

Obtención de antisueros contra antígenos somáticos para la identificación de *Vibrio cholerae*

Hilda María García, Roxana Domínguez, Bárbara Cedré, Luis García, Reynaldo Oliva, Vismar Torres y Arturo Talavera

Instituto Finlay. Centro de Investigación - Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana. Cuba.

Los antisueros contra antígenos somáticos para la identificación de *Vibrio cholerae* O1 y O139, se han usado como herramienta epidemiológica para determinar el papel de estos microorganismos en la etiología de la diarrea humana, así como para investigar la correlación entre los diferentes serogrupos. Se inocularon por vía intravenosa conejos adultos con peso entre 2-2,5 Kg con cinco dosis de células enteras de los serotipos Inaba, Ogawa y del serogrupo O139 inactivadas por calor. A los 27 días se desangraron y los sueros obtenidos se absorbieron con la cepa de referencia CA385 y posteriormente con cepas del serotipo heterólogo. Se comprobó la ausencia de reacción cruzada enfrentando el suero absorbido frente a los distintos serotipos por aglutinación en lámina. Se alcanzaron títulos de 1/64 y los resultados coincidieron cuando se utilizaron sueros de referencia y los antisueros obtenidos, en la identificación de cepas de *V. cholerae* aisladas a partir de muestras de heces fecales e hisopados rectales de conejos inmunizados por vía oral con cepas vivas candidatas a vacuna oral y la caracterización de cepas epidémicas de diferentes procedencias.

Palabras claves: *V. cholerae* O1 y O139, antisueros, serodiagnóstico.

Introducción

V. cholerae, se divide en el serogrupo O1 y en aquellos que no aglutinan con el antisuero O1, denominados colectivamente como *V. cholerae* no O1 (1). Entre las cepas de *V. cholerae* O1 se incluyen dos biotipos: Clásico y El Tor. Ambos se encuentran separados en las formas antigénicas denominadas Ogawa e Inaba y raramente en un tercero Hikojima y son reconocidas con la fórmula antigénica AB, AC y ABC, según las diferentes características estructurales del polisacárido O (2).

Las cepas del serogrupo O1 causan cólera y tienen potencial epidémico y pandémico, mientras que *V. cholerae* NO O1 se encuentra ampliamente distribuido en los medios acuáticos y es responsable de gastroenteritis esporádica y de infecciones extraintestinales (3). Sin embargo, fue reportada una cepa de *V. cholerae* NO O1 clasificada como serogrupo O139 que produce toxina de cólera y ha estado implicada en epidemias de diarrea semejante al cólera en la India y Bangladesh (4).

EL lipopolisacárido (LPS) de las bacterias gramnegativas es la molécula más abundante en la superficie de la célula y constituye una barrera protectora a agentes hidrofóbicos y detergentes. El LPS consiste en 3 regiones distintas: el lípido A, el cual forma parte de la bicapa lipídica de la membrana externa, la región "core" oligosacáridica y el antígeno O, serotipo específico que es la región más externa. El antígeno O somático es un polisacárido con especificidad antigénica y es el antígeno más importante en las pruebas de diagnóstico (5).

Generalmente el diagnóstico de cólera en el laboratorio se lleva a cabo mediante el cultivo de muestras, siendo un proceso

largo y laborioso. Sin embargo la prueba serológica en lámina resulta de gran utilidad y es suficiente para la identificación preliminar de *V. cholerae* O1 y O139 (6,7). Por ello los sueros somáticos constituyen una herramienta auxiliar inapreciable para las investigaciones ecológicas y etiológicas de *V. cholerae* (7).

En el presente trabajo se exponen los resultados de la obtención, control y caracterización parcial de antisueros contra antígenos somáticos para los serogrupos O1 y O139 de *V. cholerae* y su utilización en la identificación de cepas de *V. cholerae* aisladas a partir de muestras de heces fecales e hisopados rectales de conejos inmunizados por vía oral con cepas vivas atenuadas, candidatas a una vacuna oral y en la caracterización de cepas epidémicas de diferentes procedencias.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

De las 45 cepas de *V. cholerae* incluidas en este estudio, cinco eran de referencia, donadas por el Dr. Richard Finkelstein, del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Missouri, E.U. y se emplearon para la obtención, absorción y control de los sueros de aglutinación; 27 cepas epidémicas de diferentes procedencias; 12 cepas atenuadas por ingeniería genética, candidatas a una vacuna oral contra cólera, obtenidas por el Laboratorio de Genética Molecular del CENIC, Cuba, y una cepa vacunal licenciada del CVD, EE.UU.

Preparación del antisuero

Las cepas de referencias (NIH41, NIH35A3 y MO45) se cultivaron en caldo Triptona Soya a 37 °C y 200 rpm durante 8 horas. Los cultivos se inactivaron a 100 °C durante 2 horas y posteriormente se centrifugaron a 15 000 g por 15 minutos; la biomasa fue lavada dos veces con solución salina fisiológica al 0,85% y se resuspendió en la misma solución, ajustándose finalmente la suspensión bacteriana a una densidad óptica de 1.00 en un fotocolorímetro a una longitud de onda de 540 nm (7).

El modelo animal empleado fue conejos Nueva Zelandia de 2,0-2,5 Kg de peso, los cuales fueron inoculados por vía intravenosa a intervalos de 4 días con 0,5; 1; 2; 4, y 4 mL respectivamente de la suspensión celular de DO=1.00. Antes de cada inmunización se extrajo 5 mL de sangre y el suero se tituló por aglutinación rápida en lámina. A los 27 días de inmunizados los conejos fueron desangrados y se colectó la sangre. El suero se separó e inactivó a 56 °C por 30 minutos y se conservó a -20 °C hasta su uso (7).

Absorción de los sueros inmunes

Las cepas CA385, O22, NIH35A3 y NIH41 fueron crecidas en césped en placas de Agar Triptona Soya (TSA) a 37 °C por 24 horas, cada placa se colectó con 5 mL de solución salina fisiológica e inactivó a 100 °C por 1 hora. Las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 15 000 g por 15 minutos. La absorción se realizó mezclando 5 mL de suero inmune con la biomasa obtenida de la centrifugación (7). Para evitar una falsa aglutinación con colonias rugosas se absorbió con la cepa CA385 (8) y después con las cepas heterólogas. Las mezclas se incubaron a 50 °C por 1 hora y posteriormente se centrifugaron a 15 000 g por 30 minutos (7). A cada antisuero absorbido se le añadió tiomersal al 0,01% como preservativo, almacenándolos a 4 °C hasta su uso (9).

Titulación de los antisueros

Se utilizó la Técnica de Aglutinación en Lámina según Janda y Col (3); una asada de inóculo bacteriano procedente de cuñas de TSA, se mezcla con diluciones dobles en solución salina del antisuero a titular. Se consideraron positivas aquellas reacciones que ocurrieron en un minuto.

Control de especificidad de los antisueros somáticos obtenidos

Se prepararon diluciones 1:3, 1:5 y 1:10 a partir de antisueros con un título de 1/64 en solución salina fisiológica estéril, siguiendo la metodología recomendada en el Manual de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (6). Se colocó una gota (50 µL) de cada dilución en una zona marcada sobre una lámina o placa. Para cada cepa se colocaron dos testigos negativos, uno con una gota de solución salina al 0,85% y el otro con una gota de suero normal estéril de conejo (SNC). Como controles positivos se emplearon antisueros de referencia polivalentes O1 y monovalentes Ogawa e Inaba (Murex Diagnostics).

Se preparó una suspensión de *V. cholerae* de la cepa correspondiente (Mc Farland 2 ó 3) en solución salina con colonias de un cultivo de 18-24 h en TSA. Se agregó una gota de la suspensión a cada dilución del antisuero y a los testigos de solución salina y de SNC. Se mezcló bien y se agitó continuamente la lámina de 30 segundos a 1 minuto. Se leyó la reacción de aglutinación sobre una caja con luz o una fuente de luz indirecta con fondo oscuro. El criterio para la lectura de los resultados en cuanto al grado de aglutinación fue el siguiente:

Título	% de aglutinación
4+	100
3+	75
2+	50
1+	25
0+	0

Para que la prueba sea considerada válida los testigos no deben aglutinar (6).

Fueron empleadas 12 cepas atenuadas candidatas para una vacuna oral contra *V. cholerae* construidas en el laboratorio de Genética del CENIC (10, 11) y la cepa CVD 103 HgR (12) todas aisladas a partir del hisopado rectal (HR) y heces (HF) de conejos inmunizados oralmente (13); a 24 cepas epidémicas de *V. cholerae* O1 y a 3 cepas de *V. cholerae* O139, después de su caracterización e identificación microbiológica en el laboratorio de Bacterias Enteropatógenas del Instituto Finlay.

Resultados y Discusión

Las condiciones de cultivo y el esquema de inmunización utilizado resultaron adecuados para la producción de antisueros contra *V. cholerae* O1 y O139. Los títulos obtenidos de los sueros inmunes por la prueba de aglutinación en lámina fue de 1/64.

Las cepas de un serotipo frecuentemente reaccionan de forma cruzada, lenta y débilmente con el antisuero de otro serotipo, lo cual depende de la calidad de la absorción. En este trabajo se logró absorber totalmente los antisueros Inaba y Ogawa con cultivos heterólogos, al igual que el antisuero O139 con células de la cepa del serogrupo O22.

En el control de los antisueros contra antígenos somáticos se obtuvo una aglutinación positiva en 30 segundos cuando se enfrentaron las cepas NIH35A3 y NIH41 a las diferentes diluciones del suero polivalente. Para la dilución 1/3 se obtuvo un título de 4+, para un 100% de aglutinación, en la dilución 1/5 un título de 3+, para un 75%, y para la dilución 1/10 un título de 2+, para un 50% y se esperó hasta un 1 minuto para considerar positiva la reacción (Tabla 1).

No se observó aglutinación con la cepa MO45 y los testigos de salina y SNC, corroborando la posible utilización del antisuero polivalente para la identificación de *V. cholerae* O1. Los cultivos identificados como *V. cholerae* O1, al enfrentarse a los sueros monovalentes Ogawa e Inaba, arrojaron similares resultados

Cólera. Selección de Publicaciones

para la aglutinación en las diluciones realizadas. Iguales resultados se obtuvieron cuando se enfrentó el cultivo de la cepa MO45 a las diferentes diluciones del antisuero O139 y no

se obtuvo autoaglutinación en los testigos salina y SNC (Tabla 1).

Tabla 1. Control de los antisueros contra antígenos somáticos

	Antisuero Polivalente O1			Antisuero Inaba			Antisuero Ogawa			Antisuero O139			SNC ¹	Salina
Cepa/Dil.	1/3	1/5	1/10	1/3	1/5	1/10	1/3	1/5	1/10	1/3	1/5	1/10	-	-
NIH35A3	4+	3+	2+	4+	3+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-
NIH41	4+	3+	2+	-	-	-	4+	3+	2+	-	-	-	-	-
MO45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4+	3+	2+	-	-

1. Suero normal de conejo.

Todas las cepas atenuadas candidatas a una vacuna oral contra cólera aisladas del HR y HF de conejos inmunizados por vía oral aglutinaron con el antisuero específico correspondiente al serotipo de su cepa parental. La mutación realizada a las cepas vacunales en los genes que codifican para las principales toxinas, no afectó los genes involucrados en la biosíntesis del antígeno O, ni tampoco se observó conversión de Inaba a Ogawa ó viceversa *in vivo* o *in vitro* debido a esta mutación (Tabla 2), tales resultados coincidieron cuando se utilizaron los antisueros obtenidos por nuestro laboratorio y los de referencia.

De las 27 cepas epidémicas de *V. cholerae* O1, 16 aglutinaron con el antisuero Inaba y 8 con el Ogawa; las 3 cepas de *V. cholerae* O139 resultaron negativas frente al antisuero polivalente O1 y positivas frente al O139 (Tabla 3), resultando un 100% de coincidencia con la clasificación de las cepas estudiadas, lo que corrobora la especificidad de los antisueros obtenidos.

La obtención de antisueros somáticos es una opción muy recomendable para el diagnóstico rápido de ambos serogrupos de *V. cholerae*.

Tabla 2. Identificación serológica de cepas vivas atenuadas de *V. cholerae* aisladas de hisopado rectal y heces

Cepas ¹	Polivalente ² O1	Antisuero ³ Inaba	Antisuero ⁴ Ogawa	Antisuero ⁵ O139
569B	+	+	-	-
CVD103 HgR	+	+	-	-
C7258	+	-	+	-
81	+	-	+	-
82	+	-	+	-
87	+	-	+	-
88	+	-	+	-
638	+	-	+	-
72	+	-	+	-
SG251	-	-	-	+
251-a	-	-	-	+
C6706	+	+	-	-
413	+	+	-	-
417	+	+	-	-
1332	+	+	-	-
1333	+	+	-	-

Cepas Parentales: C7258 (El Tor Ogawa); C6706 (El Tor Inaba); 569B (Clásico Inaba); SG251 (O139). Cepas Vacunales: 81; 82; 87; 88 (ctxA⁻ ctxB⁻ zot⁻ ace⁻ orfU⁻ cep⁻) mutantes a partir de la C7258; 638 (ctxA⁻ ctxB⁻ zot⁻ ace⁻ orfU⁻ cep⁻ hap: celA) mutante a partir de la 81; 413 y 417 (ctxA⁻ ctxB⁻ zot⁻ ace⁻ orfU⁻ cep⁻) mutantes a partir de la C6706; 1333 y 1332 (ctxA⁻ ctxB⁻ zot⁻ ace⁻ orfU⁻ cep⁻ hap: celA) mutantes a partir de la 413; CVD 103 HgR (ctxA⁻ hlyA: HgR) mutante a partir de la 569B. 2, 3, 4, 5. Los resultados coinciden tanto con los antisueros de referencia como con los obtenidos en este trabajo.

Tabla 3. Identificación serológica de cepas epidémicas de *V. cholerae* de diferentes procedencias

Antisuero

Cólera. Selección de Publicaciones

Cepas ¹	Antisuero Polivalente O1	Inaba	Ogawa	Antisuero O139
CA401	+	+	-	-
Lou 15	+	+	-	-
Zaire	+	-	+	-
17	+	+	-	-
62746	+	+	-	-
Ecuador	+	+	-	-
Lima	+	+	-	-
Gamene	+	-	+	-
Malawy	+	+	-	-
4685	+	+	-	-
41	+	+	-	-
34	+	-	+	-
C6706	+	+	-	-
C7258	+	-	+	-
Nig. B	+	-	+	-
Nig. C	+	+	-	-
Nig. D	+	+	-	-
8809	+	+	-	-
8811	+	+	-	-
8814	+	-	+	-
8816	+	-	+	-
8819	+	+	-	-
8820	+	+	-	-
8825	+	-	+	-
MDO12	-	-	-	+
SG251	-	-	-	+
1839	-	-	-	+

Cepas epidémicas caracterizadas microbiológica, bioquímica y serológicamente en el Laboratorio de Bacterias Enteropatógenas del Instituto Finlay.

Referencias

- Sakazaki R, Shimada T. Serovars of *V. cholerae* identified during 1970-1975 [Report]. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 1977; 30: 279.
- Sakazaki R, Donovan TJ. Serology and epidemiology of *V. cholerae* and *Vibrio mimicus* In Bergan Y, ed. *Methods in microbiology*. London: Academic Press. 1984.
- Janda JM, Powers C, Bryant RG, Abott SL. Current perspectives on the epidemiology and pathogenesis of clinical and significant vibrio spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 1981; 245-267.
- Albert MJ, Siddique AK, Islam MS, Faruque ASG, Ansaruzzaman M, Faruque AM, Sack RB. Large outbreak of clinical cholera due to *V. cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet.* 1993; 341:704.
- Stroehrer UH, Karageorgos LE, Morona R, Manning PA. Serotype conversion in *V. cholerae* O1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992; 89: 2566-2570.
- CDC, NCID, OPS. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *V. cholerae*. Programa especial de publicaciones. Washington, D. C., Estados Unidos. 1994.
- Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Okitsu T, Matsuchima A, Asai Y, Yamai S, Nakazato T, Balakrish N, Albert JM, Takeda Y. Extended Serotyping Scheme for *V. cholerae*. *Current Microbiology.* 1994; 28: 175-178.
- Shimada T, Sakazaki R. R antigen of *V. cholerae*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1973; 26: 155-160.
- Bhattacharya FK. *V. cholerae* flagellar antigens: a serodiagnostic test, functional implications of H- reactivity and taxonomic importance of cross- reaction within the *Vibrio* genes. *Med. Microbiol. Immunol.* 1975; 162:29.
- Benítez JA, Silva A, Rodríguez BL, Fando R, Campo J, Robert A, García H, García L, Pérez JL, Oliva R, Torres R and Ledon T. Genetic manipulation of *V. cholerae* for vaccine development: construction of life attenuated El Tor candidate vaccine strains. *Archives of Medical Research.* 1996; 27(3):275-283.
- Fando R, Pérez J L, Rodríguez B L, Campos J, Robert A, García L, Silva A, Benítez JA. Promoter activities in *V. cholerae* ctx Φ Prophage. *Infect. Immun.* 1997; 65:1561-1565.

12. Levine MM, Tacket CO. Recombinant live cholera vaccine. In Wachsmuth I K, Blake PA, Olsvick O, Eds. *V. cholerae and cholera, Molecular, to global perspectives*. Washington; D.C: ASM Press;1994.
13. García HM, García L, Oliva R, Pérez JL, Cedré B, Domínguez R, Benítez JA. Estudio del patrón de excreción y la capacidad productora en conejos inmunizados oralmente con cepas atenuadas de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor. [Aceptada para publicar en la *Revista Cubana de Medicina Tropical*]. 1997.

Production of antiseras against somatic antigens for the identification of *Vibrio cholerae*

Abstract

Antisera against somatic antigens to identify *V. cholerae* O1 and O139, have been used as epidemiologic tool to determine the role of these microorganisms in the ethiology of human diarrhea, and to investigate the correlation among different serogroups. Adult rabbit were inoculated with five doses of heat inactivated whole cells from Inaba, Ogawa and O139 serogroup. Twenty-seven days later, rabbits were bled and the obtained sera were absorbed with CA385 reference strain and with heterologous serotype. Lack of cross reaction was demonstrated mixing absorbed serum with the three serotypes by slide agglutination. Titres of 1/64 were obtained and the results coincided with reference sera in the identification of *V. cholerae* strains isolated from feces and rectal swab of rabbits immunized through oral route with live strains candidates to oral vaccine and in the characterization of epidemic strains of different origins.

Key Words: *V. cholerae* O1 and O139, antisera, serodiagnosis.