

Modificaciones genéticas en mutantes atoxigénicos de *Vibrio cholerae* O139 que mejoran sus propiedades como candidatos vacunales

Talena Ledón*, Celso Pérez, Javier Campos, Edith Suzarte, Karen Marrero, Boris Luis Rodríguez, Caridad Urra, Arlenis Moreno y Rafael Fando.

Departamento de Genética, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. *Correo electrónico: talena.ledon@biocnic.edu.cu

Recibido: 14 de mayo de 2003. Aceptado: 26 de marzo de 2004.

Palabras clave: *Vibrio cholerae* O139, vacunas, *hapA*, *mshA*, colonización.
Key words: *Vibrio cholerae* O139, vaccine, *hapA*, *mshA*, colonization.

RESUMEN. La hemaglutinina proteasa constituye un locus atractivo para la inserción de genes heterólogos que permitan la identificación de candidatos vacunales de *Vibrio cholerae*. Un mutante de *Vibrio cholerae* O139 previamente desprovisto de los genes de CTX ϕ fue secuencialmente manipulado mediante técnicas de ingeniería genética para obtener primero, derivados *hapA::celA* y después, clones con mejores propiedades de bioseguridad mediante una mutación en el gen *mshA*. La primera de las modificaciones consistió en la inserción del gen *celA* de *Clostridium thermocellum* el cual permite, mediante una técnica microbiológica sencilla, la distinción inequívoca del candidato vacunal de las cepas de *Vibrio cholerae* circulantes en la naturaleza. El gen *mshA* codifica la subunidad fundamental de la hemaglutinina sensible a manosa, fimbria que constituye el portal de entrada de varios vibrio-fagos, entre ellos VGJ ϕ , el cual es capaz de transportar los genes de la toxina colérica entre diferentes cepas de *Vibrio cholerae* mediante un mecanismo de transducción especializada altamente eficiente. La caracterización genética de los mutantes se realizó mediante *Southern blotting* con sondas que reconocen específicamente los genes de interés. Los mutantes así obtenidos mantuvieron el fenotipo de mótils de sus parentales y un buen nivel de colonización en el modelo del ratón neonato, aspectos esenciales para un candidato vacunal.

ABSTRACT. The hemagglutinin/protease represents an attractive locus for the insertion of heterologous tags which unequivocally distinguish vaccine candidates from wild type of *Vibrio cholerae*. An atoxigenic mutant of *Vibrio cholerae* O139 was sequentially manipulated using molecular biology methods to obtain *hapA::celA* derivatives which were later improved in their environmental safety by means of an *mshA* mutation. The *celA* gene from *Clostridium thermocellum* was used to tag the vaccine prototypes. The marked strains could be unequivocally distinguished using a simple microbiological technique. The *mshA* gene codes the main subunit of pilus MSHA that constitutes the portal of entry of several vibriophages, such as VGJ ϕ which is able to carry the cholera toxin genes between different *Vibrio cholerae* strains by an efficient mechanism of specialized transduction. The mutants thus obtained resulted motiles and showed a good colonization capacity in the infant mouse cholera model, traits which are remarkable to vaccine candidates.

INTRODUCCION

Vibrio cholerae (*V. cholerae*) es el agente etiológico de la enfermedad diarreica aguda conocida como cólera. Hasta el aislamiento en 1992 de cepas de *Vibrio cholerae* del serogrupo O139, esta enfermedad epidémica era asociada exclusivamente a *Vibrio cholerae* serogrupo O1.¹ Un

evento clínico de esta enfermedad induce una inmunidad protectora a largo plazo en más del 80 % de los afectados, por lo que la obtención de una vacuna que estimule el sistema inmune mucosal se encuentra entre los objetivos de los investigadores de este campo. Varias cepas genéticamente modificadas pertenecientes

a los biotipos El Tor y O139 han resultado ser bien toleradas e inmuno-génicas en estudios en voluntarios.^{2,3} 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 estimulación de una respuesta inmune específica, y la colonización del tracto gastrointestinal del ratón neonato es ampliamente aceptada como un indicador que correlaciona bien con la colonización del intestino humano, por lo que este modelo es utilizado para evaluar y seleccionar los mejores candidatos vacunales contra la enfermedad.⁴

La atenuación de la virulencia en las cepas vacunales vivas de *V. cholerae* se logra fundamentalmente mediante 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 filamentosos denominado CTX ϕ ,⁵ 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 este microorganismo.⁶

V. cholerae produce también una hemaglutinina proteasa (HA/P), codificada por el gen *hapA* que tiene la capacidad de degradar proteolíticamente varias proteínas del hos-

pedero entre las que se encuentra la mucina. Aunque el papel de HA/P en el proceso de patogénesis de *V. cholerae* no ha sido completamente explicado, sí se han presentado elementos que avalan su contribución a la reactogenicidad de candidatos vacunales.^{3,7} Recientemente fue aislado un nuevo fago filamentosos que infecta *V. cholerae* denominado VGJΦ, el cual utiliza como receptor la fimbria tipo 4 hemaglutinina sensible a manosa (MSHA).⁸ VGJΦ es capaz de transmitir eficientemente los genes que codifican la toxina del cólera entre diferentes poblaciones bacterianas de *V. cholerae* que produzcan MSHA.⁹ 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.¹⁰ Sin embargo, se ha reportado que no juega un papel esencial en el proceso de colonización intestinal por la bacteria,^{11,12} ni en la inducción de una respuesta inmune protectora.¹³

La integración estable del gen *celA* de *Clostridium thermocellum* en el genoma de *Vibrio cholerae* ha sido descrita como una buena estrategia para diferenciar a los vibrios que lo porten de aquellos circulantes en el ambiente. Estudios previos han demostrado que se produce una endoglucanasa enzimáticamente activa y fácilmente detectable.¹⁴

En el Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas se han construido diferentes variantes de candidatos vacunales de *V. cholerae* O139.^{14,15} Entre ellos, se encuentran variantes atoxigénicas derivadas de una cepa de *V. cholerae* O139 de reciente aislamiento, con un patrón de resistencia a antibióticos más favorable para su uso en humanos y mejor capacidad colonizadora que otras variantes desarrolladas por los investigadores de dicho departamento.

El objetivo de este trabajo es describir las diferentes modificaciones genéticas realizadas a estos mutantes atoxigénicos, en aras de mejorar sus propiedades como candidatos vacunales, particularmente las mutaciones en los genes *hapA* y *mshA* que constituyen un factor de virulencia y el portal de entrada a vibriofagos, respectivamente. Se presentan, además, los resultados de la evaluación de la capacidad colonizadora de estos candidatos vacunales, criterio a partir del cual

se selecciona el mejor prototipo para ser evaluado en posteriores estudios preclínicos y clínicos, de seguridad e inmunogenicidad.

MATERIALES Y METODOS

Cepas, plasmidios y medios de cultivo

Todas las cepas empleadas en el trabajo (Tabla 1) fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) y conservadas a -70 °C en el mismo medio suplementado con glicerol al 20 %. Los vectores suicidas (Tabla 1) fueron propagados en *Escherichia coli* SY327λpir y movilizados hacia *V. cholerae* por conjugación, utilizando la cepa de *E. coli* S17-1λpir. Los antibióticos fueron añadidos, cuando fue necesario, a las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp) a 100 µg/mL, kanamicina (Kan) a 50 µg/mL y polimixina B (Pol) a 13,2 µg/mL.

Técnicas de Biología Molecular

El ADN cromosomal de *V. cholerae* fue preparado según la metodología descrita por Ausubel y cols.²¹ Las mini preparaciones de ADN plasmídico fueron realizadas según Birnboim y Doly.²² Las enzimas de restricción y modificación, así como los adaptadores fueron provistos por Boehringer Mannheim y utilizados de acuerdo a sus instrucciones. Los plasmidios recombinantes fueron construidos utilizando métodos clásicos.²¹

El vector suicida pCVDBCelA fue construido en varios pasos. En primer lugar se insertó un adaptador *BglII* en el sitio *SmaI* del plasmidio suicida pCVD442, dando lugar al plasmidio pCVDB. El plasmidio pJHC1 fue utilizado como fuente para obtener el fragmento de ADN que contenía la secuencia del gen *celA* de *Clostridium thermocellum*, insertada en el gen *hapA* de *V. cholerae*. Dicho fragmento se obtuvo a partir de la digestión con la enzima *BglII* y la banda de interés de 6,4 kb fue purificada utilizando el sistema *GFX PCR DNA and gel band Purification* (Amersham) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Posteriormente, este fragmento fue clonado en el plasmidio suicida pCVDB, previamente digerido con *BglII*, y se obtuvo el plasmidio pCVDBCelA. Este vector puede ser utilizado en la obtención de mutantes *hapA* de *V. cholerae* que contengan el gen *celA* insertado en el locus de HA/P.

Inserción del gen *celA* en el genoma de *Vibrio cholerae*

La estrategia seguida para obtener estos prototipos vacunales de

segunda generación se basó también en la metodología de intercambio alélico con vectores suicidas, previamente descrita.²³ Los mutantes ΔCTXφ*hapA::celA* se obtuvieron utilizando el plasmidio pCVDBCelA, que fue transferido por conjugación desde la cepa de *E. coli* S17-1λpir hacia la cepa de *V. cholerae* CRC13, y los exconjugantes de *Vibrio* fueron seleccionados en placas de LB suplementadas con Amp y Pol. La capacidad de producir endoglucanasa A activa fue evaluada según se describe más adelante. Se seleccionaron varios exconjugantes con actividad endoglucanasa y luego se verificó por *Southern blotting* que poseían una estructura génica correcta. Algunos de ellos fueron cultivados durante 18 h en caldo LB y diferentes alícuotas fueron sembradas en placas de LB sin NaCl, suplementadas con sacarosa al 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. La estructura génica del locus *hapA* en los clones segregantes fue también evaluada por *Southern blotting* utilizando sondas de ADN que reconocen específicamente los genes *hapA* y *celA*, respectivamente. Ambas sondas fueron obtenidas utilizando el sistema de marcaje y detección no radiactivo para Digoxigenina, de Boehringer Mannheim. Se seleccionaron tres clones para evaluar sus características morfofuncionales y a partir de ese análisis se seleccionó uno de ellos para posteriores modificaciones genéticas.

Ensayo de la actividad endoglucanasa

La actividad endoglucanásica fue evaluada según la descripción de Robert y cols.²³ Brevemente, las cepas a analizar fueron sembradas por agotamiento en placas de LB sólido e incubadas toda la noche a 37 °C. Posteriormente, las placas fueron cubiertas con una capa fina de agar-carboximetilcelulosa (0,5 y 0,1 %, respectivamente, en una solución de fosfato-citrato) e incubadas durante 3 h a 70 °C. Una vez transcurrido este tiempo, las placas se tiñeron con rojo congo al 1 % durante 5 min, y posteriormente, se lavaron con NaCl al 10 % para desteñir. La formación de un halo transparente alrededor de la colonia era indicador de la actividad celulolítica.

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

| Cepas | Descripción | Fuente o Referencia |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| <i>E. coli</i> | | |
| SY327 λ pir | $\Delta(lac pro) argE(Am) rif nalA recA56 (\lambda pirR6K)$ | 16 |
| S17-1 λ pir | <i>RecA thi pro hsdRM</i> (RP4-2 <i>Tc::Mu-Km::Tn7</i> , λ pir, Km ^r , (Tp ^r , Sm ^r)) | 17 |
| <i>V. cholerae</i> | | |
| CRC13 | Mutante $\Delta CTX\Phi$ derivado de la cepa salvaje de <i>Vibrio cholerae</i> O139 CRC266 | 15 |
| CRC131 | Mutante <i>hapA::celA</i> , derivado de la cepa atoxigénica de <i>V. cholerae</i> CRC13 | Este estudio |
| CRC132 | Mutante <i>hapA::celA</i> , derivado de la cepa atoxigénica de <i>V. cholerae</i> CRC13 | Este estudio |
| CRC134 | Mutante <i>hapA::celA</i> , derivado de la cepa atoxigénica de <i>V. cholerae</i> CRC13 | Este estudio |
| CRC222 | Mutante <i>mshA</i> , derivado de la cepa de <i>V. cholerae</i> CRC132 | Este estudio |
| CRC223 | Mutante <i>mshA</i> , derivado de la cepa de <i>V. cholerae</i> CRC132 | Este estudio |
| CRC241 | Mutante <i>mshA</i> , derivado de la cepa de <i>V. cholerae</i> CRC132 | Este estudio |
| 569b | Serogrupo O1, biotipo clásico, serotipo Inaba | Calcutta, India, 1945 |
| L911 | Mutante <i>hapA::celA</i> , derivado de la cepa atoxigénica de <i>V. cholerae</i> SG25-1a | 14 |
| Plasmidios y fagos | | |
| pIJHCI | Amp ^r , vector derivado del pIJ2925 que tiene insertado en su sitio <i>Bgl</i> II un fragmento de 6400 pb con el gen <i>hapA</i> interrumpido por el gen <i>celA</i> . | 18 |
| pCVD442 | Amp ^r , Vector suicida derivado del pGP704 que contiene además el gen <i>sacB</i> como marcador de contraselección | 19 |
| pCVDB | Amp ^r , Vector suicida derivado del pCVD442 que contiene un sitio <i>Bgl</i> II sustituyendo el sitio <i>Sma</i> I de este vector | Este estudio |
| pCVDBCelA | Amp ^r , Fragmento <i>Bgl</i> II de 6400 pb proveniente de pIJHCI clonado en este sitio del pCVDB | Este estudio |
| pCV Δ mshA | Derivado del vector pCVD442 con un fragmento <i>Sac</i> I- <i>Sph</i> I que contiene los genes flanqueantes a <i>mshA</i> fusionados | 20 |
| VGJ ^{Kan^r} Φ | Kan ^r , Vibriofago derivado de VGJ Φ con un marcador de resistencia a Kan insertado en su genoma | 9 |

Construcción de mutantes *mshA* de *Vibrio cholerae*

La construcción de mutantes *mshA* fue realizada mediante el reemplazamiento alélico del gen *mshA* en el cromosoma de la cepa de *V. cholerae* CRC132, por el fragmento que posee sólo las regiones extremas de este gen fusionadas en el plasmidio pCV Δ mshA. Dicho plasmidio se introdujo en la cepa CRC132 por

conjugación según se describió anteriormente. El sitio de integración del pCV Δ mshA en los transformantes fue analizado mediante *Southern blotting* y se seleccionaron dos clones en los que el vector con el fragmento portador de la supresión se insertó en el locus del gen *mshA* salvaje. Estos clones fueron cultivados en caldo LB para favorecer la escisión del vec-

tor suicida por recombinación homóloga (segregación). Los clones segregantes fueron seleccionados en placas de LB-sacarosa, y posteriormente, se verificó la sensibilidad a Amp. Mediante un estudio de *Southern blotting* con una sonda específica para el gen *mshA* se seleccionaron tres clones que retuvieron en su genoma la copia mutada del gen.

Susceptibilidad a la infección con VGJ^{Kan ϕ}

Para los ensayos de infección, la cepa de *V. cholerae* 569b infectada con el fago VGJ^{Kan ϕ} se creció hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm igual a 2. Se tomó una alícuota del cultivo y se filtró por membrana de 0,22 μ m para eliminar las células. El filtrado se chequeó sembrando una alícuota de 50 μ L en placa de LB sólido e incubando a 37 °C toda la noche para comprobar su esterilidad por ausencia de colonias. Se usaron 200 μ L del sobrenadante libre de células, o diluciones del mismo, para infectar 20 μ L de un cultivo fresco de la cepa usada como receptora. En este caso, se realizó el experimento con más de diez clones exconjugantes o segregantes seleccionados. El sobrenadante filtrado con las partículas de fago se puso en contacto durante 20 min a temperatura ambiente con una alícuota de células receptoras. Seguidamente las células fueron sembradas en medio LB sólido (suplementado con Kan) y se dejaron crecer a 37 °C toda la noche.

Ensayo de motilidad

El ensayo de motilidad se realizó según se ha descrito anteriormente.¹⁴ Para ello, colonias aisladas de una placa fresca de LB fueron inoculadas por punción (2 a 3 mm) en una placa de LB con agar al 0,3 %. El diámetro de cada colonia expandida en el agar suave fue medido al cabo de 6 h de incubación a 30 °C. Se considera que una cepa bacteriana no es mótil si posee un diámetro de 3 mm o menos a partir del punto de aplicación. La cepa no mótil *V. cholerae* L911 fue utilizada como control.

Colonización intestinal

Para evaluar la capacidad colonizadora de los candidatos vacunales de *V. cholerae* se empleó una modificación del procedimiento de Richardson.²⁴ Los ratones Balb/c u OF-1 lactantes (3 a 5 d de nacidos) se separaron de sus madres tres horas antes del experimento y se asignaron aleatoriamente a los grupos experimentales. Se prepararon cultivos frescos en LB de las cepas a evaluar y se leyó la absorbancia a 600 nm. Se ajustó la suspensión para garantizar un contenido aproximado de 10⁵ 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 1 % en solución 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. Cada grupo experimental se muestreó (n = 5 ratones cada vez) a las 24, 72 y 120 h de inoculados para determinar el contenido intestinal de vibriones. Para ello, los cinco ratones se sacrificaron en atmósfera de clorofórmico, sus intestinos delgados se extrajeron; se midieron, se lavaron tres veces con solución salina; y se homogenizaron, cada uno en 5 mL de PBS, empleando un disruptor de cuchillas Ultraturrax 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. La comparación estadística de la capacidad colonizadora de las cepas atenuadas a los diferentes tiempos se realizó por la prueba Kruskal Wallis o U de Matt Whitney, según fue necesario.

RESULTADOS Y DISCUSION

Debido a que no existen modelos animales que reproduzcan los síntomas clínicos del cólera, es necesario realizar la evaluación preliminar de candidatos vacunales en voluntarios sanos. Se han llevado a cabo varios intentos para construir candidatos vacunales para inmunizar contra *V. cholerae* O1 y O139, pero muchos han tenido que ser descartados por resultar reactogénicos en estudios iniciales de tolerancia.^{25,26} Aunque se han construido otros prototipos vacunales cubanos de *V. cholerae* O139, diferentes variantes han de ser consideradas teniendo en cuenta que su desempeño en humanos está aún por evaluar.^{14,15}

La cepa *V. cholerae* O139 CRC266, aislada en la India en 2000, fue seleccionada como punto de partida para la obtención del mutante atoxigénico CRC13, por poseer un patrón de susceptibilidad a antibióticos más favorable para el uso en humanos. Mediante técnicas de ingeniería genética se eliminó de su cromosoma el genoma del fago CTX ϕ que contiene todos los genes pertenecientes al antes denominado casete de virulencia.¹⁵

Construcción de mutantes hapA::celA

Para facilitar los estudios de campo es conveniente utilizar cepas vacunales que posean algún rasgo que las distinga fácilmente de otros vibrios circulantes en el ambiente. Para ello, el Laboratorio de Genética del CNIC ha desarrollado una metodología que permite la inserción de un gen reportero en el genoma de *V. cholerae*, en este caso el gen *celA* de *C. thermocellum* que codifica un β (1-4) glucanohidrolasa termofílica denominada endoglucanasa A.²³ La actividad de esta enzima puede ser evaluada de forma sencilla a partir de cultivos frescos en medio sólido. El locus del gen *hapA* es utilizado como sitio de inserción del gen heterólogo ya que mutantes *hapA* mantienen la virulencia y la capacidad de colonización en el modelo del ratón infante.^{27,28} Por otro lado, candidatos vacunales portadores de esta mutación han resultado no reactogénicos en estudios con voluntarios humanos sanos.^{3,7}

Una segunda generación de candidatos vacunales de *V. cholerae* O139 se desarrolló a partir del mutante CRC13, luego del reemplazamiento alélico del gen *hapA* de su cromosoma por el alelo *hapA::celA* presente en el plasmidio suicida pCVDBCelA (Tabla 1). Este proceso incluyó un paso de formación de cointegrantes diploides resistentes a ampicilina (Amp^r) a partir de cuya segregación se obtuvieron varios mutantes *hapA::celA*. La selección de los clones en ambos casos se realiza a partir del análisis de los resultados del *Southern blotting* utilizando como sondas los genes *hapA* y *celA* (Fig. 1, paneles A y B, respectivamente). El aumento en aproximadamente 14 kb de la banda correspondiente a la digestión *XhoI* del cointegrante E7132, con relación a la que aparece al digerir el ADN de la cepa parental CRC13, tanto con la sonda *hapA* (Fig. 1A, carrilera b) como con la *celA* (Fig. 1B, carrilera b), indica que ocurrió la inserción en el locus adecuado del plasmidio pCVDBCelA. Luego de la segregación en medio LB carente de antibiótico, se obtuvieron varios clones sensibles a Amp (Amp^s) que retuvieron la actividad endoglucanasa y cuya estructura genómica, a partir de un análisis de *Southern blotting* utilizando las mismas sondas, se corresponde con lo esperado. La banda obtenida en los clones segregantes es aproximadamente 3,2 kb mayor que la de la cepa pa-

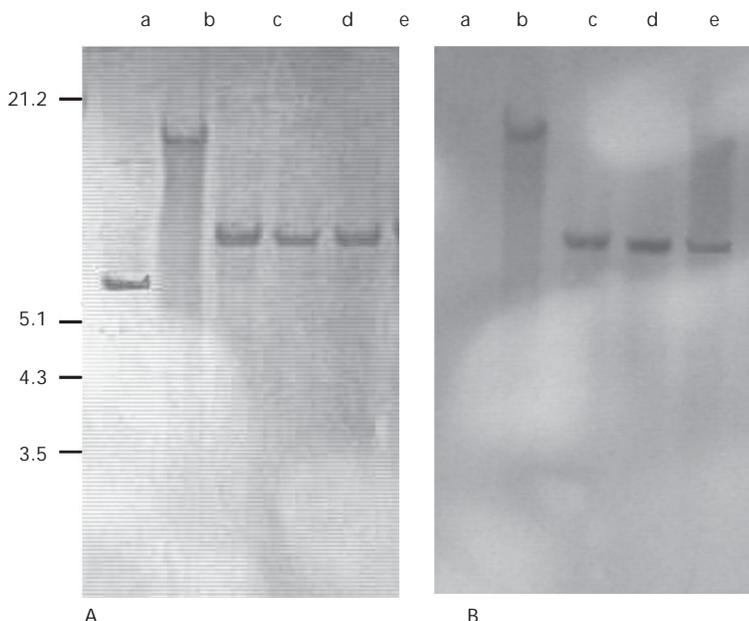


Fig. 1. Análisis por Southern blotting de la cepa atoxigénica CRC13 y sus derivados *hapA::celA*. Las sondas utilizadas fueron: panel A, *hapA* y B, *celA*. Los patrones de bandas corresponden a: carrileras a: CRC13, b: cointegrante E7132, c: segregante CRC131, d: segregante CRC132 y e: segregante CRC134. A la izquierda se indica la posición y el tamaño aproximado en kb de las bandas más importantes para el análisis, pertenecientes al patrón de peso molecular (PPM) Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, de Fermentas.

rental, este tamaño se corresponde con el del gen *celA* clonado en el plasmidio pCVDBCelA (Fig. 1, carrileras de c a d). Se seleccionaron tres clones denominados CRC131, CRC132 y CRC134 para estudiar sus características fenotípicas y seleccionar el más adecuado para posteriores modificaciones genéticas.

Evaluación de la capacidad colonizadora de mutantes *hapA::celA*

La capacidad para colonizar el intestino del ratón neonato se considera un buen correlato de lo que ocurre en el intestino humano. Las cepas de *V.*

cholerae atenuadas con fines vacunales se evalúan en ratones lactantes para verificar su capacidad colonizadora y su nivel de atenuación, previo a la evaluación en humanos.²⁴ Si una cepa coloniza el intestino delgado de ratones lactantes y no produce efecto letal, entonces puede ser estudiada en humanos. Esta prueba es utilizada a modo de filtro para escoger los mutantes de *V. cholerae* más apropiados como candidatos vacunales. Al comparar la capacidad colonizadora de los mutantes CRC131, CRC132 y CRC134 con la de la cepa CRC13, concluimos que el comportamiento relativo de

este índice en los dos primeros clones varió en el tiempo. Los mutantes CRC131 y CRC132 mostraron niveles de colonización superiores a los de CRC13 a las 24 h ($P = 0,0017$ y $P = 0,005$, respectivamente). A las 72 h el clon CRC131 mantuvo esta tendencia, aunque en menor grado ($P = 0,035$) y el CRC132 mantuvo los mismos niveles que a las 24 h, pero con el paso del tiempo el grado de colonización de estos mutantes *hapA* se redujo, y a las 120 h los niveles no fueron estadísticamente diferentes de los de su parental ($P = 0,2258$ y $P = 0,328$, respectivamente) de acuerdo con la prueba U de Matt Whitney (Tabla 2). Más allá del análisis estadístico de los valores alcanzados en el índice de colonización, se aprecia que las variaciones de este parámetro en el caso de estos mutantes *hapA* y la cepa de partida, con relación al número de vibrios presentes en el inóculo, no son superiores a dos órdenes logarítmicos, lo que en términos de impacto sobre la capacidad inmunogénica de las cepas no es significativo, considerando el comportamiento de otros candidatos vacunales cuya capacidad inmunogénica ya ha sido evaluada en humanos o en otros modelos animales.^{7,14} Por otro lado, de acuerdo con los resultados alcanzados por los autores del presente trabajo y otros investigadores con diferentes mutantes *hapA* en otras cepas de *V. cholerae*, no se puede concluir que la diferencia encontrada esté relacionada directamente con la deficiencia de HA/P.^{23,27-29} Otros estudios deberán realizarse para aclarar este punto de la discusión. En cambio, el clon CRC134 muestra una marcada reducción de su capacidad colonizadora con relación a la de la cepa CRC13 ($P < 0,001$), según la prueba

Tabla 2. Capacidad colonizadora en el modelo de ratón lactante de la cepa de *V. cholerae* CRC13 y sus mutantes *hapA* y *mshA*.

| Cepas <i>V. cholerae</i> | Log UFC/cm ² intestino a diferentes tiempos promedio (rango) ^a | | |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|
| | 24 h | 72 h | 120 h |
| CRC13 | 3,4 (2,1 – 5,9) | 3,9 (2 – 5,3) | 3,5 (2,6 – 5) |
| CRC131 | 4,4 (1,5 – 5,4) | 3,2 (1,9 – 4,6) | 3 (2 – 4,4) |
| CRC132 | 4,4 (2,2 – 5,5) | 4,6 (3,6 – 5,6) | 3,1 (1,7 – 4,5) |
| CRC134 | 1,3 (1,1 – 1,6) | 1,3 (1 – 2) | 0,99 |
| CRC222 | 4,7 (3,8 – 5,9) | 4,8 (4,3 – 5,9) | 4,8 (2,9 – 5,7) |
| CRC223 | 5,4 (4,1 – 6,9) | 4,3 (3,9 – 5,6) | 4,2 (2,3 – 6) |
| CRC241 | 5,4 (5 – 5,8) | 4,6 (2,8 – 5,3) | 3,9 (2,3 – 5,4) |

^a Cada valor corresponde al promedio de al menos cinco ratones procesados.

U de Matt Withney (Tabla 2), lo cual indica que otra mutación debió ocurrir durante el proceso de generación de este mutante que afectó su capacidad para colonizar el intestino del ratón neonato. De acuerdo con estos resultados, el clon CRC134 fue descartado como posible candidato vacunal y se seleccionó el mutante CRC132 para posteriores estudios, considerando que mantiene niveles de colonización superiores a los de CRC131 por más tiempo y que su capacidad colonizadora es comparable a la de otros candidatos vacunales ensayados exitosamente en voluntarios sanos.⁷

Construcción de mutantes incapaces de expresar MSHA

La idea de utilizar cepas vivas como vacuna siempre se ha visto sometida a un juicio crítico por la potencialidad que éstas tienen de readquirir los genes de la toxina del cólera (CT). El aislamiento de un nuevo fago filamentososo denominado VGJ ϕ con capacidad de transmitir eficientemente los genes de CT aumentan el interés de buscar soluciones que reduzcan esta posibilidad y de esta forma mejorar las propiedades de bioseguridad del candidato vacunal en cuestión. La transmisión de los genes de CT por VGJ ϕ se produce a través de la formación de un cointegrado entre su genoma y el de CTX ϕ , dando lugar a un fago híbrido funcional denominado HybP ϕ .⁹ Al igual que VGJ ϕ , este fago híbrido infecta a *V. cholerae* a través de la fimbria MSHA. 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.²⁰

De acuerdo con los resultados de colonización en el modelo del ratón neonato y sin otro criterio excluyente que alegar, la cepa CRC132 fue seleccionada para iniciar la construcción de una nueva generación de cepas vacunales incapaces de producir la fimbria MSHA, con el objetivo de impedir la readquisición de los genes de la toxina colérica a través de un fago como HybP ϕ , que muy probablemente puede ser encontrado en el ambiente.⁹

Teniendo en cuenta que el gen *mshA* codifica la pilina principal de la fimbria MSHA, se utilizó una estrategia diseñada para construir mutantes de este gen a partir de la cepa de *V. cholerae* O139 CRC132, con lo cual se obtendrían candidatos vacunales con un nivel aceptable de

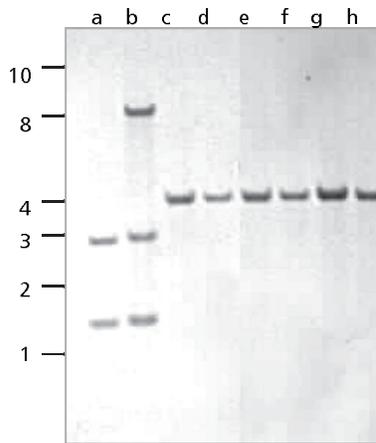


Fig. 2. Análisis por Southern blotting de la cepa CRC132 y sus derivados *mshA*. Los patrones de bandas corresponden a: carrilera a: CRC132, b: cointegrante E2, c: segregante CRC222, d: segregante CRC223, e: segregante CRC225, f: segregante CRC228, g: segregante CRC229, h: segregante CRC241. A la izquierda se indica la posición y el tamaño aproximado en kb de las bandas más importantes para el análisis, pertenecientes al patrón de peso molecular (PPM) Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, de Fermentas.

seguridad ambiental, caracterizados por exhibir total protección contra la incorporación y posterior diseminación de los genes que codifican CT mediante fagos híbridos del tipo de HybP ϕ . El hecho de que la mutación introducida sea una delección asegura la irreversibilidad del evento y por tanto, de la expresión de esta fimbria.

La estrategia utilizada para deleccionar *mshA* en el cromosoma de la bacteria fue el intercambio alélico mediante recombinación homóloga con el locus *mshA* mutado que está presente en el vector suicida pCV Δ *mshA* (Tabla 1).

El proceso de construcción de los mutantes se siguió mediante Southern blotting (Fig. 2), y se empleó como sonda el propio gen *mshA* mutado. Esta técnica permitió determinar la estructura genética de aquellos clones en los que el plasmidio suicida pCV Δ *mshA* se insertó por recombinación homóloga en el locus deseado del cromosoma de la cepa de partida utilizada, (eventos de recombinación ilegítima en sitios no deseados del genoma bacteriano también pueden ocurrir con cierta frecuencia). La digestión del ADN de los cointegrantes con la enzima de restricción *Bst*XI permite la identificación de los clones correctos, ya que el evento de integración del plasmidio suicida genera un patrón de bandas específico. Estos cointe-

grantes correctos pueden generar dos tipos de patrones de bandas, en dependencia del evento de recombinación ocurrido. En todos los casos el proceso recombinativo produjo uno solo de ellos, y fue aquel en el que se obtuvieron tres bandas: una de 8,7 kb, una de 1,5 kb y otra de 2,8 kb (Fig. 2, carrilera b). Sin embargo la digestión del ADN cromosomal de la cepa parental con la misma enzima origina dos bandas: una de 1,5 kb y otra de 2,8 kb (Fig 2, carrilera a). De acuerdo con esto se escogieron dos cointegrantes correctos (en la Fig. 2 se representa el patrón de uno de ellos, E-2, carrilera b) a partir de los cuales, después de un paso de segregación en medio LB líquido, se seleccionaron los segregantes capaces de crecer en LB sacarosa y que al mismo tiempo fueran sensibles a Amp, lo que indicaba que dichos segregantes habían perdido el plasmidio anteriormente integrado.

Debido a que la cepa CRC132 es capaz de infectarse con VGJ-Kn ϕ , se realizó un ensayo de infección con el objetivo de seleccionar aquellos segregantes que fueran resistentes a la infección con el fago, los cuales deben corresponder a las cepas que presentan la delección del gen deseado. Tres de estos clones, CRC222, CRC223 y CRC241, fueron seleccionados para posteriores estudios, y su estructura genética confirmada mediante Southern blotting (Fig. 2). La digestión con *Bst*XI de los ADNs de los segregantes que no poseen el gen *mshA* genera como resultado una banda de 4,0 kb (Fig. 2, carrileras de c a h), mientras que el ADN de los segregantes que dejaron en el cromosoma el alelo no mutado, digerido con la misma enzima genera un patrón de bandas idéntico al descrito para las cepas parentales.

El estudio de la capacidad colonizadora de todos estos mutantes indicó que no hay diferencias significativas en el comportamiento de este índice entre ellos y su parental, la cepa CRC132 (P = 0,1043), de acuerdo con la prueba de Kruscal Wallis (Tabla 2).

Caracterización fenotípica

Los mutantes de segunda y tercera generación obtenidos fueron analizados desde el punto de vista serológico y microbiológico. Todas las cepas 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 parentales. Al deter-

minar la movilidad de los mutantes *hapA::ceIA* y Δ *mshA* construidos, se comprobó que los diámetros de expansión de los mutantes se mantuvieron aproximadamente iguales a los de las cepas progenitoras de partida (alrededor de 13 mm), lo cual indica que esta función no fue alterada durante el proceso de construcción de estos candidatos vacunales.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados indican que la disrupción de los genes *hapA* y *mshA* en los candidatos vacunales vivos atenuados CRC222, CRC223 y CRC241, los provee de mejores niveles de seguridad ambiental que la cepa atoxigénica de la que se derivan, debido a la imposibilidad de estos mutantes de revertir a la virulencia por readquisición de los genes que codifican la toxina colérica mediante un fago como HybPφ. Por otra parte, se comprobó que estas deleciones no provocan cambios adversos en las cepas vacunales en cuanto a: morfología, motilidad, serología, o en la colonización en el modelo del ratón lactante. Además, de acuerdo con resultados anteriormente reportados, estas mutaciones no deben interferir en la inducción de una respuesta inmune protectora por parte de estos candidatos vacunales vivos atenuados durante ensayos clínicos con voluntarios humanos. Estudios posteriores en otros modelos animales permitirán definir el mejor candidato para su evaluación en estos tipos de ensayos.

BIBLIOGRAFIA

- Levine M.M. and Pierce N.F. In: Cholera, Plenum, New York, 285-328, 1992.
- 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., García H., Fando R., Cedré B., et al. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTXPhi-negative, hemagglutinin/protease-defective EI Tor strain as a cholera vaccine candidate. **Infect. Immun.**, **67**, 539-545, 1999.
- Cedré M.B., García Imía L.G., García Sánchez H.M., Fariñas M.M., Talavera C.A. and Infante Bourzac J.F. Intestinal colonization of the infant mouse model by attenuated and virulent *Vibrio cholerae* strains. **Arch. Med. Res.**, **29**, 231-234, 1998.
- Waldor M.K. and Mekalanos J.J. Lyso-genic conversion by a filamentous

phage encoding cholera toxin. **Science**, **272**, 1910-1914, 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**, 1487-1492, 1988.
- García L., Jidy M.D., García H., Rodríguez B.L., Fernández R., Año G., et al. The vaccine candidate *Vibrio cholerae* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. **Infect. Immun.**, **73**, 3018-3024, 2005.
- Campos J., Martínez E., Suzarte E., Rodríguez B.L., Marrero K., Silva Y., et al. VGJ phi, a novel filamentous phage of *Vibrio cholerae*, integrates into the same chromosomal site as CTX phi. **J. Bacteriol.**, **185**, 5685-5696, 2003.
- Campos J., Martínez E., Marrero K., Silva Y., Rodríguez B.L., Suzarte E., et al. Novel type of specialized transduction for CTX phi or its satellite phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ phi in *Vibrio cholerae*. **J. Bacteriol.**, **185**, 7231-7240, 2003.
- Ehara M., Shimodori S., Kojima F., Ichinose Y., Hirayama T., Albert M.J., et al. Characterization of filamentous phages of *Vibrio cholerae* O139 and O1. **FEMS Microbiol. Lett.**, **154**, 293-301, 1997.
- 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* EI Tor. **Infect. Immun.**, **64**, 3369-3373, 1996.
- Tacket C.O., Taylor R.K., Losonsky G., Lim Y., Nataro J.P., Kaper J.B., et al. Investigation of the roles of toxin-coregulated pili and mannose-sensitive hemagglutinin pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection. **Infect. Immun.**, **66**, 692-695, 1998.
- Osek J., Svennerholm A.M. and Holmgren J. Protection against *Vibrio cholerae* EI Tor infection by specific antibodies against mannose-binding hemagglutinin pili. **Infect. Immun.**, **60**, 4961-4964, 1992.
- Ledón T., Valle E., Valmaseda T., Cedré B., Campos J., Rodríguez B.L., et al. Construction and characterisation of O139 cholera vaccine candidates. **Vaccine**, **21**, 1282-1291, 2003.
- Ledón T., Campos J., Suzarte E., Marrero K., Rodríguez B.L., Moreno A., et al. Obtención de mutantes atoxigénicos para inmunizar contra *Vibrio cholerae* O139. **Revista CNIC Ciencias Biológicas**, **36**, 2005.
- 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* requires toxR. **J. Bacteriol.**, **170**, 2575-2583, 1988.
- Benítez J.A., Silva A.J., Rodríguez B.L., Fando R., Campos J., Robert A., et al. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: construction of live attenuated EI Tor candidate vaccine strains. **Arch. Med. Res.**, **27**, 275-283, 1996.
- Donnenberg M.S. and Kaper J. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using the positive-selection suicide vector. **Infect. Immun.**, **59**, 4310, 1991.
- Martínez E., Silvera R., Campos J., Rodríguez B.L., Silva Y., Suzarte E., et al. Cepas vivas atenuadas de *Vibrio cholerae* con características mejoradas de seguridad ambiental. **Revista CNIC Ciencias Biológicas**, **36**, 2005.
- Ausubel F.M., Brent R. and Kingston R.E. Short protocols in molecular biology, John Wiley & Sons Inc., New York, 1995.
- Birnboim H.C. and Doly J.A. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. **Nucleic Acids Res.**, **7**, 1513-1523, 1979.
- Robert A., Silva A., Benítez J.A., Rodríguez B.L., Fando R., Campos J., et al. Tagging a *Vibrio cholerae* EI 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.
- Richardson S.H. Animal models in cholera Research. In *Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspectives. Wachmuth IK, Blake PA, Olsvik O. ASM Press, Washington, D.C., 203-225, 1994.
- Levine M.M. and Kaper J.B. Live oral vaccines against cholera: an update. **Vaccine**, **11**, 207-212, 1993.
- Sack D.A., Sack R.B., Nair G.B. and Siddique A.K. Cholera. **Lancet**, **363**, 223-233, 2004.
- 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.
- Hase C.C. and Finkelstein R.A. Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. **J. Bacteriol.**, **173**, 3311-3317, 1991.
- Silva A.J., Leitch G.J., Camilli A. and Benítez J.A. Contribution of hemagglutinin/protease and motility to the pathogenesis of EI Tor biotype cholera. **Infect. Immun.**, **74**, 2072-2079, 2006.