

# Optimización del ensayo vibriocida colorimétrico para la determinación de anticuerpos séricos contra *V. cholerae* del serogrupo O139

Joivier Vichi-Lozada, Edith Suzarte-Portal\*, Talena Ledón-Pérez, Rafael Fando-Calzada.

Departamento de Biología Molecular, División Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6412, La Habana, Cuba. Correo electrónico: edith.suzarte@cnic.edu.cu; rafael.fando@cnic.edu.cu

Recibido: 1ro de febrero de 2010.

Aceptado: 5 de mayo de 2010.

Palabras clave: ensayo vibriocida colorimétrico, *Vibrio cholerae* O139, optimización ensayo bactericida, título vibriocida.  
Key words: colorimetric vibriocidal assay, *Vibrio cholerae* O139, optimization bactericidal assay, vibriocidal titer.

**RESUMEN.** El título de anticuerpos vibriocidas es reconocido actualmente como el mejor marcador de inmunidad protectora ante la infección con *Vibrio cholerae*. Su evaluación permite estudiar la efectividad de vacunas durante ensayos preclínicos y clínicos, a través de la determinación de la funcionalidad de anticuerpos séricos, capaces de lisar células en presencia de complemento exógeno. Se han desarrollado distintos ensayos bactericidas con puntos finales y métodos de determinación del título vibriocida diferentes. La presencia de cápsula en el serogrupo O139 de *Vibrio cholerae* constituye un impedimento para la lisis eficiente de las células bajo condiciones del ensayo vibriocida utilizado en cepas del serogrupo O1. Por tal razón, se hace necesario adaptar los ensayos bactericidas existentes para *V. cholerae* O1, con la finalidad de utilizarlos con el serogrupo O139. A partir de un ensayo vibriocida colorimétrico, desarrollado para el serogrupo O1, se optimizaron las condiciones necesarias para una eficiente lisis celular del serogrupo O139 por anticuerpos específicos y el complemento. Este método colorimétrico tiene la ventaja que mediante la adición de glucosa y un indicador de pH al medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las células sobrevivientes, puede determinarse visualmente el título de forma clara e inequívoca. Los mejores resultados se obtuvieron después del crecimiento de la cepa diana en cuñas de agar LB, al usar una concentración inicial de vibrión diana de  $10^6$  UFC/mL, una concentración inicial del complemento de 100 %, disolución salina fisiológica como diluyente y tiempo de reacción de vibriolisis de una hora. Estas condiciones de experimentación permitieron obtener resultados exactos y precisos para *V. cholerae* O139.

**ABSTRACT.** The vibriocidal titer is the best immunity marker recognized for protection against *Vibrio cholerae*. Its evaluation through the determination of serum antibodies that are functionally able to kill cells in the presence of exogenous complement, has gained a great importance for studying cholera vaccine protection efficacy during preclinical and clinical trials. Many versions of cholera bactericidal assay have been developed with different end points and different methods of determining the vibriocidal titer. The presence of capsule in serogroup O139 affects cell lysis efficacy under O1 vibriocidal assay conditions. Therefore, these conditions must be adapted to the O139 serogroup. From a vibriocidal colorimetric assay for serogroup O1, efficient cell lysis conditions for the serogroup O139 by the action of specific antibodies and complements were optimized. This colorimetric test has the advantage that glucosa and pH indicator addition to the culture media, where the surviving cells grow, makes possible to visually read the titer in a simple and clear way. The best results were achieved after growing initially the target strain in LB agar, having an initial concentration of target vibrios of  $10^6$  CFU/mL, an initial complement concentration of 100 % and physiological saline as assay diluent, being one hour the lytic reaction time. Under the above experimental conditions, the results were exact and precise for *V. cholerae* O139.

## INTRODUCCIÓN

Cólera es una enfermedad diarreica aguda causada por la bacteria Gram-negativa *Vibrio cholerae*. Hasta el momento, solo dos serogrupos de este microorganismo son capaces de producir epidemias: el serogrupo O1 y O139. El primero, es el causante de las siete pandemias reportadas en el mundo hasta el momento, mientras que el serogrupo O139 emergió como nuevo agente epidémico en 1992, momento a partir del cual, han aparecido brotes epidémicos limitados al sudeste asiático, desplazando temporalmente al serogrupo O1, pero sin extenderse a magnitud de pandemia.<sup>1</sup>

La mayor diferencia entre *V. cholerae* O1 y O139 reside en los componentes de la superficie celular. Estos serogrupos difieren en la estructura del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y en que *V. cholerae* O139 expresa un polisacárido capsular.<sup>2</sup>

Aunque el control higiénico y sanitario representa la mejor forma de prevenir la enfermedad, la vacunación se considera la herramienta más efectiva para la protección, especialmente, en los países subdesarrollados que poseen bajos índices de salubridad.<sup>3</sup> Existen muchos candidatos vacunales orales contra *V. cholerae* O1 en desarrollo clínico,<sup>4,5</sup> de ellos, solo dos están disponibles

comercialmente, aunque tienen dificultades para lograr un nivel de protección adecuado en individuos de áreas endémicas,<sup>6</sup> así como en la población más afectada por la enfermedad que son los niños menores de 5 años.<sup>7</sup>

La inmunidad inducida contra el serogrupo O1 no es capaz de proteger contra O139,<sup>8</sup> por lo que estos candidatos vacunales no son eficaces contra la infección por *V. cholerae* O139, serogrupo para el cual no se encuentra disponible hasta el momento una vacuna.

En la búsqueda de vacunas efectivas es necesario establecer un medidor inmunológico confiable que correlacione con la protección. Es precisamente el título de anticuerpos vibriocidas el mejor marcador actualmente reconocido de inmunidad protectora ante la infección con *V. cholerae*<sup>9-11</sup> y su evaluación permite estudiar la efectividad de vacunas durante ensayos preclínicos y clínicos.<sup>12-14</sup> Este ensayo mide la funcionalidad de anticuerpos séricos capaces de lisar células en presencia de complemento exógeno. En la historia de ensayos bactericidas en cólera, se han desarrollado diferentes variantes que utilizan puntos finales y diferentes métodos de determinación del título vibriocida. El primer ensayo vibriocida descrito estaba basado en el conteo directo en placas de agar, pero la gran laboriosidad que requería a pesar de ser un método muy exacto, hizo que no se utilizara ampliamente.<sup>15</sup> Un segundo ensayo, también en placas de agar, tenía como desventaja que cualquier célula que sobreviviera a la lisis podría ser aglutinada por anticuerpos presentes en el suero, lo que introducía errores en la determinación.<sup>16</sup> El tercer ensayo desarrollado, tenía lugar en tubos de ensayos en que se usaba medio de cultivo líquido y se determinaba el punto final por determinación espectrofotométrica.<sup>17</sup> Desafortunadamente, este ensayo solo es capaz de analizar un número pequeño de muestras.<sup>18</sup>

En la última década del siglo pasado, un sistema de análisis basado en placas de microtitulación fue introducido y ha sido ampliamente utilizado para evaluar la efectividad de las vacunas contra *V. cholerae*. Este sistema permite analizar un elevado número de muestras al mismo tiempo, es además simple, reproducible y específico. Existen dos variantes para determinar el título bactericida: determinación espectrofotométrica y observación visual mediante la utilización de un sustrato cromogénico como indicador de cambios de pH<sup>19</sup> o cambios redox.<sup>20</sup>

Cedré y cols. modificaron el ensayo reportado por Benenson en 1968 para *V. cholerae* O1 y lo convirtieron en un método colorimétrico, mediante la adición de glucosa y un indicador de pH al medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las células sobrevivientes.<sup>21</sup> Los vibrios que sobreviven a la acción bactericida, crecen a expensas de los nutrientes y producen ácido durante su crecimiento. El pH del medio disminuye, lo que provoca el cambio de color del indicador de púrpura a amarillo, lo que simplifica la determinación y permite un punto final más claro e inequívoco en la titulación.<sup>21</sup>

El surgimiento de *V. cholerae* O139 en el año 1992, como un nuevo serogrupo asociado al cólera epidémico, llevó a una reevaluación del ensayo vibriocida. La presencia de cápsula en este serogrupo incrementa la resistencia a la lisis celular mediada por el complemento, lo que dificulta la utilización de los ensayos vibriocidas establecidos para *V. cholerae* O1.<sup>22</sup> Para vencer esta dificultad algunos laboratorios han desarrollado variantes del ensayo bactericida en el que usan mutantes carentes de cápsula como cepas indicadoras,<sup>10,23</sup> mayor concentración de complemento o menor concentración de la cepa diana.<sup>22,24</sup>

Este trabajo tuvo como objetivo optimizar un ensayo vibriocida colorimétrico para O139, tomando como referencia el trabajo desarrollado por Cedré y cols. para *V. cholerae* O1 y evaluar asimismo, la precisión y la especificidad de esta técnica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Optimización del ensayo vibriocida colorimétrico para *V. cholerae* O139

#### Preparación de la cepa diana, evaluación de diferentes medios de cultivo y diferentes concentraciones celulares

Siguiendo el procedimiento general descrito por Cedré y cols.<sup>21</sup> la cepa diana MO45 de *V. cholerae* O139,<sup>20</sup> se sembró en cuñas previamente calentadas de agar LB (triptona, 1 %, extracto de levadura, 0,5 %, cloruro de sodio, 1 %) o agar BHI (OXOID). Las cuñas se incubaron a 37 °C durante cuatro horas<sup>19</sup> y el crecimiento celular fue recogido en un medio diluyente. La suspensión bacteriana se ajustó a una DO<sub>600 nm</sub> entre 0,2 y 0,3 y a partir de ella, se prepararon disoluciones de concentración 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> y 10<sup>7</sup> vibrios/mL para definir aquella que permitía alcanzar los mayores títulos.<sup>21</sup>

#### Determinación de la dilución del complemento a utilizar

Como fuente de complemento se utilizó el comercial de conejo de (PEL-FREEZ, Dynal Biotech, USA) preparado a dos concentraciones diferentes, puro y diluido 1 : 2 en el medio diluyente de elección. En cada caso, se mezclaron volúmenes iguales de complemento y de suspensión celular.

Con el objetivo de demostrar que el complemento utilizado no poseía actividad bactericida intrínseca, se tomaron 200 µL de la suspensión bacteria-complemento, se incubaron por una hora a 37 °C y se sembraron diluciones adecuadas de la mezcla en placas de agar LB.

#### Selección del diluyente de los componentes de la reacción

Se evaluaron los medios diluyentes siguientes: disolución salina fisiológica (NaCl al 0,85 %) y disolución salina estabilizada con fosfato PBS (NaCl, 137 mmol/L; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 9,58 mmol/L; KCl, 2,68 mmol/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,47 mmol/L; pH 7,2). Ambos medios se utilizaron para recoger el crecimiento bacteriano en las cuñas y preparar de esta manera, las diferentes concentraciones de célula diana ensayadas.

#### Tiempo de incubación de los componentes de la reacción de vibrilisis

Las diluciones seriadas de los sueros a evaluar se mezclaron con iguales volúmenes de la suspensión bacteria-complemento y posteriormente, las placas fueron cubiertas e incubadas por diferentes tiempos en los que se incluyó: 30, 60 y 90 min a 37 °C. El volumen final de cada pozo en la placa fue de 50 µL y la concentración de complemento cuatro veces menor que la inicial.

#### Muestras de sueros utilizadas y muestras controles incluidas en el ensayo

Se evaluaron dos muestras de suero de conejo con respuesta específica contra el serogrupo O139 provenientes de un estudio previo consideradas estándares de referencia: una muestra de alto título vibriocida y una de título medio. Paralelamente, se incluyó como control negativo, una muestra de suero proveniente de un conejo no inmunizado con *V. cholerae* O139. Se distribuyeron por duplicado en placas estériles de microtitulación (Greiner, Alemania) en diluciones triples seriadas con el medio diluyente de elección y se comenzó por 1 : 30 hasta 1 : 21 870. En todas las placas se incluyeron los controles siguientes: control de reactivos (incluyó diluciones de

suero de alto título y disolución salina) para verificar esterilidad de los reactivos utilizados en el ensayo,<sup>25</sup> control de crecimiento celular (incluyó suspensión celular y disolución salina) y control de actividad intrínseca del complemento (incluyó disolución salina y suspensión bacteria-complemento).<sup>26</sup>

#### Medio indicador y determinación del título vibriocida

Después de transcurrido el tiempo establecido de reacción de lisis celular dependiente de complemento, se adicionaron 150  $\mu$ L de medio indicador (caldo LB suplementado con glucosa al 1 % y como indicador de pH, bromocresol púrpura 0,003 % preparado en disolución alcohólica). La placa se incubó nuevamente entre 3 y 4 h a 37 °C y se procedió a la medición por observación visual.<sup>19,20</sup> El título se definió como el inverso de la mayor dilución del suero en la que se apreció inhibición del crecimiento bacteriano,<sup>20,27</sup> revelado por la invariabilidad del color en el medio de cultivo.<sup>21</sup>

#### Evaluación de la precisión del ensayo vibriocida colorimétrico para *V. cholerae* O139

La determinación de la precisión incluyó los ensayos siguientes: repetibilidad (precisión intraensayo) y la precisión intermedia que contempla precisión interensayo y precisión interoperario.

La precisión de cada experimento se definió como adecuada siempre que el porcentaje de coincidencia del título entre réplicas de un mismo suero fuera igual o mayor que 50 %. Asimismo, la variación del título debía oscilar en más-menos una dilución en los diferentes ensayos de repetibilidad y precisión intermedia, según lo informado por Cedré y cols.<sup>21</sup>

#### Repetibilidad (Precisión intraensayo)

Se evaluaron mediante el ensayo vibriocida colorimétrico para O139, seis réplicas de cada suero de referencia (en el mismo día) por el mismo analista usando las mismas disoluciones y equipos.

#### Precisión intermedia

##### Precisión interensayo

Se evaluaron mediante el ensayo vibriocida colorimétrico para O139 ocho réplicas de cada suero de referencia en días diferentes por el mismo analista usando diferentes disoluciones.

##### Precisión interoperario

Los ensayos vibriocidas fueron ejecutados por dos analistas en un mismo laboratorio. Se evaluaron varias réplicas de los sueros de referencia utilizando disoluciones diferentes preparadas por cada uno de los operarios.

#### Determinación de la viabilidad residual posterior a reacción de vibriolisis

En tres experimentos independientes, en que se utilizó el ensayo vibriocida colorimétrico para O139 optimizado, se tomaron 20  $\mu$ L de cada pocillo después de ocurrida la reacción de vibriolisis y justamente al añadir el medio indicador, para conteo de viables. Se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en placas de LB para determinar la correspondencia entre el título visual y la viabilidad residual posterior a la lisis por complemento.

#### Método para determinar la especificidad del ensayo de microtitulación de anticuerpos bactericidas contra los vibriones del serogrupo O139

El ensayo que emplea las variables optimizadas en los acápite anteriores se empleó para titular dos sueros estándar de referencia de títulos conocidos: 1) el suero CU-980417, proveniente de un individuo cubano sano sin

contacto previo con *V. cholerae*, y 2) el suero CH99, proveniente de un paciente sudafricano de cólera infectado con *Vibrio cholerae* O1, de título promedio geométrico igual a 810 determinado frente a la cepa VC12 de *V. cholerae* O1 mediante el ensayo informado por Cedré y colaboradores en el 2003.<sup>21</sup>

Dado que el ensayo implementado por Cedré y colaboradores, en 2003 para *Vibrio cholerae* O1, se diferencia del optimizado en este trabajo en que emplea una concentración de la cepa diana de  $10^8$  unidades formadoras de colonias (UFC)  $\text{mL}^{-1}$ , dos órdenes más que el descrito en este documento y una concentración final del complemento cinco veces menor (5 %), el suero CH99 se retituló frente a la cepa VC12 en iguales condiciones de concentración celular y complemento, para disponer así de un título ajustado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Optimización del ensayo vibriocida colorimétrico para *V. cholerae* O139 Establecimiento de las condiciones: medio de cultivo de la cepa diana, concentración óptima del complemento y de células diana

Lograr lisar eficientemente las cepas del serogrupo O139 *in vitro* bajo la acción de anticuerpos bactericidas específicos y el complemento, resultó un proceso difícil. Se observó, que en dependencia de las condiciones del sistema de ensayo, los vibrios O139 pueden mostrarse sensibles o resistentes a anticuerpos y complemento.

Mediante la utilización del ensayo vibriocida colorimétrico desarrollado por Cedré y cols.,<sup>21</sup> para *V. cholerae* O1 como punto de partida, se evaluaron tres sueros estándar de referencia con título diferente ante cepas O139 y se usó disolución salina fisiológica como diluyente. Como cepa diana se utilizó la MO45 de *V. cholerae* O139 que constituye una cepa de referencia de este serogrupo (ATCC 51394) y se variaron las condiciones siguientes: concentración celular inicial de la cepa diana;  $10^5$ ,  $10^6$  y  $10^7$  UFC/mL, medio de crecimiento de esta (medio LB o BHI) y concentración inicial del complemento comercial Pel Freez (puro y al 50 %). Se varió en cada ensayo solo uno de ellos (Tabla 1). En todas las condiciones ensayadas, el suero negativo proveniente de un conejo no inmune al serogrupo O139, resultó en un título vibriocida menor de 30, menor dilución evaluada, por lo que se le asignó convencionalmente un valor de 10.

El medio de cultivo tradicionalmente utilizado para el crecimiento de la cepa diana fue el BHI; sin embargo, los ensayos realizados con una suspensión bacteriana preparada a partir de células crecidas en cuñas de agar LB, mostraron mayores títulos teniendo en cuenta las mismas condiciones de concentración de complemento y cepa diana. Los mayores índices de título promedio geométrico (GMT) fueron 2 712,18 y 5 749,44 en BHI y LB respectivamente, cuando se utilizó una concentración de vibrión diana del orden de  $10^6$  UFC/mL y el complemento puro. Este comportamiento pudiera estar relacionado con una expresión diferencial del polisacárido capsular (CPS) en la superficie celular en estos medios de cultivo, pues se ha asociado la producción de cápsula en el serogrupo O139 de *Vibrio cholerae* como la causa responsable de su resistencia a la lisis por complemento.<sup>28-30</sup> Aun así, Atrigge y cols. en un estudio realizado en el año 2000, no pudieron encontrar diferencias en la síntesis de la cápsula en la cepa AI1837 en diferentes medios de cultivo, donde se incluyó BHI y LB. Con el objetivo de visualizar el material capsular, en este caso, se utilizaron técnicas de microscopía electrónica y estudios de *immunoblot*-

**Tabla 1.** Título bactericida al utilizar diferentes condiciones en el ensayo vibriocida colorimétrico para *V. cholerae* O139

Medio de crecimiento del vibrión diana	Concentración inicial de complemento (%)	Concentración inicial de MO45 (UFC/mL)	Suero estándar de referencia de título medio <sup>1</sup>	Suero estándar de referencia de título alto <sup>2</sup>
BHI	100	10 <sup>6</sup>	810	2 712,18 (2 430 - 7 290)
		10 <sup>7</sup>	270	1 402,96 (810 - 2 430)
		10 <sup>5</sup>	270	1 402,96 (810 - 2 430)
	50	10 <sup>6</sup>	270	1 402,96 (810 - 2 430)
		10 <sup>7</sup>	ND	ND
		10 <sup>5</sup>	810	4 208,88 (2 430 - 7 290)
LB	100	<b>10<sup>6</sup></b>	<b>810</b>	<b>5 749,44 (2 430 - 7 290)</b>
		10 <sup>7</sup>	810	4 208,88 (2 430 - 7 290)
	50	10 <sup>6</sup>	270	2 430
		10 <sup>7</sup>	270	1 916,48 (810 - 2 430)

Los valores bajo las columnas corresponden: <sup>1</sup> a la media geométrica (GMT) y <sup>2</sup> GMT (rango) del título vibriocida de al menos tres réplicas. En el primer caso, no hubo variación en las determinaciones realizadas. En negritas el ensayo con los mejores títulos vibriocida. ND, título vibriocida no detectado.

ting de lisados celulares completos en electroforesis en geles de acrilamida.<sup>22</sup> Tampoco pudo correlacionar, bajo sus condiciones de experimentación, el crecimiento en diferentes medios de cultivo con la diferente susceptibilidad de O139 a lisis por complemento mediada por anticuerpo. Todo esto no elimina la posibilidad de que en las condiciones estudiadas, este sí sea un factor que está influyendo.

Es posible que la cápsula interfiera con la adsorción de los anticuerpos vibriocidas al LPS o a otros antígenos superficiales y a la adhesión productiva del complejo final del complemento, que es responsable de afectar la integridad de la superficie celular y provocar la lisis.<sup>25</sup> Esta es la razón por la que muchos investigadores informan ensayos vibriocidas para O139 usando mutantes carentes de cápsula o aislados clínicos de *V. cholerae* O139 de los últimos años, como la cepa CIRS 134 que posee menor contenido de CPS que las cepas aisladas en los años 1993-1995.<sup>25</sup>

El medio LB es simple, económico y no contiene componentes que puedan estar bajo restricción como el BHI, por lo que se decidió continuar el estudio usando esta condición de crecimiento que resulta más ventajosa.

La fuente exógena y la concentración del complemento son factores que influyen en la medición de la actividad bactericida. Debido a que el suero humano puede presentar niveles diferentes de potencia y actividad del complemento, que afectan la reproducibilidad del ensayo, este ha sido reemplazado por una fuente de complemento exógeno disponible comercialmente (Department of Vaccines and Biologicals World Health Organization, 1999). Muchos investigadores utilizan complemento comercial de curiel o de conejo de tres a cuatro semanas de edad. Este último fue el escogido para el estudio de optimización, pues se ha descrito que es capaz de fijar los componentes C3 y C4 de forma equivalente al complemento humano mostrando resultados comparables (WHO, 2007) y además, se demostró que el comercializado por la compañía Pel Freez no muestra actividad bactericida intrínseca contra el serogrupo O139, o sea la mezcla de bacteria-complemento después de 1 h de incubación a 37 °C, al sembrarse, rinde el mismo número de unidades formadoras de colonias (UFC) que

un control que no posee complemento, de ahí que se concluyera que esta fuente de complemento es idónea para el ensayo bactericida en cólera.

La concentración de complemento añadido al sistema de ensayo es un determinante primario de la sensibilidad lítica. En este estudio se evaluaron dos concentraciones iniciales de complemento comercial de conejo Pel Freez (50 % y 100 %) para una concentración final de 12,5 y 25 %, respectivamente en los pocillos de la placa de microtitulación. Los títulos vibriocidas obtenidos con el complemento empleado al 100 % fueron superiores a los obtenidos usando el complemento diluido al 50 %, resultado que evidencia que el complemento puro no está en concentración excesiva, pues se vuelve limitante cuando se le aplica un factor de dilución de dos que es pequeño.

Los ensayos bactericidas para *V. cholerae* O1 hasta ahora descritos utilizan el complemento mucho más diluido, a una concentración final en pocillo en el intervalo de 1,7 a 5 %. En el caso del serogrupo O139, cuyas cepas se muestran resistentes a la lisis por complemento en las condiciones empleadas para O1, se conoce que concentraciones mayores de complemento (entre 5 y 10 % concentración final en pocillo). Aun así, el ensayo colorimétrico en vías de optimización en este trabajo, necesita de una concentración mayor (25 %), lo cual puede deberse a que existen diferencias con el resto de los ensayos específicos para O139 con respecto al método de determinación del título vibriocida y al punto final establecido en cada caso, así como a la utilización de diferentes concentraciones de la cepa diana.

Otro factor a variar en la puesta a punto de un ensayo para medir actividad bactericida contra O139 es la concentración de la célula diana.<sup>26</sup> Teniendo en cuenta que *V. cholerae* O139 produce cápsula se hace necesario, para incrementar la susceptibilidad a la lisis, emplear una menor concentración de células que las establecidas para *V. cholerae* O1.<sup>20,24</sup> Se probaron varias combinaciones usando la cepa diana a una concentración de 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> o 10<sup>7</sup> UFC/mL. Los resultados (Tabla 1) permitieron determinar que la concentración del orden de 10<sup>6</sup> UFC/mL es la óptima a utilizar, pues muestra los mejores títulos. Solo en el caso en que se empleó la combinación: medio de cultivo inicial BHI, 50 % de complemento y una

concentración de  $10^5$  UFC/mL de células diana, se obtuvieron títulos similares a la condición de  $10^6$  UFC/mL, pero el tiempo de medición de los resultados se alargó de 30 a 45 min, lo cual no es deseable. La utilización de una concentración de células diana de  $10^6$  UFC/mL, hace que el tiempo necesario para la medición de los resultados posterior a la adición del medio de crecimiento con el indicador de pH, oscile entre tres y cuatro horas, para una duración total del ensayo de alrededor de 9,5 h, lo cual es factible de realizar en una jornada laboral.

Después de evaluar diferentes condiciones de ensayo se establecieron las preliminares óptimas para la realización del ensayo bactericida colorimétrico para *Vibrio cholerae* O139, las cuales son: crecimiento de la cepa diana en medio LB, concentración inicial de complemento 100 % y concentración de la cepa diana en el orden de  $10^6$  UFC/mL.

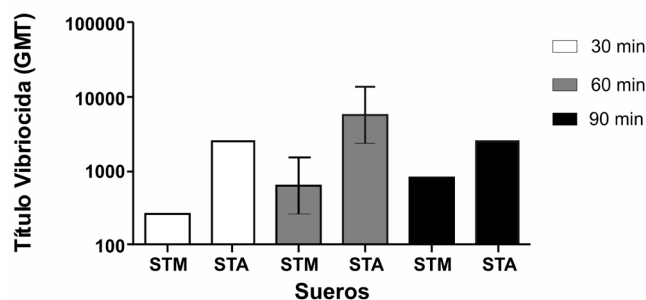
### Establecimiento de las condiciones: tiempo de vibriolisis y naturaleza del diluyente del ensayo

El tiempo de reacción bacteria-anticuerpo-complemento establecido para *V. cholerae* O1 es de una hora.<sup>17</sup> Con el objetivo de disminuir el tiempo del ensayo o incrementar su sensibilidad para el serogrupo O139, se probaron tres tiempos de reacción de vibriolisis diferentes que correspondieron a 30, 60 y 90 min y se utilizaron las condiciones óptimas anteriormente establecidas en el presente trabajo.

Los títulos obtenidos para los sueros estándares de referencia en los diferentes tiempos de vibriolisis (Fig.1) no mostraron diferencias significativas al aplicar la prueba de Wilcoxon ( $P > 0,05$ ). Aún así, se observó una tendencia a incrementar el valor de GMT del título vibriocida en el suero de referencia de título medio a medida que aumenta el tiempo de reacción de vibriolisis, siendo el valor mínimo 270 para 30 min y el valor máximo 810 para 90 min. En el caso del suero de referencia de título alto, no se observó este comportamiento, ya que se obtuvieron títulos similares de anticuerpos vibriocidas en los tres tiempos analizados. Al parecer, en esta condición la cantidad de anticuerpos en la mezcla es saturante y el proceso de vibriolisis se vuelve entonces independiente del tiempo de reacción.

Los resultados demuestran que no es posible aumentar la sensibilidad del ensayo ostensiblemente por el aumento del tiempo de vibriolisis hasta 90 min y que el tiempo óptimo debe mantenerse en 60 min como se utiliza para *V. cholerae* O1, pues disminuirlo a 30 min podría subestimar la actividad vibriocida de sueros con título medio o bajo.

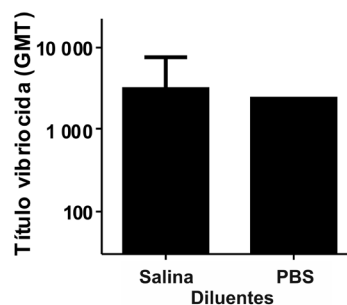
La naturaleza del diluyente influye sobre la susceptibilidad de la cepa diana a la acción bactericida del suero



**Fig. 1.** Título vibriocida a diferentes tiempos de vibriolisis. Cada barra representa el GMT de cuatro réplicas y el intervalo de confianza con 95 % de probabilidad. STM Suero estándar de referencia de título medio. STA Suero estándar de referencia de título alto.

mediada por complemento. Una posible explicación es que el diluyente puede influir en la disponibilidad o función de uno o más componentes del complemento durante la reacción de vibriolisis.<sup>22</sup> Para analizar el impacto del diluyente sobre el título, se evaluaron varias alternativas: disolución salina fisiológica y PBS. Se utilizaron las condiciones óptimas establecidas con anterioridad incluido un tiempo de vibriolisis de 1 h y se evaluó el suero estándar de referencia de título alto (Fig. 2).

No se detectaron diferencias significativas entre los títulos obtenidos con los diferentes diluyentes (Wilcoxon,  $P > 0,05$ ). Este resultado coincide con el publicado por Cedré y colaboradores<sup>21</sup> en los experimentos de robustez del ensayo vibriocida colorimétrico para *V. cholerae* O1 por lo que se decidió continuar el estudio utilizando como diluyente disolución salina fisiológica.



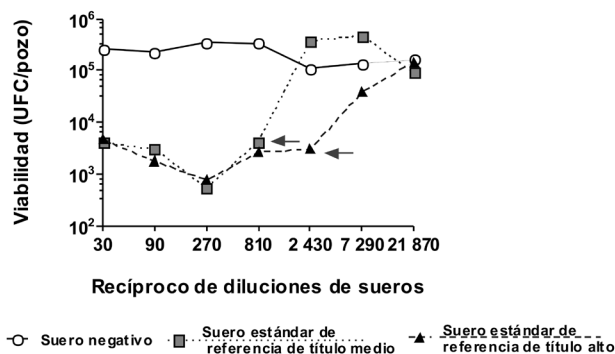
**Fig. 2.** Influencia del diluyente sobre la actividad vibriocida del patrón de suero de título alto. Cada barra representa el GMT de cuatro réplicas y el intervalo de confianza con 95 % de probabilidad.

### Determinación de la viabilidad residual posterior a reacción de vibriolisis. Relación con el título vibriocida determinado por observación visual

Teniendo en cuenta que la medición del título vibriocida en este ensayo se realiza por observación visual, se hacía necesario determinar la correspondencia entre el título y la lisis bacteriana que ocurre debido a la acción del complemento mediado por anticuerpos específicos y que se revela por la invariabilidad del color del indicador de pH en el pocillo.<sup>26</sup> Con ese objetivo, se contaron las UFC en cada uno de los pocillos correspondientes a diluciones diferentes del suero evaluado (Fig. 3).

El número de viables en el suero estándar de referencia de título negativo se comportó de modo independiente de la dilución del suero, como era de esperar. Este suero no posee anticuerpos específicos capaces de activar el complemento y promover la lisis (Fig. 3).

Los resultados indicaron que el cambio de color de púrpura a amarillo del bromocresol púrpura en medio LB con glucosa, está determinado por el crecimiento de las células sobrevivientes de la reacción de vibriolisis. Por cuanto, una cantidad de células en el pozo inferior a  $10^4$  no será suficiente para causar, en el período de tres a cuatro horas de crecimiento bacteriano, el cambio del indicador de pH y el medio se mantiene invariablemente púrpura. Sin embargo, una viabilidad residual superior a  $10^4$  UFC por pozo, al cabo del tiempo de crecimiento, causa el viraje del indicador de púrpura a amarillo. Estos resultados demuestran que existe una estrecha relación entre la concentración de anticuerpos funcionales (diluciones del suero), el número de células sobrevivientes y el cambio de coloración del medio indicador; como fue reportado por Cedré y col. en 2003 para *V. cholerae* O1.<sup>21</sup>



**Fig. 3.** Viabilidad residual posterior a la reacción de vibriólisis. Cada punto representa la media de tres experimentos independientes. Las saetas en gris indican el título vibriocida determinado por observación visual.

Diferentes métodos bactericidas para *V. cholerae* O139 han sido descritos con variedad de puntos finales. De esta forma, Attridge en 2000, describió un método en tubo de ensayos, en el cual posterior a la hora de vibriólisis se determina la viabilidad residual y se establece el título vibriocida como la dilución del suero capaz de lisar el 50 % de los vibrios indicadores. Igualmente en 2002, describió un procedimiento bactericida en placas de microtitulación en el que el punto final se establece por determinación espectrofotométrica luego de cinco horas de crecimiento y se toma como título vibriocida la dilución mayor que causa 70 % o más de lisis. Otro procedimiento que también utiliza la determinación espectrofotométrica fue descrito por Qadri y cols. en 1995 y establece como título vibriocida la mayor dilución de suero que causa una reducción de la densidad óptica (DO) a 595 nm mayor del 50 % en relación con la densidad óptica de los pocillos controles sin suero. En el ensayo colorimétrico estudiado para O139 se pudo comprobar que el título vibriocida determinado por inspección visual se corresponde con un 98 % o más de lisis bacteriana, luego de 1 h de incubación de suero, cepa diana y complemento. El color púrpura en el pocillo se mantiene siempre que haya ocurrido un 98 % o más de lisis con respecto al control sin suero. Si al disminuir la concentración de anticuerpos vibriocidas, la lisis que se logra en el pocillo es inferior al 98 %, la coloración del medio cambia a amarillo. Sin dudas, la ventaja de la sencilla y rápida determinación en este ensayo a través de la observación visual del cambio del indicador de pH, va ligada a una sensibilidad menor. Estas diferencias en el punto final de las técnicas vibriocidas han de tenerse en cuenta en el momento de comparar resultados entre ellas.

**Ensayo de especificidad**

La especificidad del ensayo de anticuerpos bactericidas contra *Vibrio cholerae* del serogrupo O139 se midió a través de la titulación de la actividad vibriocida contra la cepa MO45 presente en los sueros CU-980417 y CH99, ambos de título conocido frente a *Vibrio cholerae* O1, cepa VC12. El suero CU-980417 produjo un título promedio geométrico por debajo de 30 y convencionalmente, se le asignó un valor de 10, considerado negativo; mientras que para el suero CH99 se obtuvo un título promedio geométrico de 270. La magnitud del título del suero CH99 frente a la cepa MO45 de *V. cholerae* O139 fue menor que frente a la cepa VC12 de *Vibrio cholerae* O1; no obstante, la detección de actividad bactericida contra el serogrupo cruzado indicó que este ensayo tendría limitado valor diagnóstico serológico para estudios epidemiológicos

retrospectivos, en los cuales la muestra de suero se toma en la fase aguda o convaleciente de la enfermedad. Sin embargo, este ensayo de microtitulación retiene su valor diagnóstico de la seroconversión con anticuerpos de actividad bactericida en sujetos participantes en la evaluación clínica de vacunas vivas atenuadas de *Vibrio cholerae* del serogrupo O139, en que el sujeto se evalúa en el estado preinmune para establecer el título base y post-infección para determinar a su vez, el título inducido por la vacunación.

La detección de título positivo anti O139 en el suero de un individuo infectado con *Vibrio cholerae* O1 observada en este experimento, es probablemente un indicativo de que la respuesta humoral contra las proteínas de membrana externa, comunes en los serogrupos O1 y O139, tributa a la acción bactericida dependiente del complemento que aparece en el suero de sujetos inmunes a la infección por *Vibrio cholerae*.

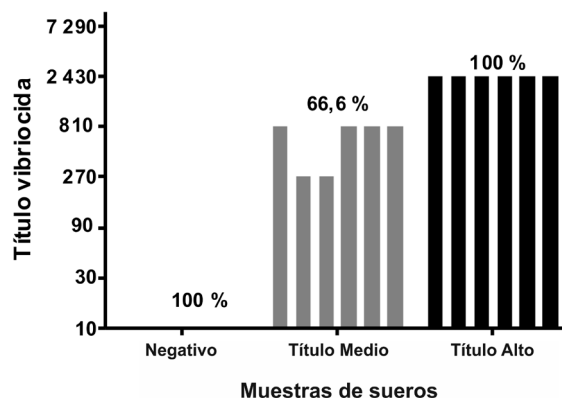
**Ensayos de precisión**

La precisión es un grado de la reproducibilidad y confiabilidad de cualquier ensayo analítico.<sup>31</sup> Para establecer qué tan precisa es la técnica vibriocida colorimétrica para O139, durante el proceso de optimización en este trabajo, se evaluó la repetibilidad (Fig. 4) y la precisión intermedia (Figuras 5 y 6).<sup>21</sup>

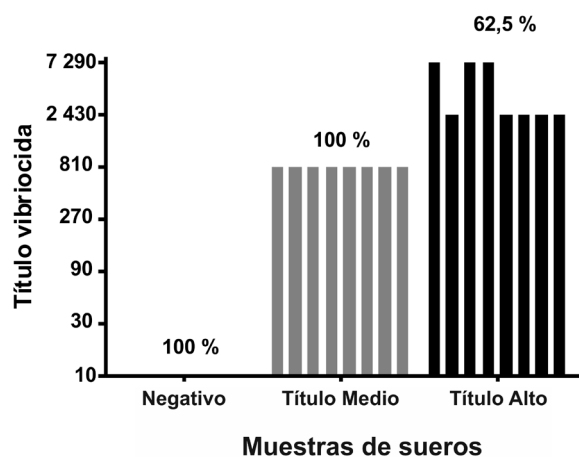
En todos los ensayos de precisión, se obtuvo un 100 % de coincidencia para el suero estándar de referencia negativo. El título asignado para este suero fue 10, que es la tercera parte del inverso de la menor dilución de suero y coincidió con el obtenido para el control de la actividad bactericida intrínseca del complemento, que no contenía suero y el control de células, que no incluyó ni suero ni complemento.

El ensayo de repetibilidad determina la proximidad entre los resultados de mediciones individuales realizadas en un mismo día, bajo las mismas condiciones (Fig. 4). Los porcentajes de coincidencia se consideraron adecuados, pues estuvieron por encima del 50 % en todos los casos. Para el suero estándar de referencia de título medio se obtuvo una coincidencia del 66,6 % con un coeficiente de variación de 8,96 %. Las variaciones del título estuvieron entre 270 y 810 lo que reveló que la dispersión estaba en el rango de una dilución. En el caso del estándar de título alto las determinaciones coincidieron todas las veces.

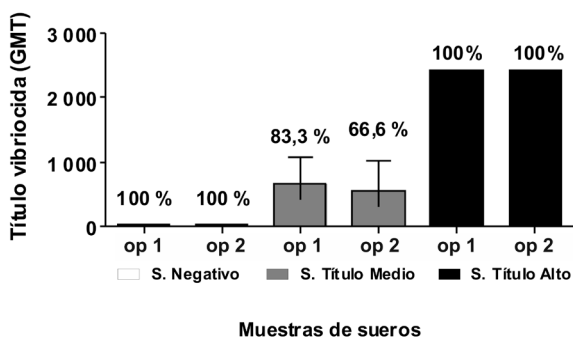
A diferencia del ensayo de repetibilidad, el ensayo de precisión interensayo mostró la proximidad entre las mediciones individuales realizadas en diferentes días con



**Fig. 4.** Ensayo de repetibilidad. Sobre cada suero estándar de referencia se muestra el porcentaje de coincidencia de mediciones individuales realizadas bajo iguales condiciones.



**Fig. 5.** Ensayo de precisión interensayos. Sobre cada suero estándar de referencia se muestra el porcentaje de coincidencia de mediciones individuales realizadas en días diferentes con disoluciones de trabajo diferentes.



**Fig. 6.** Ensayo de precisión interoperarios. Cada barra significa el GMT de seis réplicas con el IC de 95 % de probabilidad. Sobre las barras se muestra en porcentaje de coincidencia de las determinaciones realizadas.

distintas disoluciones (Fig. 5). El porcentaje de coincidencia fue superior al 50 % para todos los casos, con un valor mínimo de 62,5 % para el suero estándar de referencia de título alto y un coeficiente de variación de 6,93 %. La variación del título también estuvo en el intervalo de una dilución, entre los valores 2 430 y 7 290, lo que indica que el ensayo vibriocida colorimétrico para *V. cholerae* O139 en optimización en este trabajo es reproducible.

El ensayo de precisión interoperarios (Fig. 6) representó el último nivel de evaluación de la precisión en este estudio. Reunió la mayor cantidad de fuentes de variación evaluadas: operario y disoluciones diferentes. Los porcentajes de coincidencia en cada caso fueron superiores al 50 % y solo se observó variación en las determinaciones de la muestra de título medio. A pesar de que el porcentaje de coincidencia fue diferente entre los dos operarios, 83,3 y 66,6 %, no se detectaron diferencias significativas entre los índices de GMT alcanzados por cada uno de ellos para esta muestra de suero (U de Mann-Whitney,  $P > 0,05$ ). Teniendo en cuenta que en este ensayo la determinación del punto final es cualitativa y está estrechamente ligada a la habilidad del técnico,<sup>21</sup> se acepta que desviaciones del título alrededor de una dilución se consideren dentro del intervalo de error de la técnica.

## CONCLUSIONES

La optimización del ensayo vibriocida colorimétrico para O139 tomando como punto de partida la técnica

desarrollada por Cedré y cols. para *V. cholerae* O1 estableció las condiciones necesarias para una eficiente lisis celular de este serogrupo por anticuerpos específicos y el complemento. A partir de un crecimiento inicial de la cepa diana en cuñas de agar LB, una concentración de vibrión diana de  $10^6$  UFC/mL (dos órdenes inferior a la concentración utilizada para el ensayo homólogo con el serogrupo O1) y una concentración del complemento del 100 % (cinco veces superior a la utilizada para O1), se lograron resultados exactos y precisos para *V. cholerae* O139, serogrupo que requiere condiciones más favorables para la lisis por anticuerpos específicos y complemento por la presencia de cápsula. Contar con este ensayo de microtitulación es de suma utilidad en la evaluación clínica de vacunas vivas atenuadas de *Vibrio cholerae* del serogrupo O139.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Griffith DC, Kelly-Hope LA, Miller MA. Review of reported cholera outbreaks worldwide, 1995-2005. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(5):973-977.
- Boutonnier A, Villeneuve S, Nato F, Dassy B, Fournier JM. Preparation, immunogenicity, and protective efficacy, in a murine model, of a conjugate vaccine composed of the polysaccharide moiety of the lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 bound to tetanus toxoid. *Infect Immun.* 2001;69(5):3488-3493.
- Fournier JM, Quilici ML. [Cholera]. *Presse Med.* 2007;36(4 Pt 2):727-739.
- Lopez AL, Clemens JD, Deen J, Jodar L. Cholera vaccines for the developing world. *Hum Vaccin.* 2008;4(2):165-169.
- Chowdhury MI, Sheikh A, Qadri F. Development of Peru-15 (CholeraGarde), a live-attenuated oral cholera vaccine: 1991-2009. *Expert Rev Vaccines.* 2009;8(12):1643-1652.
- Richie EE, Punjabi NH, Sidharta YY, Peetosutan KK, Sukandar MM, Wasserman SS *et al.* Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. *Vaccine.* 2000;18(22):2399-2410.
- Clemens JD, Sack DA, Harris JR, Van Loon F, Chakraborty J, Ahmed F *et al.* Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh: results from three-year follow-up. *Lancet* 1990; 335(8684):270-273.
- Albert MJ, Alam K, Ansaruzzaman M, Qadri F, Sack RB. Lack of cross-protection against diarrhea due to *Vibrio cholerae* O139 (Bengal strain) after oral immunization of rabbits with *V. cholerae* O1 vaccine strain CVD103-HgR. *J Infect Dis.* 1994;169(1):230-231.
- Glass RI, Svennerholm AM, Khan MR, Huda S, Huq MI, Holmgren J. Seroepidemiological studies of El Tor cholera in Bangladesh: association of serum antibody levels with protection. *J Infect Dis.* 1985;151(2):236-242.
- Losonsky GA, Lim Y, Motamedi P, Comstock LE, Johnson JA, Morris JG, Jr. *et al.* Vibriocidal antibody responses in North American volunteers exposed to wild-type or vaccine *Vibrio cholerae* O139: specificity and relevance to immunity. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997;4(3):264-269.
- Mosley WH, Ahmad S, Benenson AS, Ahmed A. The relationship of vibriocidal antibody titre to susceptibility to cholera in family contacts of cholera patients. *Bull World Health Organ.* 1968;38(5):777-785.
- Benitez JA, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B *et al.* Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTXPhi-negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect Immun.* 1999;67(2):539-545.
- Cohen MB, Giannella RA, Bean J, Taylor DN, Parker S, Hooper A *et al.* Randomized, controlled human challenge study of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of a single dose of Peru-15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infect Immun.* 2002;70(4):1965-1970.
- Concha A, Giraldo A, Castañeda E, Martínez M, de la HF, Rivas F *et al.* Safety and immunogenicity of oral killed whole cell recombinant B subunit cholera vaccine in Barranquilla, Colombia. *Bull Pan Am Health Organ.* 1995;29(4):312-321.

15. Finkelstein R.A. Vibriocidal antibody inhibition (VAI) analysis: a technique for the identification of the predominant vibriocidal antibodies in serum and for the detection and identification of *Vibrio cholerae* antigens. *J Immunol.* 1962;89:264-271.
16. Holmgren J, Svennerholm AM, Ouchterlony O. Quantitation of vibriocidal antibodies using agar plague techniques. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol.* 1971;79(5):708-714.
17. Benenson AS, Saad A, Mosley WH. Serological studies in cholera. 2. The vibriocidal antibody response of cholera patients determined by a microtechnique. *Bull World Health Organ.* 1968;38(2):277-285.
18. Yang JS, Kim HJ, Yun CH, Kang SS, Im J, Kim HS *et al.* A semi-automated vibriocidal assay for improved measurement of cholera vaccine-induced immune responses. *J Microbiol Methods.* 2007;71(2):141-146.
19. Cedré MB, García Sánchez HM, García Imia LG, Talavera CA. [Standardization and evaluation of the modified vibriocidal assay]. *Rev Cubana Med Trop.* 1999;51(3):156-159.
20. Boutonnier A, Dassy B, Dumenil R, Guenole A, Ratsitorahina M, Migliani R *et al.* A simple and convenient microtiter plate assay for the detection of bactericidal antibodies to *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio cholerae* O139. *J Microbiol Methods.* 2003;55(3):745-753.
21. Cedré B, Viel Y, Rodríguez T, Anno G, Pino Y, García H *et al.* Validación del ensayo vibriocida colorimétrico para determinar anticuerpos séricos contra cepas candidatas vacunales de *Vibrio cholerae*. *VacciMonitor.* 2003;12(1):23-30.
22. Attridge SR, Qadri F, Albert MJ, Manning PA. Susceptibility of *Vibrio cholerae* O139 to antibody-dependent, complement-mediated bacteriolysis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2000;7(3):444-450.
23. 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(22):2844-2852.
24. Qadri F, Mohi G, Hossain J, Azim T, Khan AM, Salam MA *et al.* Comparison of the vibriocidal antibody response in cholera due to *Vibrio cholerae* O139 Bengal with the response in cholera due to *Vibrio cholerae* O1. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995;2(6):685-688.
25. Qadri F, Svennerholm AM, Shamsuzzaman S, Bhuiyan TR, Harris JB, Ghosh AN *et al.* Reduction in capsular content and enhanced bacterial susceptibility to serum killing of *Vibrio cholerae* O139 associated with the 2002 cholera epidemic in Bangladesh. *Infect Immun.* 2005;73(10):6577-6583.
26. Rodríguez T, Lastre M, Cedre B, del Campo J, Bracho G, Zayas C *et al.* Standardization of *Neisseria meningitidis* serogroup B colorimetric serum bactericidal assay. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(1):109-114.
27. Attridge SR, Johansson C, Trach DD, Qadri F, Svennerholm AM. Sensitive microplate assay for detection of bactericidal antibodies to *Vibrio cholerae* O139. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(2):383-387.
28. Waldor MK, Mekalanos JJ. Emergence of a new cholera pandemic: molecular analysis of virulence determinants in *Vibrio cholerae* O139 and development of a live vaccine prototype. *J Infect Dis.* 1994;170(2):278-283.
29. Nesper J, Schild S, Lauriano CM, Kraiss A, Klose KE, Reidl J. Role of *Vibrio cholerae* O139 surface polysaccharides in intestinal colonization. *Infect Immun.* 2002;70(11):5990-5996.
30. Meno Y, Waldor MK, Mekalanos JJ, Amako K. Morphological and physical characterization of the capsular layer of *Vibrio cholerae* O139. *Arch Microbiol.* 1998;170(5):339-344.
31. Jacobson RH. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev Sci Tech.* 1998;17(2):469-526.