

Construcción y caracterización de mutantes de *Vibrio cholerae* incapaces de formar *biofilm*

Edith Suzarte, Javier Campos, Karen Marrero, Yussuan Silva, Boris L. Rodríguez, Eriel Martínez, Talena Ledón, Arlenis Moreno y Rafael Fando.

Dpto. de Genética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 19 de octubre de 2002. Aceptado: 16 de diciembre de 2002.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, *biofilm*, exopolisacárido, mutantes de cólera, candidato vacunal.
Key words: *Vibrio cholerae*, biofilm, exopolysaccharide, cholera mutants, vaccine candidates.

RESUMEN. *Vibrio cholerae* es el agente causal de la enfermedad diarreica epidémica conocida como cólera. Este microorganismo es capaz de crecer como *biofilm* sobre superficies abióticas y bióticas. Se plantea que la formación de *biofilm* por *V. cholerae* pudiera constituir una ventaja adaptativa para su sobrevivencia en los ecosistemas acuáticos. Para el establecimiento de un *biofilm* maduro es necesario la producción de un exopolisacárido denominado EPS^{Br}. En este trabajo se describe la construcción de mutantes derivados de la cepa vacunal atenuada *V. cholerae* 1333 por la inactivación del gen VC0934 que codifica para una glicosiltransferasa involucrada en la síntesis de EPS^{Br}. La inactivación de este gen, que incapacita a los mutantes de producir *biofilm*, fue realizada con el objetivo de disminuir el impacto ambiental de este candidato vacunal vivo. Los mutantes mantuvieron similares características deseadas de su cepa parental como: serología, morfología, motilidad y colonización en el modelo del ratón lactante. Resultaron además, incapaces de desarrollar el fenotipo rugoso bajo condiciones inductoras, siendo este la variante más resistente a la acción de distintos agentes como el cloro. Cuando a los mutantes se les restituyó el gen VC0934 salvaje se obtuvo una recuperación de la capacidad formadora de *biofilm* en ellos. Adicionalmente, se construyó un mutante VC0934 derivado de la cepa toxigénica de *V. cholerae* C7258 que resultó tan virulento como su cepa parental en el modelo del ratón lactante, lo cual sugiere que el gen VC0934 no desempeña un papel importante en la patogenia de *V. cholerae*. Todos estos resultados llevan a concluir que la mutación en VC0934 es una característica ventajosa para candidatos vacunales vivos de *V. cholerae* porque no afecta importantes propiedades de una cepa vacunal y sí permitiría afectar su sobrevivencia en el ambiente acuático.

ABSTRACT. *Vibrio cholerae* is a gram-negative aquatic bacterium responsible for the acute diarrheal disease of cholera, which is an epidemic illness that causes significant morbidity and mortality in the developing world. *V. cholerae* is able to grow as biofilms over abiotic and biotic surfaces. It has been suggested that the formation of biofilm by *V. cholerae* could be an important factor for the survival of this bacterium in the aquatic ecosystem. The synthesis of an exopolysaccharide is required for biofilm formation. This work describes the construction of mutants, derived from the attenuated vaccine strain of *V. cholerae* 1333, by inactivating of the gene VC0934 that encodes a glicosiltransferase required for production of the exopolysaccharide. Inactivation of this gene, which renders the mutants unable to form biofilms, was aimed at diminishing the environmental impact of live vaccine candidates. The mutants retained desired characteristics of the parental strain such as normal morphology, serology, motility and colonization in the suckling mouse model. Besides their inability to produce biofilms the mutants were also unable to produce the rugose phenotype under inducing conditions. When a wild type copy of the VC0934 gene was restored to the mutants they recovered the capacity to produce *biofilm*. Additionally, a glicosiltransferase mutant of the toxigenic strain of *V. cholerae* C7258 was constructed and it was as virulent as the parental strain in the suckling mouse model, which suggests that the gene VC0934 does not play an important role in *V. cholerae* pathogenicity. These results allowed to conclude that mutation of the gene VC0934 is probably a desirable feature in live cholera vaccine candidates because it does not significantly affect important properties of the vaccine strains while it seems to affect its environmental survival.

INTRODUCCION

Vibrio cholerae, una bacteria Gram negativa que habita en varios tipos de ambientes acuáticos, es el agente causal de la enfermedad diarreica epidémica conocida como cólera. En las regiones donde esta enfermedad es endémica, las epidemias ocurren con una tendencia estacional, siendo *V. cholerae* de difícil aislamiento en las aguas en los períodos interepidémicos, tras los cuales suele resurgir en múltiples focos dando lugar a la próxima epidemia.¹ Se ha sugerido que en estos períodos interepidémicos la bacteria se encuentra en un estado viable, pero no cultivable bajo el cual retiene su virulencia² y que el fitoplankton y el zooplankton son sus reservorios en el ambiente acuático. Numerosos estudios demuestran que *V. cholerae* es capaz de unirse a superficies tanto abióticas^{3,4} como bióticas^{4,5} formando una estructura tridimensional ordenada denominada *biofilm*,^{3,6} constituida por aglomerados de bacterias rodeados por canales de agua, que permiten la entrada de nutrientes a las células asociadas al *biofilm* y la salida de metabolitos tóxicos. En el estado natural, el microorganismo se ha encontrado asociado a superficies de plantas, algas verdes filamentosas, zooplankton, crustáceos e insectos.^{7,8}

El establecimiento del *biofilm* pudiera ser un factor importante en la sobrevivencia de *V. cholerae* en el ambiente acuático, pues dentro de esta estructura el microorganismo puede establecer transacciones metabólicas favorables con otros miembros del *biofilm* y a su vez, pro-

tegerse de predadores y agentes oxidantes⁹ que se encuentren en el ambiente. Además, la unión de la bacteria a superficies bióticas como el exoesqueleto de crustáceos puede constituir una forma de nutrición, pues *V. cholerae* es capaz de metabolizar la quitina.¹⁰ De esta forma, el *biofilm* puede ser una ventaja adaptativa importante en la sobrevivencia de este microorganismo en los ecosistemas acuáticos y especialmente, en las aguas de estuarios, lagos y ríos con las que el hombre tiene un mayor contacto. Por tanto, la habilidad de formar *biofilm* puede ser en parte responsable de la rápida dispersión de *V. cholerae* durante las epidemias.

Para la formación del *biofilm* es necesario la producción de un exopolisacárido³ denominado EPS^{Et}. Este exopolisacárido asociado con la variante de colonia rugosa es capaz de proteger a la célula de la acción bactericida del cloro y del peróxido de hidrógeno.^{3,11} Las proteínas encargadas de su síntesis y exportación se encuentran codificadas por un fragmento cromosomal de 26,5 kb denominado *vps* y por otros loci en el genoma de *V. cholerae*.^{3,12} En ausencia de los genes *vps* las células solo forman una monocapa en la superficie.⁷

Este trabajo tuvo como objetivo describir la obtención y caracterización de mutantes derivados de candidatos vacunales de *V. cholerae* incapaces de formar *biofilm* por la inactivación del gen VC0934, que forma parte de la región *vps* y codifica para una glicosil transferasa. Estos mutantes se construyeron con el fin de disminuir la sobrevivencia en el ambiente de estas cepas vivas atenuadas, teniendo en cuenta que su liberación al ambiente constituye uno de sus mayores inconvenientes. Además, se demostró que el producto del gen VC0934 no es un elemento importante para la patogenia de *V. cholerae*, por lo cual, se prevé que su mutación no afectará las propiedades inmunogénicas de los nuevos candidatos vacunales VC0934 obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

Cepas, medios de cultivo y plasmidios utilizados

La Tabla 1 muestra las cepas bacterianas y plasmidios utilizados en este trabajo.

Las cepas fueron cultivadas en medio LB (triptona 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 1 %) y medio LB sacarosa (triptona 1 %, extracto

Tabla 1. Cepas y plasmidios utilizados.

Cepa	Características
<i>E. coli</i>	
JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac proAB)</i> (promega).
S17-1	<i>hsdR</i> RP4-2 <i>karr::Tn 5 tet::MU</i> integrado en el cromosoma (promega).
<i>V. cholerae</i>	
C6706	O1, El Tor, Inaba (aislada en Perú, 1991).
1333	Derivado de C6706, Δ (<i>cep oriU ace zot ctxA ctxB</i>) <i>hap::cellA</i> , obtenido en el laboratorio de los autores.
C7258	O1, El Tor, Ogawa (aislada en Perú, 1991).
16-1, 16-2, 16-3, 17-1, 17-2, 17-3, 17-4, 17-5, 17-6, 17-7	Derivados de 1333, mutantes en el gen VC0934 (obtenidos en este trabajo).
MC43	Derivado de C7258, mutante en el gen VC0934 (obtenido en este trabajo).
M16131	16-1 complementado con el gen VC0934 salvaje luego de un proceso de reemplazamiento alélico (obtenido en este trabajo).
Plasmidio	
pGEM [®] T Vector	Derivado del pGEM [®] 5Zf(+) utilizado para la clonación de productos de <i>PCR</i> que poseen adenina en sus extremos. Amp ^r . ¹³
pGEM34	pGEM T-vector que contiene el producto de <i>PCR</i> del gen VC0934 de <i>V. cholerae</i> (este trabajo).
pG34	pGEM34 con una delección interna <i>NariI-BglIII</i> de 300 pb en el gen VC0934, responsable de su inactivación (este trabajo).
pCVD442	Vector suicida en <i>V. cholerae</i> con <i>ori</i> de replicación del R6K y <i>oriT</i> del RP4. Amp ^r y contiene además, el gen <i>sacB</i> como marcador de contraselección. ¹⁴
pCVΔ34	pCVD442 con la banda <i>SphI-SalI</i> derivada del pG34 que se corresponde con el fragmento que contiene al gen VC0934 inactivado (este trabajo).
CV34	pCVD442 portando la banda <i>SphI-SalI</i> del pGEM34 que contiene al gen VC0934 salvaje (este trabajo).

de levadura 0,5 %, sacarosa 15 %). Para medio sólido se utilizó agar al 1,5 %, excepto para LB agar suave en el que se empleó al 0,3 %. Cuando fue necesario a los medios se le añadieron los antibióticos siguientes: ampicilina (Amp) en una concentración de 100 µg/mL y polimixina a 10 µg/mL.

Amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen VC0934 de *Vibrio cholerae*

Se amplificó por PCR un fragmento de 1,4 kb que contenía al gen VC0934 a partir del ADN cromosómico de la cepa de *V. cholerae* C7258, utilizando los cebadores 6585 (5'-GCATGCGTCTAGTGATGAAGG-3') y 6586 (5'-TCTAGACTGTCTTAATACGC-3') que hibridan con las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen respectivamente. En la secuencia del cebador 5' se adicionó un sitio *SphI* para facilitar la clonación posterior del fragmento en el plasmidio pCVD442. El producto de

PCR obtenido fue ligado en el plasmidio pGEM-Tvector, luego electroporado en células de *E. coli* JM109 que se sembraron en placa de LB con suplemento de ampicilina para de esta forma seleccionar los transformantes y obtener el pGEM34.

Construcción de mutantes en el gen VC0934 derivados de las cepas de *Vibrio cholerae* 1333 y C7258

La construcción de mutantes genéticamente definidos deficientes en la síntesis de una glicosiltransferasa codificada por el gen VC0934 relacionada con la producción del exopolisacárido, fue realizada mediante reemplazamiento alélico de este gen en el cromosoma de las cepas de *V. cholerae* 1333 y C7258 con un alelo mutado que se construyó como sigue:

Se inactivó el gen VC0934 clonado en el pGEM34 a través de una delección *NariI-BglIII* de 300 pb, con lo que se obtuvo el plasmidio pG34, del cual se extrajo el fragmento *SphI-*

SalI, que contenía el gen VC0934 inactivo y se subclonó en el vector suicida pCVD442 para obtener el plasmidio pCVΔ34. Este último fue introducido en *V. cholerae* 1333 y C7258 mediante conjugación incubando una mezcla de la cepa donora de *E. coli* S17-1 (previamente transformada con pCVΔ34) y la aceptora de *V. cholerae* (1:1) en medio LB durante 4 h a 37 °C. Los transformantes resultantes fueron seleccionados en placas de LB con suplemento de ampicilina. La integración de pCVΔ34 en el cromosoma de *V. cholerae* fue analizada mediante *Southern blot*. Los cointegrantes correctos fueron cultivados en caldo LB sin presión selectiva de antibiótico y extendidos posteriormente en placas de LB sacarosa con el objetivo de seleccionar aquellos clones que luego de un proceso de doble recombinación homóloga habían eliminado el plasmidio de su cromosoma. Los segregantes correctos fueron seleccionados por *Southern blot*.

Hibridación por *Southern blot*

La técnica de hibridación *Southern blot* se realizó según Sambrook y col.¹⁵ Las muestras del ADN cromosomal, digeridas previamente con la enzima *AvaI*, fueron corridas en un gel de agarosa al 0,8 % y transferidas a una membrana de nylon del tipo Hybond-N siguiendo un procedimiento de transferencia alcalina por capilaridad ascendente.¹⁶ Como sonda se utilizó el fragmento *XbaI/NcoI* derivado del plasmidio pGEM34 que contenía el gen VC0934. La detección se realizó con el sistema no radioactivo de digoxigenina (DIG) de Böehringer Mannheim.

Aislamiento, purificación de ADN y transformación bacteriana

El aislamiento de ADN genómico de *V. cholerae* se realizó según el método de Ausubel y col.¹⁷ y la purificación de ADN plasmídico mediante el Sistema *Wizard Plus Midipreps DNA purification System* de Promega. La separación del ADN en geles de agarosa fue hecha según Sambrook y col.¹⁵ y la purificación de fragmentos de ADN a partir de estos se realizó con el sistema *GFX PCR DNA and gel Band Purification* de Amersham Pharmacia Biotech según las recomendaciones del fabricante. Las cepas de *E. coli* fueron transformadas con ADN plasmídico mediante electroporación según Dower y col.¹⁸

Cuantificación del *biofilm*

Las cepas bacterianas fueron crecidas estáticamente en medio LB en placas multipozos de poliestireno a temperatura ambiente durante 24 h. Se determinó la densidad óptica (DO) del cultivo a 540 nm para evaluar el crecimiento y luego de un lavado con disolución salina PBS (NaCl 0,14 mol/L, KCl 2,7 mmol/L, Na₂HPO₄ 0,01 mol/L, KH₂PO₄ 1,8 mmol/L, pH 7,4) el *biofilm* fue teñido con violeta cristal 0,1 % durante 30 min. Luego de un segundo lavado con PBS las células adheridas a la pared del pozo fueron desprendidas por adición de dimetilsulfóxido, y se cuantificó el *biofilm* mediante la determinación de la DO a 540 nm.

Inducción del fenotipo rugoso

Los mutantes fueron incubados en agua peptona alcalina (1 % NaCl, 1 % peptona, pH 8,5) a 37 °C durante 22 d. Al cabo de distintos tiempos, se esparcieron diluciones de cada cultivo en placas de LB sólido para detectar el fenotipo de las colonias crecidas.

Caracterización de los mutantes obtenidos

Serología y observación morfológica

La determinación serológica fue realizada con el empleo de sueros polivalentes aglutinantes de *V. cholerae* Ogawa, Inaba y O1 obtenidos en conejos suministrados por Murex Biotech Ltd.

El examen morfológico se realizó al microscopio electrónico mediante tinción negativa con acetato de uranilo (4 %).

Ensayo de motilidad

Colonias aisladas de una placa fresca de LB fueron sembradas por punción (2 a 3 mm) en una placa de LB Agar 0,3 %. El diámetro de cada colonia expandida en el agar suave fue medido al cabo de 24 h de incubación a 30 °C.

Colonización en el modelo del ratón lactante

Grupos de quince ratones Balb/c de 3 a 5 d de nacidos, luego de ser separados de sus madres durante 4 h, fueron inoculados intragástricamente con 10⁶ unidades formadoras de colonias (UFC) de las cepas de *V. cholerae* 16-1, 17-2 ó 1333. Las células utilizadas en el inóculo fueron crecidas en 5 mL de caldo LB a 37 °C hasta una DO de 1,0 a 600 nm, partiendo de colonias de placas frescas. Los títulos bacterianos en los inóculos fueron determinados exten-

diendo diluciones seriadas de cada uno en placas de LB. Los ratones fueron devueltos a sus madres luego de cuatro horas de inoculados. Al cabo de las 24, 72 y 120 h fueron sacrificados grupos de cinco ratones, a los cuales se les extrajo el intestino delgado, que posteriormente fue lavado y homogenizado en 5 mL de PBS. Diluciones seriadas de cada homogenado se sembraron en placas de LB polimixina para cuantificar el número de vibrios presentes en ellos.

Ensayo de virulencia

Utilizando un procedimiento similar al ensayo de colonización fueron inoculados grupos de diez ratones con las cepas C7258, el mutante MC43 y la cepa vacunal atenuada 1333, esta última utilizada como cepa control negativo del experimento. Al cabo de 24, 72 y 120 h se determinó el número de ratones sobrevivientes.

RESULTADOS Y DISCUSION

Obtención de mutantes definidos derivados de *V. cholerae* 1333 en el gen VC0934

Yildiz y Shoolnick reportaron la existencia de una agrupación de genes (*cluster*) en el cromosoma de *V. cholerae*, implicados en la producción del exopolisacárido (EPS^{ETB}) requerido para la formación de un *biofilm* maduro³ a la cual, llamaron *vps*. Esta región de 26,5 kb que se extiende entre los marcos abiertos de lectura (ORF) VC0915 al VC0939, contiene dos agrupamientos de genes (ORF VC0916 al VC0927 y VC0934 al VC0937) que presentaban similitud con genes conocidos implicados en la biosíntesis y transportación de polisacáridos, y un agrupamiento intermedio (ORF VC0928 al VC0933) que codifica para proteínas con funciones no relacionadas con la síntesis de polisacáridos. Los genes cuantificados arriba del ORF VC0937 al parecer tampoco están involucrados en la síntesis de polisacáridos.¹⁹

Con el fin de impedir la producción de EPS^{ETB} y de esta forma, evitar la formación de *biofilm* en la cepa vacunal de *V. cholerae* 1333 para disminuir su impacto ambiental, se procedió a inactivar el gen VC0934 que codifica para una glicosiltransferasa involucrada en la síntesis del exopolisacárido. Luego de un proceso de recombinación homóloga, se obtuvieron 10 mutantes derivados de 1333 con una copia inactiva del gen VC0934 en el genoma mediante reemplazamiento alélico del gen salvaje en el cromosoma.

soma de la cepa por el alelo mutado del plasmidio pCVΔ34. Para ello, el pCVΔ34 fue introducido en *V. cholerae* mediante conjugación generando un grupo de cointegrantes producto de un primer evento de recombinación homóloga entre los fragmentos adyacentes a la deleción en el plasmidio y los fragmentos homólogos en el cromosoma de la cepa.

Como resultado del proceso de segregación de los cointegrantes correctos, se seleccionaron 10 clones para identificar por *Southern blot* la presencia del gen VC0934 mutado en el genoma (Fig. 1). Con este fin, el ADN cromosómico de los mutantes y de la cepa parental fueron digeridos con la enzima *AvaI*, que posee dos sitios de corte en las secuencias que flanquean por ambos lados al gen VC0934 en el genoma de *V. cholerae*. De esta forma, la cepa parental resulta en una banda de 3,6 kb y las cepas mutantes en una banda de 3,3 kb que se corresponde, en este último caso, con el gen inactivado producto de la deleción. Todos los clones analizados presentaban la deleción de 300 pb en el gen VC0934.

Formación y cuantificación del biofilm

La capacidad de formar *biofilm* fue evaluada en los mutantes de *V. cholerae* 1333. El *biofilm* fue cuantificado mediante la determinación de la DO a 540 nm. Se observó que aunque todas las cepas mostraban un crecimiento similar, existían diferencias notables en cuanto al establecimiento del *biofilm*: los mutantes fueron incapaces de producir *biofilm* (o lo hicieron a niveles mínimos) a diferencia de la cepa parental 1333 que exhibe una DO_{540 nm} promedio de 1,95. La figura 2 muestra los resultados del ensayo de formación y cuantificación del *biofilm* de los mutantes 16-1 y 17-2. El resto de los mutantes evaluados se comportaron de un modo similar a estos dos.

Con el objetivo de determinar si el fenotipo mostrado por los mutantes se debía únicamente a la mutación introducida en el gen VC0934, se le restituyó al mutante 16-1 la copia salvaje del gen. Para ello, el plasmidio pCV34, que portaba el gen salvaje clonado, se introdujo mediante conjugación en la cepa mutante 16-1 y a través de un procedimiento similar al utilizado para la obtención de los mutantes, se logró intercambiar el alelo mutado en el cromosoma por el funcional y se obtuvo la

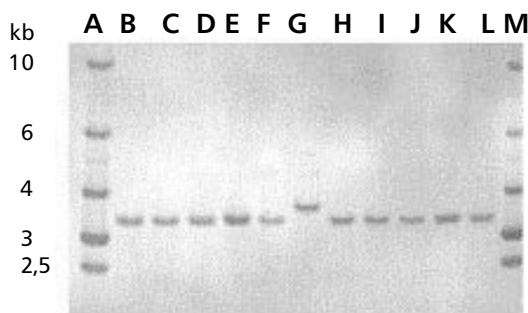


Fig. 1. Análisis por Southern blot de los segregantes derivados de los cointegrantes de 1333 con el plasmidio pCVΔ34. Como sonda se usó el fragmento *XbaI/NcoI* del plasmidio pGEM34 que contiene el gen VC0934. Cada carril se corresponde con la digestión *AvaI* de los ADN cromosómicos de, B: 16-1, C: 16-2, D: 16-3, E:17-2, F: 17-2, G: 1333, H: 17-3, I: 17-4, J: 17-5, K: 17-6, L:17-7. A y M: marcadores de talla molecular.

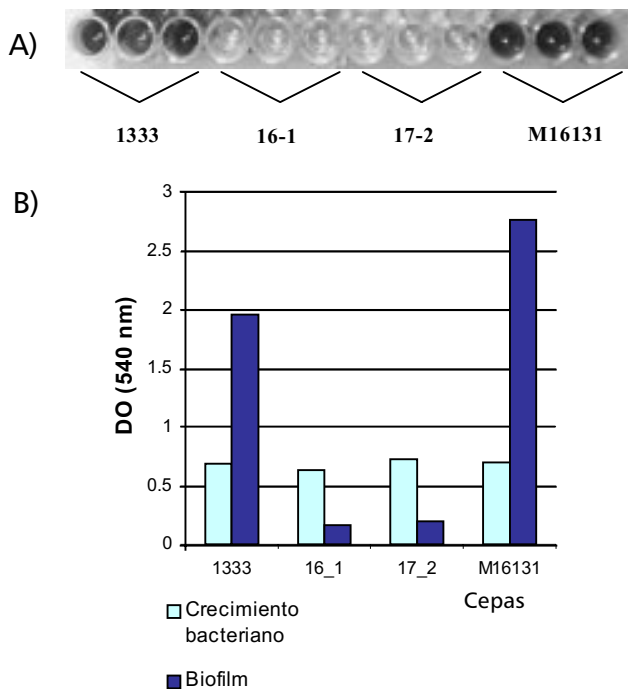


Fig. 2. Ensayo de formación de biofilm de dos de los mutantes VC0934, su cepa parental 1333 y M16131. A) Placa teñida con violeta cristal. La coloración intensa revela la aparición de biofilm. B) Valores relativos del biofilm y del crecimiento bacteriano.

cepa M16131. Luego de evaluar la formación de *biofilm* se encontró que M16131 recuperó la capacidad de producirlo (Fig. 2), lo que evidenció que el fenotipo mostrado por los mutantes obtenidos estaba asociado con la inactivación del gen VC0934.

Como se había supuesto la mutación de este gen impidió la formación de *biofilm* en los mutantes derivados de 1333. En estudios previos sobre la formación de *biofilm* por *V. cholerae* en medio LB en superficies abióticas Waltnick y Kolter demostraron que mutantes en genes involucrados en la síntesis del exopolisacárido eran incapaces de formar *biofilm* y permanecían asociados a la superficie formando una monocapa.⁷ Estos investigadores sugirieron que el EPS^{Etr} desempeña un papel en la estabilización de la estructura tridimensional del *biofilm*, al permitir en el constreñimiento físico, la disminución de las repulsiones intercelulares debido al mantenimiento de las distancias entre las células.⁷

Inducción del fenotipo rugoso

Como forma de sobrevivencia *V. cholerae* puede cambiar su fenotipo de colonias lisas a rugosas mante-

niendo su virulencia.²⁰ Este fenotipo originalmente descrito por Bruce White en 1938 exhibe una elevada resistencia a agentes tales como el cloro, los ácidos, el peróxido de hidrógeno, la actividad bactericida del suero mediada por el complemento y condiciones de estrés oxidativo y osmótico.^{11,21} En estudios previos realizados por Yildiz y Schoolnik³ se demostró que la morfología rugosa de *V.cholerae* O1 El Tor estaba asociada con la producción de un exopolisacárido, que promovía la formación de *biofilm* y que era el responsable de la resistencia mostrada por la variante rugosa. Teniendo en cuenta este hecho, se procedió a evaluar la aparición de colonias del fenotipo rugoso en el mutante 16-1 y su progenitor 1333 durante un período de 22 d, incubados estáticamente en agua peptona alcalina a 37 °C, condiciones que favorecen el cambio de colonias lisas a rugosas,²⁰ con el objetivo de comprobar si los mutantes del gen VC0934 no eran capaces de producir el exopolisacárido. Se encontró que el mutante 16-1 mantenía un fenotipo liso hasta el día 22 del experimento mientras que la cepa parental *V. cholerae* 1333 mostraba colonias con morfología rugosa a partir del octavo día de incubación. Este resultado confirmó que la incapacidad de los mutantes obtenidos de formar *biofilm* se debió a la no-producción del exopolisacárido y además, se prevé que el hecho de que los mutantes no puedan formar el fenotipo rugoso los haga mucho más vulnerables a los cambios ambientales y consecuentemente afecte su persistencia en el ambiente acuático.

Caracterización de los mutantes en el gen VC0934 derivados de 1333

Con el objetivo de determinar si los mutantes construidos conservaban propiedades deseadas en candidatos vacunales vivos para inmunizar contra *V. cholerae* se estudió un conjunto de indicadores que se exponen a continuación.

Características serológicas y morfológicas

Primeramente, se analizaron las características serológicas de las cepas mutadas mediante un ensayo de aglutinación, utilizando sueros obtenidos en conejo. Todas las cepas mantuvieron el serogrupo O1 serotipo Inaba al igual que su cepa parental, característica importante teniendo en cuenta que la respu-

ta inmune mayoritaria generada por una infección con *V. cholerae* es contra el lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa.²²

También se analizó la morfología al microscopio electrónico de los mutantes y al compararla con la de su cepa parental, no se observó ningún cambio notable en la forma y tamaño de la bacteria.

Evaluación de la motilidad

V. cholerae posee un flagelo polar envainado que le confiere gran movilidad y le permite atravesar la capa de mucus del intestino y alcanzar los enterocitos.²³ Algunos estudios aseguran que la motilidad es un factor que contribuye a la patogénesis y colonización del intestino por la bacteria,²⁴ sin embargo, otros investigadores han encontrado que mutantes no móviles son completamente virulentos en el modelo del ratón lactante, ampliamente utilizado para evaluar colonización de varias vacunas vivas atenuadas de cólera.²⁵ Por tanto, existe la posibilidad de que la motilidad pueda desempeñar un papel, aún no definido, en la regulación de algunos aspectos de la virulencia de *V. cholerae*. Debido a esto, se evaluó la motilidad de los mutantes obtenidos mediante la determinación del diámetro de expansión de las colonias en agar suave luego de 24 h de incubación a 30 °C. Los mutantes fueron tan móviles como su cepa parental 1333 (Tabla 2), lo que evidencia que este factor no fue alterado durante el proceso de construcción de aquellos.

Tabla 2. Motilidad de las cepas.

Cepas	1333	16-1	17-2
Diámetro (mm)	18,3 ± 2,4	21,5 ± 0,7	19 ± 1,4

Cada valor representa el promedio de tres mediciones y su desviación estándar.

Tabla 3. Resultados del experimento de colonización en el modelo del ratón lactante.

Tiempo (h)	Cepas		
	1333	16-1	17-2
	UFC totales recuperadas por cepa.		
0	2,5 · 10 ⁶	2,5 · 10 ⁶	1,9 · 10 ⁶
24	2,8 · 10 ⁴ ± 3,2	5,8 · 10 ⁴ ± 10	7,3 · 10 ⁴ ± 1,3
72	8,8 · 10 ⁴ ± 9,8	1,0 · 10 ⁵ ± 4,7	2,2 · 10 ⁴ ± 10,4
120	4,5 · 10 ⁵ ± 5	1,8 · 10 ⁴ ± 2,5	3,2 · 10 ⁵ ± 1,6

Cada valor representa el promedio correspondiente a cinco ratones en dos experimentos independientes y su desviación estándar. El límite de detección de este ensayo es de 2 · 10³ unidades formadoras de colonias (UFC).

Colonización en el modelo el ratón lactante

La capacidad colonizadora de las cepas mutadas y su persistencia en el intestino delgado murino fue evaluada comparativamente con la de su cepa parental 1333, teniendo en cuenta que es necesaria una colonización adecuada de las cepas vacunales para lograr una respuesta inmune potente y duradera. Los mutantes 16-1 y 17-2 fueron capaces de colonizar el intestino delgado del ratón lactante tan bien como 1333 (Tabla 3).

Ensayo de virulencia

Aunque la colonización de los mutantes derivados del candidato vacunal 1333 no se vió afectada por la inactivación del gen VC0934, se analizó si este gen podría tener algún papel en la virulencia de una cepa toxigénica de *V. cholerae*. Para ello, se evaluó la virulencia de un mutante de este gen, derivado de la cepa toxigénica C7258 denominado MC43, que también fue incapaz de formar *biofilm*. MC43 fue construido de forma similar a los mutantes derivados de 1333. Los resultados demuestran que una cepa atenuada de *V. cholerae* como 1333 no provoca la muerte de los ratones neonatos en un período de 24 h (Tabla 4), al contrario de la cepa toxigénica C7258 que es capaz de matar a todos los ratones inoculados en solo 17 h. Los índices de sobrevivencia de estos animales inoculados con la cepa mutada MC43 y su parental C7258 son similares, lo que pone de manifiesto que el gen VC0934 no desempeña un papel im-

Tabla 4. Resultados correspondientes al ensayo de virulencia de las cepas C7258 y su mutante MC43 en el modelo de ratón lactante.

Tiempo (h)	Cepas		
	1333	C7258	MC43
Sobrevivencia de ratones			
0	10	9	10
17	10	7	8
24	10	0	1

portante en la patogenia de *V. cholerae*, al menos en el modelo animal analizado.

CONCLUSIONES

Los mutantes VC0934 construidos mantuvieron inalteradas características importantes deseables en un candidato vacunal, tales como la morfología, el LPS o antígeno O, la motilidad y la colonización en el modelo de ratón lactante. Además, se mostraron incapaces de formar *biofilm* y desarrollar el fenotipo de colonias rugosas, que es la variante más adaptada para el crecimiento y sobrevivencia del vibrio en el ambiente acuático. Todo ello unido a que el gen VC0934 no codifica un factor importante en la patogenia de *V. cholerae* en el modelo animal evaluado, hacen que la mutación efectuada en este gen, sea una característica potencieamente ventajosa para un candidato vacunal vivo de *V. cholerae*, pues permitiría disminuir su impacto ambiental.

BIBLIOGRAFIA

- Lipp E.K., Huq A. and Colwell R.R. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model, **Clinical Microbiology Review**, **15**, 757, 2002.
- Colwell R.R., Brayton P., Harrington P., Tall B., Huq A., Levine M. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in human intestine, **World J. Microbiol. Biotechnol.**, **12**, 28, 1996.
- Yildiz F.H. and Shoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation, **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **96**, 4028, 1999.
- Watnick P.I., Fullner K.J. and Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by

Vibrio cholerae El Tor, **J. Bacteriol.**, **181**, 3606, 1999.

- Chiavelli D.A., Marsh J. W., and Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton, **Applied and Environmental Microbiology**, **67**, 3220, 2001.
- Watnick P.I. and Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm, **Mol. Microbiol.**, **34**, 586, 1999.
- Coldwell R.R. Global climate and infection disease: the cholera paradigm, **Science**, **274**, 2025, 1996.
- Islam M.S., Drasar B.S. and Sack R.B. The aquatic flora and fauna as reservoirs of *V. cholerae*: a review, **J. Diarrhoeal. Dis. Res.**, **12**, 87, 1994.
- Wai S.N., Mizunoe Y. and Yoshida S. How *Vibrio cholerae* survive during starvation, **FEMS Microbiology Letter**, **180**, 123, 1999.
- Fletcher M. Bacterial attachment in aquatic environments: a diversity of surface and adhesion strategies, In *Bacterial Adhesion: Molecular and ecological diversity*, Fletcher M. (ed.), Wiley Liss New York, 1, 1996.
- Wai S.N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S.I. and Yoshida S.I. *Vibrio cholerae* O1 strain TS1-4 produces the exopolysaccharide materials that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation, **Applied and Environmental Microbiology**, **64**, 3648, 1998.
- Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraib A. and Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: Influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation, **Infection and Immunity**, **69**, 435, 2001.
- Promega corporation. PGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Technical Manual TM042, USA, 1999.
- Valle E., Ledón T., Cedré B., Campos J., Valmaseda T., Rodríguez B., García L., Marrero K., Benítez J., Rodríguez

S. and R. Fando, Construction and characterization of a nonproliferative El Tor cholerae vaccine candidate derived from strain 638, **Infection and Immunity**, **68**, 6411, 2000.

- Sambrook J., Fritsch E.F. and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.
- Chomazynski P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. **Analyt. Biochem.**, **201**, 134, 1992.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. y K. Struhl, *Short protocols in molecular biology*; John Wiley & Sons Inc, New York, USA, 1995.
- Dower W.J., Miller J. F. and Ragsdale C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res.**, **16**, 6127, 1988.
- Ali A., Mahmud Z.H., Morris J. G., Sozhamannan S. and Johnson J. Sequence analysis of *TnphoA* insertion sites in *Vibrio cholerae* mutants defective in rugose polysaccharide production, **Infection and Immunity**, **68**, 6857, 2000.
- Morris J.G. *et al.*, *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans, **J. Infect. Dis.**, **174**, 1364, 1996.
- Rice E.W. *et al.* *Vibrio cholerae* O1 can assume a "rugose" survival form that resists killing by chlorine, yet retains virulence, **Int. J. Environ. Health Res.**, **3**, 89, 1993.
- Svennerholm A.M., Jonson G. and Holmgren J. Immunity to *Vibrio cholerae* infection, *Vibrio cholerae* and Cholera: molecular to global perspectives, Ed: Wachsmuth I.K., Blake P.A. and Olsvick, Asm Press, Washington DC, 257, 1994.
- Freter R., and Jones G.W. Adhesive properties of *Vibrio cholerae*: nature of the interaction with intact mucosal surfaces, **Infection and Immunity**, **14**, 246, 1976.
- Richardson K. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models, **Infection and Immunity**, **59**, 2727, 1991.
- Freter R., O'Brien P. C.M., and Macsai M.M.S. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: *in vivo* studies, **Infect. Immun.**, **34**, 234, 1981.