

Cepas vivas atenuadas de *Vibrio cholerae* con características mejoradas de seguridad ambiental

Eriel Martínez, Risset Silvera, Javier Campos, Boris Luis Rodríguez, Yussuan Silva, Edith Suzarte, Talena Ledón, Karen Marrero y Rafael Fando.

Dpto. de Genética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6414, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 30 de septiembre de 2004. Aceptado: 8 de noviembre de 2004.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, hemaglutinina sensible a manosa, vacuna, seguridad ambiental.
Key words: *Vibrio cholerae*, mannose sensitive hemagglutinin, vaccine, environmental safety.

RESUMEN. Los candidatos vacunales de *Vibrio cholerae* basados en células vivas atenuadas por manipulación genética constituyen la variante más promisoría para obtener una vacuna efectiva contra el cólera. Sin embargo, la liberación de millones de células vivas al ambiente durante las campañas de vacunación masivas lleva implícito el riesgo de que las cepas atenuadas readquieran los genes de la toxina colérica por algún mecanismo de transferencia genética horizontal. En este trabajo se describe la construcción de una nueva generación de candidatos vacunales con índices mejorados de seguridad ambiental mediante la delección del gen *mshA* del cromosoma de las cepas vacunales de *Vibrio cholerae*. Este gen codifica la subunidad mayoritaria de la fimbria tipo 4 hemaglutinina sensible a manosa (MSHA), la cual constituye el receptor del fago filamentosos VGJ ϕ . El fago VGJ ϕ transduce los genes de la toxina del cólera, el principal factor de virulencia de *V. cholerae*, por un mecanismo específico y eficiente. Por tanto, la fimbria MSHA constituye un portal de entrada de los genes de la toxina colérica mediante transferencia genética horizontal. La estrategia utilizada para deleccionar el gen *mshA* del genoma bacteriano fue el remplazamiento genético del gen tipo salvaje bacteriano por una copia mutada por delección, contenida en un vector suicida. Los mutantes Δ *mshA* obtenidos mostraron total resistencia a la infección con VGJ ϕ por lo cual, son incapaces de readquirir los genes que codifican la toxina del cólera a través del mecanismo mediado por este fago. Por otra parte, estos mutantes mantuvieron inalteradas las características de las cepas de partida que son deseables en candidatos vacunales, como son: la morfología, la velocidad de crecimiento, la motilidad y la colonización en el modelo de ratón lactante.

ABSTRACT. Live attenuated vaccine candidates of *Vibrio cholerae* are the most promising option to develop an effective vaccine against cholera disease. However, the releasing to the environment of millions of vibrio cells during vaccination campaigns entails the risk that attenuated strains reacquire the cholera toxin genes by a horizontal gene transfer mechanism. This work describes the construction of a new generation of vaccine candidates with improved environmental safety features by deletion of the *mshA* gene from the chromosome of the *Vibrio cholerae* vaccine strains. This gene encodes the main subunit of the mannose sensitive hemagglutinin (MSHA) type 4 pilus, which functions as a receptor of the filamentous phage VGJ ϕ . The phage VGJ ϕ is able to transduce the genes encoding cholera toxin, the main virulence factor of *V. cholerae*, through a specific and efficient mechanism. Therefore, the MSHA pilus is a port of entry for the genes of cholera toxin by horizontal gene transfer. The strategy used to delete the *mshA* gene was the genetic replacement of the wild type gene by an internal deleted copy of the gene contained in a suicide vector. The resultant Δ *mshA* mutants showed full resistance to the infection with VGJ ϕ , thus, they are unable to reacquire the cholera toxin encoding genes through the mechanism mediated by this phage. Besides, these mutants kept unaltered the features of their parental strains that are desirable for an effective vaccine candidate, such as the morphology, growing rate, motility and ability to colonize the small intestine in the suckling mouse cholera model.

INTRODUCCION

El cólera es una enfermedad diarreica severa provocada por la bacteria Gram negativa *Vibrio cholerae*. Actualmente, a pesar de los grandes avances obtenidos en el conocimiento sobre las vías de prevención y tratamiento de la enfermedad,¹ esta aún constituye una carga para los países subdesarrollados, que no pueden establecer o mantener instalaciones médicas e higiénicas necesarias para controlarla. Particularmente en estas regiones, el cólera es responsable de una significativa mortalidad y daño económico. Es por ello que obtener una vacuna efectiva y segura contra el cólera resulta de gran importancia.

A pesar de que se han desarrollado varios prototipos vacunales contra el cólera, entre los que se encuentran las vacunas de subunidades y de células muertas, el desarrollo de candidatos vacunales basados en células vivas atenuadas ha brindado los resultados más promisorios.²⁻⁵ Aún cuando este último enfoque ofrece ventajas sobre los demás prototipos vacunales en términos de producción, fácil administración y generación de una respuesta inmune protectora; las desventajas más importantes asociadas con su uso son en primer lugar, la reactividad residual de estas vacunas, inadecuada para su empleo en humanos,² y en segundo lugar, los riesgos potenciales asociados con la liberación al ambiente en gran escala de estos microorganismos ge-

néticamente modificados.⁶ Este segundo aspecto relacionado con la seguridad ambiental y la epidemiología del cólera, es motivo de preocupación por los estudiosos del tema, debido al comportamiento impredecible de las cepas vacunales vivas atenuadas de *V. cholerae* cuando sean liberadas durante las campañas de vacunación masiva, en las cuales millones de células bacterianas vivas serán excretadas al entorno.

La mutación atenuante fundamental en las cepas vacunales vivas de *V. cholerae* ha sido la delección de los genes que codifican la toxina del cólera (CT), principal factor de virulencia de este microorganismo. Estos genes están contenidos en el genoma de un fago filamentoso denominado CTX ϕ ⁷, que puede transmitirlos entre cepas de *V. cholerae* que expresen el receptor de este fago, la fimbria tipo 4 denominada *pilus* co-regulado con la toxina (TCP). Esta fimbria que se expresa también en las cepas vacunales, es además un factor esencial para la colonización del intestino delgado humano por *V. cholerae*⁸. Recientemente, fue aislado un nuevo fago filamentoso de una cepa toxigénica

V. cholerae O139 denominado VGJ ϕ , el cual utiliza como receptor la fimbria tipo 4 hemaglutinina sensible a manosa (MSHA)⁹ VGJ ϕ es capaz de transmitir eficientemente los genes que codifican la toxina del cólera entre diferentes poblaciones bacterianas de *V. cholerae* que producen MSHA, a través de la formación de un cointegrado entre su genoma y el genoma de CTX ϕ , dando lugar a un fago híbrido funcional denominado HybP ϕ .¹⁰ Al igual que VGJ ϕ , este fago híbrido infecta a *V. cholerae* a través de la fimbria MSHA.¹⁰ El gen que codifica la subunidad principal de esta fimbria, *mshA*, se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de las cepas de *V. cholerae* toxigénicas circulantes en el ambiente y se ha detectado también en cepas no toxigénicas.¹¹ Sin embargo, se ha reportado que esta fimbria no desempeña un papel esencial en el proceso de colonización intestinal por la bacteria ni en la inducción de una respuesta inmune protectora.¹²⁻¹⁴ La mayoría de los candidatos vacunales vivos atenuados de *V. cholerae*, que se encuentran actualmente en estudio, expresan la fimbria MSHA. Esto hace que exista un riesgo potencial de que dichos

candidatos vacunales reviertan a la virulencia mediante la readquisición de los genes que codifican la toxina del cólera en el ambiente durante las campañas de vacunación, lo cual podría ocasionar un efecto totalmente contrario al deseado.

El objetivo de este trabajo fue la construcción de una nueva generación de candidatos vacunales vivos atenuados de *V. cholerae* que no expresan MSHA sin afectar las propiedades que se consideran importantes para la inducción de una respuesta inmune efectiva y que estarían imposibilitadas de revertir a la virulencia por la readquisición de los genes que codifican la toxina colérica a través de un fago como HybP ϕ , haciéndolas de este modo más seguras ambientalmente.

MATERIALES Y METODOS

Plasmidios, oligonucleótidos, fagos, cepas y medios de cultivo utilizados

La Tabla 1 presenta los plasmidios, fagos y cepas bacterianas usadas en este trabajo con sus características fenotípicas y genotípicas más importantes. Los medios de cultivo utilizados fueron: Luria-

Tabla 1. Plasmidios, fagos y cepas bacterianas utilizadas en el trabajo.

Plasmidios, fagos, cepas	Características	Fuente/Referencia bibliográfica
Plasmidios		
pGEM-T Vector	Vector para clonar productos de PCR, Amp ^r , sistema de selección por colonias blancas y azules.	Promega
pG Δ <i>mshA</i>	Derivado del vector pGEM-T que contiene las regiones flanqueantes al gen <i>mshA</i> obtenidas y fusionadas por PCR.	Este estudio.
pCVD442	Vector suicida que contiene origen de replicación R6K, la región mobRP4 para movilización por conjugación, el gen <i>sacB</i> como marcador de contraselección y Amp ^r .	
pCV Δ <i>mshA</i>	Derivado del vector pCVD442 con el fragmento <i>SacI-SphI</i> derivado del pG Δ <i>mshA</i> que contiene las regiones flanqueantes a <i>mshA</i> fusionada.	Este estudio.
Fagos		
VGJ-Kn ϕ	Derivado de CTX ϕ con un marcador de resistencia a kanamicina insertado en el sitio único NotI.	(9)
HybP-Kn ϕ	Fago híbrido recombinante originado <i>in vivo</i> por recombinación sitio-específica de la forma replicativa de CTX-Kn ϕ y VGJ ϕ .	(10)
<i>E. coli</i>		
S17- λ pir	<i>RecA thi pro hsd R-M^r</i> (RP4-2 <i>Tc::Mu-Km::Tnδ</i> , λ pir (Tp ^r , Sm ^r).	Promega
Top 10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX</i> 74 <i>deoR recA1 araD</i> 139 Δ (<i>araA-leu</i>) 7697 <i>galJ galK rpsL endA1 nupG</i> .	Promega
<i>V. cholerae</i>		
638	Derivado de C7258 Δ (<i>cep OrfU ace zot ctxA ctxB</i>) <i>hap:: celA</i> .	(16)
1333	Derivado de C6706 Δ (<i>cep OrfU ace zot ctxA ctxB</i>) <i>hap:: celA</i> .	(17)
N16961	Serotipo O1, biotipo El Tor, Inaba.	(18)

Bertani (LB) y LB-sacarosa (triptona, 10 g/L; sacarosa 100 g/L; extracto de levadura, 5 g/L y agar 15 g/L para medio sólido). Cuando fue necesario, a los medios se le añadieron antibióticos a las concentraciones siguientes: ampicilina (Amp) a 100 µg/mL, kanamicina (Kn) a 100 µg/mL y polimixina B (Pol) a 100 U/mL.

Técnicas usadas en el trabajo con ADN

El aislamiento del ADN total de *V. cholerae* se realizó según Ausubel y col.¹⁹ y para la purificación del ADN plasmídico se utilizaron los sistemas *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* y *Wizard Plus Midipreps DNA Purification System* (Promega, EE.UU.). Las enzimas de modificación/restricción de ADN utilizadas fueron adquiridas de las firmas Promega (EE.UU.), Amersham (RU) y New England Biolabs (EE.UU.). Para su uso, se tuvieron en cuenta las recomendaciones de los fabricantes. Los oligonucleótidos utilizados se sintetizaron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Ciudad de La Habana). La separación de fragmentos de ADN mediante electroforesis y la técnica de hibridación de *Southern* se realizaron esencialmente según fue descrito por Sambrook y col.,²⁰ aunque para el marcaje y detección de la sonda se utilizó el sistema no radioactivo *DIG labeling and detection Kit* (Roche, Suiza). La purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se realizó utilizando el sistema *GFX PCR DNA and gel Band Purification* (Amersham) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Transformación bacteriana. La transformación de *E. coli* con ADN plasmídico se realizó mediante electroporación como fue descrito por Dower y col. a 2,5 kV en cubetas de 1 mm de separación entre los electrodos. Para transformar *V. cholerae* con plasmidios suicidas, se utilizó el método de conjugación bacteriana. Para ello, se sembraron mezcladas en una misma placa de LB sólido la cepa donante de *E. coli* S17-1 λpir transformada con el vector suicida a transferir y la cepa receptora de *V. cholerae*. Al cabo de 4 h de incubación a 37 °C la superficie de la placa se lavó con 1 mL de LB para coleccionar las bacterias. Se realizaron diluciones seriadas de la suspensión bacteriana, de las cuales, se sembraron 100 µL en placas de LB-Amp-Pol. En presencia de

estos antibióticos sólo crecen los transformantes de *V. cholerae* que adquirieron e integraron a su genoma el plasmidio suicida de *E. coli*.

Construcción del vector suicida pCVΔmshA. La construcción del vector suicida pCVΔmshA se realizó en varias etapas (Fig. 1). En la etapa inicial, se amplificaron por PCR en reacciones independientes cada uno de los fragmentos flanqueantes al gen *mshA* de la cepa N16961 utilizando los oligos CNC-8125 (ATG-ATCGTGAAGTCGACATG) y CNC-8126 (CAGCAACCGAGAATTACA-ATCACCACG) para el fragmento 1, localizado en la región 5' inmediata del gen y los oligos CNC-8127 (ATTCTCGGTTGCTGGACTGCTTGIG) y CNC-8128 (GCTCTAGAGTATTC-ACGGTATTCG) para el fragmento 2, inmediato al gen por la región 3'. Para la reacción de amplificación de estos fragmentos se utilizaron 200 ng de ADN cromosómico como molde, 0,2 mmol/L de deoxirribonucleótidos, 30 pmol de cada cebador, 2,5 U de Taq polimerasa y una concentración de MgCl₂ de 2,5 mmol/L en un volumen final de 50 µL. Todos los reactivos fueron suministrados por Promega. La reacción de amplificación fue sometida a 30 ciclos que consistieron en: 1 min de desnaturalización a 94 °C; 1 min de apareamiento a 60 °C y 1,3 min de extensión. En una etapa posterior, los fragmentos 1 y 2 de ~1,3 kb, obtenidos en las reacciones de amplificación iniciales, fueron purificados a partir de gel y 50 ng de cada uno se mezclaron para utilizarlos como ADN molde en una segunda reacción de fusión-amplificación con el objetivo de fusionar los dos fragmentos flanqueantes al gen *mshA* (Fig. 1). En esta reacción, se usaron solo los oligos externos CNC-8125 y CNC-8128 como cebadores y las condiciones utilizadas para la PCR fueron iguales a la amplificación anterior. La fusión fue posible porque los oligonucleótidos internos CNC-8126 y CNC-8127 fueron diseñados de modo que sus extremos 5' fueran complementarios (Fig. 1). De este modo, los dos productos amplificados hibridaron por las regiones complementarias en los primeros ciclos de la PCR y sirvieron de cebadores mutuos para que la polimerasa extendiera hasta el extremo del fragmento de ADN opuesto (Fig. 1) El fragmento resultante de la fusión (de ~2,6 kb) fue purificado de gel y 300 ng de este se mezclaron con 100 ng de pGEM-T-Vector (Promega). A la mezcla se adicionó ligasa de

ADN T4 y el ADN ligado fue introducido por electroporación en la cepa de *E. coli* JM109. Las células transformadas fueron seleccionadas en medio LB sólido con suplemento de Amp, IPTG (1 mmol/L) y Xgal (50 µg/mL). Se analizaron varios clones de la transformación –que provenían de colonias blancas– mediante restricción del ADN plasmídico. Se seleccionó un clon que contenía el vector pGEM-T-Vector con el fragmento de 2,6 kb clonado y esta construcción fue denominada pGΔmshA (Fig. 1). Seguidamente, se digirieron 3 µg de pGΔmshA con *SacI-SphI* y se obtuvieron dos fragmentos, uno 2,8 kb correspondiente al vector y uno de 2,6 kb que contenía la fusión. Este último se purificó a partir de gel y 600 ng se mezclaron con 600 ng del vector suicida pCVD442 –digerido con *SacI-SphI*– y los fragmentos de ADN fueron ligados. La cepa de *E. coli* S17-1 λpir se transformó con el producto de la reacción y se seleccionó un clon que contenía el vector pCVD442 con el fragmento de 2,6 kb clonado y la construcción resultante se denominó pCVΔmshA (Fig. 1).

Delección del gen *mshA* del cromosoma de *V. cholerae*. El plasmidio suicida pCVΔmshA fue introducido en *V. cholerae* mediante una conjugación. Se seleccionaron al azar varios de los clones Amp^r obtenidos (recombinantes simples) y se crecieron por separado en LB líquido sin antibiótico a 37 °C y 240 r/min durante toda la noche. Alícuotas de estos cultivos crecidos se sembraron en placas separadas de LB-sacarosa y se dejaron crecer a 37 °C. Se tomaron diez colonias de cada placa y se replicaron en nuevas placas de LB y LB-Amp. Se tomaron los clones que crecieron en LB, pero no en LB-Amp (o sea que segregaron el plasmidio anteriormente integrado) y se usaron para realizar un ensayo de infección con el fago VGJ-Knφ. Se tomaron varios clones resistentes a la infección con este fago provenientes de cada cepa (638 ó 1333) y se estudiaron mediante hibridación de *Southern* para corroborar que el gen *mshA* fue delecionado del cromosoma bacteriano.

Ensayo de infección

Para los ensayos de infección de *V. cholerae* con los fagos VGJ-Knφ y HybP-Knφ, se utilizó el procedimiento descrito por Campos y colaboradores.⁹

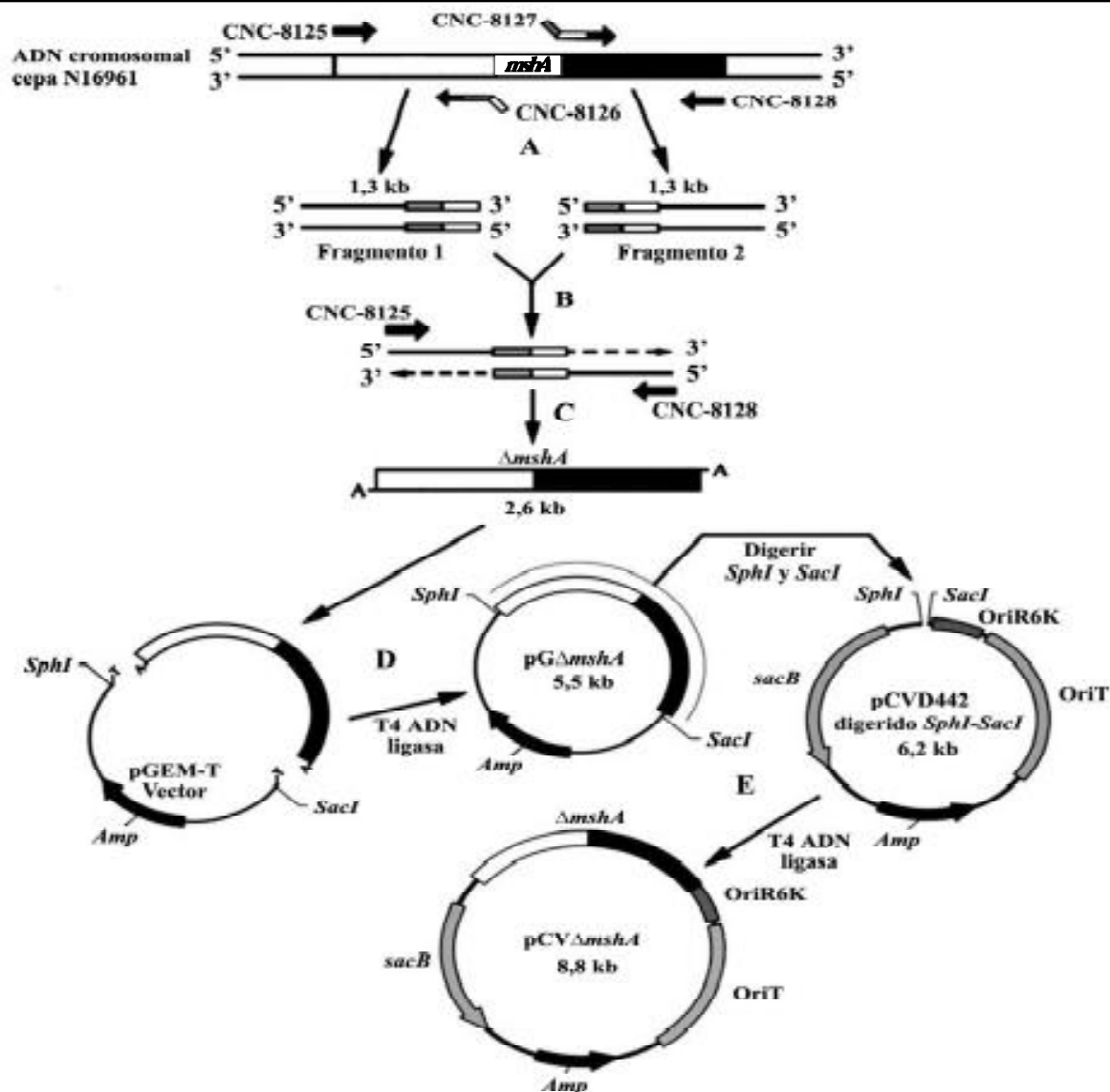


Fig. 1. Delección de *mshA* mediante PCR y construcción del vector suicida pCV $\Delta mshA$. (A) Las regiones flanqueantes del gen *mshA* (aproximadamente 1,3 kb por cada lado) de la cepa N16961 se amplificaron en reacciones independientes de PCR utilizando los oligonucleótidos indicados. Los oligonucleótidos internos CNC-8126 y CNC-8127 se diseñaron de manera que compartieran entre sí una secuencia complementaria de 14 pb (B) Alícuotas de cada fragmento amplificado se mezclaron y se sometieron nuevamente a amplificación por PCR en presencia de los oligonucleótidos externos solamente. En los primeros ciclos los productos hibridaron por la región de homología correspondiente a los oligos internos y fueron extendidos hasta el extremo del fragmento complementario por la polimerasa. (C) En los ciclos siguientes, el nuevo producto fusionado sirvió como molde para una reacción normal de PCR con los oligos externos CNC-8125 y CNC-8128 y como resultado, se obtuvo un nuevo producto formado por los fragmentos 1 y 2 fusionados y con el gen *mshA* deletado. (D) El fragmento producto de la fusión se clonó en el plasmidio pGEM-T-Vector y la construcción obtenida se denominó pG $\Delta mshA$. (E) Por último, el fragmento fue extraído de pG $\Delta mshA$ por digestión con las enzimas *SphI* y *SacI* y subclonado en el vector suicida pCVD442 digerido con las mismas enzimas. La construcción obtenida, pCV $\Delta mshA$ se utilizó para construir los mutantes *mshA*⁻ de *V. cholerae*.

Estudio morfológico de *V. cholerae*

Muestras de la fase exponencial y de la estacionaria de cultivos de *V. cholerae* fueron observadas al microscopio óptico para analizar la morfología de las células bacterianas. Para ello, se tomaron 10 μ L de los cultivos y se extendieron en un portaobjeto. Las preparaciones se fijaron con calor, se tiñeron con violeta cristal durante 1 min, luego se lavaron con agua destilada y se ob-

servaron al microscopio. Se analizaron cualitativamente varios aspectos: forma de coma, largo y grosor bacteriano.

Ensayo de movilidad

Para evaluar la movilidad de *V. cholerae*, colonias aisladas de una placa fresca de LB fueron inoculadas por punción (2 a 3 mm de profundidad) en una placa de LB con agar al 0,3 %. El diámetro de expan-

sión de cada colonia en el agar suave fue medido al cabo de 24 h de incubación a 30 °C. Se considera que una cepa bacteriana no es móvil si posee un diámetro de 2 mm o menos a partir del punto de aplicación.

Caracterización serológica de *V. cholerae*

Una colonia fresca de ~1,5 mm de diámetro de la cepa a caracterizar crecida en LB fue resuspendida

en 30 μ L de disolución salina (NaCl 0,9 %) y esta suspensión bacteriana fue depositada en tres gotas separadas de 10 μ L cada una sobre un portaobjetos. Seguidamente, se añadieron 10 μ L de cada uno de los antisueros anti-O1, anti-Ogawa o anti-Inaba (Murex Biotech Ltd., RU) a cada gota, se homogeneizaron las tres suspensiones por movimiento suave circular del portaobjetos y se inspeccionó visualmente la presencia de aglutinación.

Ensayo de la actividad endoglucanasa conferida por el gen *celA*

La actividad endoglucanasa en las cepas de *V. cholerae* marcadas con el gen marcador *celA* se determinó según lo descrito previamente por Robert y colaboradores.¹⁷

Determinación del tiempo de duplicación de *V. cholerae*

Se determinó el tiempo de duplicación de cada cepa estudiada en 50 mL de medio LB (en erlenmeyers de 250 mL) a 37 °C y 240 r/min. Para ello, se inocularon $\sim 10^7$ células de cada cepa en los 50 mL del caldo de cultivo a partir de un precultivo crecido durante toda la noche en LB. La DO_{600} fue determinada cada 30 min después del comienzo de la fase exponencial del cultivo y hasta que se alcanzó la fase estacionaria. Se tomaron varios tiempos de la fase exponencial temprana del cultivo con sus valores logarítmicos de DO_{600} respectivos y se realizó una regresión lineal con estos datos. El valor de la pendiente de la recta de mejor ajuste (B) se utilizó para calcular el tiempo de duplicación ($t_{dupl.}$) de cada cepa según la expresión siguiente: $t_{dupl.} = \lg 2/B$. Los valores del $t_{dupl.}$ se obtuvieron de al menos tres réplicas independientes para cada cepa y se calculó el valor promedio y su desviación estándar.

Ensayo de colonización de *V. cholerae* en el modelo de ratón lactante

Grupos de 10 ratones BalB/c de 3 a 5 d de nacidos y separados de sus madres durante 4 h fueron inoculados orogástricamente con 10^7 a 10^8 células de las cepas a evaluar suspendidas en 50 μ L de PBS. Las células para el inóculo fueron crecidas en 5 mL de LB a 37 °C hasta una $DO_{600} = 1$. Los ratones se sometieron a 4 h de ayuno antes y después de la inoculación y fueron devueltos a sus madres. Al cabo de las 96 h, se sacrificaron los ratones de cada cepa inoculada, se les extrajeron

los intestinos delgados y luego de lavarse con PBS, estos fueron homogeneizados en 5 mL de PBS (13 500 r/min, 10 s con un homogeneizador Ultraturax). El extracto crudo y diluciones seriadas de cada homogenado fueron extendidos en placas de LB-Pol para contar los vibriones que fueron capaces de colonizar el intestino de los ratones.

RESULTADOS Y DISCUSION

Construcción y caracterización de mutantes nulos para la expresión de MSHA

Las cepas 638 y 1333 (Tabla 1), fueron seleccionadas para iniciar la construcción de una nueva generación de cepas vacuales en las que se delecionó el gen *mshA*. Se seleccionaron estas cepas vacuales por haber mostrado buenas cualidades en ensayos preclínicos y clínicos, tales como: índices adecuados de colonización intestinal en el modelo del ratón lactante o en humanos y capacidad para generar títulos aceptables de anticuerpos vibriocidas en conejos o humanos. En el caso de 638, el candidato vacunal construido en el CNIC que ha sido más estudiado,¹⁶ se conoce además que protegió a humanos inmunizados cuando estos fueron retados con una cepa virulenta de *V. cholerae* (resultados en proceso de publicación). A diferencia de la cepa 1333, la 638 es portadora de una mutación indefinida que impide que la subunidad MshA, normalmente expresada en esa cepa, se ensamble en la superficie externa de la bacteria,¹⁶ por lo que esa cepa poseía de antemano el fenotipo MSHA⁻ resistente a la infección con HybP ϕ . Sin embargo, se introdujo la mutación genéticamente definida del gen *mshA* en ella debido a que esto es una característica más deseable y aceptada en una cepa vacunal para uso en humanos que una mutación indefinida.

Construcción de los mutantes *mshA*⁻

La estrategia utilizada para delecionar *mshA* del cromosoma de estas cepas fue el remplazamiento genético del gen salvaje *mshA* por un locus *mshA* mutado mediante recombinación homóloga. Esta estrategia se realizó en varias etapas: 1) primeramente, se delecionó la mayor parte del gen *mshA* a través de la amplificación y fusión mediante PCR de las regiones flanqueantes de este gen (1,3 kb por cada lado) utilizando como molde ADN genómi-

co de la cepa El Tor N16961 de la cual, se conoce la secuencia genómica completa¹⁸ (Fig. 1). 2) Este fragmento de ADN fusionado que contenía la delección de *mshA* se clonó en el vector pGEM-T y de aquí, se subclonó en el vector suicida pCVD442 con lo que se obtuvo la construcción pCV Δ *mshA* (Fig. 1), la cual, se transformó por electroporación en la cepa S17-1 λ pir, que permite la replicación de este plasmidio, pues contiene la proteína p necesaria para el funcionamiento del ori R6K y 3) el plasmidio pCV Δ *mshA* fue transferido por conjugación desde S17-1 λ pir hacia *V. cholerae*, donde es incapaz de replicarse y por tanto, ocurre el remplazamiento del locus *mshA* tipo salvaje del cromosoma bacteriano por el locus mutado Δ *mshA* contenido en el plasmidio mediante varios eventos de recombinación homóloga (Fig. 2).

Ahora que se dispone de la secuencia completa del genoma de *V. cholerae*¹⁸ se hace más sencillo el proceso de construcción de mutantes, puesto que se pueden predecir con una precisión casi absoluta los sitios de corte enzimáticos y las estructuras que se obtendrán durante el proceso de construcción. El proceso se siguió mediante *Southern blotting* y se seleccionó la enzima *Bst*XI, que permitió un análisis certero de todos los eventos de recombinación intermedios hasta llegar a la construcción de los mutantes (Fig. 2). Los posibles eventos de recombinación homóloga que podían ocurrir entre el fragmento portador de la delección presente en el plasmidio pCV Δ *mshA* y el genoma de *V. cholerae* 638 ó 1333, fueron convenientemente representados (Fig. 2). Dichos eventos podían ocurrir tanto por la región 5' (representada en blanco) como por la región 3' (representada en negro) del gen *mshA* (representado en gris) presente en el cromosoma bacteriano de estas cepas (Fig. 2). Todas las estructuras genéticas predichas según este esquema fueron corroboradas en la práctica mediante análisis por *Southern blotting* utilizando la sonda Δ *mshA*-S (Fig. 3).

Así, los clones en los que el plasmidio suicida pCV Δ *mshA* se insertó por recombinación homóloga en el locus deseado del cromosoma de las cepas de *V. cholerae* 638 ó 1333 produjeron un patrón de bandas específico en los cointegrados obtenidos según el lugar por donde ocurrió la recombinación homóloga.

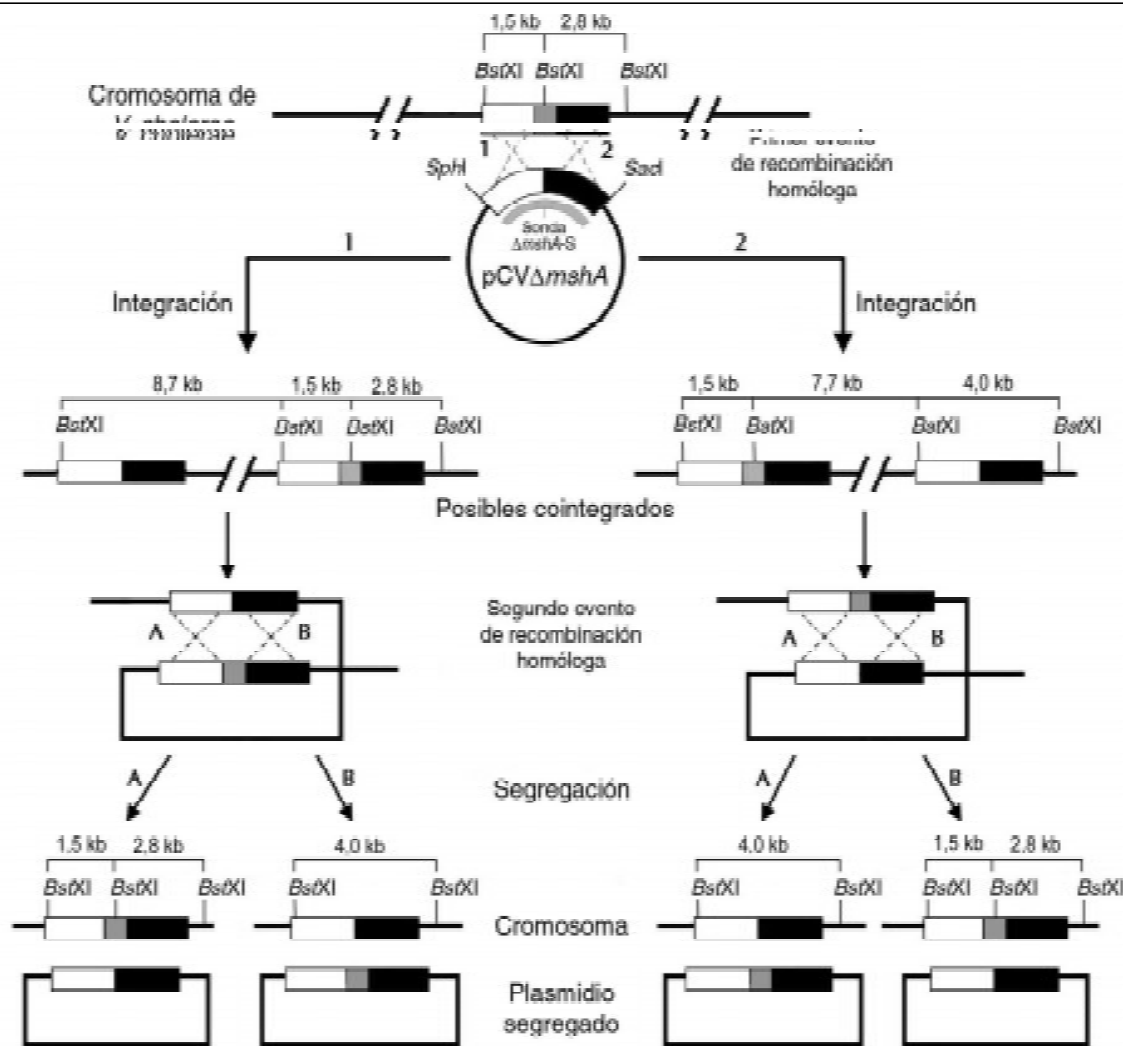


Fig. 2. Estrategia de reemplazamiento genético seguida para construir mutantes *mshA*⁻. En un primer evento de recombinación homóloga entre el fragmento portador de la delección, presente en el plasmidio pCVΔ*mshA*, y el genoma de *V. cholerae*, que ocurre de dos formas posibles (1 ó 2), se generan dos posibles cointegrados. En un segundo evento de recombinación homóloga el plasmidio pCVΔ*mshA* se segrega del cromosoma bacteriano también de dos formas posibles (A o B). Los mutantes *mshA* de *V. cholerae* se obtienen como resultado de los eventos de recombinación 1-B y 2-A. El gen *mshA* se representa en gris y las regiones flanqueantes 5' y 3' se representan en blanco y negro, respectivamente. También se indica la región de ADN que se utilizó para construir la sonda Δ*mshA*-S, así como los sitios de corte de la enzima *Bst*XI utilizada para estudiar el proceso de construcción de los mutantes mediante Southern blotting (Fig. 3) y el tamaño de cada fragmento *Bst*XI esperado.

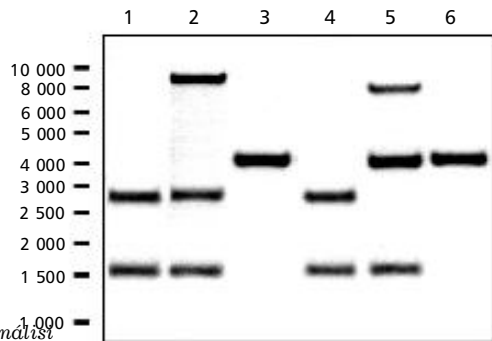


Fig. 3. Análisis de las cepas de *V. cholerae* 1333 y 638, de sus cointegrantes y mutantes *mshA*⁻. El ADN total de cada muestra digerido con *Bst*XI, fue aplicado en el orden siguiente: 1. 1333. 2. Cointegrante de 1333 por el evento de recombinación 1. 3. Mutante *mshA*⁻ RAF01, obtenido por el evento de recombinación 1-B. 4. 638. 5. Cointegrante de 638 por el evento de recombinación 2. 6. mutante *mshA*⁻ JCG03, obtenido mediante el evento de recombinación 2-A. La sonda utilizada fue Δ*mshA*-S.

Cuando la recombinación ocurrió mediante el evento de recombinación 1 y el ADN cromosomal del cointegrado se digirió con *Bst*XI (Fig. 2) se obtuvieron tres bandas de 8,7; 2,8 y 1,5 kb (Fig. 3), mientras que cuando ocurrió a través del evento de recombinación 2 (Fig. 2) también se obtuvieron tres fragmentos *Bst*XI pero de 7,7; 4,0 kb y 1,5 kb (Fig. 3). La estructura de los cointegrados pudo ser fácilmente diferenciada de las cepas de partida (638 y 1333), las cuales produjeron solo dos bandas de 2,8 y 1,5 kb con *Bst*XI (Fig. 3). Además, los cointegrados mostraron un fenotipo resistente a ampicilina y sensible a sacarosa —conferido por los genes *bla* y *sacB*, respectivamente, del plasmidio

pCV Δ *mshA* integrado— ausente en las cepas progenitoras 638 y 1333. Estos resultados eran esperados según fue predicho a partir de las estructuras del genoma bacteriano y el plasmidio suicida pCV Δ *mshA*. De acuerdo con esto, se tomaron dos clones cointegrados correctos —uno de 638 y uno de 1333— a partir de los cuales, después de un segundo evento de recombinación homóloga, se obtuvieron clones resistentes a sacarosa y sensibles a ampicilina, lo que indicó que dichos clones habían segregado —perdido— el plasmidio anteriormente integrado. El proceso de segregación (inverso a la integración) también podía ocurrir según dos eventos de recombinación (Fig. 2, A o B), uno que generaba la delección deseada del gen *mshA* y otro que restituía la estructura original de las cepas progenitoras 638 y 1333. La estructura genética de los mutantes *mshA* obtenidos fue fácilmente distinguible de la estructura de los segregantes que mantuvieron la estructura tipo salvaje de sus progenitores, puesto que al perderse un sitio *Bst*XI junto con el fragmento delecionado del gen *mshA*, se genera una sola banda de 4,0 kb, mientras que los segregantes que restituyeron la estructura original generaron la misma estructura de los progeni-

tores 638 y 1333 —dos bandas de 2,8 y 1,5 kb— (Fig. 3). Se seleccionó un clon que contenía la delección del gen *mshA* por cada cepa progenitora; el clon proveniente de 638 se denominó JCG03 y el proveniente de 1333, RAF01.

Caracterización de los mutantes *mshA*⁻ obtenidos

Los mutantes *mshA*⁻ obtenidos se caracterizaron en cuanto a sus susceptibilidades a los fagos VGJ ϕ y HybP ϕ . Adicionalmente, con el objetivo de determinar si los mutantes Δ *mshA* construidos conservaban propiedades deseables en candidatos vacunales para inmunizar contra el cólera, y también como un modo de chequear que la mutación introducida solo afectó al locus *mshA* y no tuvo efectos pleiotrópicos indeseados, se estudió la morfología celular, la movilidad, el antígeno O, el fenotipo CelA, el tiempo de duplicación y la colonización en el modelo del ratón neonato.

Susceptibilidad de los mutantes a los fagos VGJ ϕ y HybP ϕ . Se utilizaron las variantes marcadas, VGJ-Kn ϕ y HybP-Kn ϕ , para evaluar la susceptibilidad de los mutantes *mshA*⁻ obtenidos a los fagos VGJ ϕ y HybP ϕ . Se pudo apreciar que la

cepa KHT52, usada como control positivo se infectó normalmente con los dos fagos (Tabla 2); sin embargo, los mutantes fueron completamente resistentes a estos fagos a una multiplicidad de infección (MDI) de 10², al igual que el mutante *mshA*⁻, KHT46, construido en 1996 por Thelin y Taylor.¹³

Morfología y movilidad. Las células de los mutantes presentaron una morfología normal cuando se examinaron por microscopía óptica. Para determinar la movilidad de los mutantes Δ *mshA* construidos, fueron sembrados en LB-agar suave donde se midieron los diámetros de expansión alcanzados por las colonias. Se considera que una cepa es no-móvil cuando muestra un diámetro de expansión en el agar suave menor de 2 mm. Se apreció que los diámetros de expansión de cada mutante se mantuvieron aproximadamente iguales a los diámetros de expansión de las cepas progenitoras de partida (alrededor de 20 mm), mientras que la cepa Peru-15, el control no-móvil del experimento, se expandió menos de 2 mm alrededor del punto de siembra (Tabla 3). Teniendo en cuenta estos resultados se puede considerar que los mutantes resultaron tan móviles como las cepas progenitoras, lo que indicó que esta función no se alteró durante el proceso de construcción de los mutantes.

Antígeno O de superficie. La respuesta inmune mayoritaria generada por una vacuna anticólera es contra el lipopolisacárido (LPS) de la superficie externa de la bacteria también conocido como antígeno O. De aquí, la importancia de confirmar que las cepas mutadas en el gen *mshA* expresen el antígeno correspondiente a sus cepas progenitoras correctamente. Esto se estimó mediante la aglutinación de las células bacterianas con antisueros específicos para cada antígeno O. Se pudo comprobar que el mutante JCG03 conservó el serogrupo O1 y el serotipo Ogawa y el mutante RAF01 conservó el serogrupo O1 y el serotipo Inaba de sus cepas progenitoras respectivas.

Fenotipo CelA⁺. A la mayoría de las cepas vacunales de *V. cholerae* genéticamente modificadas construidas en el Dpto. de Genética del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, se les ha introducido el gen *celA*, que codifica la endoglucanasa A de *Clostridium thermocellum*, mediante inserción mutacional en el gen que codifica la HA/proteasa

Tabla 2. Susceptibilidad de los mutantes a los fagos VGJ-Kn ϕ y HybP-Kn ϕ .

Cepa	Número de transductantes Kn ^r ^a	
	VGJ-Kn ϕ ^b	HybP-Kn ϕ ^c
KHT52 (Control +)	(1,3 ± 0,6) · 10 ⁸	(9,7 ± 0,9) · 10 ⁷
JCG03	ND	ND
RAF01	ND	ND
KHT46 (Control -)	ND	ND

^aLa susceptibilidad a cada fago se determinó mediante el conteo del número de transductantes Kn^r. ND Transductantes resistentes a Kn no detectados. Resultados correspondientes a tres experimentos independientes. ^bSe utilizaron 10¹⁰ partículas de VGJ-Kn ϕ para infectar ~10⁸ células de cada cepa (MDI = 10²). ^cSe utilizaron 10⁸ partículas de HybP-Kn ϕ para infectar ~10⁸ células de cada cepa (MDI = 10²).

Tabla 3. Diámetro de la expansión en agar suave de las cepas 638, 1333 y sus mutantes Δ *mshA* derivados

Cepas de <i>V. cholerae</i>	Diámetro de expansión ^a (mm)
Peru-15 ^b	1,6 ± 0,5
638	20,2 ± 1,3
JCG03	20,0 ± 1,8
1333	20,2 ± 1,4
RAF01	19,3 ± 1,3

^aValores promedio de al menos tres experimentos independientes. ^bControl negativo carente de motilidad.

(hap). Esta modificación facilita la identificación de las cepas vacunales de otras cepas de *V. cholerae*, lo que permite chequear la pureza del cultivo durante el proceso productivo y el seguimiento en el ambiente de las cepas vacunales durante las campañas de vacunación a la vez que elimina el efecto reactogénico indeseado que pudiera tener el gen hap.¹⁷ Todos los mutantes $\Delta mshA$, al igual que las cepas progenitoras respectivas, mostraron la actividad β -1,4-endoglucanasa conferida por el gen celA, por lo que se descarta la posibilidad de que se haya introducido alguna mutación no deseada que hubiera afectado el fenotipo CelA⁺, lo que ratifica la estabilidad genética de este marcador en las cepas vacunales.

Tiempo de duplicación. Las características del crecimiento de los mutantes JCG03 y RAF01 fueron analizadas en medio rico LB a 37 °C y 240 r/min. Se realizaron curvas de crecimiento por triplicado de cada uno de estos mutantes y de sus cepas progenitoras y se determinaron sus tiempos de duplicación medios durante la fase exponencial. El tiempo de duplicación de la cepa JCG03 fue de (18,96 ± 0,77) min, mientras que el de su progenitor 638 fue de (19,73 ± 1,16) min. En el caso de la cepa RAF01 el tiempo de duplicación fue de (19,12 ± 1,64) min, mientras que el de su progenitor 1333 fue de (19,81 ± 1,31) min. Estos resultados indicaron que la mutación del gen *mshA* no afectó la velocidad de crecimiento de las cepas JCG03 y RAF01.

Colonización en el intestino del ratón lactante. Una colonización adecuada en el intestino humano es necesaria para generar una respuesta inmunológica potente y duradera, ya que la multiplicación local de la bacteria potencia la interacción de *V. cholerae* con el sistema inmune mucosal. Se evaluó la colonización de los mutantes $\Delta mshA$ JCG03 y RAF01 y sus cepas progenitoras en el modelo del ratón lactante. Aunque no existe un modelo animal ideal para evaluar la colonización de *V. cholerae*, la correspondiente a diferentes cepas de *V. cholerae* en el modelo del ratón lactante tiene un elevado grado de correspondencia con la que tiene lugar en voluntarios humanos.²¹ La tabla 4 muestra la colonización alcanzada por cada una de las cepas de partida y sus respectivos mutantes $\Delta mshA$ a las 96 h después de la inoculación. Como puede apreciarse, tanto las cepas de

Tabla 4. Capacidad colonizadora de las cepas vacunales 638, 1333 y sus mutantes $\Delta mshA$ en el modelo de ratón lactante

Cepas	Inóculo (UFC)	UFC recuperadas (96 h) ^a
KHT52 ^b	1,30 · 10 ⁷	ND
638	2,41 · 10 ⁷	(7,30 ± 0,29) · 10 ⁶
JCG03	1,59 · 10 ⁷	(8,12 ± 0,85) · 10 ⁶
1333	2,49 · 10 ⁸	(1,97 ± 0,53) · 10 ⁷
RAF01	4,25 · 10 ⁷	(2,56 ± 0,60) · 10 ⁷

^aCada valor corresponde al promedio del número de unidades formadoras de colonias obtenidas de diez ratones procesados a las 96 h después de inoculados. ^bCepa mutante de TCP no colonizadora usada como control negativo. ND Ninguna UFC detectada.

partida como los mutantes colonizaron el intestino delgado de los ratones neonatos de manera aceptable para la generación de una respuesta inmune. Esto indica que la mutación del gen *mshA* no afectó la función de colonización en los mutantes.

CONCLUSIONES

La delección del gen que codifica la subunidad proteica principal de la fimbria MSHA en la nueva generación de cepas vacunales construida en este trabajo, evita la transmisión horizontal de los genes de la toxina del cólera. Los mutantes obtenidos mediante esa manipulación genética fueron completamente resistentes a la infección con los fagos VGJ ϕ y HybP ϕ , lo cual disminuye a un mínimo la probabilidad de readquisición de CTX ϕ por mediación de un fago híbrido del tipo de HybP ϕ . El proceso de construcción de los mutantes no alteró ningún otro factor importante deseable en una cepa vacunal de *V. cholerae*, tales como la morfología celular, la movilidad, la estructura del antígeno O de superficie, la velocidad de crecimiento y la capacidad de las cepas mutadas para colonizar adecuadamente el intestino delgado del ratón lactante. Los candidatos vacunales construidos están listos para entrar en fase de estudios preclínicos y clínicos. Se prevé que la mutación introducida no afectará la inducción de una respuesta inmune adecuada para proteger contra el cólera, ya que se ha informado previamente que la fimbria MSHA no es importante para el desarrollo de una respuesta protectora contra el cólera.¹²⁻¹⁴

BIBLIOGRAFIA

- Holmgren J. Actions of cholera toxin and the prevention and treatment of cholera. *Nature*, **292**, 413, 1981.
- Finkelstein R.A. Why do we not yet

have a suitable vaccine against cholera? *Adv. Exp. Med. Biol.*, **371B**, 1633, 1995.

- Kaper J.B. *Vibrio cholerae* vaccines. *Rev. Infect. Dis.*, **11** Suppl. 3, S568, 1989.
- Benítez J.A., Silva A.J., Rodríguez B.L., Fando R., Campos J., Robert A., García H., García L., Pérez J.L., Oliva R., Torres C.A. and Ledón T. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. *Arch. Med. Res.*, **27**, 275-83, 1996.
- Kenner J.R., Coster T.S., Taylor D.N., Trofa A.F., Barrera-Oro M., Hyman T., Adams J.M., Beattie D.T., Killeen K.P. and Spriggs D.R. Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J. Infect. Dis.*, **172**, 1126, 1995.
- Taylor R., Shaw C., Peterson K., Spears P. and Mekalanos J. Safe, live *Vibrio cholerae* vaccines? *Vaccine*, **6**, 151, 1988.
- Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage 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, 1988.
- Campos J., Martínez E., Suzarte E., Rodríguez, B.L., Marrero, K., Ledón, T., Del Sol, R., and Fando, R. VGJ ϕ , a Novel Filamentous Phage of *Vibrio cholerae*, Integrates Into the Same Chromosomal Site than CTX ϕ . *J. Bacteriol.*, **185**, 5685, 2003.
- Campos J., Martínez E., Marrero K., Silva Y., Rodríguez B.L., Suzarte E., Ledón T. and Fando R. Novel type of specialized transduction for CTX ϕ or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ ϕ in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.*, **185**, 7231, 2003.
- Ehara M., Shimodori S., Kojima F., Ichinose Y., Hirayama T., Albert M. J., Supawat K., Honma Y., Iwanaga M. and Amako K. Characterization of filamentous phages of *Vibrio cholerae* O139 and O1. *FEMS Microbiol. Lett.*, **154**, 293, 1997.

12. 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. **Infect. Immun.**, **64**, 3369, 1996.
13. Thelin 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. **Infect. Immun.**, **64**, 2853, 1996.
14. Tacket C.O., Taylor R.K., Lonsky G., Lim Y., Nataro J.P., Kaper J.B. and Levine M.M. Investigation of the roles of toxin-coregulated pili and mannose-sensitive hemagglutinin pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection. **Infect. Immun.**, **66**, 692, 1998.
15. 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.
16. Benítez J.A., García L., Silva A., García H., Fando R., Cedré B., Pérez A., Campos J., Rodríguez B.L., Pérez J.L., Valmaseda T., Pérez O., Pérez A., Ramírez M., Ledón T., Jidy M.D., Lastre M., Bravo L. and Sierra G. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX ϕ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. **Infect. Immun.**, **67**, 539, 1999.
17. Robert A., Silva A., Benítez J.A., Rodríguez B.L., Fando R., Campos J., Sengupta D.K., Boesman-Finkelstein M. and Finkelstein R.A. 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, 1996.
18. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L., Gill S.R., Nelson K.E., Read T.D., Tettelin H., Richardson D., Ermolaeva M.D., Vamathevan J., Bass S., Qin H., Dragoi I., Sellers P., McDonald L., Utterback T., Fleishmann R.D., Nierman W.C. y White O. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. **Nature**, **406**, 477-83, 2000.
19. Ausubel F., Brent M.R., Kingston R. E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., and Struhl K. Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons Inc, New York, USA, 1995.
20. Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (2nd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. 1989.
21. Angelichio M.J., Spector J., Waldor M. K. and Camilli A. *Vibrio cholerae* intestinal population dynamics in the suckling mouse model of infection. **Infect. Immun.**, **67**, 3733, 1999.