de PT (carril 3) principalmente en el rango de los 14 kDa a los 53 kDa.

## 6. DISCUSIÓN.

Como se mencionó en parráfos anteriores la tos ferina es una enfermedad que afecta principalmente a la población infantil de todo el mundo; las cifras señalan de 30-50 millones de casos y 300,000 muertes al año ocasionadas por la bacteria *Bordetella pertussis* (Black, 1997). Las primeras vacunas producidas para prevenir esta enfermedad estaban elaboradas con células completas, sin embargo, ocasionan varias reacciones adversas que van desde la fiebre hasta encefalopatía. Para evitar estos efectos secundarios, desde los años 80's se comenzaron a desarrollar las primeras vacunas acelulares, las cuales estaban formuladas con uno ó más factores de virulencia asociadas a *B. pertussis.*

Los factores de virulencia que se han seleccionado como principales componentes de las vacunas acelulares son la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosa. La primera es responsable de leucocitosis, mitogenicidad y letalidad. La segunda, permite la adhesión de la bacteria al sistema respiratorio del hospedero.

En la mayoría de los países desarrollados se elabora y utiliza la vacuna acelular de *B. pertussis* y la han combinado con la vacuna contra la difteria y el tétanos (DTPa), por el contrario, los países subdesarrollados como es el caso de México, tienen que comprar e importar la vacuna a precios muy altos.

En este trabajo se propuso estandarizar un método de producción y purificación de la toxina pertussis y la hemaglutinina filamentosa por técnicas cromatografícas, que permita la elaboración de la vacuna acelular, cuya principal aportación se verá reflejada en el ahorro de divisas además de contar con una vacuna para su distribución y aplicación en la población infantil mexicana, así como reducir los gastos médicos y de hospitalización relacionados con la tos ferina.

Para cumplir con los objetivos planteados, se produjeron tres lotes experimentales con la finalidad de obtener gran cantidad de sobrenadante y extraer toxina pertussis y hemaglutinina filamentosa. Se utilizó la cepa 509 lote CTH BP2.8L4 proporcionada por el Departamento de Fermentaciones del Instituto Nacional de Higiene (BIRMEX).

Primeramente, se estandarizó el proceso de crecimiento de *B. pertussis* desde la apertura de vial hasta a nivel de garrafón de 4 L. En experimentos realizados con anterioridad en el Instituto Nacional de Higiene (BIRMEX) se determinaba cuando hacer el pase a cualquier nivel determinando el matraz y/ó garrafón que presenta mayor valor de U.O. y que cumpliera con las pruebas de pureza satisfactoriamente.

En el Departamento de Fermentaciones de BIRMEX en el período de 2007-2008, se realizaron pruebas para estandarizar las condiciones de crecimiento de *B. pertussis*, por lo que los resultados obtenidos en ese período se compararon con los reportados en esos años.

Se realizó la apertura de vial en medio de Verwey, con la finalidad de activar la cepa y poder realizar los pases, y así obtener toxina pertussis y hemaglutinina filamentosa. En la **Gráfica 1** se muestran los resultados de tres diferentes lotes experimentales producidos durante la apertura de vial, en el tiempo final los resultados son muy similares, esto se puede deber a que estaban en las mismas condiciones de temperatura, agitación y tiempo de incubación. Los valores de absorbancia obtenidos para los tres lotes fueron para el lote 1 de 1.434 de unidades de absorbancia; en el 2 de 1.459 unidades de absorbancia y finalmente para el lote 3 de 1.468 unidades de absorbancia. El promedio de los tres lotes es de 1.455. Los resultados concuerdan con los obtenidos anteriormente por Birmex y con lo señalado por Thalen y cols.(2006), quienes establecieron que en la apertura de vial en tiempo final el cultivo debe tener entre 1.4-2.0 unidades de absorbancia, para continuar con la siguiente etapa.

En la **Gráfica 2** se muestran los resultados del segundo pase en medio de Verwey al tiempo final en el crecimiento de *B. pertussis*. En el lote 1 se obtuvieron 0.965 unidades de absorbancia, en el lote 2 1.057 unidades de absorbancia y en el lote 3 1.038 unidades de absorbancia. Entre los tres lotes se obtuvo un promedio de 1.02 unidades de absorbancia. Igualmente en el Departamento de Fermentaciones se reporta un rango de 0.9 a 1.5 en pase de matraz a matraz, por lo que lo obtenido en este trabajo entra dentro de esos valores.

El medio FGP-1 que tiene como base a los aminoácidos glutamato y prolina, se utiliza en el Instituto Nacional de Higiene (BIRMEX) para que se favorezca la producción de los factores de virulencia (incluidas la toxina pertussis y hemaglutinina filamentosa) por *B. pertussis.* (Thalen,1998).

El siguiente pase fue de medio Verwey a medio FGP-1 y los resultados se muestran en la **Gráfica 3**. En el lote 1 el promedio de los 6 matraces fue de 1.026 unidades de absorbancia, en el lote 2 de 1.148 unidades de absorbancia y en el lote de 3 1.107 unidades de absorbancia. El promedio de promedios de los tres lotes fue de 1.119 unidades de absorbancia, que está dentro del rango de 0.9 a 1.5 reportado por BIRMEX.

En los resultados de las tres graficas anteriores (grafica 1,2 y 3) podemos observar que en todos los pases el microorganismo excretó al medio la toxina pertussis, que es el antígeno de interés para este trabajo, la cual fue determinada por la técnica de ELISA.

El último pase fue de matraz a garrafón, estos fueron divididos en dos grupos: cultivo agitado y cultivo estacionario. Esto tuvo como finalidad el determinar en que condiciones se obtiene más PT y FHA. En la **Gráfica 4** se presenta un comparativo de los resultados correspondientes a la cinética de crecimiento tanto en cultivo agitado y estacionario. Como se observa en la gráfica el crecimiento bacteriano fue mayor en el cultivo agitado que en el estacionario. Podemos señalar que de las 30 h que estuvieron los cultivos en agitación la fase logarítmica se alcanzó desde las 3h (rombos azules) y continúo ininterrumpidamente hasta finalizar el tiempo de incubación. *B. pertussis* ha sido catalogado como un aerobio estricto, por lo que la agitación favorece la oxigenación de la bacteria y con esto hay una mejor asimilación de nutrientes y se

favorece el crecimiento. Por el contrario, se observó que cultivo estacionario el crecimiento fue pobre y constante; no hubo crecimiento del microorganismo de manera exponencial durante las 99 h que permaneció en incubación.

A pesar de que se sabe que *B. pertussis* es un aerobio estricto, en este trabajo se propuso crecer la bacteria de forma estacionaria, ya que se ha reportado en bibliografía que por agitación mecánica FHA pierde su actividad hemoaglutinante. Rodriguez, y cols., en 1993 determinaron que mientras más fuerte es la agitación (210-450rpm) de un cultivo de *B. pertussis*, más probabilidad existe de que la FHA sufra daño mecánico, observándose una pérdida de los componentes de FHA de mayor peso molecular 220 y 210 kDa que corresponden a la hemaglutinina y un incremento de los de menor peso molecular (≤97kDa.). En este trabajo las condiciones de agitación fueron de 200 rpm y los resultados de los cromatogramas demostraron que en los cultivos agitados hay presencia de FHA al igual que en los cultivos estacionarios. Para comprobar la actividad hemoaglutinante de la proteína se realizaron pruebas de aglutinación de eritrocitos de pollo al 1% (fig. 5), observándose aglutinación de la FHA en los cultivos en agitación y estacionarios.

Se sugiere que no se utilice el cultivo estacionario, ya que al querer escalar la producción a nivel de fermentador, no sería rentable porque es mucho tiempo invertido en el proceso y esto daría como resultado desgaste en los equipos, principalmente en los empaques de los fermentadores, por lo que se sugiere el uso de cultivo agitado.

Con respecto a la producción de PT, se observa en la gráfica 4 que tanto en el cultivo agitado como en el estacionario hay producción de toxina, siendo en mayor cantidad en el cultivo agitado (triángulos verdes) en comparación con el cultivo estacionario (asteriscos morados). Se aprecian dos picos a las 9 y 15 h que indican mayor cantidad de producción de PT en el cultivo agitado, sin embargo, después de ese tiempo la cantidad de toxina comienza a disminuir. Thalen y cols. en 2006 determinaron que durante el crecimiento de la bacteria existe actividad proteolítica que ocasiona que la concentración de PT baje de un 60 a un 40%. Esta puede ser la razón por la que observamos en este trabajo una disminución de la producción de PT. La degradación de PT y posiblemente de algunos otros factores de virulencia por proteasas será analizada en trabajos posteriores.

Después de obtenido el sobrenadante de los cultivos agitados y estacionarios, se buscó purificar a la toxina pertussis y a la hemaglutinina filamentosa por medios cromatográficos. Se seleccionaron cuatro columnas para llevar a cabo la purificación, reportadas en bibliografía como las mejores para obtener estas proteínas.

Mediante la aplicación de un gradiente de concentración en la cromatografía, el cual favorece la separación de las proteínas para liberarse de la fase estacionaria. Por lo cual la elución se inicia al incrementar la concentración del eluyente.

Los resultados obtenidos en los cromatogramas fueron similares para cultivo agitado y estacionario.

En la **Fig. 2** se muestra el cromatograma en columna de CM-sepharosa. En esta columna sólo se logró la purificación de PT. De los tres reguladores que se usaron, PT eluyó con el regulador de concentración de 50 mM/urea 2M pH 7.4 ajustando la muestra a pH 6.0 (segundo pico). No se logro la obtención de FHA con el regulador de fosfatos 50mM/NaCL 500mM pH 8.0. Estos resultados son similares a los reportados por Ozcengiz y cols. en el 2004 donde obtuvo la toxina pertussis con la misma concentración de regulador y el mismo pH; sin embargo, ellos si lograron eluir a la FHA. La purificación de FHA por esta columna también fue reportada por Sato y cols.1983 y por Ju y cols.,1997.

Los resultados obtenidos en la columna de sephacryl se mostraron en la **Fig. 3**. Como se observa se logró la purificación de FHA en varias fracciones (6 picos) con un regulador de fosfatos 5mM a pH 6.8. Lo obtenido en este trabajo es similar a lo reportado por Askelöf y cols. en 1982. Ellos obtuvieron 5 fracciones de FHA en esta columna las cuales no eran puras, sino que estaban asociadas con aglutinógenos, lipopolisacáridos y factores promotores de linfocitosis. Al observar los resultados obtenidos con la columna de sephacryl se decidió probar otra columna, ya que la FHA fraccionada no sería de utilidad.

Con respecto a la columna de hidroxiapatita (**Fig. 4)** Sato y cols. en 1983 lograron purificar a la FHA con un regulador de fosfatos a concentración de 0.1 M a pH 8. La obtención de PT usando esta columna fue hecha por Ju y cols. en 1997; de igual forma Svoboda y cols. 1986, reportan la elución de PT. En este trabajo se lograron obtener dos picos uno a 5mM/NaCl 50 mM a pH 6.8 que pertenece a las proteínas contaminantes y el otro a 500mM/NaCl 150 mM a pH 6.8. En el segundo pico se determinó por pruebas de ELISA la presencia de PT y FHA mezcladas. Empleando el regulador de fosfatos de 0.1 M a pH 8 de Sato (1983) no se eluyó ninguna proteína.

Con las diferentes fracciones recolectadas de la cromatografía en hidroxiapatita, se realizó una prueba de control en proceso que fue la hemaglutinación de eritrocitos de pollo al 1%; con esta prueba se buscó comprobar la presencia de FHA y PT. Como se observa en la **Fig. 5** efectivamente hay aglutinación tanto en FHA como en PT. Debemos recordar que la fracción B de la toxina pertussis es responsable de la adhesión de la toxina a las células del epitelio respiratorio por lo que podemos observar un poco de aglutinación en eritrocitos de pollo por tener receptores en común.

Con la muestra obtenida en la columna de hidroxiapatita, se elaboró una mueva prueba, esta vez con una columna de afinidad utilizando fetuina para obtener PT y dejar eluir a FHA y así poder obtenerla pura **(fig. 6)**.

Se ha reportado en bibliografía que la utilización de la proteína fetuina junto a una columna de sepharosa ocasiona que PT se asocie a la columna más fácilmente por lo que se obtiene mayor cantidad de toxina (Bogdan, 2003), lo que fue comprobado en este trabajo al lograr la purificación de varias fracciones de PT con una solución reguladora de Tris-HCl 0.05M con $MgCl_2$ 4M pH 7.4.

Para corroborar que efectivamente se trataba de PT se realizó una prueba de electroforesis SDS-Page en geles de poliacrilamida teñidos en plata. Los resultados mostrados en la Fig. 7 indican la presencia de PT y no de FHA, por lo que podemos concluir que efectivamente, la columna de sepharosa-fetuina sirve para obtener PT purificada.

Como se observa en el gel de la Fig. 7 existen numerosas bandas en la muestra correspondiente a PT (carril 1) las cuales se encuentran en un rango de 15 a 30 kDa. Estas bandas pertenecen a las diferentes subunidades de PT: S1 que posee un peso entre los 28-30kDa, S2 de 24-26 kDa, S3 de 23 a 25 kDa y las subunidades S4 y S5 de 15 kDa. Estas bandas son iguales a las observadas en el carril 3 que correponde al estándar de PT.

Chong y cols. en 1988 utilizaron la misma columna de sepharosa-fetuína para obtener PT purificada, y al igual que en este trabajo, logró separar por electroforesis SDS-Page las distintas subunidades de la toxina.

## 7. CONCLUSIONES.

- Los resultados obtenidos en cada pase con respecto a las unidades de absorbancia son similares a los reportados por el Departamento de Fermentaciones en los años 2007-2008.
- En todos los pases se observó presencia de toxina pertussis.
- La producción de toxina pertussis fue mayor en cultivo agitado que en cultivo estacionario.
- FHA fue purificada por cromatografía tanto en cultivo agitado como estacionario.
- Con la columna de CM-sepharosa sólo se purificó PT pero en cantidades muy pequeñas.
- Con la columna de Sephacryl se obtuvo FHA en diferentes fracciones.
- Empleando la columna de Hidroxiapatita se eluyeron PT y FHA mezcladas.
- La PT y FHA obtenidos en la columna de Hidroxiapatita aglutinaron eritrocitos de pollo al 1%.
- Con la columna de Sepharosa-fetuina se logro la purificación de PT obtenida de la columna de hidroxiapatita.
- Se comprobó la presencia de las 5 subunidades de PT por medio de electroforesis SDS-PAGE.

## 8. RECOMENDACIONES.

- Continuar con el escalamiento a nivel de fermentador de 50 L para favorecer el crecimiento y producción de PT y FHA, ya que a nivel de matraz y garrafón es difícil conocer y controlar la cantidad de $O_2$ disuelto, debido a que este microorganismo es un aerobio estricto.

- Continuar con la caracterización de PT y FHA.

- Determinar el método de destoxificación de PT y FHA.

- Calcular los rendimientos tanto de PT como de FHA purificadas.

- Optimizar el método de purificación de PT y FHA para obtener mayores rendimientos

- Establecer la cantidad de PT y FHA para poder formular una vacuna pentavalente acelular e implementar los estudios pre-clínicos.

## 9. IMPLICACIONES BIOÉTICAS.

El material biológico es de uso exclusivo para las pruebas de control señaladas por la Organización Mundial de La Salud (World Health Organization, Technical Report Series, No 800, 1990, Anexo 2) y en la FEUM.

No se realizaron pruebas del producto obtenido en humanos y solo se utilizarán animales para prueba de control de calidad.

## 10.- IMPLICACIONES DE BIOSEGURIDAD.

El manejo del material biológico y el desarrollo experimental se llevó a cabo de acuerdo a las Normas de Bioseguridad que confieren a un Laboratorio de Nivel 2 de seguridad (NOM-059-SSA1-2006) y los desechos biológicos generados del proceso experimental fueron tratados como Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI) (LGEEPA, LGPGIR y Reglamento de LGPGIR)

## 11.- ANEXOS

Anexo 1.- Formulación del medio de Verwey

| | | VOLUMEN EN LITROS | | |
|---|---|---|---|---|
| **No.** | **Reactivo** | **1** | **10** | **15** |
| 1 | Almidón soluble | 1.0 g | 10.0 g | 15.0 g |
| 2 | Cloruro de potasio (KCl) | 0.2 g | 2.0 g | 3.0 g |
| 3 | Fosfato monobásico de potasio ($KH_2PO_4$) | 0.5 g | 5.0 g | 7.5 g |
| 4 | Cloruro de magnesio hexahidratado ($MgCl{\cdot}6H_2O$) | 0.1 g | 1.0 g | 1.5 g |
| 5 | Acido nicotínico | 0.02 g | 0.2 g | 0.3 g |
| 6 | Glutatión | 0.01 g | 0.1 g | 0.15 g |
| 7 | Ácidos casamínicos | 14.0 g | 140.0 g | 210.0 g |
| 8 | Agua AFI | c.b.p. | c.p.b. | c.b.p. |

Anexo 2.- Formulación del medio FGP-1M:

| | | VOLUMEN EN LITROS | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **No.** | **Reactivo** | **1** | **10** | **45** | **180** |
| 1 | NaCL | 2.0 g | 20 g | 70 g | 1600 g |
| 2 | Glutamato de sodio | 10.7 g | 107 g | 374.5 g | 8,560 g |
| 3 | L-Prolina | 0.24 g | 2.4 g | 8.4 g | 192 g |
| 4 | L-Cistina | 0.04 g | 0.4 g | 1.4 g | 32 g |
| 5 | $KH_2PO_4$ | 0.5 g | 5 g | 17.5 g | 400 g |
| 6 | KCl | 0.2 g | 2 g | 7 g | 160 g |
| 7 | $MgCl_2.6H_2O$ | 0.1 g | 1 g | 3.5 g | 80 g |
| 8 | Ácido ascórbico | 0.02 g | 0.2 g | 0.7 g | 16.0 g |
| 9 | Ácido nicotínico | 0.004 g | 0.04 g | 0.14 g | 3.2 g |
| 10 | Glutatión | 0.1 g | 1 g | 3.5 g | 80 g |
| 11 | $CaCl_2.2H_2O$ | 0.02 g | 0.2 g | 0.7 g | 16.0 g |
| 12 | Ácidos casamínicos | 4.0 g | 40 g | 140 g | 3200 g |
| 13 | Almidón soluble | 1.5 g | 15 g | 52.5 g | 1200 g |
| 14 | Extracto de levadura | 5.0 g | 50 g | 175 g | 4000 g |
| 15 | Tris | 1.25 g | 12.5 g | 43.75 g | 1000 g |

## Anexo 3.- Fundamento de la Técnica de Cromatografía.

La técnica cromatográfica se utiliza para separar componentes usando una variedad de interacciones químicas entre la muestra y la columna cromatográfica. Es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector (ver Figura 1).

Figura I. HPLC Equipo utilizado para la obtención de fracciones con posible presencia de PT y/o FHA

El analito pasa a través de una columna de la fase estacionaria bombeando la fase móvil líquida con alta presión. La muestra se introduce en pequeños volúmenes a la corriente de la fase móvil y allí se retarda por medio de interacciones químicas con la fase estacionaria mientras atraviesa la columna. El retardo se conoce como tiempo de retención, único para cada analito. Depende de la naturaleza del analito, de la fase estacionaria y de la composición de la fase móvil.

Los solutos más comunes usados en la fase móvil son combinaciones de agua purificada con líquidos orgánicos, los más comunes son metanol y acetonitrilo, también suelen usarse sales y amortiguadores para contribuir a la separación de componentes. También se usa el ácido trifluoroacético para actuar como formador de pares iónicos.

Estas combinaciones introducen el concepto de gradiente de elución. Consiste en la variación de la composición de la fase móvil, para adaptarse a los diferentes analitos y conseguir mejores resultados. El gradiente separa la matriz del analito en función de la afinidad del analito por la composición de la fase móvil. Cada analito tiene un gradiente de elución óptimo para obtener la máxima separación de picos en el detector.(Skook y Cols., 1994).

## Anexo 4.- Fundamento de la técnica de Electroforesis.

La electroforesis es la migración de solutos iónicos bajo la influencia de un campo eléctrico; estas partículas migran hacia el cátodo o ánodo (electrodos - y +), en dependencia de una combinación de su carga, peso molecular y estructura tridimensional. Los métodos electroforéticos son de alta sensibilidad, poder de resolución y versatilidad, y sirven como método de separación de mezclas complejas de ácidos nucleicos, proteínas y otras biomoléculas, donde aportan un potente criterio de pureza.

Se pueden conocer también mediante estas técnicas, las características ácido-básicas de las proteínas presentes en un extracto crudo, lo que da la información necesaria si se pretende realizar una separación cromatográfica basada en diferencias de carga. Es útil además para determinar otros parámetros como peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas.

## 12.- BIBLIOGRAFIA


Abramson T, Kedem H, Relman DA. PLoS ONE. 2008;3(11):e3825. Epub 2008 Nov 27. Modulation of the NF-kappaB pathway by Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin.

Abramson T, Kedem H, Relman DAImmun. 2001.Proinflammatory and Proapoptotic Activities Associated with *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutins. April; 69(4): 2650–2658

Alison A. Weiss y Erick L. Hewlett., 1996. División clínica farmacológica y geografía Médica. 40:661-86.

Bamberger, E. y Srugo, I. 2008. What is new in pertussis? Eur J Pediatr 167:133-139.

Beltrán, S., Cervantes, Y., Villaseñor, A. 2011. Consenso para el diagnóstico clínico y microbiológico y la prevención de la infección por Bordetella pertussis. *Salud pública de méxico / vol. 53, no. 1, enero-febrero.*

Black S. 1997. Epidemiology of pertussis. Pediatr Infect Dis J. Apr;16(4 Suppl):S85-9.

Bogdan A. John, Wei Yuan, Karen O. Long-Rowe. 2003. Identification of Peptides that Mimic the Pertussis Toxin Binding Site on Bovine Fetuin. Appl. Environ. Microbiol.69(10):6272-6279.

Cecile A.; Geuijen,W.; Willems, J.; Mooi.L. 1996. The Major Fimbrial Subunit of *Bordetella pertussis* Binds to Sulfated Sugars. Infection And Immunity, July, p. 2657–2665.

Cofré J. 1999. *Bordetella pertussis.* Fastidio para clínicos y epidemiólogos. Rev. Chilena Infectología. 16 (1) pag 7-16.

Chong, P. y Klein,M. 1988. Single-step purification of pertussis toxin and its subunits by heat-treated fetuin-Sepharose affinity chromatography. Biochem. Cell Biol. Vol. 67.

Diavatopoulos DA, Hijnen M, Mooi, R 2006. Adaptive evolution of the Bordetella autotransporter pertactin. Evol Biol. Nov;19(6):1931-8.

Ellen S. Bamberger & Isaac Srugo, 2008, What is new in pertussis? Eur J Pediatr 167:133–139.

Elmer W. Koneman, Stephen D. Allen, William M. Jander. 2002. Diagnostico Microbiológico. 5ª ED. 416-425.

Fry SR, Chen AY, Daggard G, Mukkur TKJ. 2008 Parenteral immunization of mice with a genetically inactivated pertussis toxin DNA vaccine induces cell-mediated immunity and protection. Med Microbiol Jan;57(Pt 1):28-35

Frohlich,B.; Alarcao,M.; Feldberg,R.; Nicholson,G.; Siber,G. and Swartz,W. 1996. Formation and cell-medium partitioning of autoinhibitory free fatty acids and cyclodextrin's effect in the cultivation of *Bordetella pertussis.* Journal of Bacteriology 45: 137-148.

Geurtsen J, Dzieciatkowska M, Steeghs L, Hamstra HJ, Boleij J, Broen K, Akkerman G, El Hassan H, Li J, Richards JC, Tommassen J, van der Ley P. Infect Immun. 2009 Apr 13. Identification Of A Novel Lipopolysaccharide Core Biosynthesis Gene Cluster In Bordetella Pertussis: Influence Of Core Structure And Lipid A Glucosamine Substitution On Endotoxic Activity.John Bernard Henry. 1998. Diagnostico y Tratamiento Clínicos por el Laboratorio. [Epub ahead of print] 352-360.

Hewlett EL. Toxins and other virulence factors. Chapter in: Principles and practice of infectious Diseases, 3rd Edition. Mandell GL, cols., eds. New York: Churchill Livingstone 1990: 2-9.

Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y. 1983. Heptakis(2,6-O-dimethyl)beta-cyclodextrin: a novel growth stimulant for Bordetella pertussis phase I. J Clin Microbiol. May;17(5):781-6.

John Bernard Henry. 1998. Diagnostico y tratamiento Clínicos por el Laboratorio. P 352-360.

Ju CL, Sheu GC, Cheng Y, Lu CH. 1997. Production and purification of Bordetella pertussis toxin. Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Ji Mian Yi Xue Za Zhi. May;30(2):72-83.

Julio SM, Inatsuka CS, Mazar J, Dieterich C, Relman DA, Cotter PA. 2009. Natural-host animal models indicate functional interchangeability between the filamentous haemagglutinins of Bordetella pertussis and Bordetella bronchiseptica and reveal a role for the mature C-terminaldomain, but not the RGD motif, during infection. Mol Microbiol. Mar;71(6):1574-90. Epub 2009 Feb 10.

Keil, D J and Fenwick, B. (2000). Role of *Bordetella bronchiseptica* in infections tracheobronchitis in dogs. *JAVMA*, Vol. 212, No2, 200-207.

Lamberti Y, Hayes JA, Perez Vidakovics ML, Rodriguez ME. 2009. Cholesterol-dependent attachment of human respiratory cells by Bordetella pertussis. FEMS Immunol Med Microbiol. Apr 6.

Licari P.; Winberry,L.; Swartz, R. 1991. The effect of pH on the production of pertussis toxin by Bordetella pertussis. Journal of Biotechnology;17:189-193.

Luttinger P. 1985. Pertussis immunization. NY Med J. 101:1043.

Madell, L.; Bennet. E. 2002. Enfermedades Infecciosas Principios y Prácticas. 219:2932-39.

Mooi; F.; van Loo, I.; King, A. 2001. Adaptation of Bordetella pertussis to vaccination: a cause for its reemerge? Emerging Infectious Diseases 7(3) 526-528.

Muñoz F. 2006. Pertussis in infants, children, and adolescents; diagnosis, treatment, and prevention. Semin Pediatr Infect Dis 17:14-9.

Nascimento IP, Dias WO, Quintilio W, Christ AP, Moraes JF, Vancetto MD, Ribeiro-Dos-Santos G, Raw I, Leite LCMicrobes Infect. 2008 Feb;10(2):198-202. Epub 2007 Nov 20.. Neonatal immunization with a single dose of recombinant BCG expressing subunit S1 from pertussis toxin induces complete protection against Bordetella pertussis intracerebral challenge.

Ozcengiz E, Kilinç K, Büyüktanir O, Günalp A. Rapid purification of pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) by cation-exchange chromatography. Vaccine. 2004 Mar 29;22(11-12):1570-5.

Paccani SR, Dal Molin F, Benagiano M, Ladant D, D'Elios MM, Montecucco C, Baldari CT. Infect Immun. 2008 Jul;76(7):2822-32. Epub 2008 Apr 21Suppression of T-lymphocite activation and chemostaxis by the adenylate cyclase toxin of B. pertussis.

Paddock CD, Sanden GN, Cherry JD, Gal AA, Langston C, Tatti KM, Wu KH, Goldsmith CS, Greer PW, Montague JL, Eliason MT, Holman RC, Guarner J, Shieh WJ, Zaki SR. Clin Infect Dis. 2008 Aug 1;47(3):328-38 Pathology and pathogenesis of pertussis infection in infants.

Pootong A, Budhirakkul P, Tongtawe P, Tapchaisri P, Chongsa-nguan M, Chaicumpa W. Asian Pac J Allergy Immunol. 2007 Mar;25(1):37-45. Monoclonal antibody that neutralizes pertussis toxin activities

Poulain-Godefroy O, Vendeville C, Locht C, Riveau G. FEMS Immunol Med Microbiol. 2008 Oct;54(1):129-36. Epub 2008 Aug. Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin delivered by mucosal routes enhances immunoglobulin levels in serum and mucosal fluids.

Picazo JJ. 2002. Guía práctica de vacunaciones. Centro de Estudios de Ciencias de la Salud. Madrid.

Rojas, O. 2003. Inmunología (DE MEMORIA) 320, 322, 333, 337, 338.

Rodriguez, M.; Samo, A.; Hozbor, D. y Yatorno, O. 1993. Effect of hydromechanical forces on the production of filamentous haemagglutinin and pertussis toxin of B. pertussis. J Indus Microbiol 12: 103-108.

Salyers, A., Whitt D. 1 994. Bacterial pathogenesis. A molecular approach. ASM press.

Sekura, RD; Fish; F; Manclarck; CR; Meade,B; Zhang, YL. Pertussis toxin affinity purification of a new ADP-ribosyltransferase. J Biol Chem. 1983. Dec10; 258(23): 14647-51.

Skelton SK, Wong KH. Simple, efficient purification of filamentous hemagglutinin and pertussis toxin from Bordetella pertussis by hydrophobic and affinity interaction. J Clin Microbiol. 1990 May;28(5):1062-5.

Stainer, W.D., and M. J. Scholte. 1970. A Simple Chemically Defined Medium for the Production of Phase I Bordetella pertussis. Journal of General Microbiology; 63:211-220.

Sato Y., M. Kimura and H. Fukumi. 1981. Development of a Pertussis Component Vaccine in Japan. The Lancet:124-126

Sato, Y.; Cowell,J.; Sato,h.; Burstyn,D. Manclarck, C. 1983. Separation and Purification of the Hemagglutinins from Bordetella pertussis. Infect. Immun. 313-320.

Skoog, Douglas A. y Leary, James J. 1994, Análisis Instrumental, Madrid: McGraw-Hill.

Svoboda M, Hannecart-Pokorni E, Borremans M, Christophe J. Rapid purification of Bordetella pertussis toxin by alternating affinity and hydrophobic chromatography. Anal Biochem. 1986 Dec;159(2):402-11.

Thalen Marcel, Mariam Venema, Jan van den Ijsse, Luc Berwald, Coen Beuvery, Dirk Martens and Johannes Tramper. Effect of relevant culture parameters of Pertussis Toxin expression by Bordetella pertussis. Biologicals 2006;34:213-220.

Verwey, W.; Thiele, E.; Sage,D.; Schuehardt, L. 1949. A simplified liquid culture media for de growth of *Haemophilus pertussis*.

Vitek CR, Pascual FR, Baugham, AL., Murphy TV. 2003. Increase in deaths from pertussis from young infants in the United States in the 1990. Pediar Infect Dis J. 22:628:634.6

Walter Ledermann D. 2004. Revista Chilena de Infectología, Breve historia de la *Bordetella pertussis,* Santiago Vol. 21, núm 3, p 241-246.

Weiss, A. and Hewlett, E. 1986. Virulence factors of *Bordetella pertussis.* Annual Review Microbiology 40:661-86.

William S. Probert,Janet Ely, Kimmi Schrader,Jessica Atwell, Angela Nossoff, and Stanley Kwan. Identification and Evaluation of New Target Sequences for Specific Detection of *Bordetella pertussis* by Real-Time PCR. Epub ahead of print.

Winter, K.; Harriman, K.; Schechter,R.; Yamada, E.; Talarico, J.; Chavez, G.. 2010. Notes from the field: Pertussis – California, January and June 2010. Centers for Disease Control and Prevention.