

Estudios preliminares para el desarrollo de un reactivo diagnóstico serológico de fiebre tifoidea

Preliminary studies for the development of a reactive serologic diagnosis of typhoid fever

Por Jennifer L. Encinas-Reyes, M. Guadalupe Flores-Beltrán, Beatriz Ortega-Escamilla, Jesús Alarcón-Bonilla
Universidad Tecnológica de Tecámac

Dirección electrónica del autor de correspondencia:
jabbio@hotmail.com

Recibido: Marzo 11 de 2014
Aceptado: Octubre 1 de 2014

RESUMEN: Un método para el diagnóstico de la fiebre tifoidea es la serotipificación que se basa en el principio de aglutinación a partir de los antígenos flagelar H y somático O con sus anticuerpos correspondientes. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de tesis fue desarrollar un reactivo de diagnóstico para dicha enfermedad por seroaglutinación. Para tal fin, la cepa *Salmonella typhi* ATCC 6539 se propagó en Agar Sulfito de Bismuto, comprobando su pureza por morfología colonial y microscópica, y por pruebas bioquímicas. Posteriormente, se produjeron los antígenos H en caldo flagelar y caldo formolado con fucsina, y el antígeno O en caldo soya tripticasa y caldo fenolado con rojo Congo. Los antígenos se evaluaron con sueros positivos de conejo inmunizado y de pacientes de un nosocomio del Estado de México, observando resultados positivos por aglutinación significativa.

PALABRAS CLAVES: Antígeno somático y flagelar, fiebre tifoidea, *Salmonella typhi*, seroaglutinación.

ABSTRACT: A method for the typhoid diagnosis is serotyping which is based on the principle of agglutination from the flagellar H and somatic O antigens and their corresponding antibodies. Therefore, the aim of this thesis was to develop a diagnostic reagent for this disease by seroagglutination. For this, the strain of *Salmonella typhi* ATCC 6539 was propagated in Bismuth Sulfite Agar, verifying its purity by colonial and microscopic morphology and biochemical tests. Subsequently, the H antigen was produced in flagellar and formolade broths with fuchsin and the O antigen was produced in trypticase soy and phenolated broths with Congo red. The antigens were evaluated with positive sera from immunized rabbits and patients from a hospital in State of Mexico, they produced positive results by significant agglutination.

KEY WORDS: *Salmonella typhi*, seroagglutination, somatic and flagellar antigen, Typhoid.

Introducción

En México en el año 2010 las enfermedades gastrointestinales infecciosas ocuparon el lugar 23 de las causas totales de muerte a nivel nacional. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) se estima que cada año se presentan 1,500 millones de episodios de diarrea y una tasa de mortalidad por causa de esta enfermedad de 1.5 millones de personas en países en vías de desarrollo. Estas enfermedades son uno de los principales problemas de salud pública tanto en México como en el mundo. Se transmiten, ya sea por vía fecal-oral, o bien por el consumo de agua y alimentos contaminados. Afectan principalmente a la población infantil, y tanto su incidencia como su prevalencia dependen del nivel socioeconómico de los pacientes (Fernández, 2008).

Uno de los agentes etiológicos responsable es *Salmonella typhi*, microorganismo causante de la fiebre tifoidea. Esta bacteria afecta a más de 21.6 millones de personas alrededor del mundo con aproximadamente 220,000 casos de muerte. Según datos de la Secretaría de Salud en el 2010 los estados con mayor prevalencia son Chiapas, Nuevo León, Zacatecas,

San Luis Potosí, Guanajuato, Oaxaca y Tamaulipas. La frecuencia de esta enfermedad en México durante el año se manifiesta en los meses de abril a julio registrándose el mayor número de casos y tiende a disminuir durante los meses de septiembre a octubre (Forsythe *et al.*, 1999).

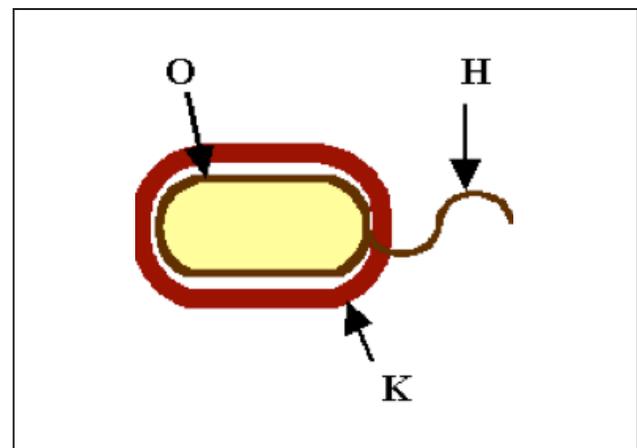


Figura 1. Estructura antigénica del género *Salmonella*

La estructura antigénica del género *Salmonella* (familia de las enterobacterias) es la siguiente (Martínez *et al.*, 1999) (Figura 1):

1. Antígeno somático (O): lipopolisacárido que aumenta la virulencia evitando la activación alterna del complemento, escapando de la fagocitosis.

2. Antígeno flagelar (H) o (d): proteína presente sólo en especies de salmonela móviles.

3. Antígeno capsular o de envoltura (Vi o K) (específico para *Salmonella typhi*, *dublin*, y *paratyphi C*): mucopolisacárido, protector de los antígenos O contra la acción de los anticuerpos o el complemento.

Existen diferentes técnicas de diagnóstico de laboratorio para la confirmación de esta enfermedad, como son los hemocultivos o coprocultivos. Sin embargo, las pruebas serológicas facilitan el diagnóstico oportuno para evitar consecuencias irreversibles, así como identificar anticuerpos específicos presentes en el suero de los pacientes basándose en la especificidad del reconocimiento antígeno-anticuerpo.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un reactivo de diagnóstico serológico específico, a partir de antígenos flagelares y somáticos, partiendo de un cultivo axénico de *Salmonella typhi* con colorantes adyuvantes para su fácil lectura e interpretación. La prueba puede ser cuantitativa realizando titulaciones del suero del paciente para detectar el estado de la enfermedad (Angarita, 2005).

Metodología

A partir de la propagación de la cepa *Salmonella typhi* ATCC6539 en placas de Agar sulfito de bismuto (ASB, Difco) a 37°C/24h., se seleccionaron por morfología colonial y microscópica (tinción de Gram) las UFC características para su posterior evaluación metabólica por pruebas bioquímicas (Ver Tabla 1). Con la finalidad de obtener un cultivo axénico se inoculó un tubo con 5 mL de caldo Soya Trypticasa (CST, Difco) estéril a 37°C/24 h. De éste, se obtuvo el paquete celular a 5,000 rpm/5 min.(Eppendorf) y se resuspendió en solución salina estéril (SSE, Pisa). Se determinó la concentración a una D.O. de 600 nm (Thermo Genesis 910) ajustándose a una concentración final de 900×10^6 UFC/mL (SC)

Para la obtención del antígeno flagelar H se inoculó con la SC anterior, un tubo con 5mL de caldo flagelar y se incubó a 37°C/24 h. Al final de la incubación se le agregó al medio solución fisiológica formolada al 1% y se dejó reposar a temperatura ambiente por una hora. Como coadyuvante se le agregó 0.1 mL de una solución de Fucsina (Sigma) al 1%.

Para la obtención del antígeno somático O se inoculó con la SC un tubo con 5 mL de CST a 37°C/24 h. Posteriormente se le agregó 2 mL de alcohol absoluto (Reasol) y se dejó reposar por 2 h. Después, se centrifugó a 2000 rpm/5 min (Eppendorf). El paquete celular se resuspendió en 5 mL de Solución Fisiológica Fenolada al 1% (SFF). Al final se le agregó 0.1 mL de una solución de Rojo Congo (Sigma) al 5%.

Para la producción de anticuerpos específicos (suero) se inmunizó un conejo por vía intravenosa con 0.5 mL de la SC a los 1, 4 y 8 días, y por vía intramuscular a los 12 días. Posteriormente se colectaron 18 mL de sangre en tubos con anticoagulante (EDTA), y se centrifugó a 5000 rpm/ 15 min. (Eppendorf) obteniendo el suero de conejo (ACC).

Resultados

Se obtuvieron por estría cruzada en ASB colonias características (Figura 2, izquierda) y en la morfología microscópica bacilos cortos Gram negativos no esporulados aislados (Ver Figura 2, derecha). Los resultados de las pruebas bioquímicas (Tabla 1) comprueban la pureza de la cepa *Salmonella typhi* ATCC 6539.

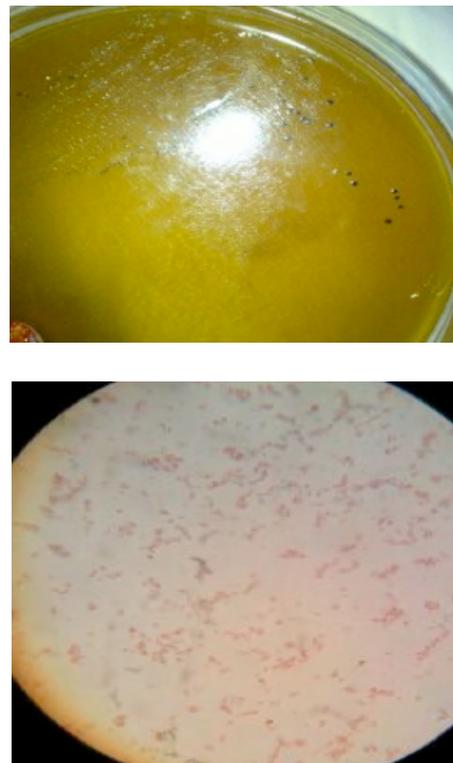


Figura 2. Morfología colonial en ASB (Izquierda) y microscópica (derecha) de *Salmonella typhi* ATCC 6539

Tabla 1.- Evaluación metabólica de *Salmonella typhi* ATCC 6539

Prueba Bioquímica	Resultado
Citrato de Simmons	negativo
Fermentación de glucosa (TSI)	positivo
Producción de H ₂ S (TSI/SIM/LIA)	positivo
Fermentación de lactosa (TSI)	negativo
Movilidad (MIO/SIM)	positivo
Descarboxilación de la lisina (LIA)	negativo
Fermentación de glicerol	Débil
Descarboxilación de la ornitina (MIO)	Negativo
Producción de indol (MIO/SIM)	Positiva

Fuente: Mc. Faddin, 2003

La Figura 3 muestra la evaluación de la especificidad de los antígenos H y O con coadyuvante (Fucsina y Rojo Congo, respectivamente) al someterlos tanto con los anticuerpos de conejo así como con sueros positivos donados por el Centro Médico ISSEMYM de Ecatepec. El costo estimado del reactivo diagnóstico fue de \$ 200 pesos, precio competitivo contra los 300 a 400 pesos que cuestan los de marca comercial.



Figura 3. Especificidad de los antígenos flagelar H (2a) y somático O (3b)

Conclusiones

Se comprobó la pureza de la cepa de *Salmonella typhi* ATCC 6539 por morfología colonial (ASB), microscópica (Tinción de Gram) y pruebas bioquímicas. Se verificó la especificidad de los antígenos flagelar H y somático O con Fucsina y Rojo Congo respectivamente como coadyuvantes con sueros positivos a *Salmonella typhi* de conejo inmunizado y de sueros de pacientes del Centro Médico ISSEMYM Ecatepec. Se recomienda evaluar la efectividad del reactivo diagnóstico desarrollado para fiebre tifoidea con respecto al tiempo para determinar su caducidad.

Referencias

- Angarita Bautista, L. Y. (2005). Técnicas de inoculación, sangría de animales, obtención de antígenos bacterianos y preparación de antisueros. Cúcuta : Universidad de Santander. Recuperado de: <http://es.scribd.com/doc/3288391>.
- Fernández Escartin, E. (2008). *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. 2da. Edición. Querétaro : U.A. de Querétaro.
- Forsythe, S. J. y Hayes, P. R. (1999). *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP*. Madrid : Acribia.
- Madigan, M., J. Martinko, P. Dunlap, D. y Clark, D. Brock. (2009). *Biología de los Microorganismos*. Doceava Edición. Pearson. España.
- Martínez, I., Muñoz, Y., Riveron, L., Duarte, M., y Jones, C. (1999). Caracterización fisicoquímica del polisacárido Vi de *Salmonella typhi*. *Vaccine Monitor* 12(2)23-28.
- Mc. Faddin (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*, 3ª Ed. Buenos Aires : Ed. Médica Panamericana.
- NOM. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. (1995). Bienes y Servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos. México.