

Resultados preliminares de la evaluación de diferentes concentraciones de la suspensión bacteriana empleada como inóculo en el Ensayo bactericida de Sangre Total

María Amalia Camaraza¹, Natasha Anwar², Teresita Leiva¹, Aida G. Arnet¹, Franklin Sotolongo¹, Catherine Ison²

¹ Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. La Habana, Cuba. E-mail: camaraza@finlay.edu.cu

² Saint Mary's Hospital, Imperial College Medical School. Londres, Reino Unido.

El Ensayo Bactericida del Suero (EBS), está considerado como la "prueba de oro" para evaluar la eficacia serológica de vacunas antimeningocócicas, teniendo en cuenta que la presencia de anticuerpos bactericidas en el suero se relaciona con la protección frente a esta enfermedad. Los niveles de anticuerpos anticapsulares obtenidos frente a los serogrupos A y C de *Neisseria meningitidis* han confirmado la utilidad de esta técnica. Sin embargo, se señala una pobre correlación entre los resultados de laboratorio y la protección clínica demostrada después de la aplicación de vacunas compuestas por vesículas de membrana externa del serogrupo B. Ison y colaboradores desarrollaron el Ensayo de Sangre Total (EST), que evalúa la capacidad bactericida de la sangre. Los resultados obtenidos indican que es un marcador de inmunidad más sensible que el EBS para el serogrupo B. En un estudio de evaluación de la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC[®], realizado en infantes y empleando el EST, se obtuvo un 50% de respondedores a la cepa homóloga (B:4:P1.19,15). La respuesta contra cepas heterólogas resultó baja. Teniendo en cuenta estos resultados y los de otros estudios realizados por los autores, se evaluó el comportamiento de la prueba utilizando concentraciones menores de la suspensión bacteriana empleada como inóculo. Para este propósito se estudió la actividad bactericida de la sangre de dos adultos sanos, mediante el EST frente a las cepas B:4:P1.19,15 (Cu 385/83) y B:15:P1.7,16 (MC58). Se evaluaron, además de la concentración recomendada originalmente (10^6 ó 10^7 UFC/mL), dos inferiores (10^5 y 10^4 UFC/mL). El primer donante mostró una actividad lítica del 40% frente a la cepa homóloga, a una concentración de inóculo de 10^7 UFC/mL. Para las concentraciones de 10^5 y 10^4 UFC/mL la lisis fue de alrededor del 80%. El comportamiento frente a la cepa heteróloga fue de un 25% de lisis a la mayor concentración del inóculo y aproximadamente de un 60% para las concentraciones inferiores. El segundo donante no mostró actividad lítica alguna frente a un inóculo de 10^7 UFC/mL de la cepa homóloga, mientras que empleando inóculos de 10^5 y 10^4 UFC/mL se obtuvieron respuestas de alrededor del 55% y del 65% respectivamente. El comportamiento frente a la cepa heteróloga fue de un 40% de lisis a la mayor concentración del inóculo y de un 70% y 80% a las concentraciones 10^5 y 10^4 UFC/mL respectivamente.

Palabras claves: Ensayo Bactericida del Suero, Ensayo de Sangre Total, *Neisseria meningitidis*

Introducción

La enfermedad meningocócica (EM) continúa siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en la niñez a nivel mundial; ésta es causada por una bacteria *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*) (1). Existen diferentes serogrupos de *N. meningitidis*, aunque los grupos A, B y C causan el mayor número de casos de EM.

La cápsula que rodea al microorganismo se considera el principal determinante de virulencia (2), aunque existen

otros componentes de la membrana externa, lipooligosacáridos (3), pili (4) y proteínas Opa y Opc (5).

La susceptibilidad a la EM ha sido asociada con la ausencia de anticuerpos específicos que activan el complemento y a través de los cuales se produce la lisis de la bacteria (2). Estos anticuerpos están dirigidos al polisacárido capsular y su presencia ha mostrado protección frente a los serogrupos A y C (6). Sin embargo, el polisacárido capsular del meningococo serogrupo B es pobremente inmunogénico y no induce protección (7), sugiriendo que otros componentes de la envoltura celular, como las proteínas de membrana

externa, están involucrados en la protección. La defensa del hospedero frente a la enfermedad causada por el serogrupo B pudiera involucrar la fagocitosis, además de la lisis celular mediada por anticuerpos y complemento (8).

El Ensayo Bactericida del Suero (EBS) está considerado la "prueba de oro" utilizada para medir los niveles de anticuerpos bactericidas contra *N. meningitidis*, y un incremento en los títulos después de la inmunización con vacunas de polisacáridos capsulares de los serogrupos A y C se correlacionan con la protección (6). Sin embargo, cuando se ha empleado para evaluar la eficacia de vacunas obtenidas a partir del serogrupo B, las cuales consisten en vesículas de membrana externa, los resultados obtenidos señalan una pobre correlación entre la eficacia serológica y la protección (9,10).

Ison y colaboradores desarrollaron el Ensayo de Sangre Total (EST), el cual se comporta como un modelo "ex vivo" de bacteriemia que permite evaluar la actividad bactericida de la sangre total, determinada tanto por el componente soluble como el celular (11). Los resultados de los estudios con EST indican que el ensayo es un marcador de inmunidad más sensible que el EBS para el serogrupo B (12, 13).

Los resultados de la evaluación de la vacuna antimeningocócica cubana en infantes, mediante el EST, mostraron que el 50% de los niños provocaban una lisis celular > 50% frente a la cepa vacunal B:4:P1.19,15 (13), y resultó muy pobre la respuesta contra cepas heterólogas del mismo serogrupo.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de este estudio fue determinar si una reducción de la concentración del inóculo bacteriano empleado en el EST aumentaba la sensibilidad de este Ensayo, definida como el incremento del porcentaje de lisis bacteriana en función del tiempo con la consecuente mejora de los resultados a alcanzar en los estudios futuros de evaluación de la respuesta inmune inducida por VA-MENGOC-BC®.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas

Se utilizaron dos cepas de *N. meningitidis*:

- cepa cubana 385/83 (B:4:P1.19,15)
- cepa de la Comunidad Económica Europea MC58 (B:15:P1.7,16)

Crecimiento de la bacteria

Las cepas estaban conservadas en medio Greave en nitrógeno líquido. Se sembraron (por duplicado) en placas de agar base GC (36g/L, Difco) suplementado

con 1% de IsoVitaleX. Se incubaron a 37 °C con 6% CO₂ y una humedad >90% durante 18 h. Se subcultivaron en placas con el mismo medio fresco y se incubaron bajo las mismas condiciones 4 h antes de comenzar el EST. A las 3½ h se realizó tinción de Gram y chequeo de serogrupo. Se hizo una suspensión bacteriana en RPMI (Gibco BRL) ajustada a una densidad óptica de 1.0 a 540 nm (aproximadamente 10⁹ UFC/mL). A partir de ésta, se hicieron dos suspensiones equivalentes a 10⁷ y 10⁶ UFC/mL.

Donantes

Se evaluó la actividad bactericida de la sangre de dos adultos sanos mediante el EST. La sangre venosa extraída (24 mL), se colectó en un tubo plástico universal (Sterilin) que contenía 10U/mL de heparina como anticoagulante. Se realizaron tres experimentos con cada donante y en cada uno cuatro ensayos. Se hicieron 12 ensayos en total.

Ensayo de Sangre Total (11)

Brevemente: se distribuyeron alícuotas de 1 mL de sangre en tubos plásticos "bijoux" que se inocularon con cada una de las suspensiones bacterianas: 10⁷, 10⁵ y 10⁴ UFC/mL (por cuatuplicado). Después de la inoculación de la bacteria, se colocaron los 12 tubos (correspondientes a cada cepa) en una plataforma rotatoria a 20 rpm a 37 °C. Se tomaron 10 µl de cada mezcla en los tiempos 0, 45 y 90 min y se realizaron 4 diluciones en RPMI (1:10). Se sembraron 10 µl de cada dilución (5x10 µl) en placas de agar base GC. Se incubaron todas las placas a 37°C con 6% de CO₂ y una humedad >90% durante 24 h. Al día siguiente se realizó el conteo de las colonias en cada placa. El resultado se expresó como el porcentaje de lisis a los 45 y 90 min aplicando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ lisis} = 100 - (\text{UFC a 90min} \div \text{UFC a 0} \times 100)$$

Análisis estadístico

Se calculó la media del porcentaje de muerte, la desviación estándar y el coeficiente de variación utilizando el Programa Excel (Microsoft). Se realizaron tres experimentos para determinar la variación entre ellos y en cada uno se hicieron cuatro réplicas con el objetivo de analizar además, la variación dentro de un mismo experimento.

Resultados y discusión

El Ensayo de Sangre Total es un modelo "ex vivo" de bacteriemia; evalúa las interacciones de la bacteria y el hospedero (14). La habilidad del microorganismo de sobrevivir en la sangre depende, entre otros factores, de los atributos patogénicos y del estado fisiológico de la célula bacteriana cuando penetra en el torrente sanguíneo (11). En este ensayo se realiza la unión de la

sangre con la bacteria cuando la célula se encuentra en su fase exponencial de crecimiento.

En el desarrollo del modelo de Sangre Total se evaluó el efecto del anticoagulante en la sobrevivencia de los distintos serogrupos de *N. meningitidis*. El patrón de sobrevivencia del serogrupo B no se afectó con el uso de la heparina como anticoagulante (11).

En el presente trabajo se estudió la actividad bactericida de la sangre de dos adultos sanos, mediante el EST frente a las cepas B:4:P1.19,15 y B:15:P1.7,16. Se evaluaron, además de la concentración recomendada originalmente (10^6 ó 10^7 UFC/mL), dos inferiores (10^5 y 10^4 UFC/mL). Los resultados que se muestran a continuación representan la media de todos los ensayos correspondientes a cada donante.

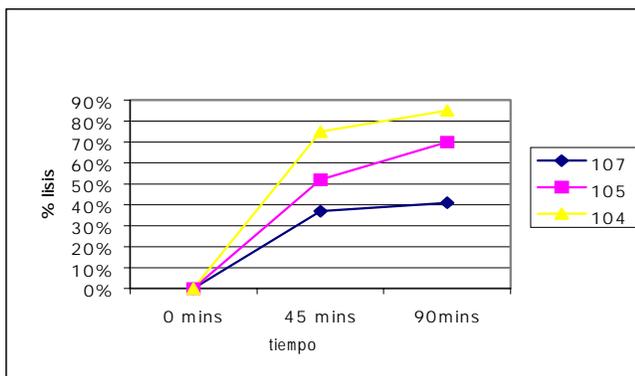
Primer donante

El Gráfico 1 muestra el porcentaje de muerte de *N. meningitidis* (cepa B:4:P1.19,15) debido a la actividad lítica de la sangre, a los tiempos 0, 45, 90 min de incubación de la mezcla sangre-bacteria. El resultado definitivo está dado por el porcentaje de lisis obtenido a los 90 min. El criterio de positividad de la prueba es de una lisis celular > 50%.

La actividad lítica fue de un 40% a la concentración de inóculo de 10^7 UFC/mL y alrededor del 80% para las concentraciones de 10^5 y 10^4 UFC/mL. La desviación estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV) entre ensayos fueron de un 12% y 31% respectivamente para la mayor concentración de inóculo. A la concentración de inóculo de 10^5 UFC/mL, la DS y el CV fueron de 5% y 6% respectivamente y para la menor concentración de 5 y 5% respectivamente.

El porcentaje de lisis provocada por la sangre frente a la cepa B:15:P1.7,16 fue de un 25% a una concentración de inóculo de 10^7 UFC/mL y

Gráfico 1. Porcentaje de muerte de *N. meningitidis* (B:4:P1.19,15) debido a la actividad bactericida de la sangre del donante 1



aproximadamente de un 60% cuando se empleó inóculos de 10^5 y 10^4 UFC/mL (Gráfico 2). La DS y el CV fueron de un 24% y de un 92% respectivamente para la mayor concentración de inóculo. A la concentración de 10^5 UFC/mL, la DS y el CV fueron de 12% y 22% respectivamente y para la menor concentración de 27 y 42%.

Segundo donante

El segundo donante no mostró actividad lítica alguna frente a un inóculo de 10^7 UFC/mL de la cepa B:4:P1.19,15, mientras que empleando inóculos de 10^5 y 10^4 UFC/mL el porcentaje de lisis fue de un 55% y 65% respectivamente (Gráfico 3). La DS y el CV entre ensayos resultaron 0 para la mayor concentración del inóculo. A una concentración de 10^5 UFC/mL, la DS y el CV fueron de 9% y 17% respectivamente y para la menor concentración de 8% y 12%.

Resultados similares se obtuvieron en un trabajo de laboratorio realizado anteriormente al mismo donante, donde se empleó la misma cepa y se analizaron iguales concentraciones del inóculo. No se manifestó actividad lítica a la mayor concentración del inóculo y el porcentaje de muerte estuvo alrededor del 50% para las dos concentraciones inferiores (resultados no publicados).

El Gráfico 4 representa el porcentaje de muerte debido a la actividad lítica de la sangre frente a la cepa B:15:P1.7,16, la cual fue del 40% a la concentración de inóculo de 10^7 UFC/mL. Cuando se emplearon inóculos de 10^5 y 10^4 UFC/mL, el porcentaje de lisis fue de 70 y 80% respectivamente. La DS y el CV fueron de un 39% y de un 95% para la mayor concentración del inóculo. A la concentración de 10^5 UFC/mL, la DS y el CV fueron de 12 y 17% respectivamente y para la menor concentración de 6% y 7%.

Gráfico 2. Porcentaje de muerte de *N. meningitidis* (B:15:P1.7,16) debido a la actividad bactericida de la sangre del donante 1

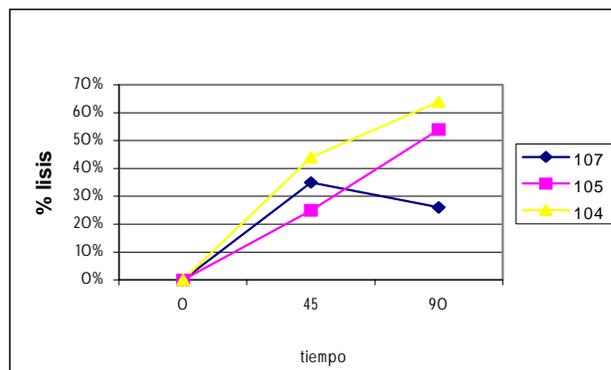
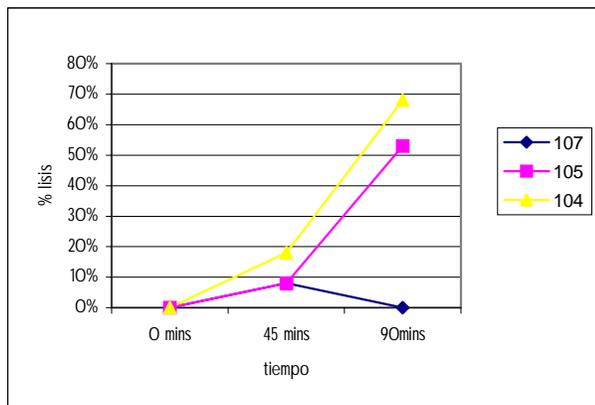
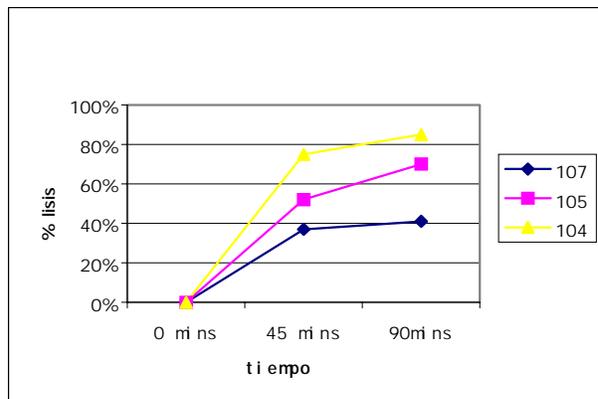


Gráfico 3. Porcentaje de muerte de *N. meningitidis* (B:4:P1.19,15) debido a la actividad bactericida de la sangre del donante 2



La sensibilidad del EST aumentó al reducir la concentración del inóculo bacteriano a 10^5 y 10^4 UFC/mL con respecto a la concentración recomendada originalmente (10^7 UFC/mL).

Gráfico 4. Porcentaje de muerte de *N. meningitidis* (B:15:P1.7,16) debido a la actividad bactericida de la sangre del donante 2.



La desviación estándar y el coeficiente de variación entre ensayos disminuyeron al emplear concentraciones inferiores del inóculo bacteriano.

Referencias

- Achtman M. Global epidemiology of meningococcal disease. In: Cartwright K, Ed. *Meningococcal disease*. London: John Wiley and Sons.1995; 159-77.
- Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med*. 1969; 129:1307-26.
- Verheul AF, Snippe H, Poolman JT. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol Rev*. 1993; 57:34-49.
- Virji M, Kayhty H, Ferguson DJ, Alexandrescu C, Heckels JE, Moxon ER. The role of pili in the interactions of pathogenic *Neisseria* with cultured human endothelial cells. *Mol Microbio*. 1991; 5:1831-41.
- Virji M, Makepeace K, Peak IR, Ferguson DJ, Jennings MP, Moxon ER. Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol*. 1995; 18:741-54.
- Gotschlich EC, Goldschneider I, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human volunteers. *J Exp Med*. 1969; 129:1367-84.
- Wyle FA, Artenstein MS, Brandt BL, et al. Immunologic response of man to serogroup B meningococcal polysaccharide vaccines. *J. Infect. Dis*. 1972; 126:514-21.
- Ross SC, Rosenthal PJ, Berberich HM, Densen P. Killing of *Neisseria meningitidis* by human neutrophils: implications for normal and complement-deficient individuals. *J. Infect. Dis*. 1987; 155:1266-75.
- Sierra GV, Campa HC, Varcancel NM, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis* : protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann*. 1991; 14:195-207.
- Perkins BA, Jonsdottir K, Briem H, et al. Immunogenicity of two efficacious outer membrane protein-based serogroup B meningococcal vaccines among young adults in Iceland. *J. Infect. Dis*. 1998; 177:683-91.
- Ison CA, Heyderman RS, Klein NJ, Peakman M, Levin M. Whole blood model of meningococcal bacteraemia a method for exploring host-bacterial interactions. *Microb Pathog*. 1995; 18:97-107.

12. Ison CA, Anwar N, Cole MJ, *et al.* Assessment of immune response to meningococcal disease: comparison of a whole-blood assay and serum bactericidal assay. *Microb Pathog.* 1999; 27.
13. Ortega Y. Aplicación del Ensayo de Lisis de Sangre Total para la evaluación de la respuesta inmune protectora inducida por VA-MENGOC-BC® (tesis de licenciatura en Bioquímica). Ciudad de La Habana. Instituto Finlay, 1998.
14. Arditi M, Kabat W, Yogev R. Antibiotic-induced bacterial killing stimulates tumour necrosis factor release in whole blood. *J. Infect Dis.* 1993; 167:240-4.

Preliminary evaluation of different concentrations of bacterial suspensions used in the Whole Blood Bactericidal Assay

Abstract

The Serum Bactericidal Assay (SBA) has been considered the "golden standard" to evaluate the serological efficacy of meningococcal vaccines, taking into account that the presence of serum bactericidal antibodies is related with protection. The levels of A and C capsular polysaccharide antibodies against these serogroups has confirmed the reliability of this assay. The SBA has also been used to assess the efficacy of serogroup B vaccines, but in some studies, the correlation between serological efficacy and protection has been poor. Ison *et al* developed the Whole Blood Assay (WBA) that measures the complete bactericidal activity in blood. The results obtained indicate that this model is a more sensitive marker of immunity than SBA for serogroup B. The results from the evaluation of the Cuban meningococcal vaccine (VA-MENGOC-BC®) in infants using WBA showed that after the immunisation around 50% of infants exhibited > 50% lysis of the vaccine strain (B:4:P1.19,15). The results against heterologous strains were poor. Taking into account these and other results we evaluated the behavior of the WBA using lower concentrations of the bacterial suspension used as inoculum. Blood from two healthy adults was screened for bactericidal activity using the WBA, against B:4:P1.19,15(Cu 385/83) and B:15:P1.7,16 (MC58) strains. In addition to the recommended concentration (10^6 or 10^7 CFU/mL), two lower concentrations were used (10^5 and 10^4 CFU/mL). The first donor showed a lytic activity of 40% against the homologous strain, at a concentration of 10^7 CFU/mL. At 10^5 and 10^4 CFU/mL concentrations, lysis was around 80%. The behavior against the heterologous strain showed 25% of lysis at a concentration of 10^7 CFU/mL and around 60% at lower concentrations. The second donor did not show lytic activity against the homologous strain at a concentration of 10^7 CFU/mL, while it showed 55% and 65% lysis at 10^5 and 10^4 CFU/mL concentrations, respectively. The results against the heterologous strain were 40% of lysis for the highest concentration and 70% and 80% for concentrations of 10^5 and 10^4 CFU/mL respectively.

Key words: Serum Bactericidal Assay, Whole Blood Assay, *Neisseria meningitidis*