

# Análisis de la expresión de las pilinas TCP y MSHA de *Vibrio cholerae* en diferentes condiciones de crecimiento *in vitro*

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

Dpto. de Genética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6414, Avenida 25 y Calle158, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 29 de octubre de 2003. Aceptado: 16 de diciembre de 2003.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, expresión, pilina, MSHA, TCP.  
Key words: *Vibrio cholerae*, expression, pili, MSHA, TCP.

**RESUMEN.** *Vibrio cholerae* es una bacteria acuática Gram negativa que provoca una enfermedad diarreica aguda en los seres humanos. Entre las pilinas tipo IV expresadas en la superficie de *V. cholerae* se encuentran: la pilina coregulada con la toxina del cólera (TCP) y la hemaglutinina sensible a manosa (MSHA). La expresión de TCP y MSHA en los diferentes serogrupos y biotipos de *V. cholerae* ha sido pobremente estudiada. En el presente trabajo se analizó la expresión de las subunidades mayoritarias de ambas pilinas (TcpA y MshA) por *Western Blot* en un grupo de cepas de *V. cholerae* crecidas en diferentes condiciones de cultivo *in vitro*. Mientras que el ensamblaje de TCP y MSHA en la superficie bacteriana fue determinado por la infección de los vibrios con los fagos CTX $\phi$  y VGJ $\phi$ , respectivamente. Los experimentos demostraron que MshA se produce en todas las cepas con independencia del medio o la condición de cultivo utilizado. Por el contrario, TcpA no fue detectada en todas las cepas, ni en todas las condiciones de cultivo. Su producción estuvo en dependencia del serogrupo, el biotipo y las características intrínsecas de cada cepa, así como de la condición de cultivo utilizada. Por otra parte, en la mayoría de las cepas evaluadas, se detectó la MSHA en la superficie celular, mientras que el ensamblaje de TCP solo se evidenció en las cepas Clásicas dado que las cepas El Tor y O139 presentan inmunidad frente a la infección con el fago CTX $\phi$ . Estos resultados demuestran las diferencias de expresión entre estas dos pilinas, ya que MshA se comporta como una proteína de expresión constitutiva mientras que la producción de TcpA tiene una regulación más compleja que está determinada por las interacciones de las cepas con los medios y las condiciones de cultivo empleadas.

**ABSTRACT.** *Vibrio cholerae* is gram-negative aquatic bacterium that causes an acute diarrheal disease in humans. This microorganism expresses two major type IV pili on the bacterial surface: the toxin co-regulate pilus (TCP) and the manose-sensitive hemagglutinin (MSHA). The expression of TCP and MSHA in different serogroups and biotypes of *Vibrio cholerae* has been poorly studied. In this study were examined different culture conditions for the expression of the major protein subunits of these pili (TcpA and MshA) in a wide variety of *V. cholerae* strains by using Western Blot. The assembling of TCP and MSHA on the bacterial surface was also examined by the infection of the strains with phages CTX $\phi$  and VGJ $\phi$ , respectively. This data showed that MshA protein was produced in all culture conditions and in all *V. cholerae* strains tested, while TcpA protein was only detected in restrictive conditions and follow an expression pattern dependent on the vibrios serogroup and biotype. Most *V. cholerae* strains assemble MSHA pili on the bacterial surface; however TCP pili was only detected in Classical strains because the El Tor and O139 strains exhibit phage immunity against CTX $\phi$  infection. The results demonstrated that MshA and TcpA express in a different manner. Meanwhile MshA expression occurs like a constitutive protein by *V. cholerae* strains on the contrary, the regulation of TcpA production is subjected to a complex mechanism, which depends on the interaction of the strains with the media and the culture conditions tested.

## INTRODUCCION

*Vibrio cholerae* es una bacteria Gram-negativa que causa diarrea severa en humanos. Las cepas de *V. cholerae* que producen la enfermedad se dividen en dos serogrupos; O1 y O139 de acuerdo con las características fenotípicas del lipopolisacárido de la membrana citoplasmática.<sup>1</sup> El serogrupo O1 se divide en dos biotipos, Clásico y El Tor, este último responsable de la más reciente epidemia de cólera.<sup>2</sup> La toxina colérica constituye el determinante principal de virulencia y es la responsable del desbalance electro-lítico que conduce a la deshidratación de los pacientes infestados.<sup>3</sup>

Por otra parte, la toxina del cólera (TCP),<sup>4</sup> es otro importante factor de virulencia de los vibrios, ya que es fundamental en la colonización del intestino en humanos, además, se ha comprobado que es el receptor del fago filamentososo CTX $\phi$ , el cual porta la secuencia de ADN que codifica para la toxina del cólera.<sup>5</sup> La subunidad mayoritaria de la fimbria TCP es TcpA, una proteína con un peso molecular de 20,5 kDa.<sup>6</sup> El gen *tcpA* es regulado por una cascada de genes pertenecientes al regulón ToxR descrito en *V. cholerae*.<sup>7</sup> En experimentos *in vitro* la expresión del gen *tcpA* es también influenciada por estímulos ambientales como el pH, temperatura, osmolaridad y el dióxido de carbono.<sup>8</sup> En experimentos *in vivo* con voluntarios, la expresión del gen estuvo influenciada por las condiciones en

el tracto gastrointestinal tales como: anaerobiosis, limitación de hierro, escasez de nutrientes y otras interacciones moleculares con el hospedero.<sup>9</sup> Otra pilina bien estudiada en las cepas El Tor y O139 es la hemaglutinina sensible a manosa (MSHA).<sup>10</sup> Una de las características fenotípicas que distinguen a las cepas El Tor y O139 de las cepas Clásicas es la presencia de MSHA en la superficie celular y por ello, la capacidad de hemaglutinar eritrocitos de diferentes especies. Reportes aislados indican que algunas cepas Clásicas ensamblan pobremente la pilina en la superficie celular, sin embargo, se ha descrito que en estas cepas MSHA se expresa a niveles comparables a los reportados para las cepas El Tor y O139. Investigaciones realizadas en el locus de

MSHA establecen que la expresión del gen que codifica para la subunidad mayoritaria de esta pilina (*mshA*) ocurre de manera eficiente aunque no se han esclarecido las condiciones medio-ambientales que pueden influir favorablemente en ello.<sup>11</sup> La subunidad mayoritaria de esta pilina, MshA, posee un peso molecular de 17-kDa y la delección del gen en la cepas de *V. cholerae* no tiene influencia sobre la colonización intestinal. Sin embargo, MSHA se ha descrito como factor de adherencia en la formación de biopeículas sobre superficies bióticas y abióticas en el ecosistema marino, lo cual contribuye en gran medida a la supervivencia ambiental de la bacteria.<sup>12</sup> Recientes investigaciones han demostrado que MSHA es el receptor celular del fago filamen-

to VGJ $\phi$ .<sup>13</sup> VGJ $\phi$  es capaz de formar una molécula híbrida con CTX $\phi$  por integración sitio-específica nombrada HybP $\phi$ . El fago híbrido también utiliza como receptor la MSHA y de esta manera los vibrones no toxigénicos pueden adquirir los genes virulentos de la bacteria por transferencia genética horizontal.<sup>13,14</sup>

El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los genes *mshA* y *tcpA* para un total de 25 cepas de *V. cholerae*, agrupadas en siete cepas del biotipo Clásico, trece del biotipo El Tor y cinco cepas del serogrupo O139, en diferentes condiciones de cultivo *in vitro* mediante *Western Blot*. Además, se analizó el ensamblaje de la MSHA y el TCP en la superficie celular de los vibrones utilizando para ello la infección con los fagos VGJ $\phi$  y CTX $\phi$ , respectivamente.

**Tabla 1.** Cepas de *Vibrio cholerae* y fagos.

Cepas bacterianas <i>V. cholerae</i>	Características fenotípicas y genotípicas	Procedencia
569B	Serotipo O1, biotipo clásica, Inaba.	Calcutta, India, 1945.
CVD 103 Hgr	569B $\Delta$ <i>ctxA</i> , <i>hlyA::Hg<sup>+</sup></i> .	CVD, E.U.A., 1988.*
N16961	Serotipo O1, biotipo El Tor, Inaba.	Bangladesh, India, 1975.
JBK70	N16961 $\Delta$ <i>ctxAB</i> .	CVD, E.U.A., 1985.*
C7258	Serotipo O1, biotipo El Tor, Ogawa.	Perú, 1991.
81**	C7258 $\Delta$ ( <i>cep OrfU ace zot ctxA ctxB</i> ).	CNIC, 1995.
638**	81 $\Delta$ ( <i>cep OrfU ace zot ctxA ctxB hap::celA</i> ).	CNIC, 1996.
C6706	Serotipo O1, biotipo El Tor, Inaba.	Perú, 1991.
KHT46	Derivada de C6706 $\Delta$ <i>mshA</i> .	E.U.A., 1996.***
KHT52	Derivada de C6706 $\Delta$ <i>tcpA</i> .	E.U.A., 1996.***
413**	C6706 $\Delta$ ( <i>cep OrfU ace zot ctxA ctxB</i> ).	CNIC, 1995.
1333**	Derivada de C6706 $\Delta$ ( <i>cep OrfU ace zot ctxA ctxB hap::celA</i> ).	CNIC, 1996.
SG25-1	Serotipo O139.	Calcutta, India, 1993.
SG25-1a**	SG25-1 $\Delta$ ( <i>cep OrfU ace zot ctxA ctxB</i> ).	CNIC, 1995.
L912**	SG25-1a $\Delta$ ( <i>cep OrfU ace zot ctxA ctxB hap::celA</i> ).	CNIC, 1996.
O395	Derivada de O1, biotipo clásica, Ogawa.	Calcutta, India, 1964.
CA401	Serotipo O1, biotipo clásica, Inaba.	Calcutta, India, 1953.
CA385	Serotipo O1, biotipo clásica, Ogawa.	Calcutta, India, 1953.
NIH35A3	Serotipo O1, biotipo clásica, Inaba.	India, 1941.
1395	Serotipo O1, biotipo clásica, Inaba.	CIEI, 1991.****
CRC262	Serotipo O139.	Bangladesh, 2000.
CRC266	Serotipo O139.	Bangladesh, 2000.
E7946	Serotipo O1, biotipo El Tor, Ogawa.	Bahrain, 1978.
Lima	Serotipo O1, biotipo El Tor, Inaba.	Lima, Peru, 1991.
3083	Serotipo O1, biotipo El Tor, Ogawa.	Viet Nam, 1964.
VGJ-Kn $\phi$ <sup>12,13</sup>	Derivado de VGJ $\phi$ con un marcador de resistencia a kanamicina insertado en el sitio único <i>Xba</i> I.	CNIC, 2003.
CTX-Kn $\phi$ <sup>13</sup>	Derivado de CTX $\phi$ con un marcador de resistencia a kanamicina insertado en el sitio único <i>Not</i> I.	CNIC, 2003.

\* Center for Vaccine Development, Baltimore, E.U.A. \*\* Candidatos vacunales obtenidos en el laboratorio por ingeniería genética (Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Cuba). \*\*\* Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, New Hampshire, E.U.A. \*\*\*\* Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas, Cuernavaca, México.

**MATERIALES Y METODOS**

En este trabajo se refieren las características fenotípicas y genotípicas de las 25 cepas de *V. cholerae* utilizadas, así como se describen los fagos filamentosos que permiten la detección de las pilinas ensambladas (Tabla 1).

**Medios de cultivo utilizados**

Luria-Bertani (LB) (triptona, 1 %, extracto de levadura 0,5 %, cloruro de sodio 1 %). Opcionalmente se añadió agar al 1,5 % para preparar medio sólido.

AKI (peptona bacteriológica 1,5 %, extracto de levadura 0,4 %, cloruro de sodio 0,5 %, hidrógenocarbonato de sodio 0,32 %).<sup>16</sup>

TSB (digerido pancreático de caseína 1,7 %, digerido papaínico de semilla de soja 0,3 %, cloruro de sodio 0,5 %, hidrógenofosfato de potasio dibásico 0,25 % y glucosa 0,25 %), (OXOID).

Dulbecco's (Sigma).

Hibridoma Libre de Proteínas (PFHM, GibcoBRL).

Opcionalmente, los medios recibieron como complemento antibióticos a las siguientes concentraciones: ampicilina 100 µg/mL y kanamicina a 100 µg/mL.

**Condiciones de cultivo**

**Medio Luria Bertani (LB, pH 6,5):** Partiendo de medio LB sólido se inoculó una colonia fresca de cada cepa en 50 mL de medio líquido y posteriormente, las bacterias fueron crecidas en zaranda a 30 °C durante 16 h. Después, los cultivos fueron centrifugados a 5 000 g durante 10 min a 4 °C. La pastilla celular fue colectada y resuspendida en disolución salina estabilizada con fosfato de sodio (PBS), pH 7,4. En el medio TSB las células fueron crecidas de modo similar al LB pH 6,5, pero a 37 °C.

**Medio AKI:** Las cepas fueron crecidas y manipuladas según el método AKI.<sup>16</sup>

**Medio Dulbecco's y PFHM:** Una suspensión de 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro fue incubada sin agitación a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % durante 8 h. La suspensión fue recogida y centrifugada a 5 000 g durante 10 min a 4 °C. La pastilla celular fue colectada y resuspendida en PBS.

**Detección de MshA y TcpA por Western blot**

Se detectaron las subunidades mayoritarias de las pilinas TcpA y MshA mediante la técnica de

**Western Blot** Las células de cada cepa crecieron en los cultivos adecuados durante 16 h con agitación a 37 °C. La densidad óptica en cada cultivo fue medida a 600 nm y la concentración celular de cada muestra fue ajustada a 10<sup>10</sup> UFC/mL. Las muestras fueron desnaturalizadas por calor y aplicadas en una electroforesis de proteínas en geles de poli-acrilamida al 12,5 % (SDS-PAGE) según Lammeli.<sup>17</sup> Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond C.<sup>18</sup> La membrana fue bloqueada con PBS-leche 5 % durante 1 h y lavada tres veces con PBS-Tween 0,05 %. Posteriormente, la membrana fue incubada durante 2 h a 37 °C con los anticuerpos monoclonales 2F12F1 y 10E10E1 específicos para MshA y TcpA respectivamente.<sup>19,20</sup> La membrana fue lavada tres veces con PBS-Tween 0,05 % y se puso en contacto con el conjugado anti-IgG ratón peroxidasa (molécula completa) durante 1 h a 37 °C. La reacción fue revelada con 4-cloro-1-naftol (5 mg) en una mezcla de 0,04 % metanol; 0,006 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 25 mL de disolución salina de tris borato pH 8. Las cepas de *V. cholerae* KHT46 y KHT52 fueron los controles negativos en los experimentos realizados por ser mutantes de *mshA* y *tcpA*, respectivamente.

**Detección de las pilinas MSHA y TCP en la superficie bacteriana mediante la infección con los fagos VGJ-Knφ y CTX-Knφ**

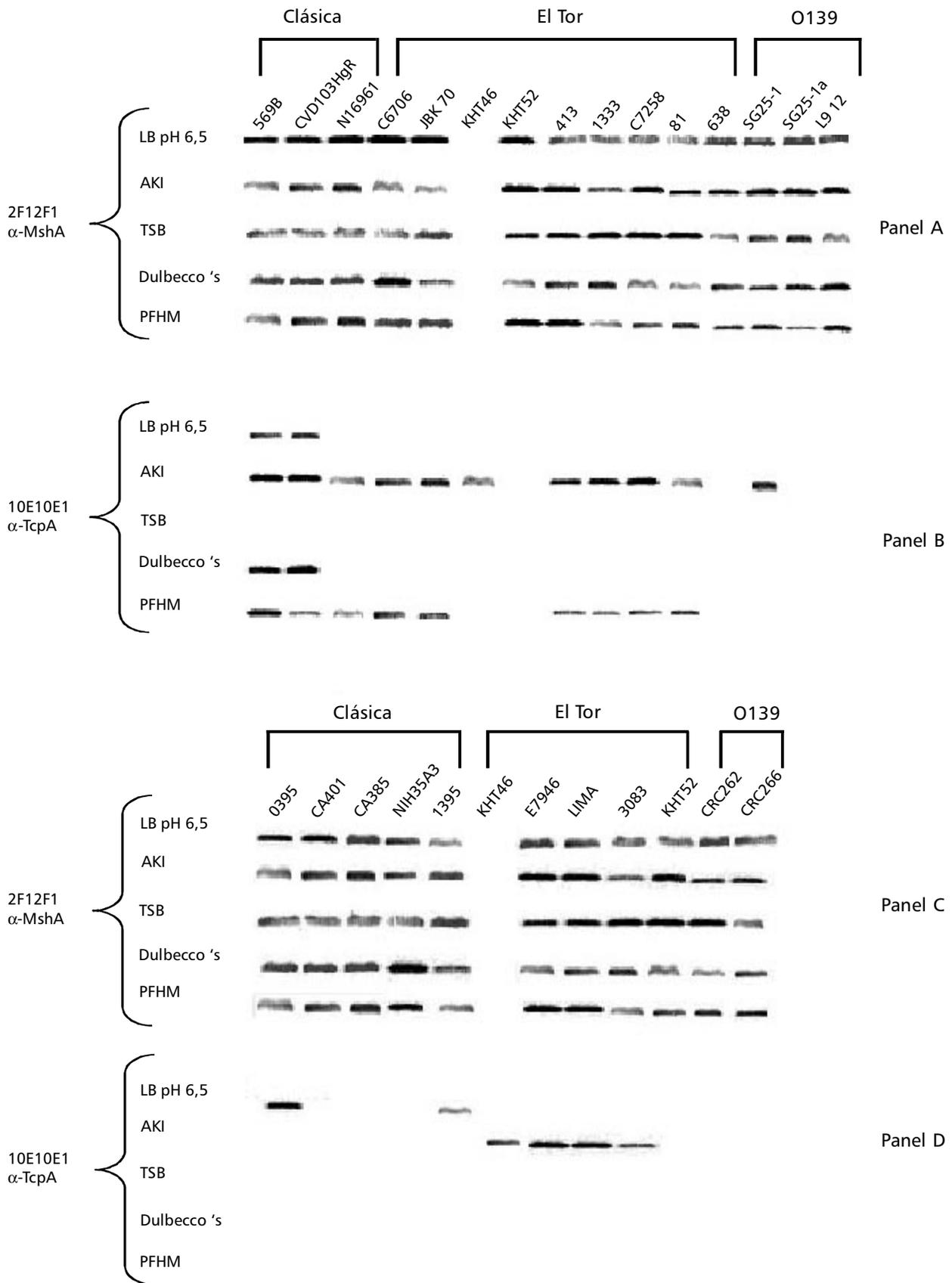
Para determinar la presencia de ambas pilinas en la superficie celular de las cepas de *V. cholerae* se utilizó la técnica de infección con los fagos VGJ-Knφ y CTX-Knφ, los cuales utilizan como receptores las fimbrias MSHA y TCP respectivamente. Una suspensión de 10<sup>6</sup> partículas de cada fago/mL fue mezclada con 10<sup>8</sup> UFC/mL de cada cepa receptora analizada. La mezcla fue esparcida sobre placas de LB con kanamicina a una concentración de 50 µg/mL. La aparición de UFC resistentes a kanamicina se tomó como índice de susceptibilidad a la infección por los fagos correspondientes.

**RESULTADOS Y DISCUSION****Detección de MshA y TcpA en las cepas de V. cholerae**

La pilina MSHA se ha descrito como factor de adherencia en la formación de biopelículas bacterianas sobre superficies bióticas y abióticas en zonas oligotróficas del ecosistema marino, potenciando la super-

vivencia ambiental de *V. cholerae* durante períodos estacionales de baja infectividad.<sup>21</sup> La expresión del gen *mshA* es un paso importante en la biogénesis de la pilina. Los resultados muestran que MshA se detectó en todas las cepas de *V. cholerae* y en todos los medios analizados, semejando el comportamiento de las proteínas de expresión constitutiva (Fig. 1). La expresión del gen *mshA* en todas las cepas evaluadas sugiere que la transcripción de este gen ocurre eficientemente a partir del promotor que se encuentra cadena arriba, en el gen *mshB* y que por tanto, su regulación no depende directamente de señales provenientes del ambiente. A diferencia de MshA, la inmunodetección de TcpA estuvo en dependencia de la relación establecida entre el serogrupo, biotipo y las características particulares de cada cepa analizada, así como de las condiciones de cultivo empleadas. Los resultados muestran que en las condiciones de crecimiento reportadas como óptimas para la expresión de TcpA en las cepas Clásicas, LB pH 6,5 a 30 °C, se detectó TcpA solamente en 569B, CVD103HgR, O395 y 1395 (Fig. 1). La presencia de TcpA no fue detectada en ninguna de las cepas evaluadas utilizando el medio de crecimiento TSB pH 8 a 37 °C, lo que sugiere que la expresión del gen *tcpA* pudiera estar reprimida por factores externos como el pH, la temperatura y nutrientes específicos que se encuentran en este medio de cultivo. Las cepas El Tor y O139 expresaron óptimamente el TcpA en medio AKI (Fig. 1), lo cual coincide con lo reportado para estas cepas.<sup>7</sup> Por otra parte, la producción de TcpA no fue detectada en las cepas vacunales 638, SG251a y L912 en ninguna de las condiciones de cultivo evaluadas. Sin embargo, se sabe que estas cepas colonizan adecuadamente el intestino de ratones lactantes, lo cual sugiere que ellas producen el TCP *in vivo*.<sup>9</sup> Teniendo en cuenta lo anterior, deben existir señales *in vivo* que activan o potencian la expresión del gen *tcpA* en estas cepas vacunales.

Los vibriones al colonizar el intestino establecen una interacción directa con las células enterocíticas, estas interacciones se han estudiado en experimentos *in vitro* utilizando medios sintéticos como Dulbecco's y PFHM.<sup>22</sup> En el medio Dulbecco's se observa la presencia de TcpA en las cepas Clásicas 569B y CVD103HgR, sin embargo, la producción de esta



**Fig. 1.** Detección por Western Blot de MshA y TcpA. Panel A y C. Se utiliza el anticuerpo monoclonal 2F12F1 específico para MshA. En todas las condiciones de cultivo se observa la presencia de MshA para todas las cepas de *Vibrio cholerae* excepto en el mutante KHT46. Panel B y D. Se utiliza el anticuerpo 10E10E1 específico en el reconocimiento de TcpA. La presencia de TcpA está determinada por el serogrupo o biotipo de la cepa, el medio de cultivo empleado y las características particulares de la cepa. La KHT52 tiene una mutación en el gen *tcpA*.

proteína no fue detectada en las cepas El Tor y O139 (Fig. 1). En este medio las bacterias crecieron en presencia de CO<sub>2</sub>, el cual potencia la expresión de TcpA.<sup>23</sup> Por otra parte, en el medio PFHM la mayoría de las cepas produjeron TcpA (Fig. 1), lo cual indica que el CO<sub>2</sub> no es la única señal capaz de potenciar la producción de esta proteína. Debe tenerse en cuenta que en ambos medios está presente el CO<sub>2</sub> y sin embargo, las cepas El Tor y O139 no producen TcpA en el medio Dulbecco's. Lo anterior sugiere que algún componente de este medio regula diferencialmente la expresión de *tcpA* para las cepas Clásicas con respecto a las El Tor y O139.

#### Detección de MSHA y TCP en la superficie de las cepas de *V. cholerae*

Los niveles de expresión del gen *mshA* en las cepas Clásicas son similares a los detectados en las cepas El Tor y O139, sin embargo, se ha reportado que las cepas Clásicas ensamblan pobremente la MSHA en su superficie al compararlas con las cepas El Tor y O139.<sup>23</sup> La cepa El Tor resultaron las más susceptibles a la infección con el fago VGJφ (++) (Tabla 2), lo que demostró que MSHA es un receptor abundante en estas cepas. Sin embargo, los candidatos vacunales 81 y 638 pertenecientes a este biotipo no se infectaron con VGJφ (Tabla 2) aún cuando producen la proteína mayoritaria MshA (Fig. 1), estas cepas probablemente porten una mutación en los genes de secreción y(o) ensamblaje que les impide exponer la pilina en la superficie bacteriana. Si bien las cepas CRC266, CRC262 y las El Tor expresan cantidades similares de MSHA en su superficie (Tabla 2), la cepa SG251 y sus derivados (SG251a y L912) presentan niveles más bajos de susceptibilidad al fago (+), lo cual indica que estas cepas producen una menor cantidad de MSHA en su superficie (Tabla 2). La mayoría de las cepas Clásicas exporta la pilina hacia la superficie celular (Tabla 2), aún cuando en ellas se observa una mayor variabilidad en la cantidad de pilina exportada. Por ejemplo, hay cepas como la 1395 (+++), muy susceptibles, o como la 569B (+), poco susceptibles (Tabla 2). La cepa CA385, al igual que la 81 y 638, no se infecta con el fago VGJφ (Tabla 2), aún cuando produce la MshA (Fig. 1). Muchos reportes plantean que la MshA se expresa exclusivamente en las cepas El Tor y que en

las cepas Clásicas su expresión es casi nula,<sup>23</sup> sin embargo, los resultados presentados aquí demuestran que la mayoría de las cepas de este biotipo expresan la MSHA en su superficie. Las diferencias encontradas indican que el método de infección por el fago VGJφ es más sensible que el método de hemaglutinación de eritrocitos de gallo para detectar la presencia de la MSHA en la superficie de las cepas de *V. cholerae*.

La pilina TCP es el receptor celular del fago CTXφ en *V. cholerae*.<sup>5</sup> Los experimentos de infección con CTXφ en las cepas Clásicas demostraron que todas se infestan con el fago (Tabla 2), lo cual resulta interesante pues algunas de ellas no produjeron TcpA (Fig. 1). Lo anterior pudiera deberse a que el método de infección por el fago CTXφ es más

sensible que la detección de TcpA por *Western Blot*. Otra posibilidad sería que la infección de CTXφ esté ocurriendo por el complejo de proteínas de membranas TolQRA, el cual ha sido reconocido como una vía alternativa de entrada del fago CTXφ en cepas carentes de TCP.<sup>24</sup> Por otra parte, las cepas El Tor y O139 no fueron infestadas por CTXφ (Tabla 2), ya que poseen en su genoma una copia del gen *rstR*<sup>25</sup> el cual reprime transcripcionalmente la expresión de los genes del nuevo fago que infecta las cepas de *V. cholerae*, confiriendo así inmunidad contra CTXφ.<sup>26</sup> Aún cuando la presencia de TCP no pudo ser detectada en las cepas El Tor y O139, el ensamblaje de esta pilina en las diferentes cepas analizadas ha sido comprobado por experimentos en el modelo de ratón lactante.<sup>27,28</sup>

**Tabla 2.** Susceptibilidad de las cepas de *V. cholerae* a la infección con los fagos VGJ-Knφ y CTX-Knφ.

Cepas bacterianas <i>V. cholerae</i>	Susceptibilidad a VGJ-Knφ**	Susceptibilidad a CTX-Knφ*
569B	+	+++
CVD 103 Hgr	+	nr
O395	+++	++
CA401	+++	++
CA385	-	+
NIH35A3	++	++
1395	+++	++
N16961	+++	-
JBK70	++	nr
C7258	+++	-
81	-	-
638	-	-
C6706	+++	-
KHT46	-	-
KHT52	+++	-
413	+++	-
1333	+++	-
E7946	+++	-
Lima	+++	-
3083	+++	-
SG25-1	+	-
SG25-1a	+	-
L912	+	-
CRC262	+++	-
CRC266	+++	-

\* Las cepas crecieron en condiciones óptimas de expresión para TCP: Clásicas, LB pH 6,5; El Tor y O139 AKI. \*\* Las cepas crecieron en condiciones óptimas de expresión para MSHA: TBS a 37°C. +++ Más de 10<sup>4</sup> UFC resistentes a kanamicina. ++ Entre 10<sup>2</sup> y 10<sup>4</sup> UFC resistentes a kanamicina. + Menos de 10<sup>2</sup> UFC resistentes a kanamicina. - Ninguna colonia detectada en LB-kanamicina. nr No realizado.

## CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que la producción de la proteína mayoritaria de la MSHA en las cepas de *V. cholerae* no depende de las condiciones de crecimiento utilizadas, lo cual indica que su regulación no está influenciada por factores externos como el pH, la temperatura o el CO<sub>2</sub> y que por tanto, se comporta como una proteína de expresión constitutiva. Por el contrario, la producción de TcpA está más regulada por las señales externas tales como la presencia de CO<sub>2</sub> y los componentes del medio, así como las características intrínsecas de cada cepa.

## BIBLIOGRAFIA

- Faruque S.M., Albert M.J. and Mekalanos J.J. Epidemiology, Genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Microbiol Mol. Biol. Rev.**, **62**, 1301, 1998.
- Kaper J.B. and Srivastava B.S. Genetics of cholera toxin. **Indian J. Med. Res.**, **95m**, 163, 1992.
- Ramamurthy T., Garg S., Sharma R., Bhattacharya S.K., Nair G.B., Shimada T., Takeda T., Karasawa T., Kurazano H., Pal A. and Takeda Y. Emergence of a novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in Southern and Eastern India. **Lancet**, **341**, 703, 1993.
- Ogierman M.A., Zabihi S., Mourtziou L. and Manning P.A. Genetic organization and sequence of the promoter-distal region of the tcp gene cluster of *Vibrio cholerae*. **Gene**, **126**, 51, 1993.
- Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous bacteriophage encoding cholera toxin. **Science**, **272**, 1910, 1996.
- Herrington D.A., Hall R.H., Losonsky G., Mekalanos J.J., Taylor R.K. and Levine M.M. Toxin, toxin-coregulated pili and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. **J. Exp. Med.**, **168**, 1487, 1998.
- Medrano I.A., DiRita J.V., Castillo G. and Sanchez J. Transient Transcriptional Activation of the *Vibrio cholerae* El Tor virulence regulator ToxT in response to culture conditions. **Infection and Immunity**, **67**, 2178, 1999.
- Bina J., Zhu J., Dziejman M., Faruque S., Calderwood S., Mekalanos J.J. ToxR regulon of *Vibrio cholerae* and its expression in vibrios shed by cholera patients. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **100**, 2801, 2003.
- Attridge S.R., Manning P.A., Holmgren J. and Jonson G. Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor. **Infection and Immunity**, **64**, 3369, 1996.
- Theelin K.H. and Taylor R.K. Toxin coregulated pilus but not Mannose-Sensitive-Hemagglutinin is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor Biotype and O139 strains. **Infection and Immunity**, **60**, 864, 1996.
- Marsh W. and Taylor R.K. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* Mannose-Sensitive Hemagglutinin type 4 pilus gene locus. **Journal of Bacteriology**, **181**, 1110, 1999.
- Chiavelli D.A., Marsh J.W. and Taylor R.K. The Mannose-Sensitive Hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. **Apply Environmental Microbiology**, **67**, 3220, 2001.
- Campos J., Martínez E., Suzarte E., Rodríguez B.L., Marrero K., Silva Y., Ledón T., Del Sol. R., Fando R. VGJ phi, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTX phi. **Journal of Bacteriology**, **185**, 5685, 2003.
- Campos J., Martínez E., Silva Y., Rodríguez B.L., Marrero K., Suzarte E., Ledón T., Fando R. Transmission of CTX $\phi$  by a novel type of specialized transduction mediated by filamentous phage VGJ $\phi$  in *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, **185**, 7231, 2003.
- Theelin K.H. and Taylor R.K. Toxin Coregulated Pilus but not Mannose-Sensitive-Hemagglutinin is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor Biotype and O139 Strains. **Infection and Immunity**, **60**, 864, 1996.
- Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. **Microbiol. Immunol.**, **30**, 1075, 1986.
- Lammeli U.K. Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680, 1970.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **76**, 4350, 1979.
- Falero G., Rodríguez B.L., Valmaseda T., Perez M.E., Perez J.L., Fando R., Robert A., Campos J., Silva A. Sierra G. and Benitez J.A. Production and characterization of a monoclonal antibody against mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae*. **Hybridoma**, **17**, 63, 1998.
- Falero G., Rodríguez B.L., Rodríguez I., Campos J., Ledón T., Valle E., Silva Y., Marrero K., Suzarte E., Valmaseda T., Moreno A. and Fando R. Production and characterization of monoclonal antibodies to El Tor Pilus of *Vibrio cholerae*. **Hybridoma and Hybridomics**, **22**, 315, 2003.
- Lipp E.K., Huq A. and Colwell R.R. Effects of Global Climate on Infectious Disease: the Cholera Model. **Clinical Microbiology Reviews**, **15**, 757, 2002.
- Rodríguez B.L., Rojas A., Campos J., Ledón T., Valle E., Toledo W. and Fando R. Differential interleukin-8 response of intestinal epithelial cell line to reactogenic and nonreactogenic candidate vaccine strains of *Vibrio cholerae*. **Infection and Immunity**, **69**, 613, 2001.
- Skorupski K. and Taylor R.K. Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. **Molecular Microbiology**, **25**, 1003, 1997.
- Heilpern A.J., Waldor M.K. CTXphi infection of *Vibrio cholerae* requires the tolQRA gene products. **Journal of Bacteriology**, **182**, 1739, 2000.
- Jouravleva E.A., McDonald G.A., Marsh J.W., Taylor R.K., Boesman-Finkelstein M., Finkelstein R.A. The *Vibrio cholerae* Mannose-Sensitive Hemagglutinin is the receptor for a filamentous bacteriophage from *V. cholerae* O139. **Infection and Immunity**, **66**, 2535, 1998.
- Davis B.M., Kimsey H.H., Kane A.V. and Waldor M.K. A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer. **EMBO J.**, **21**, 4240, 2002.
- Benítez J.A., García L., Silva A., García H., Fando R., Cedre B., Pérez A., Campos J., Rodríguez B.L., Pérez J.L., Valmaseda T., Pérez O., Pérez A., Ramírez M., Ledón T., Díaz-Ydí M., Lastre M., Bravo L. and Sierra G. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX $\phi$ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholerae vaccine candidate. **Infection and Immunity**, **67**, 539, 1999.
- Angelichio M.J., Spector J., Waldor M.K., Camilli A. *Vibrio cholerae* intestinal population dynamics in the suckling mouse model of infection. **Infection and Immunity**, **67**, 3733, 1999.