

PURIFICACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE LA FRACCIÓN ANTIGÉNICA F1 DE *Yersinia pestis*

Seraylán S*, Vargas L*.

*División de reactivos, Kits de diagnóstico y medios de cultivo (REKMEC), Centro Nacional de Producción de Biológicos, Instituto Nacional de Salud.

RESUMEN

Se ha desarrollado la extracción y purificación de la fracción antigénica F1 de *Yersinia pestis* que se utilizará en la producción de un kit para el diagnóstico de peste. El proceso se realizó a partir de biomasa de una cepa patógena de *Yersinia pestis*, aislada en Chiclayo (1999), cuyos factores de virulencia fueron comprobados con la finalidad de determinar la presencia del antígeno en mención. La biomasa bacteriana fue inactivada con acetona fría, y la purificación parcial del antígeno se realizó mediante procesos de precipitación con sales y diálisis. Para confirmar la pureza del antígeno, éste se sometió a una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% y se evidenció la presencia de una banda de 17 kDa. Se sensibilizó glóbulos rojos de carnero, con la fracción antigénica F1, para la titulación de un suero Anti-F1 por hemaglutinación pasiva e inhibición de la hemaglutinación.

Palabras clave: Purificación, control de calidad, antígeno, *Yersinia pestis*.

ABSTRACT

The extraction and purification of Fraction-1 (F1) antigen of *Yersinia pestis* has been implemented to be used in the production of a plague diagnosis kit. The process was conducted from the biomass of a pathogenic strain of *Yersinia pestis* isolated in Chiclayo (1999), whose virulence factors were confirmed in order to determine the presence of the above-mentioned antigen. The bacterial biomass was inactivated in cold acetone and the antigen partial purification was performed by precipitation with salts and dialysis. To confirm the purity of the antigen, it was subject to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in 15% gel and a 17 kDa band was shown. Red blood cells from sheep were sensitized with purified fraction 1 antigen to titer an anti-F1 serum by passive hemagglutination and hemagglutination inhibition.

Key words: Purification, quality control, antigen, *Yersinia pestis*.

INTRODUCCIÓN

La peste sigue siendo un problema de salud pública en América, debido a la persistencia de la infección selvática y el nexo entre roedores silvestres y domésticos¹.

Son muchos los reportes que señalan a un componente glicoproteico llamado fracción antigénica F1, expresado a 37°C principalmente a nivel de cápsula de la bacteria^{2,3}. Este factor altamente inmunogénico, es en realidad una mezcla de dos proteínas heterogéneas, que en su estado nativo forman agregados entre 150-200 kDa. Una de las proteínas, F1A está asociada a un pequeño residuo de carbohidratos, y la otra, F1B tiene composición solo proteica⁴. Desde muchos años atrás ha sido el antígeno de elección para la producción de reactivos de diagnóstico.

Correspondencia: Silvia Seraylán. Instituto Nacional de Salud. Calle Cápac Yupanqui 1400, Lima 11, Perú. Apartado postal 471. Telf.: (0511) 4719920 - Fax: (0511) 4710179. Email: revmedex@ins.sld.pe

La fracción empleada en las pruebas de diagnóstico es F1A, que se disocia en subunidades de 17 kDa, localizado en el plásmido de virulencia de 90 kb⁴.

Es importante destacar, que la infección de la peste puede mantenerse latente en los focos enzoóticos durante un período largo de tiempo. Por tanto la ausencia de casos humanos no debe interpretarse como extinción del foco natural¹. Así, existen referencias internacionales de reemergencia de la enfermedad en Madagascar, donde se reporta la reaparición de la enfermedad desde 1990 con más de 200 casos confirmados anualmente⁵.

Los métodos serológicos permiten la detección de focos de peste activos en poblaciones de roedores, detectando anticuerpos específicos contra *Yersinia pestis*, siendo estos estudios las herramientas imprescindibles en todo programa de control de la enfermedad.

Los focos endémicos requieren de constante vigilancia, dado que la peste está sujeta al Reglamento Sanitario Internacional.

En la actualidad se viene desarrollando la vigilancia epidemiológica de la peste en la Región Norte del Perú en donde la prueba diagnóstica que se viene empleando es la hemaglutinación pasiva e inhibición de la hemaglutinación. Para la producción de este reactivo de diagnóstico, se ha venido utilizando el antígeno F1 proveniente del CDC-Atlanta.

Como el Centro Nacional de Producción de Biológicos (CNPB) tiene como función la de proveer los reactivos para este fin, el departamento de REKMEC se propuso realizar los estudios y experimentos necesarios para obtener la purificación de la fracción antigénica F1A. El presente trabajo presenta los resultados obtenidos en la purificación del antígeno F1A a partir de la biomasa bacteriana de una cepa de *Yersinia pestis* de la región norte del Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la extracción y purificación de la fracción antigénica F1A se empleó una cepa de *Yersinia pestis* de la región norte del Perú (Chiclayo), aislada en 1999, siguiendo la técnica de Baker con modificaciones⁶.

Se realizó la confirmación bioquímica y sensibilidad al fago pestoso; se determinaron los principales factores de virulencia: presencia del plásmido de 70 kb mediante crecimiento diferencial en agar MOX a 37°C y 28°C, presencia del plásmido de 9,5 Kb mediante la prueba de coagulasa, y pigmentación a 28°C con cultivos de la cepa en agar rojo de congo.

La biomasa de la bacteria se obtuvo cultivando la cepa en TSA y extracto de levadura, a partir de la cual se hizo extracción de antígenos solubles con SST (solución salina al 2,5% saturada con tolueno). Mediante técnicas de precipitación con sales de sulfato de amonio al 25 y 30% a pH 7,2, seguido de centrifugaciones y diálisis, se fraccionó el F1A, una glicoproteína de pI 4,6 del F1B, que es una proteína de pI 4,8.

El antígeno así purificado, se liofilizó y se realizó la determinación de proteínas por el método de Lowry⁷ usando como estándar albúmina sérica bovina (1 mg/mL = 0,66 Abs 280 nm).

Se determinó la pureza del antígeno por electroforesis en SDS-PAGE al 15%⁸⁻⁹. Asimismo, se sensibilizó hematíes de carnero con el F1 purificado para titulación de un suero control positivo por hemaglutinación pasiva e inhibición de la hemaglutinación¹⁰.

RESULTADOS

Los resultados de las pruebas bioquímicas y sensibilidad al fago pestoso, fueron las correspondientes a la especie (TSI: K/A, LIA: K/A, lisis bacteriana en presencia del fago pestoso).

Se comprobó la patogenicidad de la cepa de *Yersinia pestis*, en base a las características fenotípicas de la expresión de los plásmidos de virulencia. Así, se

observó crecimiento a 28°C en agar MOX que comprobó la presencia del plásmido de 70 kb. Se comprobó la pigmentación de las colonias en agar rojo de congo a 28°C y las cepas fueron coagulasa positiva, con lo cual se verificó la presencia del plásmido de 9,5kb.

El proceso de purificación del antígeno fue satisfactorio, como se comprueba con los resultados de la electroforesis en SDS-PAGE al 15%. Para la electroforesis se probó diferentes concentraciones de proteínas siendo la concentración proteica óptima del antígeno de 2 ug, en la que se visualizó la banda específica de 17 kDa (Figura 1). La concentración proteica del antígeno purificado fue de 3,6 mg/mL.

Los resultados de la sensibilización de los hematíes de carnero con el F1 purificado son satisfactorios, según se muestra en la Figura 2 en la que se comprobó el título de un suero anti F1 control (título de 1/2048 para la prueba de hemaglutinación pasiva y de 1/128 para la prueba de inhibición de la hemaglutinación).

Con el antígeno purificado se ha preparado un kit de diagnóstico por hemaglutinación pasiva. Por otro lado, se ha producido un lote piloto de conjugado para

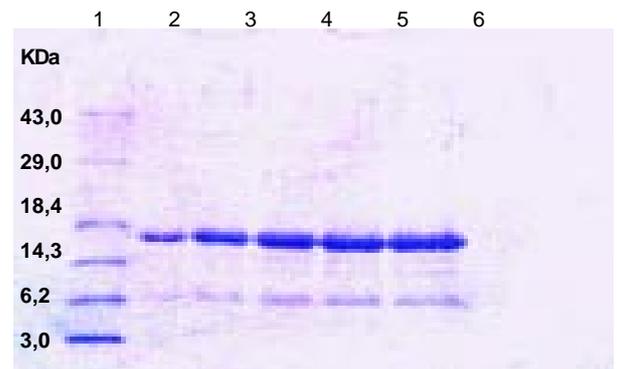


Figura 1. SDS-PAGE al 15%. 1. Estándar de P.M. de rango bajo, 2-6 (2,4,7,9 y 11 ug de antígeno F1).

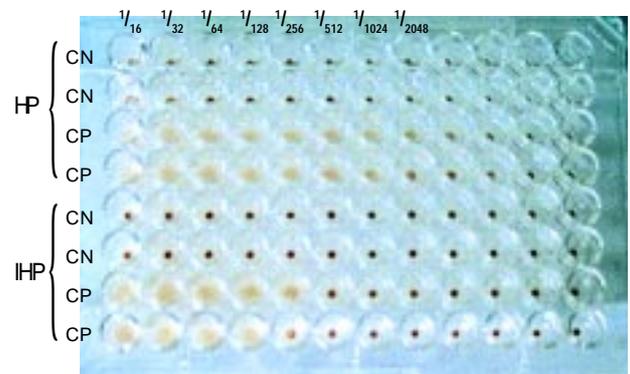


Figura 2. Hemaglutinación pasiva (HP) e inhibición de la hemaglutinación (IHP) con glóbulos rojos de carnero sensibilizados con F1. CN (Control Negativo) CP (Control Positivo).

el diagnóstico de peste por inmunofluorescencia directa.

En un futuro se piensa implementar otras técnicas de diagnóstico con el antígeno purificado para la detección de anticuerpos anti F1, como ELISA entre otras.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados confirman que el CNPB ya se encuentra en condiciones de producir el antígeno F1 de *Yersinia pestis* requerido para la preparación del reactivo de hemaglutinación y así cumplir con los requerimientos del Programa Nacional de Control de Zoonosis del Ministerio de Salud en lo que respecta a la vigilancia de la peste, programa que en el Perú empezó en 1999. Hasta hace poco el reactivo mencionado, se estuvo preparando con el antígeno F1 de procedencia del extranjero (CDC-Atlanta).

En el presente trabajo se demuestra que la purificación del antígeno F1A fue satisfactorio, obteniéndose la banda específica de 17 kDa en SDS-PAGE al 15% con una concentración de antígeno purificado de 3,6 mg/mL. lo que concuerda con lo reportado por Abath³ y Darveau⁴, trabajos en los que se menciona la presencia de la banda de 17kDa. Así mismo al someter a electroforesis el F1A del CDC con nuestro antígeno purificado obtuvimos la banda al mismo nivel en ambos casos.

En la prueba de hemaglutinación pasiva y la inhibición se obtuvieron títulos de 1/2048 y 1/128 respectivamente, con un suero anti F1 obtenido por inmunización de conejos con el F1 del CDC. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con el reactivo de hemaglutinación preparado con el F1 del CDC.

De otro lado, el hecho de haber obtenido la purificación de este antígeno nos permitirá en un futuro cercano empezar a implementar investigaciones que puedan permitir el reemplazo del método de hemaglutinación pasiva actualmente en uso, por otras

técnicas de diagnóstico más sensibles para la detección de anticuerpos anti F1 como es la técnica ELISA.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración del personal técnico del departamento de REKMEC, Tec. Lab. Carmen Quevedo Mendoza y Tec. Lab. Francisco Mendoza, por su participación en la ejecución del presente proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Acha P, Szyfres B.** Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Segunda Edición. Publicación Científica N° 503. Organización Panamericana de la Salud, 2001.
2. **Glosnicka R, Gruszkibwicz E.** Chemical composition and biological activity of the *Yersinia pestis* envelope substance. *Infect Immun* 1980; 30: 506-512.
3. **Abath F, Almeida A, Ferreira L.** Immunochemical localization of the fraction-1 antigen, a virulence determinant of *Yersinia pestis*. *An Acad Bras Sci* 1990; 62 (3): 30-34.
4. **Darveau R, Charnetzky W, Hulbert R.** Outer membrane protein composition of *Yersinia pestis* at different growth stages and incubation temperatures. *J Bacteriol* 1980; 143: 942-949.
5. **Akiew A.** Epidemiology and incidence of plague in the world. 1958-79. *Bull WHO* 1982; 60: 165-169.
6. **Baker E, Sommer H, Foster L, Meyer K.** Studies on immunization against plague. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. *J Immunol* 1952; 68: 131-145.
7. **Lowry O, Rosenbrough N.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
8. **Laemmli, U.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227: 680-685.
9. **BIO-RAD.** Laboratories. Acrylamide Polymerization - A practical Approach. US/EG Bulletin 1156, 2000.
10. **Bahmanyar M, Cavanaugh DC.** Plague Manual. WHO. Geneva, 1976.