

## Hacia el desarrollo de una vacuna eficaz contra el cólera

Lic. Luis García Imia<sup>1</sup>, Lic. Jorge Benítez Robles<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas. La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC), La Habana, Cuba

### El cólera, síntomas, patogénesis molecular

El cólera es una enfermedad diarreica aguda que se caracteriza por la deposición de abundantes heces con apariencia de agua de arroz que si no se tratan rápida y adecuadamente, conducen a la deshidratación y a la muerte de un elevado número de pacientes.

El agente etiológico del cólera es el *Vibrio cholerae*, una bacteria motil, gramnegativa y anaerobia facultativa. De acuerdo con la estructura del antígeno O, esta se puede dividir en 138 serogrupos. Hasta hace poco solo las cepas pertenecientes al serogrupo O1 producían toxina colérica (CT) y causaban cólera epidémico. Las cepas O1 se dividen en dos biotipos: Clásico y El Tor, y cada uno de ellos en tres serotipos: Ogawa, Inaba e Hikojima. A principios de 1992 se aisló una cepa de *Vibrio cholerae* no-O1 (denominada O139, Bengal) capaz de producir cólera epidémico (1). El aislamiento de esta cepa podría marcar la aparición de la octava pandemia de la enfermedad. En áreas endémicas la población adulta, reiteradamente expuesta al *Vibrio cholerae* O1, es la principal atacada por esta nueva cepa. Por lo que no existe protección cruzada entre ambos serogrupos (2,3).

Los estudios de organización de los genes de la toxina, reactividad cruzada de factores de colonización y la similitud de las cascadas de regulación que controlan la expresión de los factores de virulencia apuntan que el serogrupo O139 se deriva de vibrios El Tor (4).

*Vibrio cholerae* infecta al hombre a través de la ingestión de agua y alimentos contaminados. Una vez que han alcanzado y colonizado el intestino delgado, la expresión y secreción de CT se convierte en el paso clave de la patogénesis de este microorganismo. CT está compuesta por una

subunidad A (CTA), con actividad tóxica en las células del epitelio gastrointestinal y cinco subunidades B (CTB) que reconocen un receptor específico en la superficie de estas células y que luego de la unión a este se produce la ruptura de la toxina y la entrada de CTA a la célula (5).

Los mecanismos inmunes relacionados con esta enfermedad comprenden fundamentalmente una inmunidad antibacteriana y antitóxica. Algunos autores plantean que ambas son igualmente importantes y que actúan de manera sinérgica, mientras que otros, apoyados en estudios clínicos en humanos con cepas no toxigénicas, argumentan la importancia preponderante de la respuesta antibacteriana. Estas respuestas ocurren fundamentalmente a nivel de mucosas mediadas por anticuerpos de tipo IgA S que neutralizan la colonización intestinal del microorganismo, así como la unión de CTB a sus receptores específicos.

### Vacunas contra el cólera

Teniendo en cuenta que el *Vibrio cholerae* es un microorganismo no invasivo, que genera toda una respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal y que la propia enfermedad confiere una protección duradera, un preparado vacunal contra el cólera debe ser oral, preferiblemente con una bacteria viva o que en el proceso de producción conserve en lo posible la estructura nativa, de manera que estimule de forma efectiva el sistema inmune a ese nivel (6).

La vacuna parenteral contra el cólera, a base de células inactivadas, se ha dejado de utilizar por reactogénica y conferir una protección baja y poco duradera. Se ha trabajado intensamente en dos candidatos vacunales orales con resultados alentadores.

Holmgren en 1989 propuso una vacuna oral compuesta de células inactivadas suplementadas opcionalmente con CTB. Luego de una prueba de campo realizada en Bangladesh, esta vacuna resultó ser segura aunque de moderada eficacia (50% luego de tres años de seguimiento) (7). Además se requieren al menos dos dosis, presenta baja protección en niños y menor frente al biotipo El Tor y tiene un costo relativamente elevado.

Esta vacuna, no obstante, ha sido la más extensivamente utilizada, aunque las posibilidades de optimizarla tropiezan con el hecho de que no existe consenso sobre la importancia protectora de los antígenos proteicos del microorganismo y el carácter empírico de las condiciones de crecimiento e inactivación podría provocar la destrucción de algunos antígenos importantes para la protección.

Existen evidencias de que la infección es una interacción dinámica entre el agente infeccioso y el hospedero. En el caso del cólera se ha demostrado que la infección con cepas virulentas de *Vibrio cholerae* de ambos biotipos y serotipos provoca una sólida y duradera inmunidad a la reinfección (8). A la luz de estos conceptos se ha estado trabajando en el desarrollo de cepas de *Vibrio cholerae* genéticamente atenuadas por delección de los genes que codifican para CT y otros factores de virulencia.(9).

La primera generación de cepas vacunales se obtuvieron por delección de los genes que codifican para CTA y CT en cepas clásicas y El Tor, para producir las cepas CVD 101 y JBK 70 respectivamente que aunque brindaron una elevada protección contra el reto, mostraron una reactividad inaceptable. Un aspecto interesante derivado del ensayo con la JBK 70 fue la sólida protección alcanzada en ausencia de una respuesta antitóxica. A partir de la cepa clásica 569B, con la delección del gen que codifica para CTA y conservando aquel responsable de la síntesis de CTB, se obtuvo la cepa CVD 103, que fue significativamente menos reactiva. Posteriormente se incluyó un gen de resistencia al mercurio en el locus *hlyA* para dar lugar a cepas que han sido extensivamente investigadas en ensayos controlados con voluntarios (10)

Esta cepa vacunal es segura, no reactiva y altamente protectora incluso en niños. No obstante adolece de las siguientes limitaciones: Es menos protectora contra el reto con vibrios El Tor; debido a la pobre capacidad colonizadora, heredada de su cepa parental, se requieren altas dosis para lograr una buena inmunogenicidad y no protege en absoluto contra el ataque por *Vibrio cholerae* O139 (2).

En resumen, aún está por desarrollar una vacuna segura y altamente eficaz contra el cólera. Está claro que el conocimiento de factores de virulencia diferentes de CT contribuirá al desarrollo de una vacuna óptima.

### Resultados de las investigaciones conjuntas CENIC-Instituto Finlay

Además de CT, *Vibrio cholerae* produce otras toxinas que pueden ser responsables de la aún elevada reactividad de algunas cepas delecionadas para los genes que codifican para CTA y CTB. Entre estas toxinas se encuentran la Zonula Occludens Toxin (ZOT) y la Accessory Cholera Enterotoxin (ace), cuyo efecto tóxico se ha demostrado en experimentos en cámaras Ussing con membranas de intestino de conejo. No obstante su rol en la patogénesis del cólera, si lo tuvieran, se desconoce.

Los genes que codifican para CTA, CTB, zot, ace, orfU y cep están ubicados juntos formando un cluster en el cromosoma de *Vibrio cholerae* con secuencias repetidas directas a cada lado del tipo RS1 y/o RS2. Esta estructura en forma de transposon ha sido llamada cassette de virulencia.

En el laboratorio de Biología Molecular del CENIC, mediante el empleo de vectores suicida y técnicas de intercambio alélico, se ha obtenido un grupo de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* delecionadas para el cassette de virulencia (11). En la Tabla 1 se presentan las cepas obtenidas con su biotipo y serotipo correspondientes, así como el fenotipo resultante.

Hay un grupo de cepas serotipo Inaba y Ogawa que solamente muestran la delección del cassette de virulencia, pero que tienen una diferencia en la capacidad hemaglutinante de eritrocitos de pollo, al parecer serotipo específica y que está relacionada con la presencia o no de la hemaglutinina sensible a manosa (MSHA) en su superficie celular.

En otro grupo de cepas (103, 103B) que además de la carencia de los genes del cassette de virulencia tienen inactivado el gen de la hemaglutinina proteasa (enzima responsable de la activación proteolítica de CTA) con la inclusión en ese sitio del gen para la síntesis de la endoglucanasa A proveniente de *Clostridium thermocellum*. Esta enzima no es producida por el género vibrio por lo que su expresión es de utilidad para diferenciar una cepa vacunal de cualquier otra cepa circulante (12). Estas cepas han sido sometidas a un grupo de técnicas para comprobar *in vitro* e *in vivo* que están realmente atenuadas en su capacidad virulenta.

Tabla 1. Colección de cepas de *Vibrio cholerae* genéticamente atenuadas para inmunizar contra el cólera

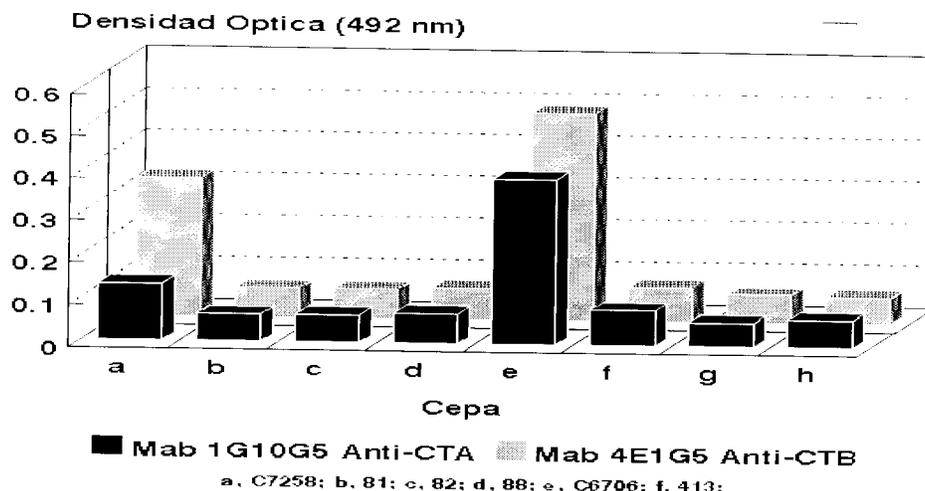
Cepa	Serología	Fenotipo/Genotipo
413	O1, Inaba	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB]
417	O1, Inaba	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB]
81	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup>
82	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup>
84	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup>
87	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup>
88	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup>
815	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup> ,thy <sup>-</sup>
4171	O1, Inaba	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],thy <sup>-</sup>
631	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup> ,hap::celA <sup>+</sup>
638	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup> ,hap::celA <sup>+</sup>
1333	O1, Inaba	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],hap::celA <sup>+</sup>
1332	O1, Inaba	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],hap::celA <sup>+</sup>
72	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup> ,hap::ctxB <sup>+</sup>
	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup> ,RS1::ctxB <sup>+</sup>
	O1, Ogawa	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB],mshA <sup>-</sup> ,RS1::cep <sup>+</sup>
251a	O139	[Dcep,DorfU,Dace,Dzot,DctxA,DctxB]

**Nomenclatura:** cep, "core encoded pilus"; orfU, "open reading frame U; ace, "acesory cholera enterotoxin"; zot, "zonula occludens toxin", ctxA, subunidad A de la toxina colérica; ctxB, subunidad B de la toxina colérica; mshA, hemaglutinina sensible a manosa; thy, auxotrofia a la timidina; hap, hemaglutinina/proteasa; celA, endoglucanasa A; RS1, secuencias repetidas que flanquean el cassette de virulencia. Los genes comprendidos en el cassette de virulencia están entre corchetes.

En la Figura 1 se muestran los resultados de las determinaciones de CT en el sobrenadante del medio de cultivo de algunas de estas cepas, por GM1-ELISA, que demuestra que estas cepas son incapaces de sintetizar la toxina ni sus subunidades en comparación

con los altos niveles de síntesis que presentan las cepas originales. Por otro lado la carencia del gen que codifica para la síntesis de la toxina está debidamente comprobado en análisis de hibridación Southern (resultados no mostrados).

Figura 1. Producción de toxina colérica en cepas atenuadas de *V. cholerae*



Aunque no existe un modelo animal que reproduzca exactamente la enfermedad, se han utilizado varios modelos animales para abordar diferentes aspectos de la patogenia e inmunogenicidad de *Vibrio cholerae* (13). Entre estos se encuentran el cálculo de la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) en ratones recién nacidos, que es muy útil en la evaluación de la virulencia de cepas de *Vibrio cholerae* y el modelo de intestino ligado (Ileal Loop) en conejo adulto muy utilizado en la cuantificación de la acción tóxica de CT a través de la medición del fluido

acumulado en un segmento de intestino ligado e inoculado con una determinada cepa de *Vibrio cholerae*.

Los resultados de la utilización del cálculo de la LD<sub>50</sub> en la evaluación de la virulencia de las cepas obtenidas se presenta en la tabla 2. Como regla general las cepas atenuadas tienen valores de LD<sub>50</sub> entre 100 y 1000 veces mayores que los de las cepas parentales lo que es una señal evidente de la atenuación alcanzada (11).

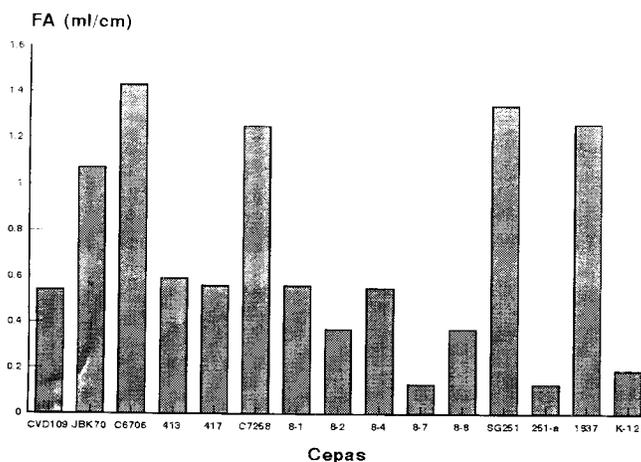
**Tabla 2. Relación de la LD<sub>50</sub> de las cepas estudiadas**

CEPAS	CLASIFICACION	LD <sub>50</sub>
569B	Clásico Inaba	2.3 x 10 <sup>5</sup>
395	Clásico Ogawa	6.06 x 10 <sup>3</sup>
N16961	EL Tor Inaba	1.7 x 10 <sup>4</sup>
C6706	EL Tor Inaba	3.6 x 10 <sup>4</sup>
413	EL Tor Inaba (mutada)	3.85 x 10 <sup>6</sup>
C7258	EL Tor Ogawa	1 x 10 <sup>4</sup>
8(1)	EL Tor Ogawa (mutada)	2.7 x 10 <sup>6</sup>
8(2)	EL Tor Ogawa (mutada)	1.9 x 10 <sup>7</sup>
8(8)	EL Tor Ogawa (mutada)	1.7 x 10 <sup>6</sup>
CVD 109	Clásico Inaba (mutada)	1.4 x 10 <sup>7</sup>
1837	O139	3.7 x 10 <sup>3</sup>
SG-251	O139	5 x 10 <sup>4</sup>
251-a	O139 (mutada)	3.9 x 10 <sup>6</sup>

Similares son los resultados en el modelo de intestino de conejo ligado donde los valores de fluido acumulado/cm de intestino son, para las cepas atenuadas, al menos el 50% de los obtenidos para sus correspondientes parentales y

a su vez comparables con los de la cepa CVD 109 obtenida en el "Center for Vaccine Development" de la Universidad de Maryland y que ya ha sido evaluada en humanos voluntarios. (Figura 2).

**Figura 2. Cuantificación del fluido acumulado en el modelo de intestino de conejo ligado (ileal loop)**



Algunas de estas cepas han demostrado ser comparablemente inmunogénicas a sus parentales, al ser administradas por vía oral a conejos adultos (resultado no mostrado).

Como conclusión podemos agregar que nuestro grupo ha obtenido, con la aplicación de técnicas de ingeniería genética, varias generaciones de cepas atenuadas que incluyen tanto aquellas con el cassette de virulencia deletado, como otras que adicionalmente han sufrido mutaciones en otros factores de virulencia,

están genéticamente marcadas o tienen incluso determinados genes del cassette de virulencia reincorporados a su genoma. La mayoría de estas cepas han demostrado su atenuación por toda una batería de técnicas *in vitro* e *in vivo* mediante el uso de los modelos animales internacionalmente utilizados en este campo, por lo que están listas para su evaluación definitiva como candidatos a cepas vacunales contra el cólera, en estudios controlados con humanos voluntarios.

### Referencias

1. Albert, M. J. *Vibrio cholerae* O139 Bengal. 1994. J. Clin Microbiol. 32:23-45.
2. Albert, M. J., K. Alam, M. Ansaruzzaman, F. Qadri and R. B. Black. 1994. Lack of protection against diarrhea due to *Vibrio cholerae* O139 (Bengal strain) after oral immunization of rabbits with *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103 HgR J. Infect. Dis. 169:230-231.
3. Tacket, C. O., G. Losonsky, J. P. Nataro, L. Comstock, J. Michalski, R. Edelman, J. B. Kaper and M.M. Levine. 1995. Initial clinical studies of CVD 112 *Vibrio cholerae* O139 live oral vaccine: Safety and efficacy against experimental challenge. J. Infect. Dis. 172:883-886.
4. Calia, K. E., M. Murtagh, M. J. Ferraro and S. B. Calderwood. 1994. Comparison of *Vibrio cholerae* O139 with *Vibrio cholerae* O1 classical and El Tor biotypes. Infect. Immun. 62:1504-1509.
5. Finkelstein R. A. Cholera enterotoxin (cholera toxin): a historical perspective. 1992. In Barua D., Greenough W. B., eds. Cholera. New York: Plenum Medical Book Company, 155.
6. Svennerholm, A-M., G. Jonson and J. Holmgren. 1994. Immunity to *Vibrio cholerae*. In Wachsmuth I. K., Blake, P. A., Olsvick O. Eds. Washington DC: ASM Press, 257.
7. Black, R. E., M. M. Levine, M. L. Clements, C. R. Young, A-M. Svennerholm and J. Holmgren. 1987. Protective efficacy in man of killed whole vibrio oral cholera vaccine with and without the B subunit of cholera toxin. Infect. Immun. 77:1116-1129.
8. Levine, M. M. Immunity to cholera as evaluated in volunteers. 1980. In Ouchterlony O., Holmgren J., eds. Cholera and related diarrheas. Basel: S. Karger, 195.
9. Levine, M. M., R. E. Black, M. L. Clements, L. Cisneros, D. R. Nalin and C. R. Young. 1981. Duration of infection-derived immunity to cholera. J. Infect. Dis. 143: 818-822.
10. Levine, M. M., C. O. Tacket. 1994. Recombinant live oral cholera vaccines. In Wachsmuth I. K., Blake, P. A., Olsvick O. Eds. Washington DC: ASM Press, 395.
11. Benitez, J. A., A. J. Silva, B. L. Rodríguez, R. Fando, J. Campos, A. Robert, H. García, L. García, J. L. Pérez, R. Oliva, C. Torres and T. Ledón. 1995. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: Construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. Arch. Med. Research. In Press.
12. Robert, A., Silva, A., Benitez, J., Rodriguez, B.L., Fando, R., Campos, J., Boesman-Finkelstein, M., Sengupta, D., Finkelstein, R. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin/protease gene using a novel reporter enzyme: *Clostridium thermocellum* endoglucanase A. Vaccines, submitted.
13. Richardson, S. H. 1994. Animals models in cholera researchs. In Wachsmuth I. K., Blake, P. A., Olsvick O. Eds. Washington DC: ASM Press, 203.