

Comunicación corta

Optimización de un medio para el cultivo del candidato vacunal VC 638 de *Vibrio cholerae*.

Orlando Reyes-Zamora, Yenisey Luna-González, Rafael Fando-Calzada y Armando T. Hernández-García.

Dirección de Enfermedades Infecciosas, Dpto. de Bioquímica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y Calle 158, Playa, Apartado Postal 6414, La Habana, Cuba. **2085236 ext. 202** orlando.reyes@cnic.edu.cu

Recibido: 11 de junio de 2013.

Aceptado: 3 de octubre de 2013.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, viabilidad, velocidad específica de crecimiento.

Key words: *Vibrio cholerae*, viability, specific growth rate.

Vibrio cholerae es una bacteria enteropatógena, causante de cólera. Se ha descrito que la toxina colérica, proteína sintetizada por *V. cholerae* es la responsable de desencadenar el proceso diarreico por su acción sobre las células intestinales.¹ VC638 es una cepa de *Vibrio cholerae* modificada genéticamente lo que hace que sea atoxigénica.²

En el proceso de desarrollo industrial de la vacuna cubana contra el cólera, a partir de la cepa VC 638, se ha utilizado un medio basado en de triptona peptona,³ con una relación (6:1) aproximadamente. Este medio es costoso según los precios descritos para sus componentes por la compañía VWR,⁴ de los cuales las cantidades de triptona y peptona las variables a controlar, pues sus costos son los más elevados. De este modo, el objetivo de este trabajo consistió en evaluar la relación triptona-peptona en el medio a escala de, zaranda para reducir el costo en la fermentación de VC 638.

A partir esta la cepa VC 638, previamente conservada, se inoculó un precultivo con 50 mL de medio Luria-Bertani (LB) toda la noche. Posteriormente, 500 mL de cada variante de medio triptona-peptona (TP) fue inoculado con 1 mL de precultivo y crecido en zaranda a 37 °C. Se monitoreó su crecimiento mediante la determinación de la densidad óptica de los cultivos cada una hora para una longitud de onda de 600 nm, a partir de las respectivas curvas de crecimiento para cada variante.

Mediante el uso del *GraphPad Prism 5.0*, programa informático ampliamente empleado en el ajuste de modelos matemáticos para explicar fenómenos biológicos, se escogió el modelo logístico, que mejor explica el crecimiento celular en *Vibrio cholerae* VC638, y permite estimar la velocidad específica de crecimiento.⁵

Se realizó un diseño factorial D-óptimo mediante el programa *Design Expert*, con el objetivo de evaluar en el medio TP (compuesto por triptona, peptona, cloruro de sodio e hidrógenofosfato de potasio) el efecto de la variación de las concentraciones de triptona y peptona sobre el crecimiento de *Vibrio cholerae*. En tal sentido, se utilizaron como variables respuesta o funciones objetivo, la viabilidad celular y la velocidad específica de crecimiento. La matriz del diseño estuvo conformada por 13 experimentos, dos de ellos controles (variantes 4 y 10), con variación en las concentraciones de triptona y peptona. Para cada variante se utilizaron cuatro réplicas a escala de 100 mL y en cada caso se graficó la curva de crecimiento mediante el uso del *GraphPad Prism* y se obtuvo una superficie de respuesta con la ayuda del *Design Expert* (Fig.1).

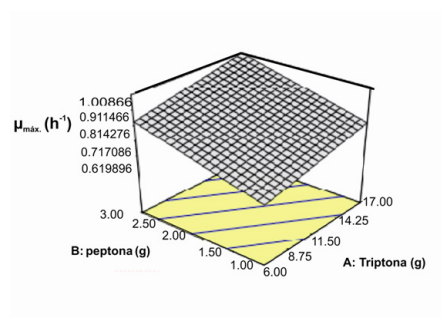


Fig. 1. Superficie de respuesta que establece la relación entre las concentraciones de triptona y peptona con la velocidad específica de crecimiento ($\mu_{\max}$) de VC 638.

Los datos de velocidad específica de crecimiento correspondiente a cada variante se compararon con las variantes 4 y 10, que corresponden a la composición del medio de cultivo TP mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, con una prueba *a posteriori* de Dunnett. Se observaron diferencias significativas para la variante 12 (relación 4 : 1 de triptona-peptona) con respecto al control ($p < 0,05$) (Fig. 2).

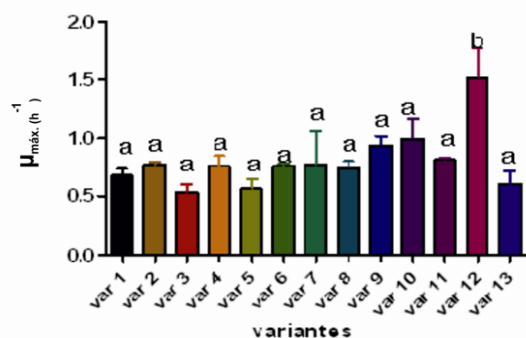


Fig.2 Velocidades específicas de crecimiento (h^{-1}) de las réplicas de cada variante del medio de cultivo durante el experimento a escala de 100 mL. Letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Los datos de viabilidad de todas las réplicas en el GraphPad Prism se transformaron a logaritmo decimal. Se realizó una prueba ANOVA de una vía para determinar las diferencias significativas de los tratamientos con respecto al control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en ninguna de las variantes analizadas.

Para determinar el costo final de cada formulación, se evaluó el costo del medio de cultivo TP, a partir de los precios referidos por la compañía VWR.⁴ Se relacionaron las cantidades utilizadas en cada variante con el precio para un litro de medio de cultivo y a partir de él, se determinó el costo final.

Con el fin de determinar el máximo valor de esta función objetivo se realizó una comparación de la función logaritmo de la viabilidad contra costo final ($\log X_v/\text{Costo final}$) para cada variante, mediante una prueba ANOVA de una vía y otra *a posteriori* de Dunnett, usando como control la variante 4 (medio TP original) pues en la misma no se introducen cambios en las concentraciones de los reactivos (Fig.3).

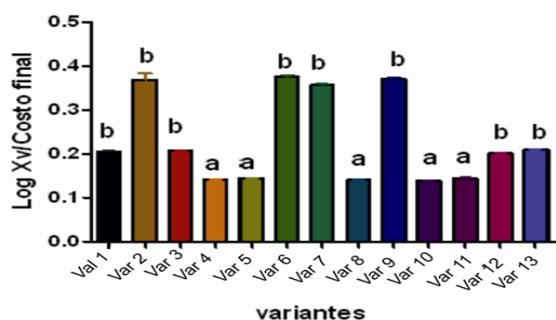


Fig. 3 Costo relativo de cada variante, en la optimización del medio para el cultivo de la cepa VC 638. Letras iguales denotan que no existen diferencias significativas en la relación ($\log X_v/\text{Costo final}$) es para una $p < 0,05$.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se aprecia que por concepto de costo relativo, existen varias posibilidades de variantes más económicas. Solo en un caso, la variante 12, se observó la mayor velocidad específica de crecimiento ($p < 0,05$) (Fig. 2), razón por la cual se decidió escalar a un volumen efectivo de 500 mL con dicha variante.

Se seleccionó la variante 12 designada como TPM, para la evaluación de las condiciones de cultivo a un volumen de 500 mL de medio de cultivo, con el objetivo de buscar reproducibilidad en los resultados obtenidos con 100mL evaluando las mismas variables.

En este caso, se incluyó una etapa de secado al vacío durante 6 h en condiciones análogas a las reportadas por García de Castro,⁶ la cual se realiza cuando el microorganismo está en fase estacionaria⁷ a partir de una mezcla lioprotectora a compuesta por leche descremada, sacarosa y ácido ascórbico en proporciones variables.

La variable viabilidad se evaluó en tres etapas: viabilidad final después de 15 h de cultivo, viabilidad de la crema (unión del pellet de centrifugación del cultivo con la mezcla lioprotectora) y viabilidad del liofilizado. La viabilidad del liofilizado estuvieron por encima de 10^9 Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/mL, lo cual se considera adecuado como dosis vacunal.⁸ Esto se corresponde con lo obtenido por García de Castro y Manzanera en trabajos previos al secar al vacío cepas de enterobacterias con un procedimiento similar al empleado en este trabajo.^{6,9}

Los resultados de viabilidad y velocidad específica de crecimiento, unidos a la disminución en un 30 % del costo del medio de cultivo TPM para la producción del candidato vacunal garantizan hacer más factible al proceso desde el punto de vista económico, aspecto a valorarse cuando se realice su escalado.

Teniendo en cuenta los resultados del presente trabajo, el medio de cultivo TPM pudiera ser una opción ventajosa para el escalado del candidato vacunal VC 638 según los aspectos cinéticos y de viabilidad celular previamente descritos. Se considera que el ahorro en recursos puede ser considerable teniendo en cuenta que este proceso se pretende llevar hasta escala productiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, Ryan ET, Calderwood SB. Cholera. *Lancet*. 2012; 379(9835): 2466-76.
2. García L, Jidy MD, García H, Rodríguez BL, Fernández R, Ano G, et al. The vaccine candidate *Vibrio cholerae* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. *Infect Immun*. 2005; 73(5): 3018-24.
3. Talavera A, Año G, García H, Moreira T, Delgado H, Riveron L, et al. Process development for a Cuban cholera vaccine based on the attenuated strain *Vibrio cholerae* 638. *Vaccine*. 2006;24(18):3746-9.
4. VWR International, LLC 2009 [Consultado 20 de septiembre de 2012]. Disponible en: www.vwr.com.
5. Hernández A, Luna Y, Plasencia C, Fando R. Parámetros cinéticos y simulación del proceso fermentativo de la cepa atenuada 638 de *Vibrio cholerae*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2012; 42(3).
6. García de Castro A, Bredholt H, Strom AR and Tunnacliffe. *A Anhydrobiotic Engineering of Gram-negative bacteria. Appl. Environm. Microbiol.* 66 (2000); 4142-4.
7. Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van 't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol.* 1990; 56(6):1875-81.
8. Nan F, Xiao DC. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*. 2011; 44: 1127-49.
9. Manzanera M, Vilchez S, Tunnacliffe A. High survival and stability rates of *Escherichia coli* dried in hydroxyectoine. *FEMS Microbiology Letters*. 233 (2004): 347-52.