

VACOLI^{MR}: VACUNA RECOMBINANTE CONTRA LA COLIBACILOSIS PORCINA. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO PRODUCTIVO Y SU EVALUACIÓN EN CONDICIONES DE CAMPO

Idania Wong Padilla,¹ Eddy Bover,¹ Roberto Basulto,¹ Susset Valderrama,¹ Marbel Ramos,¹ Nemecio González,¹ Manuel Expósito,¹ Ruthdalys Segura,¹ Eladio Salazar,¹ Lesvia Calzada,¹ Ramón Hernández,¹ Ricardo Serrano² y Delmiro Sánchez¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 387, Camagüey, Cuba.

²División de Estreptoquinasa, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, apartado postal 6162, Ciudad de La Habana CP 10600, Cuba.

Introducción

La *Escherichia coli* no patogénica es un habitante común de la flora intestinal de los mamíferos y participa junto con otras bacterias en el sistema ecológico del intestino. Sin embargo, la *E. coli* patogénica se caracteriza por ser la causante de severas afecciones intestinales y extraintestinales, como la pielonefritis, las diarreas, la meningitis y otras (1, 2). Hoy, nuestro país cuenta con una vacuna recombinante (3) preventiva contra la enterotoxigenia neonatal y post-destete, la cual en ensayos de campo redujo la morbilidad hasta el 2,7 % y la mortalidad hasta el 1,2 % en las crías y el 0,6 % en las precebas. El presente trabajo tiene como objetivo optimizar el proceso de fermentación y purificación del antígeno recombinante K88 ab, así como realizar un estudio de campo para determinar el beneficio económico que reporta la vacunación con VACOLI^{MR}.

Materiales y Métodos

El proceso fermentativo de obtención del antígeno K88 ab se realizó en medio MINCA; (glucosa 1,1 g/L, extracto de levadura suplenteado hasta 10 g/L, hidrolizado de caseína 1 g/L, dihidrógeno fosfato de potasio 1,36 g/L, hidrógeno fosfato disodio 8,06 g/L, sales trazas 1 mL/L y ampicilina 100 µg/mL). Las condiciones de fermentación, fueron; en un fermentador (Marubishi BE, Japón) de 5 L de volumen efectivo, la temperatura 37 °C, pH 7,2, agitación a 250 rpm y el flujo de aire se redujo de 1 vvm (variante 1), hasta 0,2 vvm (variante 2).

La optimización de la etapa de purificación consistió en la incorporación y sustitución de algunos pasos del proceso. El proceso de purificación anterior incluía una extracción con 2 M de tampón de urea y fosfato 50 mM a pH 7,2; seguido de una precipitación de las proteínas del sobrenadante a 4 °C con sulfato de amonio al 60 % durante 12 h y de una desalinización por columna en una matriz de G-25. Finalmente se envasaba el sobrenadante de forma estéril.

En el nuevo proceso se estudiaron los pasos de lavado y extracción, con tres soluciones tampones diferentes; (a) TF (tampón fosfato) 50 mM con 0,9 % de NaCl y pH 7,2; b) TF 50 mM con 2 M de urea y pH 7,2; c) TF 50 mM a pH 7,2. Se incorporó el paso de precipitación isoeléctrica de K88 ab a pH 5,2, con HCl al 10 %. Cada paso fue seguido de una centrifugación a 7 000 rpm durante 60 min. El proceso finalizó con una resuspensión de la proteína precipitada con TF, 50 mM a 4 °C, seguido de una centrifugación a 7 000 rpm durante 30 min, se envasó el sobrenadante de forma estéril y se adicionó formalina al 0,5 % v/v.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (4), la pureza se estableció por electroforesis con SDS (5) y se utilizó un ELISA tipo Sandwich (6) para la determinación de la concentración de antígeno.

El ensayo de campo de la vacuna se realizó en todas las granjas pertenecientes a la Empresa Porcina de la Provincia de Camagüey, efectuándose la vacunación durante 12 meses consecutivos. Los resultados de morbilidad, mortalidad y beneficio económico, se compararon con el promedio obtenido en los últimos tres años anteriores a la vacunación.

Resultados y Discusión

Al comparar los resultados obtenidos entre las fermentaciones con las dos variables de flujo de aire se pudo apreciar que la reducción de oxígeno causó un incremento en la expresión del antígeno K88 ab de 27 mg/L hasta 160 mg/L.

El estudio de extracción con las tres soluciones tampones, así como la variación del pH de los mismos durante la precipitación, mostró que era posible obtener mayor porcentaje de antígeno en relación con las proteínas totales, con el empleo del tampón fosfato 50 mM a pH 5,2 (Tabla 1).

Finalmente el proceso optimizado consta de un lavado de la biomasa con TF 50 mM a pH 7,2, una

1. Korhoen TK, Vaisanen-Rhen V, Rhen M, Pere A, Parkkinen J, Finne J. *Escherichia coli* fimbriae recognizing sialyl galactosides. *J Bacteriol* 1984;159:762-766.

2. Morris JA, Sojka WJ, Ready RA. Serological comparison of the *Escherichia coli* strains for the F(Y) and AN25 adhesins implicated in neonatal diarrhoea in calves. *Res Vet Sci* 1985;38:246-247.

3. Wong I, Bover E, Ramos M, González N, Expósito M, Segura R et al. Eficacia en condiciones de campo de una vacuna recombinante contra la colibacilosis porcina. *Biotecnología Aplicada* 1996;13:16-19.

4. Lowry OH, Rosebrough J, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.

5. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.

6. Borroto A, Basulto R, Moreno M, Silva R, Wong I, Bover E et al. Clonación de las subunidades fimbrias K88 ab y K99 e identificación de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas aisladas de cerdos enfermos. *Biotecnología Aplicada* 1992;9:148-155.

Tabla 1. Resultados de la purificación con diferentes soluciones tampones y valores de pH.

Solución tampón	Extracción	
	a	b
TF + 0,9 % NaCl	44,7	69,5
TF + 2 M urea	45,4	76,4
TF. 50 mM	47,4	77,9

a: % de antígeno K88 ab con relación a las proteínas totales, extraído por calor

b: % de antígeno K88 ab con relación a las proteínas totales, precipitado con 10 % de HCl

extracción con la misma solución tampón 20 min a 60 °C, una precipitación isoelectrica con HCl al 10 % hasta llegar a pH 5,2; cada paso seguido de una centrifugación a 7 000 rpm durante 60 min. El proceso finaliza con una resuspensión del precipitado con TF 50 mM a 4 °C, seguido de una centrifu-

gación a 7 000 rpm durante 30 min, se le añade formalina hasta una concentración de 0,5 % v/v y se realiza su envase estéril.

Los resultados de la prueba de campo fueron satisfactorios. En la Tabla 2 se muestran las pérdidas que ocasionó, en la provincia de Camagüey, la colibacilosis porcina antes y después de la vacunación.

El gasto promedio se redujo, obteniéndose un beneficio económico para la provincia de 914 140 dolares más 810 240 pesos. Esto representa una recuperación del 87 % de la moneda convertible y el 97 % de la moneda nacional en la producción porcina en Camagüey.

La aplicación de Vacoli^{MR} en condiciones de campo proporcionó además una disminución de la morbilidad por *E. coli* hasta 0,9 % en las categorías de crías más precebas así como de la mortalidad hasta 0,3 % en crías y 0 % en precebas, ambas reportadas al segundo año de comenzado el proceso de vacunación.

Tabla 2. Resultados de la morbilidad y mortalidad antes y después de la vacunación con VACOLI^{MR}. Pérdidas económicas.

Tiempo de vacunación	Años	Morbilidad (%) crías + precebas	Mortalidad (%)		Pérdidas económicas por <i>E. coli</i> (promedio)
			crías	precebas	
Antes	1991	10	6	3	
	1992	13	7	4	1 050 810 USD
	1993	8,3	2,8	1,6	835 820 pesos
Después	1994	4,5	2,1	0,6	136 670 USD
	1995	0,9	0,3	0	25 579 pesos