

Artículos Originales

Producción y caracterización de Anticuerpos Monoclonales específicos para la Toxina del *Vibrio cholerae* 01. Informe preliminar.

Rodrigo X. Armijos,^{1,4} Manuel R. Palacios Chacón,^{1,3} Camilo S. Zurita-Salinas,¹ Roberto Rodríguez,⁴ Santiago Escalante,⁴ Enrique Vela,⁴ Manuel Calvopiña H.^{1,2}

¹Centro de Biomedicina, Unidad de Inmunología y Enfermedades Tropicales, ²Cátedra de Farmacología, ³Cátedra de Medicina Tropical, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central, ⁴Instituto Nacional de Higiene "Leopoldo Izquieta Pérez", Quito-Ecuador.

Resumen

El *Vibrio cholerae* es el agente causal de la enfermedad del Cólera. El serotipo 01 puede ser subdividido en los biotipos El Tor y Clásico. En el diagnóstico de la enfermedad del Cólera se utilizan kits comerciales con el uso de Anticuerpos Monoclonales (AM), éstos existen a nivel mundial, pero el país no cuenta todavía con un centro de elaboración y mantenimiento de producción de AM, por lo que se propuso la creación de un Centro de Elaboración de Anticuerpos Monoclonales. En este informe preliminar mencionamos la producción y caracterización de AM contra la toxina colérica (TC) para lo que se utilizó como antígeno el extracto total del *V. cholerae* O1 (AC). La purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad usando Proteína A-Sefarosa. Los AM se caracterizaron por la prueba inmunoenzimática de ELISA usando la Toxina del Cólera de procedencia comercial (TCc) y bacteria sonicada como antígenos. El isotipo del AM obtenido se realizó mediante inmunodifusión doble. La especificidad se determinó mediante inmunotransferencia utilizando como soporte antigénico bacterias enteropatógenas más frecuentes en nuestro medio. Un total de 368 hibridomas se obtuvieron de los cuales 10 mostraron producción de AM. Los hibridomas de mayor producción fueron F53A9, F53F8, F57A5, F57F10, F59A1, F510F6, F510G5 y F56F11. Seleccionándose, finalmente, el hibridoma F56F11 por presentar el título más alto, correspondiendo al isotipo IgG3. No observamos reacción cruzada del AM obtenido con las demás bacterias enteropatógenas investigadas mediante inmunotransferencia. Estos resultados preliminares sustentan la posibilidad de continuar hasta la obtención del kit comercial en la identificación rápida de esta enfermedad.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, Toxina, Anticuerpos Monoclonales.

Summary

Vibrio cholerae is the causative agent of the cholera disease. The 01 *Vibrio cholerae* serotype can be divided in the El Tor and Classic biotypes. The Monoclonal Antibodies (MA) are useful in the diagnosis of cholera disease all over the world, but in our country are not available yet, due to the lack of a Center for MA Production. Consequently we propose to establish a Center for the Production of MA. In this preliminary report we describe the

Dirección para correspondencia: Dr. Rodrigo X. Armijos, Unidad de Inmunología y Enfermedades Tropicales, Centro de Biomedicina, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Central del Ecuador, Iquique s/n y Sodiro, Quito-Ecuador.

production and characterization of MA against the Cholera Toxin (TC), for this purpose we used as antigen the whole *V. cholerae* bacteria (CA). For the purification of our MA we used a column of Protein A Sepharose. The MA characterization was through ELISA and double immunodiffusion were used for the isotype characterization. The Western-Blot technic with local enteropathogenic bacterias was used for the evaluation of the MA specificity to *Vibrio cholerae*. We produced a total of 368 hybridomas, from which the production of MA was documented in F53A9, F53F8, F57A5, F57F10, F59A1, F510F6, F510G5 and F56F11. Finally, we choose the F56F11 due to it's highest MA titers which belongs to the IgG3 isotype. We didn't see any cross-reaction with other enteropathogenic bacterias in the western-blot. This preliminaries data support us in the possibility to produce a commercial kit for the rapid diagnosis of cholera disease.

Key words: *Vibrio cholerae*, Toxin, Monoclonal antibodies.

Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Central del Ecuador 2000; 25(2): 13-16

Introducción

El *Vibrio cholerae* es una bacteria gram negativa, que coloniza el intestino delgado y secreta una enterotoxina, la cual se une a las células epiteliales de la mucosa causando salida de líquido hacia el lumen del intestino.¹ El *V. cholerae* serogrupo 01 es responsable de la mayoría de epidemias y pandemias del cólera,² aunque recientemente se ha identificado al serogrupo No 01 (Bengala 0139) causante de epidemias severas de diarrea y deshidratación.^{2,3} La toxina del *V. cholerae* (TC) es una proteína heterooligomérica de 86 kDa, secretada por el *V. cholerae* cuando coloniza el intestino delgado, en donde ésta induce secreción de líquidos en forma masiva por la mucosa intestinal.⁴ La TC está formada por seis subunidades: una subunidad A central, formada por dos péptidos (A1 y A2) unidos por un puente disulfuro, rodeando las mismas se encuentran 5 subunidades B, una de estas se fija al receptor celular (gangliósido GM-1) en el epitelio intestinal, mientras que la subunidad A es la que contiene la porción enzimática de la toxina,^{5,6} que luego de ingresar al enterocito, por acción de proteasas, es dividida en dos fragmentos: A1 y A2. La A2 es una molécula de unión a la subunidad B, mientras que la A1 actúa sobre la proteína G incrementando la actividad de la adenilato ciclasa con la consecuente elevación de 3', 5' monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Las altas concentraciones de AMPc dan como resultado final la presencia de diarrea secretora o acuosa.⁶ El diagnóstico de laboratorio del cólera es por cultivo, que requiere de por al menos 48 horas para su identificación. Nuevas pruebas en el

diagnóstico están actualmente disponibles en el mercado, entre las que contamos con la utilización de anticuerpos monoclonales (AM), cuyo principal beneficio es la alta especificidad y el diagnóstico rápido.

Los AM son utilizados como herramientas óptimas para investigar y purificar diversas moléculas de interés en una amplia gama de microorganismos, por lo que es fácil su aplicación en pruebas de diagnóstico basadas en la localización y cuantificación de antígenos. El desarrollo y producción de AM para *V. cholerae* se presenta como una alternativa factible de ser aplicada como diagnóstico rápido de la enfermedad del cólera con la posibilidad también de aplicarse en la evaluación de reservorios naturales. Aunque se han desarrollado pruebas de diagnóstico del cólera utilizando anticuerpos monoclonales,⁷⁻¹⁰ el Ecuador no cuenta con esta tecnología y además, resulta oneroso su adquisición, por lo que proponemos elaborar y producir AM para el *V. cholerae* para su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad del cólera. En este artículo preliminar informamos la producción, purificación y caracterización de AM que reconocen la toxina del *V. cholerae* O1.

Materiales y Métodos

Antígeno e inmunización a ratones BALB/c. Se utilizó antígeno completo (AC) de *V. cholerae*, serotipo Ogawa, código 1130 donada por el PROCED, aislada a partir de un paciente con cólera, con el cual se inmunizaron ratones adultos BALB/c (Universidad de Tampa FL, USA), con el siguiente esquema de inmunización: día 0: se inyectó con 5 µg de AC más adyuvante completo de Freund; días 7 y 14 con 5 µg de AC más adyuvante incompleto de Freund y en el día 21 con 10 µg de AC intraperitonealmente. Siete días luego de la última inmunización, se cuantificaron los títulos de anticuerpos dirigidos al AC en el suero de los animales inmunizados, utilizando la técnica de ELISA. Brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pozos (Corning, USA) con 10 µg/ml de AC en buffer de carbonatos 0.1 M, pH 9.6, para incubarse a 4° C toda la noche. Los pozos fueron lavados por tres ocasiones con PBS-Tween-20 0,005% (Merck, Darmstadt, Alemania) por 5 minutos y bloqueados con leche descremada 4% en amortiguador de lavado por 1 hora a 37° C. Los sueros de los animales inmunizados y no inmunizados (control negativo) fueron diluidos con PBS (1:80) e incubados por 1 hora a 37° C. Las placas fueron lavadas con PBS-Tween-20 e incubadas con el conjugado marcado con peroxidasa de rábano (anti-IgG de ratón, SIGMA St. Louis, Mo, USA) por 1 hora a 37° C. Posterior a 5 lavados, se agregaron 100 µl del amortiguador citrato-fosfato 0.1 M, que contenía 1,2 benzenediamina (OPD, Sigma) y H₂O₂ (Merck) 0,01% e incubados por 20 minutos a temperatura ambiente (TA). El desarrollo del color fue medido en un lector de ELISA (LabSystems, Finlandia) a 450nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado; el punto de corte fue el promedio de dos desviaciones estándares de los controles negativos.

Producción de hibridomas. Después de 7 días de la última inmunización los animales fueron sacrificados, las células esplénicas se recuperaron y se fusionaron con las células del plasmocitoma p3-Xg3Ag8 (Ag8, donado por la Dra. Yolanda Medina del INDRE, México DF, México) de acuerdo a protocolo de Gavilondo.¹¹ Brevemente, se realizó la fusión entre las células esplénicas del ratón inmunizado con células del plasmocitoma Ag8, guardando la relación 10:1, utilizando polietilenglicol (pm 1300-1600, Sigma), en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma) más hipoxantina-aminopterina-timidina (Sigma). Las placas fueron incubadas a 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Los hibridomas obtenidos fueron transferidos en

forma consecutiva a placas de cultivo (Corning, USA) de 16, 24 y 48 pozos para su expansión.

Detección del hibridoma productor de AM por la técnica de ELISA. Se sensibilizaron placas de 96 pozos (Corning) con 10 µg/ml de TCc y AC (10 µg/ml) en buffer de carbonatos 0.1 M, pH 9.6 e incubadas a 4° C toda la noche. Los pozos fueron lavados por tres ocasiones con PBS-Tween-20 0,005% (Merck) por 5 minutos y bloqueados con leche descremada 4% en PBS-Tween-20 por 1 hora a 37° C. Los sueros de los animales inmunizados y no inmunizados (control negativo) fueron diluidos con PBS (1:80) e incubados por 1 hora a 37° C. Las placas fueron lavadas con PBS-Tween-20 e incubadas con el conjugado anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa de rábano (Sigma) por 1 hora a 37° C. Posterior a 5 lavados, se agregaron 100 µl del amortiguador citrato-fosfato 0.1 M, que contenía 1,2 benzenediamina (Sigma) más H₂O₂ (Merck) 0,01% e incubados por 20 minutos a TA. El desarrollo del color fue medido en un lector de ELISA (LabSystems, Finlandia) a 450 nm. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado; el punto de corte fue el promedio de dos desviaciones estándares de los controles negativos. Aquellos hibridomas que producían títulos elevados fueron escogidos para su expansión y purificación.

Purificación del Anticuerpo Monoclonal: Se utilizó una columna de cromatografía que se empacó con Sefarosa CL-4B-Proteína A (Sigma), utilizando el amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 8 para la fijación del AM y el amortiguador de ácido acético 0.1M en cloruro de sodio 0,15 M, pH 4 para los lavados. Los eluidos se obtuvieron en un colector de fracciones (BioRad, USA), los cuales fueron leídos a 280 nm en un espectrofotómetro (Hach, USA). Las fracciones que mostraron picos fueron seleccionadas para su posterior utilización en la identificación del isotipo del AM por inmunodifusión doble. Brevemente, se perforaron hoyos de 3 mm de diámetro en placas de agarosa (Merck) al 1% en amortiguador barbital pH 8,6. Diez µl de la fracción se colocaron en el hoyo central y en los 6 hoyos periféricos se colocaron los anticuerpos anti isotipo (Sigma). Se incubó por 48 horas en cámara húmeda a 4° C para su posterior lectura.

SDS-PAGE e inmunotransferencia. Los estudios de reacción cruzada se realizaron considerando antígenos de bacterias involucradas en la etiología de cuadros diarreicos agudos en el país. Bajo este criterio se seleccionaron las cepas de *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* enteropatógena, *Vibrio parahemolyticus*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* O1, que fueron proporcionadas por el PROCED, Quito, Ecuador, a lo que se sumó además la TCc (GIBCO, USA). Para la obtención de los correspondientes antígenos, las bacterias fueron sonicadas siguiendo tres ciclos de 1 minuto cada uno (VibraCell, USA). La determinación de proteínas del antígeno se realizó por la técnica de Lowry.¹² Posteriormente, se procedió al corrimiento electroforético de estas muestras en geles de SDS-PAGE de acuerdo a Laemmli.¹³ Una vez obtenidos las fracciones de los antígenos descritos en el gel, se realizó su transferencia a papel de nitrocelulosa (MFS, California, USA), a 780 mA por dos horas utilizando el sistema semi-seco (Modelo IMM1, WEP Co., Seattle, Wa, USA), la misma que se comprobó tras colorear un segmento de la nitrocelulosa con negro de amido. Posteriormente, se incubaron las tiras de nitrocelulosa impregnadas de cada uno de los antígenos mencionados en solución de bloqueo [gelatina (Sigma) al 0,5% en PBS, Tween-20 al 0,01 %] por 2 horas a 37° C, para seguidamente incubarse con el AM anti-cólera concentrado por liofilización, por 2 horas a 37° C. Se lavaron las membranas con PBS-Tween-20 0,005% por tres ocasiones y se incubaron con una suspensión de anticuerpo anti IgG de ratón obtenido en

cabra conjugado con peroxidasa (Sigma) por 2 horas a 37° C. Luego de lo cual se lavó e incubó por 15 minutos a TA con o-fenilenediamina 10 mg/ml (Sigma) como cromógeno, más H₂O₂ como sustrato, en amortiguador de citrato-fosfato pH 5,4 y se lavó finalmente con agua bidestilada.

Resultados

Una vez realizada la fusión de las células del bazo del ratón inmunizado con las del mieloma Ag8, se obtuvieron 368 hibridomas, lo cual indica un elevado rendimiento con la técnica de fusión empleada. En todos los casos se determinó la producción del AM anti-TC, mediante la técnica de ELISA, utilizando AC y TCc como antígenos. Únicamente se logró detectar 10 hibridomas productores del AM contra la toxina del *V. cholerae*. Aunque también se observó reactividad menor contra el AC (Tabla 1).

Tabla 1. Valores en DO mediante ELISA hallados en los sobrenadantes de lo hibridomas seleccionados

Hibridomas (Clave)	Contra TC (DO)	Contra AC (DO)
F510F6	0.337	0.015
F57F10	0.173	0.121
F53A9	0.191	0.128
F510G5	0.214	0.104
F53F8	0.188	0.067
F57A5	0.160	0.040
F59A1	0.125	0.115
F56F11	0.386	0.317
F58D5	0.201	0.013
F54D6	0.255	0.020

DO = densidad óptica a 490 nm.

TC = toxina del *Vibrio cholerae* 01

AC = antígeno completo del *vibrio cholerae* 01

De los 10 hibridomas obtenidos se encontraron títulos significativos en los siguientes casos: el F53A9, F53F8, F57A5, F57F10, F59A1, F510F6, F510G5 y F56F11, siendo este último el seleccionado para las pruebas posteriores, por presentar el mayor título de producción de AM (Tabla 2).

Mediante la inmunodifusión doble, se encontró que el AM F56F11 pertenece al isotipo IgG3 (datos no mostrados). En la prueba de ELISA como en la inmunotransferencia del AC y de la TCc, acopladas con el AM F56F11, se reveló solamente la TCc cuando se utilizó el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, en tanto que no se observaron bandas de positividad en la reacción con el anti IgM. No se observó reacción con el AC utilizando anticuerpos anti IgG y anti IgM en los dos metodologías mencionadas, cuando se utilizó el sobrenadante del hibridoma F56F11.

En relación a los estudios de reacción cruzada basados en las inmunotransferencias de los diferentes antígenos bacterianos descritos, utilizando el AM F56F11 y anti IgG de ratón se logró revelar reacción positiva en el caso de la TCc, mientras que con los otros antígenos bacterianos fueron negativos (datos no mostrados).

Discusión

En el presente estudio, se produjo un hibridoma que secreta AM, el F56F11 contra la TC del *V. cholerae* y usamos este AM para identificar y caracterizarlo. Los datos presentados muestran que hay 10 hibridomas productores del AM contra la TC y AC, y que el hibridoma F56F11 presentó títulos elevados de

reactividad contra la TC, aunque también se observó reactividad contra AC. También documentamos que el AM obtenido está dirigido contra los demás constituyentes estructurales del *V. cholerae* 01. En las inmunotransferencias no observamos reacción cruzada con las bacterias enteropatógenas investigadas.

Tabla 2. Comparación mediante ELISA (DO) de las distintas clonas obtenidas del hibridoma F56F11.

Clona	Experimentos		
	I	II	III
	Contra la toxina del <i>Vibrio Cholerae</i> 01		
4	0.476	-	2.131
5	-	1.122	0.696
6	-	1.733	0.567
7	-	1.884	0.470
8	0.466	0.555	0.668
9	0.381	1.239	0.460
10	-	0.869	0.237
11	0.366	0.097	0.036
12	0.395	1.149	0.929
13	0.609	1.430	0.900
14	0.367	-	0.198
15	-	0.735	0.291
16	0.458	-	0.055
17	0.364	0.834	0.005
18	0.427	0.728	-
19	0.273	1.739	0.418
20	-	0.069	0.036
21	-	1.106	1.415
22	-	1.584	0.688
23	0.304	-	-
24	-	0.982	-
26	1.466	1.476	-
28	0.554	1.330	-
29	-	1.608	-

Los valores subrayados corresponden a las clonas positivas seleccionadas y mantenidas en cultivo. DO= densidad óptica a 490 nm.

Con la metodología desarrollada, hemos encontrado una elevada eficacia de fusión en la elaboración de los hibridomas. El hibridoma seleccionado F56F11 muestra una alta especificidad. Este AM ha mostrado una gran estabilidad en la manipulación bioquímica, pues ha sido sometido a procesos de congelación, descongelación, diálisis y liofilización, sin mayor alteración en sus capacidades reactivas; lo cual nos asegura las óptimas cualidades que debe reunir un AM en la producción de un *kit* diagnóstico. En relación a la capacidad de reconocimiento del AM al enfrentarle con AC, no se pudo obtener en la inmunotransferencia la banda de reactividad contra TC, posiblemente, se deba a la metodología empleada en el cultivo masivo y a que la producción de la TC por el *V. cholerae* no se hallaba en su máxima expresión debido a que el crecimiento bacteriano no se encontraba en su fase logarítmica, momento en el cual se producen las mayores cantidades de TC.¹⁴ Además, la expresión de la TC requiere ciertos suplementos en el medio de cultivo que no son agregados artificialmente, sino producidos en el lumen intestinal humano. Aunque encontramos reactividad positiva en el ELISA.

La producción de *kits* diagnósticos rápidos y confiables es el objetivo de los epidemiólogos y especialistas en enfermedades infecciosas para instaurar rápidamente el tratamiento debido o informar la presencia de una enfermedad con características

epidémicas. Los métodos de inmunodiagnóstico llenan mucho de los requerimientos de especificidad y sensibilidad ya que su reacción se basa en la reacción inmune, la cual por definición presenta una alta especificidad. En las enfermedades entéricas, dada su gravedad y su curso rápido se impone este tipo de diagnóstico precoz. Aunque se han probado las siguientes técnicas de inmunodiagnóstico en el Cólera: inmunofluorescencia, coaglutinación, ELISA, Látex, las cuales utilizan AM, en el país no existe un laboratorio de investigación para la producción semi industrial de anticuerpos monoclonales diseñados para el diagnóstico rápido de la enfermedad del Cólera. Con este paso inicial de la purificación y obtención del AM mencionado, nuestra siguiente actividad es determinar si existe reacción cruzada con los otros serotipos de *V. cholerae* y posteriormente elaborar un kit diagnóstico rápido para ser aplicado en ensayos clínicos preliminares, en el laboratorio de rutina y en ensayos epidemiológicos.

Si bien estos resultados son preliminares su importancia radica que este es el primer estudio que informa sobre AM que ha sido completamente producido en el país. De esta forma ha quedado consolidado el Centro de Producción de Anticuerpos Monoclonales con la capacidad de servir al país con la elaboración de AM para su aplicación en la investigación básica, epidemiológica, clínica e industrial.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por BID-FUNDACYT mediante el Proyecto 023. Agradecemos al PROCED por la donación de las cepas bacterianas.

Bibliografía

- Kabir S: Immunochemical Properties of the Major Outer Membrane Protein of *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, 1983; 39: 452-455.
- Colwell RR: Global Climate and Infectious Disease: The Cholera paradigm. *Science* 1996; 274: 2025-2031.
- Albert MJ, Siddique M, Islam ASG, Faruque M, Ansuruzzaman S, Faruque SM, Sack RB: A large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-01 in Bangladesh. *Lancet* 341:704 (letter).
- Levine M, Kaper JB, Black RE, Clemens ML: New knowledge on pathogenesis of bacterial infections applied to vaccine development. *Microbiol Rev*, 1983; 47: 510-516.
- Holmgren J, Lindholm L: Cholera toxin, ganglioside receptors and the immune response. *Immunol Commun* 1976; 5: 737-758.
- Carrada-Bravo T: La inmunología del cólera y la biología molecular de la toxina colérica. *Progresos recientes y perspectivas futuras. Rev Alergia México*. 1994; 41: 69-76.
- Colwell RR, Hasan AK, Huq A, Loomis L, Siebeling J, Torres M, Galvez M, Islam S, Bernstein D: Development and evaluation of a rapid, simple, sensitive monoclonal antibody based coagglutination test for direct detection of *Vibrio cholerae* 01. *FEMS Microbiol Lett*. 1992; 97: 215-220.
- Losonsky G, Levine M: Immunologic methods for diagnosis of infections caused by diarrheagenic members of the families *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. Editors: Rose N, Conway de Macario E, Folds J D, Lane C J, Nakamura RM. ASM Press, Washington, DC. 1997; 494-495.
- Hasan JA, Bernstein D, Huq A, Loomis L, Tamplin ML, Colwell RR: Cholera DFA: an improved direct fluorescent monoclonal antibody staining kit for rapid detection and enumeration of *Vibrio cholerae* 01. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 120: 143-148.
- Carrillo L, Gilman RH, Mantle RE, Nuñez N, Watanabe J, Moron J, Quispe V, Ramirez Ramos AL: Rapid detection of *Vibrio cholerae* 01 in stools of peruvian cholera patients by using monoclonal immunodiagnostic kits. Loayza Cholera Working Group in Peru. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 856-857.
- Gavilondo J: Hibridomas por fusión celular. En: *Anticuerpos monoclonales*. Gavilondo J. Elfos Scientiae. Habana 1995
- Lowry OH, Rosebrough AL, Farr A, Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Laemmli U: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- Richards K, Douglas SD: Pathophysiological effects of *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* and their exotoxins on eucaryotic Cells. *Microbiol Rev* 1978; 42: 592-613.
- Finkelstein RA: Cholera. *Crit Rev Microbiol* 1973; 2: 553-623.
- Schenkein IR, Green DS, Santos S, Maas WK: Partial purification and characterization of a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1976; 13: 1710-1720.