

Inhibición del efecto anticolonizante del suero positivo de humanos inoculados con la cepa atenuada 638, *Vibrio cholerae* O1

✉ José L Pérez, Yadira Pino, Tania Valmaseda, Gemma Año López, Bárbara Cedré, Hilda García, Arturo Talavera, Luis García Imia

Instituto Finlay, Centro de Investigación y Producción de Sueros y Vacunas.
Ave. 27 No. 19805, La Lisa. AP 16017, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba.
Fax: (53-7) 208 6075; Phone: (53-7) 202 0986; E-mail: jlperez@finlay.edu.cu

RESUMEN

Como parte de los estudios hacia la obtención de una vacuna contra el cólera, se evaluó la capacidad anticolonizante del suero de humanos después de la inoculación por vía oral de una dosis de la cepa atenuada 638 y se realizaron estudios de inhibición. Se utilizaron antígenos de la superficie externa de *Vibrio cholerae* O1 tales como los lipopolisacáridos Ogawa, Inaba y del serogrupo O139, proteínas de membrana externa (PME) y el complejo antigénico de 20 kD. Se utilizó el modelo del ratón neonato. El suero positivo mostró una elevada actividad anticolonizante. En los estudios de inhibición por antígenos, se observó que el lipopolisacárido Ogawa disminuyó significativamente la capacidad anticolonizante del suero positivo. El complejo antigénico de 20 kD, el lipopolisacárido Inaba y las PME mostraron un efecto inhibitorio menor y diferencial; el lipopolisacárido O139 no mostró efecto inhibitorio. Estos resultados permitieron confirmar que el antígeno más importante desde el punto de vista protectogénico es el lipopolisacárido, aunque existen otros antígenos en la superficie celular de *V. cholerae* involucrados en la inducción de una inmunidad protectora. Los resultados descritos en este trabajo pueden contribuir a dilucidar los mecanismos de inmunidad protectora contra *V. cholerae* y estimular el uso de variantes de vacunas conjugadas y vacunas por subunidades.

Palabras claves: cólera, modelos animales, protección mediada por sueros, vacunas

Biotecnología Aplicada 2002;19:19-24

ABSTRACT

Inhibition of Anti-colonizing Effect of Positive Serum from Humans Inoculated with the Attenuated Strain 638 *Vibrio cholerae* O1. As a part of the study to obtain an oral vaccine against cholera, the anti-colonizing capacity of the human serum, extracted after an oral dose with the attenuated strain 638, was evaluated. Inhibition studies with somatic antigens of *Vibrio cholerae* O1-like, Ogawa and Inaba lipopolysaccharide (LPS), outer membrane proteins (OMP) and the 20-kD antigenic complex as well as the LPS of the O139 serogroup, were done. The neonatal mice model was utilized. The positive serum showed a high anti-colonizing activity. In the antigen inhibition studies, it was observed that the Ogawa LPS reduced the anti-colonizing capacity of the positive serum. The 20-kD antigenic complex, the Inaba LPS and the OMP showed a lower and differential inhibitory effect. These results confirm that the most protective antigen is the homologous LPS, although there are other cellular surface antigens involved in the induction of protective immunity. The results here described contribute to understand the mechanism of protective immunity against *V. cholerae* and stimulate to employ of conjugated vaccine.

Keywords: animal models, cholera, serum-mediated protection, vaccine

Introducción

El cólera es una de las infecciones entéricas que ha incidido más drásticamente en la salud de la población mundial y que continúa azotando con furia a muchos países, en especial a los del mundo en desarrollo [1].

Hasta 1992, el *Vibrio cholerae* se dividía en el serogrupo O1 y 137 serogrupos no-O1, que se diferenciaban entre sí por la reacción con el anticuerpo polivalente contra el antígeno O del lipopolisacárido (LPS) de la pared celular. El LPS de *V. cholerae* es la molécula más abundante en la superficie de la célula y forma parte de la barrera protectora frente a agentes hidrofóbicos y detergentes. La estructura química del LPS consta de tres regiones químicamente definidas: el lípido A, el núcleo oligosacárido y el antígeno O. El lípido A forma parte de la bicapa lipídica de la membrana externa, el núcleo se une al lípido A a través de una molécula conoidea como KDO (*keto-3-deoxy-d-mannose-octulosónico*

acid). La región más externa es el antígeno O, el cual se une al núcleo oligosacárido [2].

A fines de 1992 se describió en la India una nueva cepa de *V. cholerae* que no aglutinaba con el anticuerpo polivalente contra el antígeno O del LPS de cepas O1, ni con ninguno de los anticuerpos contra los 137 serogrupos restantes en aquel entonces; esta cepa causó brotes de cólera posteriores en China, Tailandia, Malasia, Nepal y Pakistán, indistinguibles a los producidos por las cepas O1 [3]. Esta nueva cepa se ubicó en un nuevo serogrupo, el O139. En la actualidad, se conocen 156 serogrupos de *V. cholerae*, el serogrupo O1 y 155 serogrupos no-O1, de los cuales sólo los serogrupos O1 y O139 son capaces de producir cólera epidémico [4]. El serogrupo O1 se divide en dos biotipos: Clásico y El Tor, de acuerdo con el comportamiento de las diferentes cepas frente a determinadas pruebas bioquímicas (sensibilidad a los bacteriófagos, sensibili-

1. Tacket CO, Cohen MB, Wasserman SS, Losonsky G, livio S, kotloff K, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentered trial of the efficacy of a single dose of live oral cholera vaccine CV103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba three months after vaccination. *Infect Immun* 1999;67:6341-5.

2. Bennis ML. Cholera: pathophysiology, clinical features, and treatment. In: Wachsmuth IK, Blake PA, editors. *Vibrio cholerae*, and cholera: molecular to global perspectives. Washington, D.C.: ASM Press; 1994. p.229-55.

3. USA-Japan cooperative medical program. 29 joint conference on cholera and related diarrhoeal diseases. The cooperative medical program; 1993.

dad a la polimixina B y expresión de hemolisinas). Cada biotipo se divide a su vez en dos serotipos: Ogawa e Inaba, según la reacción con anticuerpos monovalentes dirigidos contra los determinantes antigénicos específicos para cada serotipo. Para el serogrupo O139 no se han establecido aún las bases de su clasificación para el biotipo y serotipo.

La colonización intestinal en humanos por cepas de *V. cholerae* constituye el evento primario y más importante para el desarrollo de los mecanismos de patogenicidad y de una respuesta inmune efectiva. La enfermedad ha sido diagnosticada por la detección de vibrios en las heces fecales, lo cual refleja su multiplicación en el intestino delgado y su posterior excreción [5]. Se ha planteado que la inducción de una respuesta protectora contra la infección por *V. cholerae* es altamente dependiente de una correcta estimulación del sistema inmune de mucosa [6]. Por esta razón, en la actualidad se trabaja intensamente para obtener una vacuna eficaz contra esta enfermedad, que sea administrada por vía oral [3].

En el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), de La Habana, Cuba, en colaboración con el Instituto Finlay se han logrado diferentes cepas vivas atenuadas, candidatas a una vacuna oral contra el cólera. El candidato más avanzado en los estudios es la cepa atenuada 638, *V. cholerae* O1, El Tor Ogawa, que se obtuvo a partir de la cepa salvaje C7258 y que a diferencia de otras cepas atenuadas obtenidas en otros laboratorios en el mundo, contiene un marcador genético que consiste en la inactivación del gen *hap* por sustitución con el gen *celA*, que codifica para la enzima endoglucanasa A, la cual degrada la carboximetil celulosa [7]. La cepa atenuada 638 (CTX Φ -, *hap*::*celA*) está aún en evaluación y hasta la fecha ha demostrado ser consistentemente inmunogénica y bien tolerada en voluntarios cubanos sanos [8] y ecuatorianos (trabajo de próxima aparición). La capacidad protectora del suero positivo de voluntarios inoculados por la vía oral con la cepa atenuada 638, *V. cholerae* O1, El Tor Ogawa, se ha evaluado en dos de los más importantes modelos animales utilizados en las investigaciones sobre el cólera, el modelo del intestino ligado de conejo y el del ratón neonato [9], también se ha evaluado la actividad vibriocida de este suero y se realizaron investigaciones por ELISA y de inhibición por antígenos de su actividad vibriocida y protectora así como estudios de especificidad (trabajos de próxima aparición).

En esta investigación se describe la inhibición por antígenos de la capacidad anticolonizante del suero positivo de humanos inoculados con la cepa atenuada 638 para determinar cuáles son los antígenos de la superficie celular de *V. cholerae* que se encuentran involucrados en la generación de anticuerpos séricos en humanos, que muestran actividad anticolonizante en el modelo del ratón neonato. Uno de los antígenos utilizados fue denominado complejo antigénico de 20 kD que contiene una importante fracción de TcpA (proteína fimbrial de 20 kD, comprobada por medio de un *dot blot* en el que se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo, que en inmunomicroscopía electrónica reconoce antígenos fimbriales en la superficie de cepas clásicas) que es pobremente inmunogénica en humanos después de una inmunización por vía oral con bacterias vivas [10], pero que contiene una proteína de membra-

na externa (PME) de 20 kD (reconocida por el suero positivo en *western blot*), que se ha comprobado que es inmunogénica y protectogénica en humanos [11].

Si bien en esta investigación no se evalúa la actividad vibriocida del suero positivo, es útil informar algunos resultados logrados en este aspecto en una etapa de trabajo anterior, porque aportan conocimientos sobre propiedades del suero. El suero positivo mostró un título de anticuerpos vibriocidas en el rango de 1280 a 20480 [8]. La media geométrica de los títulos de anticuerpos vibriocidas de este suero contra *V. cholerae* VC12 (Clásico Ogawa), determinado experimentalmente, fue 8610.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas de *V. cholerae* O1 y la cepa O139, utilizadas en estos estudios aparecen en la Tabla 1. Para los ensayos biológicos, las cepas a utilizar fueron cultivadas en un medio compuesto por Peptona de carne (MERCK, Alemania) 3 g/L, Triptona (MERCK, Alemania) 17 g/L, K₂HPO₄ (MERCK, Alemania) 2,5 g/L y NaCl₂ (MERCK, Alemania) 5 g/L, pH 7,2, durante 6 h a 37 °C y 200 rpm de agitación rotacional. Para los cultivos destinados a la obtención de biomasa para purificar LPS y PME, las cepas a utilizar fueron cultivadas en medio Caldo-Triptona-Soya (TSB), según recomendaciones del fabricante (BIOCEN, Cuba) durante 8 h a 37 °C a 200 rpm de agitación rotacional. Los cultivos destinados a la purificación del complejo antigénico de 20 kD fueron elaborados según el método de AKI [18].

Preparación del suero positivo y negativo

Las muestras de suero de los voluntarios inoculados con la cepa atenuada 638 y que participaron en los ensayos, se obtuvieron por extracción de sangre antes de la inoculación y a los 7, 14, 21 y 28 días posteriores a la misma. Las muestras de suero se analizaron mediante el uso de diferentes técnicas inmunoquímicas: i) ensayo inmunoenzimático de fase sólida (ELISA) para la determinación del título de anticuerpos IgG e IgA contra el LPS Ogawa; ii) células formadoras de anticuerpos IgA (ELISPOT) contra el LPS Ogawa y iii) ensayo vibriocida [8]. Los sueros de 14 voluntarios inoculados con la cepa 638 que antes de la inoculación (T₀) no fueron reactivos en las técnicas inmunoquímicas antes mencionadas (resultados inferiores al valor de corte de la prueba) y que

4. Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Okitsu T, Matsushima A, Asai Y, Yamai S, et al. Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology* 1994; 28:175-8.

5. Siebers A, Finlay BB. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infection. *Trends Microbiol* 1996;4:22-9.

6. Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, Cryz SJ, Edelman R, Fasano A, et al. Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD110, a DctxA DzoI Dace derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis* 1993;168:1536-40.

7. Robert A, Silva A, Benítez JA, Rodríguez BL, Fando R, Campo J, et al. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain disruption of its hemagglutinin / protease gene using a novel reporter enzyme: Clostridium thermocellum endoglucanase A. *Vaccine* 1996;14:1517-22.

8. Benítez JA, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, et al. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX F - negative, hemagglutinin/ protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect Immun* 1999;67: 539-45.

9. Pérez JL, García L, Talavera A, Oliva R, Valmaseda T, Año G, et al. Passive Protection of Serum From Volunteers Inoculated with Attenuated Strain 638 of *Vibrio cholerae* O1 in animal models. *Vaccine* 2000;19:376-84.

10. Hall RH, Losonsky G, Silveira APD, Taylor RK, Mekalanos JJ, Withman ND, et al. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* O1 toxin-correlated pili in experimental cholera. *Infect Immun* 1991;59:2508-12.

11. Sengupta DK, Sengupta TK, Ghose AC. Major outer membrane proteins of *V. cholerae* and their role in induction of protective immunity through inhibition of intestinal colonization. *Infect Immun* 1992;60:4848-55.

12. Levine MM, Black RE, Clements ML, Nalin DR, Cisneros L, Finkelstein RA. Volunteer studies in development of vaccines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli* a review. In: Holme T, Holmgren J, Merson MH, Mollby R, editors. Acute enteric infections in children. New prospects for treatment and prevention Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press; 1981. p. 443-59.

13. Hase CC, Thai LS, Boesman-Finkelstein M, Mar VL, Burnette WN, Kaslow HR, et al. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains producing inactive cholera toxin analogs. *Infect Immun* 1994;62:3051-55.

Tabla 1. Cepas utilizadas en el estudio.

Cepas	Serogrupo, Biotipo y serotipo	Referencia
E7946	O1, El Tor Ogawa	[12]
C7258	O1, El Tor Ogawa	[13]
C6706	O1, El Tor Inaba	[13]
N16961	O1, El Tor Inaba	[12]
395	O1, Clásico Ogawa	[14]
CA401	O1, Clásico Inaba	[15]
569B	O1, Clásico Inaba	[16]
A11837	Serogrupo O139	[17]

Todas las cepas que se relacionan son tipo de salvaje, aisladas de epidemias. Para las cepas del serogrupo O139 no se han descrito aún los biotipos y serotipos.

a los 14 y 21 días después de la inoculación mostraron resultados que indicaron una clara seroconversión [ELISA: título ≥ 2 (log en base 10 del inverso de la dilución del suero que de un valor de densidad óptica de 0,4 unidades, considerado como valor de corte del ensayo, ELISPOT: ≥ 2 veces el número de células en T_h , vibriocida: título ≥ 1280] fueron considerados altamente positivos, mezclados, distribuidos en alícuotas de 1 mL y almacenados a -20°C . A esta mezcla de sueros se le denominó suero positivo. El suero negativo se obtuvo con los mismos criterios y procedimientos empleados para la obtención del suero positivo pero se utilizó la muestra de 4 voluntarios que recibieron placebo y que antes y después de la inoculación, respondieron con valores inferiores al valor de corte de cada una de las pruebas antes mencionadas.

Purificación del LPS Ogawa e Inaba de *V. cholerae* O1

Para la purificación del LPS de los serotipos Ogawa e Inaba de *V. cholerae* O1, se utilizaron las cepas E7946 y N16961, respectivamente. Se procedió básicamente según el método descrito por el grupo de Westphal en 1965 [19]. La biomasa celular obtenida fue resuspendida en agua hasta una concentración de 60 mg/mL, se añadió un volumen de fenol al 90% y se incubó durante 30 min a 68°C . La mezcla se mantuvo a 4°C durante toda la noche. Se observó la formación de tres fases. Se colectó la fase superior y se centrifugó a 33 300 xg durante 30 min, el sobrenadante se dializó contra 20 L de agua destilada y fue ultracentrifugado tres veces a 65 000 xg durante 5 h a 4°C . Los sedimentos obtenidos se resuspendieron en agua destilada y se trataron con deoxirribonucleasa I (Dnasa) y ribonucleasa A (Rnasa) (Sigma, EE.UU.) (0,1 mg/20 mL, en agitación y a 37°C durante 2 h) y posteriormente con Pronasa (0,2 mg/20 mL, a temperatura ambiente durante 48 h). La muestra tratada se incubó durante 10 min a 100°C , se centrifugó a 33 300 xg durante 15 min y el sobrenadante se volvió a ultracentrifugar tres veces bajo las mismas condiciones antes descritas. Finalmente, el sedimento obtenido fue resuspendido en agua, se sometió a roto-evaporación y se colocó en cámara de secado al vacío hasta la sequedad para su cuantificación por peso. Se utilizaron diferentes métodos para evaluar la presencia de contaminantes de naturaleza proteica o ácidos nucleicos como fueron: el método de Lowry [20], la electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-Page) y 15% de acrilamida [21] seguido de tinción con plata [22] y el barrido espectrofotométrico desde 200 a 300 nm, respectivamente.

Purificación del LPS del serogrupo O139

Se utilizó la cepa A11837 y se procedió básicamente según el método descrito por el grupo de Kido en 1990 [23]. La biomasa celular fue resuspendida en solución tampón (Tris 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5) hasta una concentración de 120 mg/mL. Posteriormente se añadieron 2 volúmenes de una solución alcalina (SDS al 3%, Tris 50 mM, NaOH 128 mM) y se calentó en baño de agua a 60°C durante 70 min. Se añadió un volumen de fenol:cloroformo (1:1) y se centrifugó a 16 000 xg durante 20 min a 4°C . Se tomó la fase superior y se añadió 2/3 de agua y 1/10 de acetato de

sodio 3 M pH 5, después se añadieron 2 volúmenes de etanol frío (-20°C) y se dejó reposar de 24 a 48 h a -20°C . Posteriormente se centrifugó a 16 000 xg durante 20 min a 4°C , el sobrenadante se desechó, el sedimento se resuspendió en 10 mL de agua destilada y se dializó contra 2 L de agua destilada. En lo adelante la muestra se trató como se describió antes para el LPS del serogrupo O1 después de la primera ultracentrifugación. Los criterios de pureza utilizados para esta preparación fueron también los descritos para el LPS del serogrupo O1.

Purificación de PME

Se utilizó la cepa E7946 El Tor Ogawa. La biomasa celular fue resuspendida en solución tampón Tris 30 mM-EDTA 2 mM, hasta una concentración de 210 mg/mL. La suspensión celular se colocó en un baño de agua con hielo con agitación lenta, y se añadió deoxicolato de sodio al 10% (0,25 mL/g de biomasa obtenida) y se incubó durante 1 h. Posteriormente la muestra se centrifugó a 17 700 xg durante 1 h a 4°C . El sedimento se desechó y el sobrenadante se trató con Dnasa y Rnasa (Sigma, EE.UU.) (0,1 mg/20 mL, en agitación y a 37°C durante 2 h). Después se efectuó una centrifugación a 33 300 xg durante 30 min a 4°C , el sedimento se desechó y el sobrenadante se sometió a una ultracentrifugación a 65 000 xg durante 8 h a 4°C . Posteriormente, se desechó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en una solución tampón (diethanolamina 49 mM - deoxicolato 120 mM pH 9) y se aplicó en una columna cromatográfica (XK 26/100, Sephacryl S-200 HR, Pharmacia, Suecia) eluida con Tris 30 mM-EDTA 2 mM-deoxicolato 0,5% pH 8,5. La vesícula de PME se obtuvo en el primer pico que eluyó de la columna.

La presencia de LPS y ácidos nucleicos como contaminantes en esta preparación fue evaluada por el método del *dot blot* [24] con un anticuerpo monoclonal anti-LPS O1 (4:5) y por medio del barrido espectrofotométrico desde 200 a 300 nm, respectivamente. Luego de confirmar la ausencia de contaminantes en el pico de proteínas, se le adicionaron tres volúmenes de etanol frío (-20°C) y se incubó durante toda la noche a -20°C . Posteriormente se realizó una centrifugación a 47 900 xg durante 20 min a 4°C , se eliminó el sobrenadante y el sedimento se almacenó a -20°C como PME.

Purificación del complejo antigénico de 20 kD

Se utilizó la cepa CA401 Clásico Inaba. Para la obtención del antígeno se siguió una modificación del método de Sun y colaboradores [25]. La biomasa celular fue resuspendida en PBS al 20% (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 14 mM, KCl 27 mM, NaN_3 3 mM) pH 7,4 y se sometió a un proceso de agitación vigorosa en el ultraturax T-25 IKA (Labortechnik, Berna, Suiza) a 13500 rpm. Posteriormente se realizó una centrifugación a 17 700 xg durante 1 h a 4°C , el sobrenadante se separó y el sedimento se resuspendió nuevamente en PBS al 20% y se repitió el proceso (ultraturax y centrifugación). Los sobrenadantes de las respectivas centrifugaciones se mezclaron, se añadió sulfato de amonio al 50% de saturación y se incubó durante toda la noche a 4°C en reposo. El precipitado se obtuvo por centrifugación

14. Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, Mekalanos JJ, Taylor RK, Levine MM. Toxin, toxin-nucleoagglutinin pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in human. *J Exp Med* 1988; 168:1487-92.

15. Lankford CE. Factors of virulence of *Vibrio cholerae*. *Ann NY Acad Sci* 1960; 88:1203-12.

16. Nelson ET, Clements JD, Finkelstein RA. *Vibrio cholerae* adherence and colonization in experimental cholera: electron microscopic studies. *Infect Immun* 1976; 14:527-47.

17. Comstock LE, Maneval DJr, Panigrahi P, Joseph A, Levine MM, Kaper JB, et al. The Capsule and the O Antigen in *Vibrio cholerae* O139 Bengal are associated with a genetic region not present in *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun* 1995;63: 317-23.

18. Iwanaga M, Yamamoto K. Cultive conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Microb Immunol* 1986;30:1075-83.

19. Westphal O, Jam K. Bacterial lipopolysaccharides. In: Whistler RL, editor: *Methods in carbohydrate chemistry*. New York: Academic Press Inc; 1965. p.83-91.

20. Lowry OH. A protein measurement with the folin-phenol reagent. *Biol Chem* 1951; 193:265-75.

21. Lamli UK. Clearance of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-85.

22. Tsai CM, Frash SE. Silver stain a method to proteins detection after polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1982; 199:115-9.

23. Kido N, Ohta M, Kato N. Detection of lipopolysaccharide by ethidium bromide staining after sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Bacteriol* 1990;172:1145-47.

24. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p.18-47.

25. Sun DX, Mekalanos JJ, Taylor RK. Antibodies directed against the toxin-nucleoagglutinated pilus isolated from *V. cholerae* provide protection in the infant mouse experimental cholera model. *J Infect Dis* 1990;161:1231-6.

a 33 300 xg durante 20 min y fue resuspendido y dializado contra PBS. Posteriormente se realizó una electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida (12,5%) a 1 mL del dializado (3 a 9 mg de proteínas). En esta electroforesis se utilizó como patrón de peso molecular (PPM), una mezcla de fosforilasa b (94 kD), albúmina de suero bovina (67 kD), ovoalbúmina (43 kD), anhidrasa carbónica (30 kD), inhibidor de tripsina (20,1 kD) y α -lactalbúmina (14,4 kD). Posteriormente el gel se sometió a una tinción negativa con imidazol-zinc [26], se identificó y se extrajo la banda que tuviera similar migración a la banda de proteína de 20,1 kD en el PPM. Esta banda se electroeluyó, se cuantificó la cantidad de proteínas por el método de Lowry [20] y se evaluó por el método de dot blot [24]. Para ello, se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo obtenido en el Instituto Finlay, que en inmunomicroscopía electrónica [27] reacciona con antígenos fimbriales en la superficie de cepas de *V. cholerae* del biotipo Clásico. La solución proteica ya cuantificada y evaluada fue almacenada a -20 °C.

Actividad anticolonizante de los sueros

Se utilizaron ratones BALB/c de 2 a 5 días de nacidos, suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) de La Habana, Cuba, con su correspondiente certificado de salud. Los ratones se distribuyeron en grupos de 4 animales en cajas independientes y se les administró por vía intraperitoneal 50 μ L de las siguientes variantes: i) suero positivo en cuatro diluciones diferentes, 1:5, 1:10, 1:20 y 1:40 y ii) suero negativo (control negativo del ensayo). Después de 6 h de la administración por vía intraperitoneal, se le inculó a cada ratón 50 μ L de PBS-azul de evans al 0,01% por vía oral, que contiene 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa virulenta C7258. Pasadas 18 h se sacrificaron los animales, y los intestinos de cada grupo de 4 ratones se colocaron en PBS y se homogenizaron utilizando el ultraturrax T-25 IKA (Labortechnik, Berna, Suiza) a 13 500 rpm durante 15 s. Alícuotas de 10 μ L de diluciones seriadas (factor 10) de cada muestra, se cultivaron en placas *Thiosulphate-Citrate-Bile Salt-Sucrose* (TCBS) y se incubaron durante toda la noche a 37 °C para cuantificar posteriormente las UFC. En cada variante se utilizó un grupo de 4 animales y cada variante fue ensayada cuatro veces. Los resultados que se presentan son el promedio de UFC/ratón de cuatro ensayos diferentes.

La mayor dilución del suero positivo con mejores resultados en la variante (i) fue utilizada en experimentos posteriores, en los que se emplearon para la inoculación oral de los ratones otras cepas del serogrupo O1 (C6706, El Tor Inaba; 395, Clásico Ogawa; 569B, Clásico Inaba) y una cepa del serogrupo O139 (A11837) e idénticas condiciones de ensayo.

Inhibición de anticuerpos anticolonizantes

Los experimentos se realizaron de forma similar a como se describió en el ensayo anterior, con la diferencia de que se utilizó para la administración intraperitoneal, suero positivo diluido 1:10, pre-tratado 1 h a 37 °C con 20, 40 o 60 mg de LPS Ogawa, LPS Inaba, LPS O139, PME o del complejo antigénico de 20 kD.

Estadística

Para el procesamiento estadístico de los datos, se utilizó la prueba exacta de Fisher, así como el análisis de varianza y la prueba t de *student* de datos no pareados, con un nivel de significación del 5%. Ambas pruebas se realizaron utilizando el Statgraphics Plus para Windows 2.1.

Resultados y Discusión

Importantes antígenos expuestos sobre la superficie de *V. cholerae* O1, tales como los LPS Ogawa, Inaba y O139, las PME y el complejo antigénico de 20 kD, se prepararon con elevado grado de pureza. La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos con diferentes diluciones del suero positivo y el suero negativo puro (control negativo del ensayo). Se observó que el número de UFC recuperadas de los intestinos de los ratones, cuando se utilizó el suero negativo, fue de $4,1 \times 10^7$. En cambio, cuando se utilizó el suero positivo en diluciones 1:5, 1:10 y 1:20, el número de UFC recuperadas fue significativamente menor, aunque fue menor aún cuando se utilizaron las diluciones 1:5 y 1:10. Estas últimas no tuvieron diferencias significativas entre ellas.

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos con el suero positivo en dilución 1:10, en paralelo con el

26. Hardy E, Pupo E, Castellanos-Serra L, Reyes J, Fernández-Patrón C. Sensitive reverse staining of bacterial lipopolysaccharides on polyacrylamide gels by using zinc and imidazole salts. *Analytical Biochemistry* 1997;244:28-32.

27. Almeida DJ, Waterson AP. Morphology of virus antibody interaction. *Advance Virus Res* 1959;15:307-38.

Tabla 2. Efecto del suero negativo y positivo, sobre la colonización intestinal de la cepa C7258 en el modelo del ratón neonato.

Sueros	UFC/ratón (Error)
Suero positivo 1:5	$2,93 \times 10^5$ ($1,9 \times 10^4$) ^a
Suero positivo 1:10	$2,3 \times 10^5$ ($7,1 \times 10^4$) ^a
Suero positivo 1:20	$5,42 \times 10^6$ ($1,8 \times 10^5$) ^b
Suero positivo 1:40	$5,43 \times 10^7$ ($8,5 \times 10^6$) ^c
Suero negativo puro	$4,1 \times 10^7$ ($1,3 \times 10^7$) ^c

Inóculo oral: 10^5 UFC de la cepa C7258, en 50 μ L de PBS azul de evans. Los valores representan el promedio de cuatro experimentos. En cada experimento se utilizaron cuatro ratones por grupo. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas.

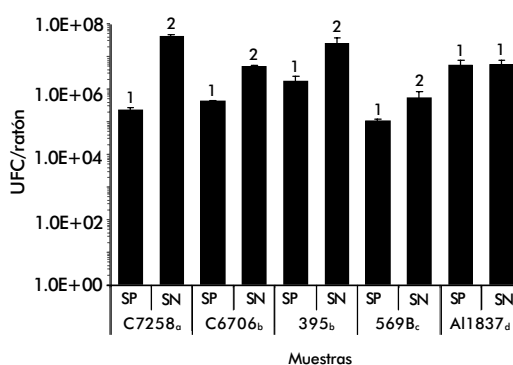


Figura 1. Variación del índice de colonización de 10^5 UFC de diferentes cepas de *V. cholerae* O1 y una cepa O139, inoculadas por vía oral en el modelo del ratón neonato, 6 h después de la administración por vía intraperitoneal de 50 μ L de suero positivo o negativo en dilución 1:10. SP: suero positivo, SN: suero negativo, cepas: C7258 (El Tor Ogawa), C6706 (El Tor Inaba), 395 (Clásico Ogawa), 569B (Clásico Inaba), A11837 (Serogrupo O139). Entre cepas, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. Números diferentes entre sueros para cada cepa, indican diferencias estadísticamente significativas.

suero negativo. Se observó un efecto anticolonizante del suero positivo sobre todas las cepas del serogrupo O1 a diferencia del efecto observado cuando se utilizó el suero negativo. Por lo tanto, se puede afirmar que el suero positivo de humanos inoculados con la cepa atenuada 638, inhibe la colonización de *V. cholerae* O1. En el efecto anticolonizante del suero positivo, se definieron tres niveles significativamente diferentes entre sí. El primer nivel corresponde a la inhibición más fuerte de la colonización, que fue observada cuando se inoculó la cepa C7258, biotipo y serotipo homólogos a la cepa 638 utilizada para la inoculación de los humanos. Un segundo nivel de menor inhibición, cuando se inoculó con las cepas C6706 y 395, serotipo heterólogo y biotipo heterólogo, respectivamente, no diferentes entre sí, y un tercer nivel de poca inhibición cuando se inoculó con la cepa 569B, biotipo y serotipo heterólogos. Cuando se inoculó con la cepa AI1837, del serogrupo O139, no se observó efecto inhibitorio del suero positivo sobre la capacidad colonizadora de esta cepa, pues el número de UFC recuperadas de los intestinos de los ratones tratados con el suero positivo, no fue significativamente diferente al número de UFC recuperada de los intestinos de los ratones tratados con el suero negativo.

Estos resultados sugirieron que la cepa 638 es capaz de generar una respuesta de anticuerpos séricos en humanos que inhiben la colonización intestinal de todas las cepas de *V. cholerae* O1 en el modelo del ratón neonato y corroboraron que la actividad anticolonizante de los anticuerpos es más fuerte contra las cepas homólogas a la 638, lo que probablemente ocurra porque en tal respuesta no solo participaron los anticuerpos anti-LPS, que pueden ser los más importantes, sino que también participaron anticuerpos contra otros antígenos, como pudieran ser diferentes PME, que solo se encuentran presentes como blancos de estos anticuerpos, cuando se trata de una cepa del biotipo El Tor serotipo Ogawa. Mientras este fue el caso con las cepas del serogrupo O1, los anticuerpos presentes en el suero positivo no inhibieron la colonización de cepas del serogrupo O139; ello probablemente se debió a que las cepas O139 presentan en su superficie un LPS estructuralmente diferente no reconocido por los anticuerpos dirigidos contra el LPS de cepas O1. En áreas donde el cólera es endémico, ésta probablemente sea también la causa de que sucesivas exposiciones a *V. cholerae* O1 no previenen la infección producida por *V. cholerae* O139 [28, 29]. Si se considera la importancia de la inhibición de la colonización intestinal por *V. cholerae* para la protección contra esta enfermedad, los resultados antes descritos, pueden ser muy valiosos para la selección de cepas candidatas a vacuna, así como para definir el tipo de cepa vacunal a administrar en determinada región afectada por la enfermedad.

La Figura 2, muestra los resultados obtenidos con el suero positivo en dilución 1:10 y pretratado con los diferentes antígenos purificados. La utilización del LPS Ogawa en el pretratamiento produjo un efecto inhibitorio significativo sobre la actividad anticolonizante del suero positivo en dilución 1:10 dado por un incremento significativo en el número de UFC que se recuperaron de los intestinos ($1,45 \times 10^7$ UFC) en comparación con el número que se recuperó cuan-

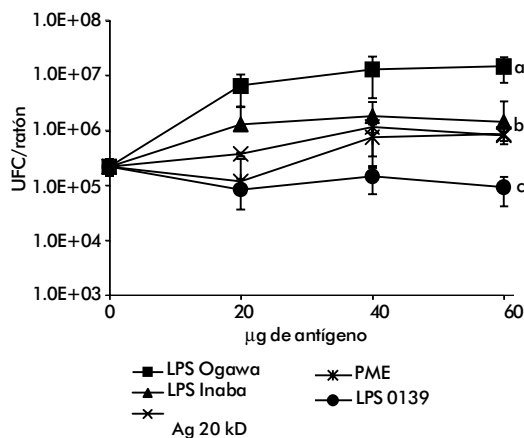


Figura 2. Efecto del pre-tratamiento del suero positivo con diferentes antígenos de la superficie de *V. cholerae*, sobre su actividad anticolonizante frente a un reto oral con la cepa salvaje C7258. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas. El número de UFC recuperadas de los intestinos de los ratones a los que se les administró por vía intraperitoneal el suero positivo sin pretratar, aparecen en la figura relacionadas a 0 cantidad de antígeno ($2,3 \times 10^5$ UFC). Cuando el suero negativo se administró por vía intraperitoneal a los ratones, el número de UFC recuperadas de los intestinos fue $4,1 \times 10^7$ UFC.

do del suero positivo 1:10 se administró sin pretratar ($2,3 \times 10^5$ UFC).

La utilización del LPS Inaba, las PME o el complejo antigénico de 20 kD produjo un efecto inhibitorio significativamente menor con relación al efecto observado cuando se utilizó el LPS Ogawa. Este efecto es manifestado por aproximadamente 10^6 UFC que se recuperaron de los intestinos, en los casos en que se utilizó cualquiera de estos antígenos en el tratamiento del suero positivo antes de la administración intraperitoneal a los ratones. Con la utilización del LPS O139 no se observó efecto inhibitorio sobre la actividad anticolonizante del suero positivo.

La actividad anticolonizante del suero positivo fue parcialmente inhibida con el LPS Inaba pero no con el LPS O139. Se ha documentado bien la presencia de un determinante antigénico común en los LPS Ogawa e Inaba, que pudiera estar implicado en este efecto inhibitorio parcial mostrado por el LPS Inaba [30]. Sin embargo, el LPS del serogrupo O139, que contiene un lípido A y un core común a los LPS del serogrupo O1, pero un polisacárido O diferente [31, 32], no inhibió la actividad anticolonizante del suero positivo contra la cepa C7258. Este resultado indicó que la actividad anticolonizante del suero estaba dirigida principalmente contra el polisacárido del LPS de *V. cholerae* y no contra el lípido A o la región del core. Diferentes estudios han demostrado que los mecanismos de protección contra el cólera comprenden una respuesta esencialmente dirigida contra las células bacterianas [33]. Se acepta que la respuesta antibacteriana se dirige preferencialmente contra el LPS, pero también se ha reconocido que otros componentes tales como PME y fimbrias, son capaces de inducir determinado nivel de respuesta inmunológica [34].

Para que *V. cholerae* logre colonizar el intestino delgado, primero debe vencer la barrera de la acidez gástrica, vencer el peristaltismo, competir con las bac-

28. Albert JM. Minireview. *V. cholerae* O139 Bengal. *Journal of Clinical Microbiology* 1994;32:2345-9.

29. Morris JG Jr, Losonsky GE, Johanson JA, Tacket CO, Nataro JP, Panigrahiand P, et al. Clinical and immunological characteristics of *Vibrio cholerae* O139 Bengal infection in North American volunteers. *The Journal of Infectious Diseases* 1995; 171:903-8.

30. Paul AM, Stroehrer UH, Morona R. Molecular basis for O-Antigen biosynthesis in *Vibrio cholerae* O1: Ogawa-Inaba Switching. In Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O, editors. *Vibrio cholerae* and cholera, molecular to global perspective. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994.p.77-90.

31. Wang J, Villeneuve S, Zhang J, Lei PS, Miller ChE, Lafaye P, et al. On the antigenic determinants of the lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae* O:1, serotypes Ogawa and Inaba. *The Journal of Bio Chem* 1998; 273:2777-83.

32. Nandy RK, Mukhopadhyay S, Ghosh AN, Ghose AC. Antibodies to the truncated (short) form of 'O' polysaccharides (TFOP) of *Vibrio cholerae* O139 lipopolysaccharides protect mice against experimental cholera induced by encapsulated O139 strains and such protection is mediated by inhibition of intestinal colonization of vibrios. *Vaccine* 1999;17:2844-52.

33. Holmgren J, Svennerholm AM. Cholera and the immune response. In: Hanson LA, editor. *Host parasite relationships in gram negative infection*. *Prog Allergy* 1983;33:106-19.

34. Jacob A, Sinha VB, Sahib MK, Srivastava R, Kaper JB, Srivastava BS. Identification of a 33 kDa antigens associated with an adhesive and colonizing strain of *Vibrio cholerae* El Tor and its role in protection. *Vaccine* 1993;11:179-88.

terias de la flora intestinal, a través de la capa mucosa y efectuar la adherencia a los enterocitos [35]. Por lo tanto, el tamaño del inóculo, la motilidad, la expresión de enzimas como mucinas y proteasas, así como la adherencia a los enterocitos, son eventos de vital importancia para la patogénesis de *V. cholerae* [35]. La infección estimula una respuesta significativa de anticuerpos antibacterianos y antitoxina, ambos en el intestino y en el suero. Estos anticuerpos específicos cooperan entre sí y producen una inmunidad protectora contra la infección [36]. Nunca la bacteria o la CT penetran más allá del epitelio intestinal durante la infección, por lo que la inmunidad protectora contra el cólera depende únicamente de los mecanismos que previenen la colonización o la acción de la toxina [37].

Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la capacidad anticolonizante del suero positivo (Figura 2), confirmaron la importancia de la respuesta anti-LPS en la protección, ya que el efecto inhibitorio más pronunciado se observó cuando se utilizó el LPS homólogo. También el LPS Inaba, las PME, o el complejo antigénico de 20 kD tuvieron un efecto perceptible en la inhibición pero fue de menor magnitud. La posibilidad de reacciones cruzadas en el ensayo de inhibición por antígenos, fue prácticamente improcedente, ya que los diferentes antígenos fueron altamente purificados y evaluados con métodos efectivos, pero además se observó que en el ensayo de inhibición los diferentes antígenos utilizados comenzaron a responder en cantidades muy superiores a 1 µg, sensibilidad del SDS-PAGE seguido de tinción con plata, uno de los métodos evaluativos de pureza que se empleó.

Según los resultados expuestos en la Tabla 2, se puede afirmar la administración del suero positivo por vía intraperitoneal en el ratón neonato produce la lisis

del inóculo de *V. cholerae* O1, administrado por vía oral. Se ha planteado que la inmunidad protectora contra *V. cholerae* es mediada principalmente por anticuerpos producidos localmente en la mucosa intestinal, los cuales son secretados hacia la superficie mucosal del tracto (anticuerpos IgA e IgM secretores). Estos anticuerpos están dirigidos fundamentalmente contra diferentes antígenos de la superficie celular de *V. cholerae* y protegen por inhibición de la colonización bacteriana y su multiplicación, así como por bloqueo de la CT. La inhibición del crecimiento bacteriano puede resultar como consecuencia de la unión de los anticuerpos a la superficie de la bacteria, los cuales interfieren con su motilidad o con los procesos específicos de la adherencia al epitelio mucosal [38].

Finalmente pudiera considerarse que los resultados descritos en este trabajo, aportan suficientes hechos que confirman la existencia de más de un antígeno en la superficie celular de *V. cholerae*, involucrado en la inducción de una inmunidad protectora; aunque el antígeno más importante fue el LPS. Por otra parte, estos resultados pueden estimular el empleo de variantes de vacunas conjugadas y vacunas por subunidades para proteger contra el cólera.

Agradecimientos

Agradecemos a los miembros del Grupo de Genética del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), por la construcción y provisión de la cepa atenuada 638, utilizada para la inoculación de los voluntarios donantes de los sueros empleados en este trabajo, así como a la técnico en veterinaria Mildrey Fariñas por su colaboración en los ensayos con el modelo animal empleado.

35. Colwell RR, Huq A. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O, editors. *Vibrio cholerae and cholera, molecular to global perspectives*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994. p.117-35.

36. Ogawa A, Takeda T. The gene encoding the heat stable enterotoxin of *Vibrio cholerae* is flanked by 123 base-pair direct repeats. *Microbiol Immunology* 1993; 37:607-16.

37. Svennerholm AM, Jonson G, Holmgren J. Immunity to *Vibrio cholerae* infection. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O, editors. *Vibrio cholerae and cholera, molecular to global perspectives*. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994. p.145-68.

38. World Health Organization. *Weekly epidemiological record*. 2001;76:117-24.

Recibido en noviembre del 2001. Aprobado en febrero del 2002.