

Obtención de mutantes atoxigénicos para inmunizar contra *Vibrio cholerae* O139

Talena Ledón*, Javier Campos, Edith Suzarte, Karen Marrero, Boris Luis Rodríguez, Arlenis Moreno, Eriel Martínez y Rafael Fando.

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

Recibido: 30 de septiembre de 2004. Aceptado: 3 de noviembre de 2004.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, O139, vacunas, mutantes Δ CTX Φ , colonización.
Key words: *Vibrio cholerae*, O139, vaccine, Δ CTX Φ mutants, colonization.

RESUMEN. Se han realizado varios intentos con el fin de obtener un candidato vacunal cubano para inmunizar contra *Vibrio cholerae* O139, pero aunque se han obtenido buenos resultados en ensayos preclínicos, ninguna de las variantes ha sido aún evaluada en voluntarios. En este trabajo se describe la construcción de dos nuevos mutantes atoxigénicos derivados de una cepa de *Vibrio cholerae* O139 de reciente aislamiento. Esta cepa fue seleccionada como parental, ya que además de ser buena colonizadora del intestino del ratón neonato posee un patrón de susceptibilidad a antibióticos más favorable, para su uso en humanos, que el de otros candidatos vacunales. Las manipulaciones genéticas que permitieron la delección del genoma de CTX Φ se realizaron utilizando la metodología de los vectores suicidas, para lo cual, se construyó un vector que permite la manipulación de cualquier cepa de *Vibrio cholerae*, independientemente del arreglo genético que posea el profago CTX Φ en su genoma. Ambos mutantes, así como su parental, mostraron fenotipos normales en cuanto a la motilidad y a la expresión de MSHA, ToxR y OmpU, sin embargo, fueron incapaces de producir la hemaglutinina proteasa en condiciones *in vitro*. Los prototipos vacunales mostraron además, una elevada atenuación, ya que ratones lactantes inoculados con ellos tuvieron un ciento por ciento de sobrevivencia, mientras que la cepa de partida resultó muy virulenta. Los mutantes atoxigénicos mostraron una adecuada colonización en el modelo del ratón lactante, aunque uno de ellos posee mejor capacidad colonizadora. Tomando en cuenta este criterio, este mutante fue seleccionado para ser sometido a otras modificaciones genéticas dirigidas a mejorar sus propiedades como candidato vacunal, desde el punto de vista de bioseguridad.

ABSTRACT. Several attempts have been made to obtain a vaccine candidate against *Vibrio cholerae* O139, but the efficacy of those prototypes remains to be confirmed by studies in volunteers. The present work describes the construction of two new atoxigenic mutants derived from a recently isolated wild type *Vibrio cholerae* O139, strain which shows a good colonization index of the suckling mice intestine and a better antibiotic susceptibility pattern compared with other vaccine candidates. Genetic manipulations allowing CTX Φ genome deletion in these mutants were made using the suicide plasmid methodology. The constructed plasmid allows effective manipulations of the genome of *V. cholerae* strains irrespective of the CTX Φ prophage genetic array on the chromosome. Both mutants, here obtained, as well as their parental strain show normal phenotypes in traits as motility, expression of MSHA, ToxR and OmpU, although they produce no hemagglutinin protease *in vitro*. The atoxigenic mutants were highly attenuated as judge by the level of surviving in the infant mice cholera model compared with their parental strain which resulted very virulent in the same model. Besides, they also retained the capacity to colonize the mice bowel, however one of them shows better colonization index and it was chosen to be further modified in order to improve its biosafety properties.

INTRODUCCION

El cólera continúa siendo una amenaza en muchos países subdesarrollados. Antes de 1992, este era asociado exclusivamente con *Vibrio cholerae* serogrupo O1. Sin embargo, a finales de 1992, un nuevo serogrupo del agente etiológico del cólera fue identificado en la India.¹ El serogrupo asociado a esta epidemia fue denominado O139. La inmunidad preexistente contra los vibrios O1 no resultaba efectiva en la protección contra el serogrupo emergente. Recientes experiencias han reforzado la necesidad de una vacuna efectiva, asumiendo que *Vibrio cholerae* O139, actualmente confinado al sudeste asiático, pudiera extenderse a otros continentes. Existen reportes que indican un incremento de los casos debido al cólera O139.² Un evento clínico de esta enfermedad induce una inmunidad protectora a largo plazo en más del 80 % de los afectados, lo que hace que se realicen grandes esfuerzos para producir una vacuna viva, atenuada, que estimule el sistema inmune mucosal, de forma muy similar a una infección natural. Varias cepas genéticamente modificadas pertenecientes a los biotipos El Tor y O139 han resultado bien toleradas e inmunogénicas en estudios en voluntarios sanos.^{3,4} La eficacia de estos prototipos vacunales debe ser aún confirmada en estudios de campo. En la patogénesis del cólera la colonización bacteriana del intestino humano es crucial en la inducción del sistema inmune,⁵ la del tracto gastrointestinal del ratón

neonato es ampliamente aceptada como un indicador que correlaciona bien con la del intestino humano. En el laboratorio de los autores se han construido otras variantes de candidatos vacunales de *Vibrio cholerae* O139,⁶ derivadas de una cepa aislada durante los primeros brotes epidémicos de este serogrupo, las que aún no se han evaluado en voluntarios humanos, pero que han mostrado niveles muy bajos de colonización en el modelo animal. El objetivo de este trabajo consistió en construir nuevos mutantes atoxigénicos a partir de cepas de *Vibrio cholerae* O139 de reciente aislamiento, con un patrón de resistencia a antibióticos más favorable para su uso en humanos y con mejor capacidad colonizadora que otras variantes existentes en el laboratorio y realizar además, su caracterización fenotípica, en aras de seleccionar el mejor candidato

para continuar realizando otras modificaciones genéticas que mejoren sus propiedades como prototipo vacunal.

MATERIALES Y METODOS

Cepas, plasmidios y medios de cultivo

La tabla 1 describe las cepas bacterianas y plasmidios utilizados

en este estudio. Todas las cepas fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) o caldo de triptona soya y conservadas a -70 °C en medio LB con suplemento de glicerol 20 %. Para la producción *in vitro* de la toxina de cólera, las cepas de *Vibrio cholerae* fueron sembradas en placas de agar sangre y posteriormente cultivadas según el método AKI.¹² Los vectores suicidas fueron propagados en *Escherichia coli* SY327λpir y movilizadas hacia *Vibrio cholerae* por conjugación utilizando la cepa de *Escherichia coli* S17-1λpir. Los antibióticos fueron añadidos, cuando fue necesario, a las concentraciones siguientes: ampicilina (Amp); 100 µg/mL y polimixina B (Pol); 13,2 µg/mL.

El ADN cromosomal de *Vibrio cholerae* fue preparado según la metodología descrita por Ausubel y colaboradores.⁷ Las minipreparaciones de ADN plasmídico fueron realizadas según Birnboim y Doly.¹³ Las enzimas de restricción y modificación, así como los adaptadores fueron provistos por Böehringer Mannheim y utilizados de acuerdo con sus instrucciones. Los plasmidios recombinantes fueron construidos utilizando métodos clásicos.¹⁴

El vector suicida pCVRB-10 fue construido en varios pasos. En pri-

mer lugar, se sustituyó el extremo 3' del elemento RS1, clonado en el plasmidio pURS1,¹⁰ a partir de su sitio *Bgl*II, por una copia de *ctxB* proveniente del plasmidio PJSB, dando lugar al plasmidio PURSB. Posteriormente, el fragmento *Xba*I-*Pvu*II, que contenía la fusión 5'-RS-*ctxB*, fue clonado en el vector suicida pCVD442 digerido *Xba*I-*Sma*I generándose el plasmidio pCVRB-10. Este vector puede ser utilizado en la obtención de mutantes ΔCTXΦ, independientemente de la organización genética de profagos CTXΦ que presenten las cepas parentales.

Construcción de cepas

La determinación de la organización génica del profago CTXΦ en la cepa parental de *Vibrio cholerae* CRC266 se realizó mediante *Southern blot*, utilizando una sonda de ADN que reconoce específicamente el gen *ctxA*, la cual fue utilizada además, para el análisis genotípico de los prototipos vacunales derivados de esta cepa toxigénica. Se utilizó también, una sonda que se denominó "core" y que consistió en un fragmento de 1 485 pb amplificado por PCR utilizando los pares cebadores, directo: 5'-CTTTACTCTCGTGTG-CGGC-3' y reverso: 5'-CTGTCTTTCCACAGCGCCG-3', que reconoce

Tabla 1. Cepas bacterianas y plasmidios utilizados en este estudio.

Cepa o plasmidio	Descripción	Referencia Bibliográfica
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>SupE44 Δlac(Z'ZYA)U169 (Φ80lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.</i>	7
SY327λpir	<i>Δ(lac pro) argEAm) rif^rnalA recA56 (λpirR6K).</i>	8
S17-1λpir	<i>RecA thi pro hsdR-M(RP4-2 Tc::Mu-Km::Tn7, λpir, Km^r, (Tp^r, Sm^r).</i>	9
<i>V. cholerae</i>		
1837	Aislamiento clínico en Calcuta, India, 1993, serogrupo O139.	G. Balakrish Nair.
CRC-262	Aislamiento clínico en Calcuta, India, 2000, serogrupo O139.	G. Balakrish Nair.
CRC-266	Aislamiento clínico en Calcuta, India, 1993, serogrupo O139.	G. Balakrish Nair.
CRC-3	Mutante ΔCTXΦ derivado de CRC266.	Este estudio.
CRC-13	Mutante ΔCTXΦ derivado de CRC266.	Este estudio.
Plasmidios		
pURS1	Amp ^r , elemento RS1clonado en el sitio <i>Sma</i> I del pUC19.	10
pJS752-3	Amp ^r , contiene un gen <i>ctxB</i> recombinante como un fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Hind</i> III clonado en el plasmidio pKK223-3.	Promega
pJSB	Amp ^r , pJS752-3 en el que el sitio <i>Bst</i> II cuesta abajo de <i>ctxB</i> fue rellenado y sustituido por un sitio <i>Bam</i> HI mediante la inserción de un adaptador.	Este estudio.
pURSB	Amp ^r , fragmento <i>Bam</i> HI de 693 pb derivado del PJSB, que contiene <i>ctxB</i> subclonado en el plasmidio pURS1 previamente digerido <i>Eco</i> RI- <i>Bam</i> HI.	Este estudio.
pCVD442	Amp ^r , vector suicida derivado del pGP704 que contiene además el gen <i>soxB</i> como marcador de contraselección.	11
pCVRB-10	Amp ^r , fragmento <i>Xba</i> I- <i>Pvu</i> II de 1 623 pb proveniente de pURSB clonado en el pCVD442 previamente digerido <i>Xba</i> I- <i>Sma</i> I.	Este estudio.

las secuencias de los genes *orfU*, *ace* y *zot* de *Vibrio cholerae*. Ambas sondas fueron obtenidas utilizando el sistema de marcaje y detección no radiactivo para digoxigenina de Böhrenger Mannheim.

La estrategia seguida para obtener estos prototipos vacunales de primera generación se basó en una metodología de intercambio alélico con vectores suicidas, previamente descrita.¹⁵ Los mutantes Δ CTX Φ se obtuvieron utilizando el plasmidio pCVR5B-10 que fue transferido por conjugación desde la cepa de *E. coli* S17- λ pir hacia la cepa de *Vibrio cholerae* CRC266 y los exconjugantes de *Vibrio cholerae* fueron seleccionados en placas de LB con suplemento de ampicilina y polimixina B. Se seleccionaron varios exconjugantes luego de verificar por *Southern blot* que poseían una estructura génica correcta, los cuales fueron cultivados durante 18 h en caldo LB y diferentes alícuotas fueron sembradas en placas de LB sin NaCl, con suplemento de sacarosa 15 %. Bajo estas condiciones, el gen *sacB*, que porta el plasmidio suicida, permite la selección positiva de aquellas bacterias en las que un segundo evento recombinante permita la eliminación de dicho vector de su cromosoma.

Caracterización fenotípica

Determinación de la producción de la toxina colérica (CT)

La producción de CT fue determinada utilizando un ensayo inmunoenzimático dependiente de GM-1 (GM-1 ELISA).¹⁶ Los anticuerpos monoclonales 1G10G5 y 4E1G5 dirigidos contra las subunidades A y B de CT, respectivamente fueron utilizados como anticuerpos primarios y un conjugado peroxidasa-IgG anti-ratón (Molécula completa, Sigma) como anticuerpo secundario.

Detección de la hemaglutinina proteasa (Hap) y la hemaglutinina sensible a manosa (MSHA)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida y el análisis por *Western blot* fueron realizados según ha sido previamente descrito.¹⁷ Las muestras fueron preparadas en cultivos de 50 mL de caldo triptonsoya (TSB) y los patrones de bandas de proteínas totales, así como de MSHA de los crudos celulares fueron analizados por SDS-PAGE de acuerdo a Laemmli.¹⁸ En el caso de MSHA estas bandas fueron detectadas utilizando un anticuerpo monoclonal específico denominado 2F12F1.¹⁹ Para la determinación de

la actividad proteasa en los sobrenadantes de los vibrios cultivados en TSB, condiciones inductoras de Hap, se siguió el procedimiento descrito por Mel y colaboradores.²⁰ Una unidad de actividad se definió como la cantidad de enzima que incrementa en 0,250 la absorbancia a 450 nm en 1 h de reacción.

Ensayo de motilidad

Colonias aisladas de una placa matriz inoculadas por punción en LB sólido con agar al 0,3 % y se incubaron a 37 °C durante 8 h y se midió el diámetro recorrido a través del agar. La cepa no mótil Perú 15 se utilizó como control en cada experiencia.

Morfología y resistencia a antibióticos

La morfología de las células fue analizada por observación al microscopio óptico. Se evaluó su susceptibilidad a estreptomycin (100 μ g/mL) y a polimixina (13,2 μ g/mL) en placas de LB y a sulfametoxazol (23,75 μ g) y trimetoprima (1,25 μ g) mediante la técnica de difusión por discos.²¹

Virulencia y colonización intestinal

Para evaluar la virulencia de las cepas salvajes de *Vibrio cholerae*, así como la capacidad colonizadora de los candidatos vacunales se empleó una modificación del procedimiento de Richardson.²² Los ratones Balb/c lactantes (3 a 5 d de nacidos) se separaron de sus madres 1 h antes del experimento y se asignaron aleatoriamente a los grupos experimentales. Se prepararon cultivos frescos en LB de las cepas a evaluar y se midió la absorbancia a 600 nm, se ajustó la suspensión para garantizar un contenido aproximado de 10^5 unidades formadoras de colonias (UFC) cada 50 μ L. A 5 mL de esta suspensión se le adicionaron 50 μ L de azul de Evan preparado al 10 % en disolución salina estéril. Una alícuota de 50 μ L de la suspensión apropiada se inoculó en cada ratón por intubación gástrica. Al concluir cada grupo experimental, se realizaron diluciones seriadas de la suspensión utilizada y se sembraron por duplicado en placas de LB. Las placas se incubaron 24 h a 37 °C y las colonias se contaron. Una hora después de inoculado cada grupo experimental, se devolvió a sus madres. En los experimentos de virulencia el número de ratones sobrevivientes se contó durante una semana. En los experimentos de colonización cada grupo experimental se muestreó (n = 5 ratones cada vez) a las 24, 72 y 120 h de inoculados para determinar el conteni-

do intestinal de vibriones. Para ello, los cinco ratones se sacrificaron en atmósfera de cloroformo, sus intestinos delgados se extrajeron; se lavaron tres veces con disolución salina; y se homogenizó, cada uno en 5 mL de PBS, empleando un homogenizador de cuchillas Ultraturax T25. El número de bacterias recuperado del intestino delgado de cada ratón se contó por siembra en placa de diluciones seriadas. Este procedimiento tiene un límite de detección de 100 UFC por intestino. Al menos tres experimentos se realizaron con cada cepa. La prueba Log-rank se usó para comparar el tiempo de sobrevivencia de ratones lactantes de la línea Balb/c en respuesta a los inóculos de *V. cholerae*. La comparación estadística de la capacidad colonizadora de las cepas atenuadas a los diferentes tiempos se realizó por la prueba U de Mann Whitney.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se han realizado varios intentos para construir un candidato vacunal cubano para inmunizar contra *V. cholerae* O139, ya que diferentes variantes han de ser consideradas teniendo en cuenta la necesidad de evaluar su desempeño en humanos. Tres aislamientos clínicos procedentes de la India fueron evaluados en el modelo del ratón infante para comprobar su capacidad de virulencia. Todas las cepas fueron igualmente virulentas (Prueba de Wilcoxon generalizada por Gehan para múltiples grupos, P = 0,086).

En las cepas O139 la resistencia a estreptomycin, trimetoprima y sulfametoxazol son codificadas por un transposón conjugativo auto-transmisible,²³ pero los aislamientos más recientes de estas cepas han resultado sensibles a estos antibióticos.²⁴ Se evaluó la susceptibilidad de las tres cepas salvajes a ellos y los resultados se correspondieron con lo reportado. Las cepas CRC262 y CRC266 resultaron sensibles, mientras que la 1837 fue resistente a todos los antibióticos cuyos genes están codificados por dicho transposón conjugativo. Todas las cepas fueron resistentes a polimixina. La cepa CRC266 fue seleccionada para manipulaciones posteriores dirigidas a obtener mutantes atoxigénicos, por poseer un patrón de susceptibilidad a antibióticos más favorable para el uso en humanos.

Estudios genético-moleculares de *V. cholerae* O1 y O139 han revelado que los genes *ctxAB* que codifi-

can para la CT residen en el genoma de un profago filamentoso llamado CTX Φ . En ellas, este profago se encuentra usualmente en arreglos en tándem, asociados frecuentemente al profago RS1 Φ . Estos arreglos CTX Φ -RS1 Φ difieren ampliamente en las cepas patogénicas en cuanto a su número y a la posición relativa que ocupen entre ellos.^{25,26} El número de copias de CTX Φ y su distribución en la cepa CRC266 fue determinado por *Southern blot*, utilizando una sonda que reconoce *ctxA*. En el patrón de hibridación obtenido (Fig. 1A) aparece una única banda de aproximadamente 18 kb al digerir el ADN con *SacI*, carrilera b, enzima que corta en segmentos adyacentes a CTX Φ y dos bandas con las digestiones *EcoRI* y *HindIII*, enzimas que cortan en los CTX Φ Calcuta,²⁷ carrileras c y d, respectivamente. Una de estas bandas, en cada caso, tiene 6,7 kb que es el tamaño del genoma de CTX Φ . Todos estos elementos permiten concluir que en esta cepa existen varias copias de CTX Φ , agrupadas en tándem.

Para la obtención de los mutantes atoxigénicos se utilizó el plasmidio suicida pCVR5B-10, que en un primer evento recombinativo permitió la selección de varios cointegrantes Amp^RPol^R. De ellos, fueron

escogidos cinco, luego de comparar sus patrones con el de la cepa parental mediante *Southern blot*. Estos clones se crecieron en medio LB sin presión selectiva de antibiótico y se seleccionaron veintisiete entre aquellos que fueron capaces de crecer en presencia de sacarosa. Los ADN de estos clones fueron digeridos con *SacI* y analizados por *Southern blot* utilizando las sondas *ctxA* y "core". La figura 1 (B y C) muestra el patrón de cuatro clones representativos. Se puede apreciar que en los clones CRC-3 y CRC-13 (carrileras d y e, respectivamente) todos los genes pertenecientes al antes denominado casete de virulencia fueron removidos, en cambio los clones CRC-11 y CRC-10 (carrileras c y f, respectivamente) retuvieron parte de la secuencia de CTX Φ , al hibridar con la sonda "core", panel C, pero no con la sonda *ctxA*, panel B. Los clones CRC-3 y CRC-13 fueron escogidos para realizarles una caracterización fenotípica que permitiera escoger el más idóneo para ser sometido a ulteriores modificaciones genéticas.

Caracterización fenotípica

Los mutantes atoxigénicos CRC-3 y CRC-13 fueron analizados desde el punto de vista microbiológico,

así como de la expresión de diferentes factores de virulencia. Se analizaron las características serológicas de estas cepas y ambas mantuvieron su capacidad de aglutinar sueros hiperinmunes obtenidos en conejos contra *V.cholerae* O139. La morfología al microscopio óptico en cuanto a forma y tamaño de las bacterias fue similar en mutantes y parental.

La cepa toxigénica CRC266 produjo concentraciones medias de toxina de $(18,16 \pm 2,35) \mu\text{g/mL}$, cuando se creció en condiciones óptimas, *in vitro*, en cambio, los clones CRC-3 y CRC-13 no produjeron cantidades detectables de CT por el método empleado (límite de detección $1,95 \mu\text{g/mL}$).

La hemaglutinina proteasa soluble (Hap) es responsable del 80 al 85 % de la actividad proteolítica de las cepas de *V. cholerae* y constituye un probable factor de virulencia, teniendo en cuenta su capacidad de degradar la mucina, la lactoferrina y otras proteínas importantes desde el punto de vista fisiológico,⁶ se ha demostrado que permite a los vibriones separarse de células intestinales humanas en cultivo y presumiblemente ayuda al vibrión a diseminarse al medio ambiente después de haber colonizado el intesti-

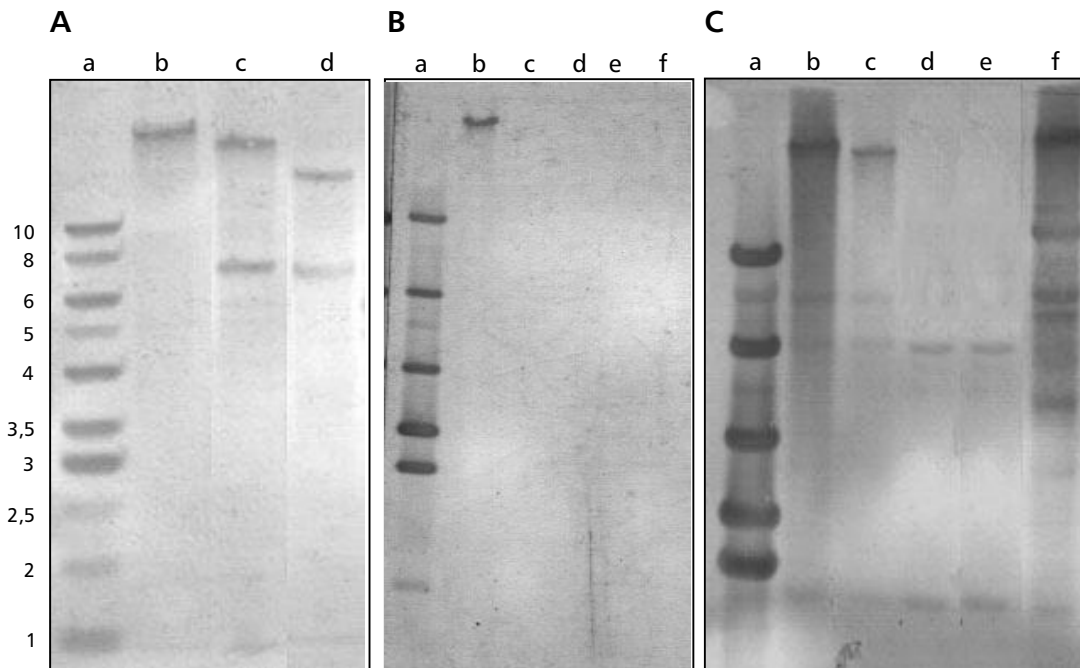


Fig. 1. Análisis por *Southern blot* de la cepa toxigénica CRC266 y sus derivados. Las sondas utilizadas fueron: paneles A y B, *ctxA*; panel C, "core". En el panel A, el ADN cromosomal de CRC266 fue digerido con las enzimas: carrilera b, *SacI*; c, *EcoRI* y d, *HindIII*. En la carrilera a, se aplicó el patrón de peso molecular (PPM) Gene Ruler™ DNA Ladder Mix de Fermentas, se señalan los tamaños aproximados (kb) que esas bandas representan. En los paneles B y C todos los ADN fueron digeridos con *SacI* y los patrones corresponden a: carrileras b, CRC266; c, CRC-10; d, CRC-3; e, CRC-13 y f, CRC-11. En las carrileras a, se aplicó el mismo PPM, pero solo aparecen marcadas las bandas de 10, 6, 4, 3 y 2,5 kb.

no.²⁸ Al analizar la actividad proteolítica presente en el sobrenadante de cultivos *in vitro* de las cepas mutantes y su parental no se pudo detectar dicha actividad en ninguno de ellos. Se utilizó como control positivo del experimento la cepa C6706, cuyo sobrenadante contuvo ($8,21 \pm 3,30$) U/mL de actividad proteolítica. Existen reportes de otras cepas toxigénicas incapaces de producir Hap, *in vitro*, a pesar de poseer el gen intacto. Se ha descrito la existencia de una mutación en el gen regulador *hapR*, como responsable de este fenotipo.²⁹ Debe ser investigado si este es el caso de las cepas objeto de este estudio.

La fimbria MSHA constituye el receptor de una gran variedad de fagos filamentosos,^{30,31} entre los que se encuentra VGJF, un vibriofago capaz de transferir eficientemente los genes de la toxina del cólera mediante un mecanismo de recombinación sitio-específica³² y ha sido involucrada, además, en la formación de biopelículas sobre superficies bióticas y abióticas, lo cual, pudiera ser importante para la supervivencia de *V. cholerae* en sus reservorios ambientales.³³ Esto lo hace un locus susceptible de ser manipulado en aras de obtener candidatos vacunales más seguros desde el punto de vista ambiental y más resistentes a la readquisición de genes tóxicos por transferencia horizontal. La expresión de MSHA se evaluó por Western blot y en todas las cepas analizadas se observó la aparición de una banda del tamaño esperado, utilizando un anticuerpo monoclonal específico (Fig. 2A).

Las proteínas de membrana externa OmpT (40 kDa) y OmpU (38 kDa) se encuentran bajo el control directo de ToxR,⁹ un regulador importante de muchos genes relacionados con la virulencia en *V. cholerae*. Recientemente fue demostrado que un balance correcto de estas porinas es importante en la virulencia, ya que cepas manipuladas genéticamente para que expresaran OmpT en lugar de OmpU mostraron una mayor sensibilidad a las sales biliares, una disminución de la expresión del principal factor de colonización en *V. cholerae* (Pelo coregulado con la toxina, TCP) y una reducción de cien veces en la capacidad de colonización del intestino del ratón lactante.³⁴ Una mutación en *toxR* pudiera ser detectada a partir del análisis de las bandas correspondientes a OmpU u OmpT en el patrón de proteínas totales de la

cepa en cuestión. La figura 2B, carrilera a, muestra el patrón normal de *V. cholerae* y la carrilera b, el patrón de un mutante *toxR*, en el que la banda correspondiente a OmpU desaparece y aparece una de mayor tamaño correspondiente a OmpT. Las cepas CRC266, CRC-3, y CRC-13 mostraron un patrón normal en relación a OmpU, aunque el patrón de proteínas totales en general sea diferente y característico de la CRC266 y sus derivados.

Capacidad colonizadora y virulencia

Las cepas de *V. cholerae* atenuadas con fines vacunales, se evalúan en ratones lactantes para verificar su capacidad colonizadora y su atenuación, previo a la evaluación en humanos.²² Si una cepa coloniza el intestino delgado de ratones lactantes y no produce efecto letal, entonces es razonable estudiarla en voluntarios sanos.

La atenuación de las cepas CRC-3 y CRC-13 se evidencia en las cur-

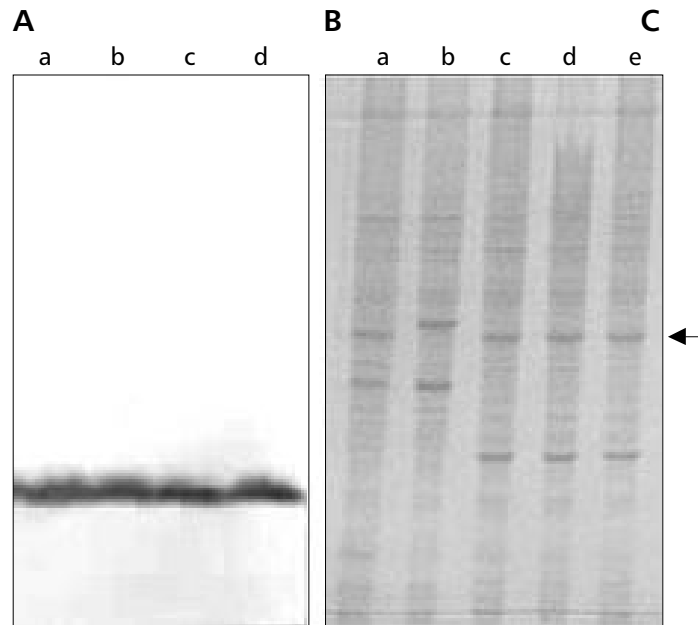


Fig. 2. Análisis de la expresión de proteínas de superficie de CRC266 y sus derivados. Panel A: Western blot con un anticuerpo monoclonal anti MSHA. Carrilera a, C6706 (control positivo); b, CRC266; c, CRC-3 y d, CRC-13. Panel B, Patrón de proteínas totales. Carrilera a, control de patrón normal; b, patrón de mutante *toxR*; c, CRC266; d, CRC-3 y e, CRC-13. La flecha indica la banda que corresponde a OmpU.

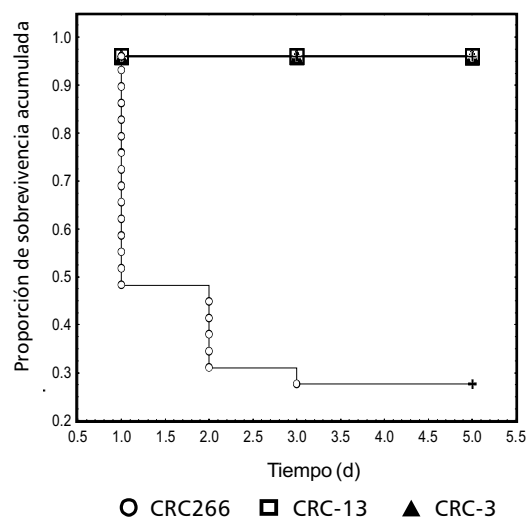


Fig. 3. Curvas de sobrevivencia de ratones Balb/c inoculados con cepas de *Vibrio cholerae* O139. En el gráfico se indican las cepas empleadas. En ambos mutantes (CRC-3 y CRC-13) los ratones inoculados se mantuvieron vivos durante todo el experimento.

vas de Kaplan-Meyer (Fig. 3), en la que se presenta la sobrevivencia de los ratones lactantes en respuesta al inóculo de 10^5 UFC de cada cepa. La inoculación del vehículo sin carga bacteriana no produjo efecto letal. En cambio, la cepa CRC266 produjo la muerte del 86 % de los animales que recibieron esta cepa ($N = 15$), lo que se detectó en las primeras 24 a 48 h (Fig. 3). Los tiempos de sobrevivencia de los ratones lactantes en respuesta al inóculo de la cepa CRC266 presentaron diferencias estadísticamente significativas (Log-rank, $P < 0,0001$). Todos los animales inoculados con las cepas de primera generación *V. cholerae* CRC-3 y CRC-13 sobrevivieron ($N = 15$), por lo que se concluyó que estaban atenuadas con relación a su parental.

Se estudió además, la habilidad de estos mutantes para colonizar el intestino del ratón neonato (Fig. 4). Se incluyeron como controles las cepas C6706 y L911, buena y mala colonizadoras del intestino del ratón neonato, respectivamente, analizadas a las 24 h. El análisis estadístico de estos resultados utilizando la prueba U de Mann Whitney indicó que no existían diferencias significativas en relación con la colonización entre las cepas CRC-3 y CRC-13 a las 24 h, pero que a tiempos mayores, 72 y 120 h, la cepa CRC-13 tenía mejor capacidad colonizadora ($P = 0,024$ y $P = 0,0015$, respectivamente). Ambas cepas poseen una capacidad colonizadora intermedia entre los controles utilizados ($P < 0,05$). Existen muchas evidencias experimentales que indican que las cepas O139, en general, colonizan el intestino del ratón neonato en menor grado a lo que lo hace *V. cholerae* O1,⁶ hecho irrelevante si se tienen en cuenta la patogenicidad que alcanzan estas cepas, ya sea porque este fenómeno no se reproduce en humanos o porque la diferencia detectada no es suficiente para influir en su potencialidad infecciosa. El grado de colonización de estas cepas es aceptable y comparable al que presenta la 638 que ya ha sido evaluada en humanos y ha probado ser capaz de colonizar adecuadamente e inducir una respuesta inmune protectora.⁴

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo permiten concluir que el clon CRC-13 reúne los requisitos para ser considerado como un candidato vacunal factible de ser utilizado como punto de partida para la obtención

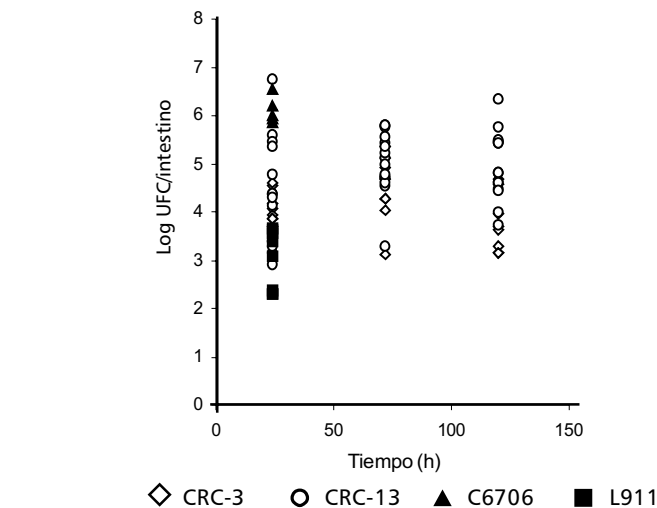


Fig. 4. Colonización del intestino del ratón lactante. Las cepas empleadas se indican en el gráfico. Las cepas C6706 y L911 son controles de elevada y baja capacidad colonizadora, respectivamente. UFC Unidades formadoras de colonias.

de prototipos vacunales con mejores propiedades desde el punto de vista de la seguridad ambiental. La realización de sucesivas modificaciones genéticas permitirá además, la inserción de un gen heterólogo para facilitar la identificación de la cepa en estudios de campo.

BIBLIOGRAFIA

- Levine M.M., Pierce N.F. In cholera, ed. Barua D. & Greenough W.B., Plenum, New York, 285-328, 1992.
- Faruque S.M. Reemergence of epidemic *Vibrio cholerae* O139, Bangladesh. **Emerg. Infect. Dis.**, **9**, 1116-1122, 2003.
- Coster T.S., Killing K.P., Waldor M.K. et al. Safety, immunogenicity and efficacy of live attenuated *Vibrio cholerae* O139 vaccine prototype. **Lancet**, **345**, 949-952, 1995.
- Benítez J.A., García L., Silva A. et al. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTXF-negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor candidate cholera vaccine strain. **Infect. Immun.**, **67**, 539-545, 1999.
- Cedré B., García L., García H., Fariñas M., Talavera A., Infante J.F. Intestinal colonisation of the infant mouse model by attenuated and virulent *Vibrio cholerae* strains. **Arch. Med. Res.**, **29**, 231-234, 1998.
- Ledón T., Valle E., Valmaseda T., Cedré B., Campos J., Rodríguez B.L., Marrero K., García H., García L. and Fando R. Construction and characterization of O139 cholera vaccine candidates. **Vaccine**, **21**, 1282-1291, 2003.
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons Inc., New York, 1995.
- Simon R., Priefer U. and Puhler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Bio/Technology**, **1**, 781-791, 1983.
- Miller V.L. and Mekalanos J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* require *toxR*. **J. Bacteriol.**, **170**, 2575, 1988.
- Campos J., Fando R., Silva A., Rodríguez B.L., Benítez J. Replicating function of the RS1 element associated with *Vibrio cholerae* CTXF prophage. **FEMS Microbiol. Lett.**, **164**, 141-147, 1998.
- Donnenberg M.S. and Kaper J.B., Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. **Infect. Immun.**, **59**, 4310, 1991.
- Iwanaga M., Yamamoto K., Ichinose Y., Nakasone N., and Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. **Microbiol. Immunol.**, **30**, 1075, 1986.
- Birnboim H.C. and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, **7**, 1513-1523, 1979.
- Promega Technical Manual. Altered sites II *In vitro* Mutagenesis System. Part # TM001, 1995.
- Robert A., Silva A., Benítez J.A. et al. 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. **Vaccine**, **14**, 1517-1522, 1996.
- Holmgren J. Comparison of the tissue receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholera toxins. **Infect. Immun.**, **8**, 851, 1973.

17. Häse C.C., Finkelstein R.A. Comparison of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease and the *Pseudomonas aeruginosa* elastase. **Infect Immun.**, **58**, 4011-4015, 1990.
18. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**, 680-685, 1970.
19. Falero G., Rodríguez B.L., Valmaseda T., Pérez M.E., Pérez J.L., Fando R., Robert A., Campos J., Silva A., Sierra G. and Benítez J.A. Production and characterization of a monoclonal antibody against mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae*. **Hybridoma**, **17**, 63-67, 1998.
20. Mel S.F., Fullner K.J., Wimer-Mackin S., Lencer W.I. and Mekalanos J.J. Association of protease activity in *Vibrio cholerae* vaccine strains with decreases in transcellular epithelial resistance of polarized T84 intestinal epithelial cells. **Infect. Immun.**, **68**, 6487-6492, 2000.
21. Mukhopadhyay A.K., Garg S., Mitra R. et al. Temporal shifts in traits of *Vibrio cholerae* strains isolated from hospitalized patients in Calcutta: a 3-year (1993-1995) analysis. **J. Clin. Microbiol.**, **34**, 2537-2543, 1996.
22. Richardson S.H. Animal models in cholera Research. In *Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspectives. Wachmuth I.K., Blake P.A., Olsvik O. ASM Press, Washington, D.C., 203-225, 1994.
23. Waldor M.K., Tschape H., Mekalanos J.J. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. **J. Bacteriol.**, **178**, 4157-4167, 1996.
24. Mitra R., Basu A., Dutta D., Nair G.B. and Takeda Y. Resurgence of *Vibrio cholerae* O139 Bengal with altered antibiogram in Calcutta, India. **Lancet**, **348**, 1181, 1996.
25. Bhadra R.K., Roychoudhury S., Banerjee R.K. et al. Cholera toxin (CTX) genetic element in *Vibrio cholerae* O139. **Microbiology**, **141**, 1977-1983, 1995.
26. Sharma C., Nair G.B., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya S.K., Ghosh R.K. and Ghosh A. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains isolated between 1992 and 1995 in Calcutta, India: evidence for the emergence of a new clone of the El Tor biotype. **J. Infect. Dis.**, **175**, 1134-1141, 1997.
27. Basu A., Mukhopadhyay A.K., Sharma C. et al. Heterogeneity in the organization of the CTX genetic element in strain of *Vibrio cholerae* O139 Bengal isolated from Calcutta, India and Dhaka, Bangladesh and its possible link to the dissimilar incidence of O139 cholera in the two locales. **Microb. Pathog.**, **24**, 175-183, 1998.
28. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y. and Hase C.C. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. **Infect. Immun.**, **60**, 472-478, 1992.
29. Zhu J., Miller M.B., Vance R.E., Dziejman M., Bassler B.L., Mekalanos J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **PNAS**, **99**, 3129, 2002.
30. Jouravleva E.A., McDonald G.A., Marsh J.W., Taylor R.K., Boesman-Finkelstein M. and Finkelstein R.A. The *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin is the receptor for a filamentous bacteriophage from *Vibrio cholerae* O139. **Infect. Immun.**, **66**, 2535-2539, 1998.
31. Campos J., Martínez E., Suzarte E., Rodríguez B.L., Marrero K., Ledón T., Del Sol R. and Fando R. VGJΦ, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTXΦ. **J. Bacteriology**, **185**, 5685 - 5696, 2003.
32. Campos J., Martínez E., Marrero K., Rodríguez B.L., Suzarte E., Ledón T. and Fando R. Novel type of Specialized Transduction for CTXΦ or its satellite Phage RS1 mediated by filamentous phage VGJΦ in *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.**, **185**, 7231-7240, 2003.
33. Watnick PI, Fullner K.J. and Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. **J. Bacteriol.**, **181**, 3606-3609, 1999.
34. Provenzano D., Schuhmacher D.A., Barker J.L. and Klose K.E. The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. **Infect. Immun.**, **68**, 1491-1497, 2000.