

FERMENTACIÓN DE ALTO RENDIMIENTO DE *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* NO TIPIFICABLE Y EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P6, UN ACERCAMIENTO A LA PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA PURIFICADA. PARTE I

HIGH YIELD FERMENTATION OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* AND PROTEIN P6 EXPRESSION : AN APPROACH TO THE PRODUCTION OF A PURIFIED VACCINE. PART I.

Zuluaga¹ D.

RESUMEN

El presente artículo describe una metodología eficiente, simple y económica para la obtención de altas densidades celulares de *Haemophilus influenzae*, con el fin de producir vacunas tanto celulares como acelulares. Se describe un método de cultivo en líquido para este microorganismo, el cual no había sido implementado en el país, aún después de varios años de investigación por parte de varios grupos, principalmente debido a los bajos rendimientos obtenidos o a los altos costos de las formulaciones más exitosas. Se evalúa el sistema, con respecto a medios sólidos y líquidos de referencia, teniendo en cuenta la cinética de crecimiento, los costos y la expresión de los antígenos más promisorios como vacuna purificada.

Palabras clave: *Haemophilus influenzae*, Fermentación, Antígenos de membrana externa, proteína P6.

SUMMARY

The present article describes an efficient, simple and unexpensive method for the production of high cellular densities of *Haemophilus influenzae* for cellular and cell free vaccine production. We present here a liquid culture-based method that had not been successfully implemented in Colombia, so far having given low yields and high costs. The kinetics, costs and production of the most promisory antigen candidates for vaccine production were evaluated in liquid and solid reference media.

Keywords : *Haemophilus influenzae*, fermentation, outer membrane antigens, P6 protein.

INTRODUCCIÓN.

Recientes trabajos han identificado claras diferencias entre *Haemophilus influenzae no tipificable* y *Hemophilus influenzae* tipo b. Estos organismos afectan diferentes poblaciones, causan diferentes infecciones, presentan diferentes antígenos de superficie al huésped, y son genéticamente diferentes. Las manifestaciones más comunes de infecciones debidas a *Haemophilus influenzae no tipificable* en adultos son infecciones del tracto respiratorio, particularmente en ancianos y exacerbaciones en pacientes con bronquitis crónica. La bacteria es causa frecuente de otitis media aguda en niños. Por su parte *Haemophilus influenzae* tipo b, juega un importante rol etiológico en meningitis bacteriana (95% de los casos). Los niños de corta edad pueden ser inmunizados eficazmente contra *Haemophilus tipo b*, después de la introducción de la vacuna conjugada (Poliribosilribitol fosfato unida a una proteína portadora). Así mismo los mecanismos responsables por la inmunogenicidad son ampliamente conocidos destacandose la importancia de la correcta expresión de los lipopolisacaridos en los cultivos para la producción de vacunas. Estas vacunas no son útiles contra *Haemophilus influenza no tipificable*, ya que este carece de la capsula de polisacáridos.

En contraste, la inmunogenicidad contra este último es contra antígenos de superficie en la membrana externa, lo que a conducido a que las investigaciones para una vacuna efectiva contra *Haemophilus influenzae no tipificable* se hayan enfocado en los componentes de la membrana externa, mostrando un gran potencial la glicoproteína de 16.600 Daltons llamada P6. Esta proteína contiene un epitope que es un determinante común contra todas las cepas de *Haemophilus influenzae*, tanto las tipo b, como las no tipificables. Este determinante antigénico es un marcador altamente específico para *Haemophilus influenzae*, ya que esta virtualmente ausente en todas las otras especies del microorganismo.

¹ Bioquímico. Director dpto. Biológicos Laboratorios Probyala A.A 110423 Bogotá Telefax 6844988

Por otra parte, varios criterios son importantes cuando se desarrolla un medio de cultivo o un proceso para la producción de vacunas. Las buenas prácticas de manufactura indican que el medio debe contener únicamente los componentes esenciales, ser reproducible y fácil de preparar. Además se deben obtener altas densidades celulares con condiciones Fisiológicas, Bioquímicas y antigénicas estables.

En el país no se conocía de la utilización de métodos fermentativos de *Haemophilus influenzae*. Un laboratorio venía empleando la metodología de cultivo en medios para la producción de vacunas a base de células completas inactivas.

En este artículo se presentan los resultados de la evaluación en cuanto a rendimiento celular, costos y expresión antigénica de un proceso fermentativo y un medio diseñado por el cultivo de ambos tipos de *Haemophilus influenzae*, comparándolo con los medios tradicionales tanto sólidos como líquidos recomendados por la literatura internacional para la producción de vacunas.

METODOS

Cepa:

Haemophilus influenzae no tipificable ATCC 19418 (Biovariedad III).

Medio de cultivo solido

Se empleo Agar chocolate, con los siguientes componentes: primatona (Sheffield) 0.2%, Extracto de levadura (Marcor) 0.5%, agar (Oxoid) 0.18%, Glucosa (Merck) 0.02% y sangre ovina 0.5%.

Medio catlin modificado

El medio completo fue preparado a partir de soluciones stock. Las sales y los aminoácidos empleados fueron grado analítico merck y los demás compuestos fueron Sigma. Las diferentes soluciones fueron esterilizadas por filtración a través de membranas de acetato de celulosa de 0.22 micras (Sartorius) o por autoclave según se indique.

Stock 1: ácido L-aspártico 5 g, ácido L-glutámico 13 g, cloruro de sodio 58 g, sulfato de potasio 10 g, cloruro de magnesio hexahidratado 2 g, cloruro de calcio dihidratado 0.28 g, EDTA 0.04 g, cloruro de amonio 0.10 g. Disueltos en 1 L de agua destilada, (pH 7.4), autoclavado y almacenado a temperatura ambiente.

Stock 2: fosfato dipotasico trihidratado 22.8 g, fosfato de potasio dihidrogeno 13.6 g, disueltos en 1 L de agua (pH 7.4), autoclavado 20 minutos a 121 oC, 20 PSI y almacenada a temperatura ambiente.

Stock 3: acetato de sodio 34 g, L-Agripina 1.5 g, glicina, 0.25 g L-iso-leucina 0.3 g, L-leucina 0.9 g, L-valina 0.6 g, L-alanina 1 g, L-lisina HCl 0.5 g, L-triptofano 0.8 g, L-

treonina 0.5 g,

L-fenilalanina 0.25 g, L-asparagina 0.25g, L-glutamina 0.5 g, L- histidina 0.18 g, L-metionina 0.15 g, carbonato de sodio 0.42 g, colina 14 mg, m-inositol 3.6 mg,. Disueltos en 1 litro de agua destilada (pH 7.4), esterilizado por filtración y almacenado a 4 oC.

Stock 4: ácido pantoténico 0.1 g, tiamina HCl g, NAD 0.1 g, llevado a 20 mL con agua destilada, esterilizado por filtración y almacenado a -20 oC.

Stock 5: protoporfirina IX 2mg/mL, autoclavado a 20 minutos a 121 oC, 20 PSI y almacenado a 4 oC.

Stock 6: uracilo 1% (P/V) en 0.1% de hidróxido de sodio; filtrado por esterilización y almacenado a 4 oC.

Stock 7: L-cistina 1 mg, L-tirosina 7 mg, hipoxantina 8 mg, disueltos en 80 ml de HCl 1M.

El medio completo consiste de 100 ml stock 1, 100 ml de stock 2, 100 ml stock3, 0.8 ml de stock 4, 1 ml de stock 5, 2 ml de stock 6; llevado todo aproximadamente 850 ml con agua destilada, posteriormente se adicionan 5 g de glucosa y 0.2 de inosina. Cuando los dos últimos compuestos estaban disueltos, se adicionó el stock 7, se completó el volumen a 1 litro con agua destilada y se ajusto el pH a 7.4 con solución de hidróxido de sodio 1M.

Medio BHI suplementado

BHI (Merck), suplementado con 10 mg/L de NAD (sigma) y 10 mg/L de hemina(BBL).

Medio experimental.

Primatona (Shiefield) 05%, extracto de levadura (Marcor) 0.5%, extracto de carne 0.15%, N-Z-amina 0.5%, glucosa 5%, cloruro de sodio 0.58% , NAD 0.001% , protoporfirin IX 0.001%. Disuelto en agua destilada, esterilizado por filtración , el pH se ajustó a 7.6 con hidróxido de sodio 10 M y se almacenó a 4 oC.

Inoculo

Las células liofilizadas fueron reconstituidas con solución salina, se estandarizó la suspensión a 1×10^5 ml, por densidad óptica a 615 nm empleando un espectrofotómetro beckman y se empleó directamente como inóculo. Para el cultivo en sólido, se inocularon frascos roux conteniendo 100ml de agar chocolate con 5 ml de la suspensión, se incubaron 48 horas a 37 grados C. Para los cultivos en líquido se inocularon 60 ml contenidos en erlenmeyers de 250 ml de cada uno de los medios experimentales (Se ensayaron más de 60 medios para llegar al medio final), al igual que el medio de referencia con 5 ml de la suspensión bacteriana, se incubaron a 37 C con agitación magnética.

Condiciones de crecimiento y cultivo en fermentador

Los cultivos líquidos fueron llevados a cabo en un fermentador TECFERM 2L (Procesos biotecnológicos y medioambientales, Bogotá), conteniendo 1 L del medio a ensayar. Se accionó el inóculo en la mitad de su fase exponencial. La temperatura fue mantenida a 37 C, el

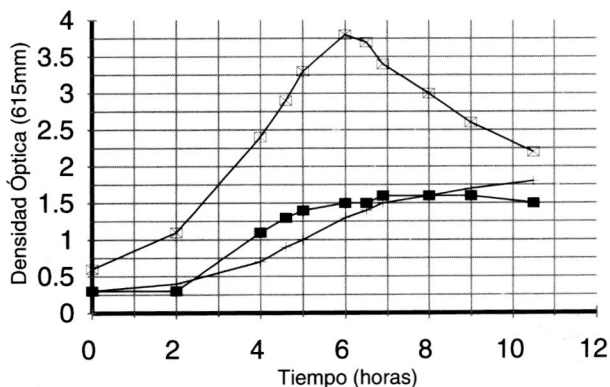
cultivo fue aireado a una tasa de 0.5 v.v.m, la agitación se mantuvo a 250 r.p.m. El pH fue medido y controlado por la adición automática de NaOH al 10%. La cinética del crecimiento fue seguida por el incremento en la densidad óptica, leída a 615 nm.

Análisis de proteínas de membrana externa.

Las membranas fueron obtenidas por extracción con sarkosyl (2%) y los perfiles de OMP se determinaron por electroforesis SDS en geles de poliácridamida del 12.5%. Se utilizó tinción con plata.

RESULTADOS

El sistema de cultivo experimental provee células con características microscópicas similares a las obtenidas en el medio de referencia, las cuales fueron altamente adaptables al ambiente in vitro. El cultivo en lote mostró una típica curva de crecimiento con una fase lag muy corta. El pico de la fase exponencial se obtuvo en corto tiempo y los picos fueron idénticos para cada uno de los 3 ensayos realizados, lo que indica la importancia de una semilla con características estándar (liofilizada). Al final de la fase exponencial comenzó una fase de lisis, por lo que la cosecha del cultivo debe efectuarse tan pronto como se obtengan dos densidades ópticas similares (fig.1).



Fermentación de *Haemophilus Influenzae*

Figura 1. Cinética de crecimiento de *Haemophilus influenzae* en diferentes medios.

Análisis de OMP s por Electroforesis SDS

El perfil electroforético de las OMPs en los diferentes medios puede verse en la figura No 2. Es de notar que no se presentaron diferencias significativas al emplear el medio experimental y la expresión de la proteína P6 fue similar a lo observado en los medios de referencia.

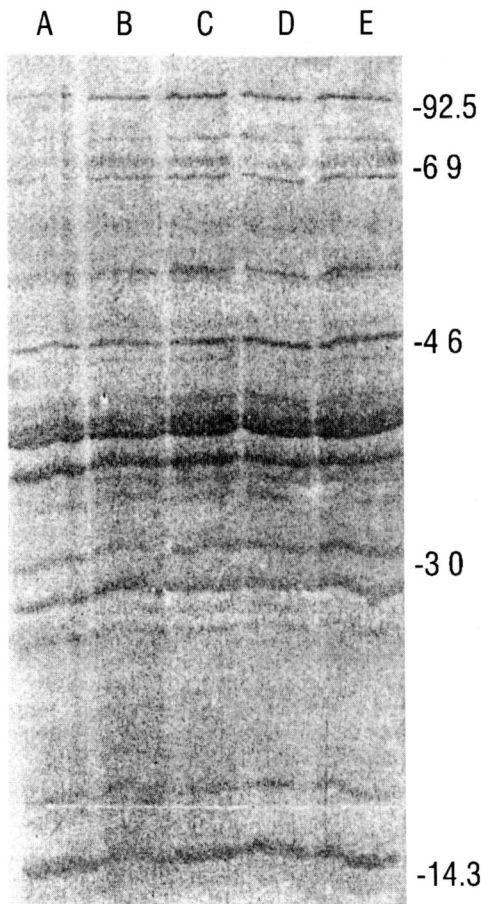


Figura 2. Electroforesis en geles de poliácridamida de *Haemophilus influenzae* cultivado en diferentes medios.

Línea A, agar chocolate; línea B, medio BHI suplementado; línea C, medio catlin modificado; línea D, medio experimental; línea E, patrón de cepa liofilizada

DISCUSIÓN

Este estudio muestra que el sistema de cultivo empleado es simple, eficiente y más económico que los métodos sólidos empleados tradicionalmente en el país, así como los métodos líquidos reportados en la literatura internacional.

Estudios previos han reportado la dificultad para la obtención de altas concentraciones de biomasa de *Haemophilus influenzae* para la producción de vacunas, así como la inestabilidad en la expresión de los diferentes antígenos al crecer el microorganismo en diferentes medios y a altas tasas de productividad. El proceso de fermentación descrito en este artículo es válido para la producción de vacunas a base de OMPs. Actualmente esta siendo empleado con éxito en Colombia para la producción de vacunas a base de células completas de *Haemophilus* no tipificable. Para su empleo en la producción de vacunas contra el *Haemophilus* tipo b, se debe evaluar la expresión de los lipopolisacáridos.

El autor pretende con este estudio, un acercamiento a la producción en el país de vacunas a base de antígenos purificados, principalmente de *Haemophilus influenzae* tanto no tipificable, como tipo b, teniendo en cuenta que uno de los obstáculos para la producción de este tipo de vacunas es la dificultad en la obtención de altas cantidades de biomasa. El siguiente aspecto a estudiar es la purificación industrial de grandes cantidades de antígenos.

Se reporta igualmente un sistema de inoculación directo a partir de semilla liofilizada a medios líquidos. Los

sistemas tradicionales requieren la producción intermedia en sustratos sólidos para acumular biomasa. Esta etapa depende notoriamente de la técnica del operador y en aplicaciones industriales puede llevar a variaciones en la densidad de la semilla starter presentandose diferencias en los tiempos de cultivo para lotes diferentes .

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece a Laboratorios Probyala por el apoyo brindado para la ejecución del presente estudio.

BIBLIOGRAFIA

- Ambrosino Donna, Schreiber Jhon R, Daum Robert S and Siber George R.** 1983 Efficacy of human hyperimmune globulin in prevention of *Haemophilus influenzae* Type b diseases in infant rats. *Infection and immunity*, Feb p 709-714.
- Band Jeffrey D, Fraser David W, Ajello Gloria.** 1984. Prevention of *haemophilus influenzae* type b disease. *J. Of American Medical Association*. May. volume 251.
- Barington T.** 1994. Opposite effects of actively and passively acquired immunity to the carrier on responses of human infants to a *haemophilus influenzae* type b conjugate vaccineinfect. *And immunity*, jan, p.9-14.
- Bell Louis M, Alpert Gershon, Campos Joseph M, Plotkin Stanley A.** 1985. Routine quantitative blood cultures in children with *Haemophilus influenzae* or *streptococcus pneumoniae* bacteremia. *Pediatrics* Vol 76 No 6. Dec.
- Bergeron Michel G, Simard Pierre, provencher Pierre.** 1987. Influence of growth medium and suplement on growth of *haemophilus influenzae* and on antibacterial activity of several antibiotics. *J. Of Clinical Micr. Apr.* P 650-655.
- Brinkley A W, Huber T W,** 1978 Method for evaluating broth culture. Media: application to *haemophilus*, *j. Of clinical -micr.* Nov., p 520-524.
- Calandra G. B, Lukacs L. J, Jonas L.C, santosham M, Ward J.I, Greenberg D.P , Daum R.S. Matthews H, Vella P.P, Ryan J.L.** 1993. Anti-PRP antibody levels after a primary series of PRP-OMPC and persistence of antybody titres following primary and booster doses. *Vaccine*, vol 11, suppl. 1.
- Csukas Zsuzsanna.** 1980. New selective medium for the isolation of *haemophilus* species *Acta Microbiologica Acad, sci, Hung.* 27,141-145.
- Dagan R et al.** 1992 a two-year prospective , nationwide study to determine the epidemiology and impact of invasive childhood *haemophilus influenzae* type b infection in israel. *Clinical infectious Diseases*, 15:720-5.
- Dagan R.** 1993. Epidemiology of invasive *haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in Israel vaccine, vol 11, Suppl. 1.
- Dangor Y, Miller S.D, Koornhof H.J, Ballar R.C.** 1992 a simple medium for the primary isolation of *haemophilus ducreyi*. *Eur. J. Clin. Micr. Infect. Dis.* Vol 11.
- Doern Gary V.** 1992. In vitro susceptibility testing of *haemophilus influenzae* : Review of new national committee for clinical laboratory standards recommendations. *J. Of clinical Micr.* Dec. , p . 3035-3038.
- Eskola J, Takala A, Kayhty H, leinonen M, Kilpi T, Peltola H, Makela P.H.**1987. Secondari cases of invasive disease caused by spread of *haemophilus influenzae* type b. *J. Of infection* 14, 233-236.
- Granoff Dan M, Weinberg Geoffrey A, shackelford Penelope G.** 1988. IgG. Subclass responses to immunization with *haemophilus influenzae* type b, polysaccharide-outer membrane protein conjugate vaccine. *Pediatric Research* vol 24, No 2.
- Granoff Dan M, Cates Lynn K.** 1985. *haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccines . *J of pediatrics*. Vol 107, No 3, pp 30-336. Sept.
- Granoff Dan M, Rathore Mobeen H, Holmes Sandra J, Granoff Paul D, Lucas Alexander H.** 1993. Effect of immunity to the carrier protein on antibody responses to *haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Vaccine*, Vol 11, Suppl.1.
- Gervaix Alain, suter Susanne.** 1993. Need for prevention of invasive *haemophilus influenzae* type b infections in Geneva, Switzerland. *Vaccine*, Vol 11, suppl. 1.
- Hardie K.** 1993. Transferrin-binding ability of invasive and commensal isolates of *haemophilus* spp. *J. Med. Microbiol*, vol 39,218-224.
- Holmes Rustin L, DeFranco Lucia M, Otto Maryellen.** 1982. Novel method of biotyping *haemophilus influenzae* that uses API 20E. *J, of clinical Micr.* Jun.P. 1150-1152.
- Holmes Sandra.** 1991. Immunogenecity of four *haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in 17-to-19 month-old children. *J, of pediatrics* vol 118, No 3,364-371.
- Insel Richar A, Amstey Marvin, Pichichero Michael E.** 1985. Postimmunization antibody to the *haemophilus influenzae* type b capsule in breast in milk . *J, of infectius diseases*. Vol. 152,No 2. Aug.
- Inzana Thomas J, Clarridge Jill, Williams Robert P.** 1987. Rapid determination of X/V growth requiremetns of *haemophilus* species in broth. *Diagn Microbiol infect Dis.* Vol 6 p 93 -100.
- Johnson P.D.R, Macinnes S.J, Gilbert G. L.** 1993. Antibodies to *haemophilus influenzae* type b outer membrane proteins in children with epiglottitis or meningitis and healthy controls. *Infection and immunity*, Apr., p. 1531-1537.
- Jonnson Steinn , Musher Daniel M, Lawrence clinton E.** 1987. Phagocytosis and killing of *haemophilus influenzae* by alveolar macrophages: no diferences between smokers and non-smokers. *Eur J. Respir Dis.* Vol 70, 309-315.
- Jones D. M,** 1993. Meningococcal vaccines. *J. Med Micr.* Vol 38, p. 77-78.
- Kayhty Helena, Makela Olli, Eskola Juhani, Saarinen Leena, Seppala Ilkka .**1988. Isotype distribution and bactericidal activity of antibodies after immunization with *haemophilus influenzae* type b vaccines at 18-24 months of age. *J, of infectious Diseases*. Vol 158, No 5. Nov.
- Kilian M, Sorensen Inger, Frederiksen W.** 1979. Biochemical characteristics of 130 recent isolates from *haemophilus influenzae* meningitis. *J, of clinical Microbiology*, P. 409-412.
- Kroll J. Simon, moxon E. Richard, Loynds Barbara M.** 1993. An ancestral mutation enhancing the fitness and increasing the

virulence of haemophilus influenzae type b. J. Of infectious diseases; 168:172-6.

Langford Paul. R, Moxon E. Richard. 1992. Growth of haemophilus influenzae type b in continuous culture: effect of dilution rate on outer-membrane protein and lipopolysaccharide expression. Fems Microbiology letters 93. P. 43-48.

Landgraf I. M, Vieira. M.F.P. 1993. Biotypes and serotypes of haemophilus influenzae from patients with meningitis in the city of Sao Paulo Brazil, j, of Clinical Microbiology, Mar., p 743-745.

Martin S. J, Hoganson D. A, Thomas E. T. 1987. Detection of streptococcus pneumoniae and haemophilus influenzae type b antigens in acute nonbacteremic pneumoniae. J., of clinical Microbiology, Feb., p . 248-250.

Mulder J, Goslings W.R, Van Der Plas M.C, Lopez Cardozo P. 1952. Studies on the treatment with antibacterial drugs of acute and chronic mucopurulent bronchitis caused by Haemophilus influenzae. Acta Med. Scandinav. vol CXLIII.

Pritkin Ronald. 1997. Failure of vaccination with haemophilus influenzae vaccine.

Rennie R. 1992. Laboratory and clinical evaluations of media for the primary isolation of haemophilus species . J., of clinical Microbiology, Aug, p 1917-1921.

Robbins Jhon B, Scheerson Rachel. 1990. Polysaccharide-protein conjugates : A new generation of vaccines. J, of infectious Diseases; 161:821-832.

Santosham Mathuram. 1993. Prevention haemophilus influenzae type b disease. Vaccine, vol. 11, suppl. 1.

San Joaquin Venusto, Stutman Harris R, Marks Melvin I. 1984.

haemophilus influenzae type b meningitis in infants rabbits AJDC. Vol 138, May.

Shih C.N, Balish E.1977. New blood culture medium. j, of clinical Microbiology, Sept., p 249-256.

Vella Philip P, Marburg Stephen, Staub Joan M, Kniskern Peter J, Miller William, Hagopian A, Ip C Tolman Richard L, Rusk Cinthia M, Chupack L.S, Ellis Ronald W.1992. Immunogenicity of conjugate vaccines consisting of pneumococcal capsular polysaccharide type 6B, 14,19F, and 23F and a meningococcal outer membrane protein complex. Infection and immunity, Dec., p. 4977-4983.

Virji Mumtaz 1990. Antigenic similarities in LPS of haemophilus and Neisseria and expression of a digalactoside structure also present on human cells . Microbial pathogenesis 9: 411-450.

Ward Joel. 1991. Prevention of invasive haemophilus influenzae type b disease: lessons from vaccine efficacy trials. Vaccine, vol 9. Supplement June.

Withe David C.1963. Respiratory systems in the hemin-requiring haemophilus species. J. Bact. Vol 85.

Wong Victor K, Kim Kwang sik. 1993. Anti-polyribosil-ribosil phosphate and anti-N. meningitidis outer membrane protein antibody levels following PRP-OMP conjugate vaccination. vaccine, Vol. 11 Issue 9.

NE: Por petición del autor se acepta como caso excepcional la publicación del artículo sin las referencias en el texto de la literatura empleada. En caso de ser necesaria cualquier información puntual comunicarse con el autor.