

Susceptibilidad de mutantes atoxigénicos de *Vibrio cholerae* O139 a la infección con los bacteriófagos CTX ϕ y VGJ ϕ

Talena Ledón, Beatriz Ferrán, Celso Pérez, Javier Campos y Rafael Fando.

Departamento de Biología Molecular, Área Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Apartado Postal 6412, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: talena.ledon@cnic.edu.cu

Recibido: 4 de junio de 2009.

Aceptado: 18 de agosto de 2009.

Palabras clave: *Vibrio cholerae* O139, vacuna, infección con fagos, CTX ϕ , VGJ ϕ .

Key words: *Vibrio cholerae* O139, vaccine, phage infection, CTX ϕ , VGJ ϕ .

RESUMEN. Los genes de la toxina del cólera (CT), principal factor de virulencia de *Vibrio cholerae*, son portados por el fago lisogénico CTX ϕ . Este puede transmitir los genes tóxicos entre cepas de esta bacteria que expresen el pelo co-regulado con la toxina (TCP), receptor del fago. VGJ ϕ es otro fago filamentosos de *V. cholerae* que también es capaz de transmitir los genes de CT a través de la formación de un fago híbrido con CTX ϕ . Tanto VGJ ϕ como el fago híbrido utilizan la hemaglutinina sensible a manosa (MSHA) como receptor, la cual se expresa en una variedad de condiciones naturales de crecimiento. La transmisión horizontal de genes puede constituir un problema, al utilizar vacunas vivas atenuadas durante campañas de vacunación masiva, en áreas de cólera endémico. Para atender este problema, se han construido las variantes atoxigénicas de *V. cholerae* O139 CRC3222 y CRC3241 que no expresan la fimbria MSHA. En este trabajo, se evalúa la susceptibilidad de estas cepas a la infección con CTX ϕ y VGJ ϕ , utilizando variantes de estos fagos marcadas con el gen de resistencia a kanamicina. Se encontró que ambas cepas fueron resistentes a la infección *in vitro* con VGJ-Kan ϕ . En cambio, a pesar de expresar TCP *in vitro*, solo se infectaron con CTX-Kan ϕ durante el paso por el intestino del ratón neonato. Estos resultados sugieren que CRC3222 y CRC3241 son prototipos vacunales más seguros desde el punto de vista ambiental, por cuanto fueron susceptibles a readquirir los genes de CT solo en las limitadas condiciones de expresión de TCP.

ABSTRACT. The cholera toxin (CT) genes, main virulence factor of *Vibrio cholerae*, are carried on the lysogenic phage CTX ϕ which can transfer the toxic genes between toxigenic and nontoxigenic strains of bacteria that express toxin co-regulated pilus (TCP), the phage receptor. VGJ ϕ is another *V. cholerae* filamentous phage which is also able to transmit CT genes by forming a hybrid phage with CTX ϕ . Both VGJ ϕ and the hybrid phage use mannose-sensitive hemagglutinin (MSHA) as receptor which is expressed in a wide spectrum of natural growth conditions. The gene horizontal transmission may pose a problem when live attenuated cholera vaccine is used during massive vaccination campaigns in cholera endemic areas. To address this problem, we have constructed the attenuated *V. cholerae* O139 variants CRC3222 and CRC3241 which are impaired to express MSHA. In this study, we evaluated the susceptibility of these strains to be infected by CTX ϕ and VGJ ϕ using phage variants tagged with a kanamycin resistance cassette. It was found that both strains were resistant to *in vitro* VGJ ϕ infection. Nevertheless, in spite of expressing TCP under *in vitro* condition, they were infected by CTX ϕ only during passage through the intestine of suckling mice. These results suggest that CRC3222 and CRC3241 are environmentally safer vaccine prototypes as they were susceptible to reacquire the CT genes only in the restricted expressing conditions of TCP.

INTRODUCCIÓN

Cepas epidémicas de *Vibrio cholerae* O1, pertenecientes a los biotipos Clásico y El Tor, han sido responsables de siete pandemias de cólera desde 1817.¹ A fines de 1992, un nuevo serogrupo con potencialidad epidémica se identificó en la India y fue denominado serogrupo O139 o Bengal.² Según informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), 11 países asiáticos han reportado el aislamiento de *V. cholerae* O139, aunque debido a una vigilancia epidemiológica inadecuada, la verdadera extensión del problema no se conoce.³ Las continuas variaciones que han sufrido las cepas pertenecientes a este serogrupo emergente,⁴⁻⁸ conjuntamente con el hecho de que la enfermedad producida por ellas es indistinguible de la producida por *Vibrio* O1, sugieren que el

serogrupo Bengal pudiera expandirse a otras áreas del mundo donde el cólera es endémico.^{9,10}

Los brotes de *V. cholerae* O139 se caracterizan por una alta incidencia en la población adulta, en contraste con la enfermedad causada por vibriones de serogrupo O1, en la que la inmunidad adquirida por la exposición natural al agente bacteriano protege a los individuos adultos contra la enfermedad. Estos datos epidemiológicos, así como estudios en modelos animales y con sueros de pacientes, han demostrado la ausencia de protección cruzada entre los dos serogrupos epidémicos de *V. cholerae*.^{8,11,12}

La OMS ha recomendado el uso de vacunas orales contra cólera, en ciertas situaciones endémicas y epidémicas, como complemento a las estrategias existentes para el control del cólera (seguridad del agua, sanidad y

manejo de casos). Particularmente en el sudeste asiático, donde se estima que el 30 % de los casos de cólera son producidos por vibrios de serogrupo O139,¹³ se recomienda el uso de una vacuna oral solo si es capaz de conferir protección contra ambos serogrupos epidémicos, siempre que hayan evidencias de circulación de vibriones del nuevo serotipo en ese lugar.^{13,14}

La toxina del cólera (CT), codificada por los genes *ctxAB*, es el principal factor de virulencia de *V. cholerae*. Las cepas toxigénicas son lisógenos de un bacteriófago filamentoso llamado CTX ϕ que porta los genes *ctxAB*, así como otros genes necesarios para la morfogénesis del fago; agrupados todos en una región de aproximadamente 4,5 kb denominada *core*.¹⁵ Posee otra región (RS2), de 2,4 kb, en la que se localizan los genes *rstA*, *rstB* y *rstR*. Estos genes codifican las proteínas necesarias para la replicación, integración y regulación de CTX ϕ , respectivamente.¹⁶ Este fago puede transmitir los genes de CT entre cepas de *V. cholerae* que expresen su receptor, la fimbria tipo 4 denominada pelo co-regulado con la toxina (TCP).¹⁵ Diferentes tipos de fagos CTX ϕ han sido descritos basados en la diversidad de los genes *rstR*, represor de CTX ϕ . Estas diferencias en los genes *rstR* constituyen la base de la heteroinmunidad entre los distintos tipos de fagos CTX ϕ .¹⁷ En los aislamientos más recientes de cepas del serogrupo O139, se ha identificado la coexistencia en sus genomas de profagos CTX ϕ de tipo Calcuta y de tipo El Tor; este último característico de *V. cholerae* El Tor, principal biotipo epidémico de la actualidad.⁹

El fago VGJ ϕ también infecta *V. cholerae*, en este caso utilizando como receptor la fimbria tipo 4 hemaglutinina sensible a manosa (MSHA).¹⁸ VGJ ϕ es capaz de transmitir eficientemente los genes que codifican la toxina del cólera entre diferentes poblaciones bacterianas de *V. cholerae* que produzcan MSHA.¹⁹

La atenuación de la virulencia, en las cepas vacunales vivas de *V. cholerae*, se logra en muchos casos mediante la remoción del genoma de CTX ϕ del cromosoma bacteriano.^{20,21} Este hecho entraña el riesgo potencial de que las cepas atenuadas puedan revertir a la virulencia, luego de readquirir los genes tóxicos a través de la transferencia horizontal de CTX ϕ , al ser empleadas en zonas con epidemias de cólera y entrar en contacto con otras cepas toxigénicas, tanto en el intestino humano como en los nichos naturales de *V. cholerae*.

En el laboratorio de los autores se han construido diferentes variantes atoxigénicas derivadas de la cepa de *V. cholerae* O139 CRC266, denominadas CRC3222 y CRC3241, que poseen además mutaciones en los genes *hapA* y *mshA*, los cuales constituyen un factor de virulencia y el receptor de vibriofagos, respectivamente.²² Este trabajo tuvo como objetivo evaluar la susceptibilidad de las cepas CRC3222 y CRC3241 a la infección con los fagos CTX ϕ y VGJ ϕ , tanto en modelos *in vitro*, como *in vivo*, cuando fuera necesario, utilizando en el último caso el modelo del ratón lactante. También se analizó la capacidad de las cepas en estudio de expresar las fimbrias TCP y MSHA, receptores de ambos fagos, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas, fagos y medios de cultivo

Las cepas de *V. cholerae* y los bacteriófagos empleados en este trabajo, así como sus características genotípicas y fenotípicas más relevantes, se relacionan más adelante (Tabla 1). Los medios de cultivo utilizados fueron: Luria-Bertani (LB) y AKI.^{23,24} Cuando fue necesario, a los medios se les añadieron antibióticos a las concentraciones siguientes: kanamicina (Kan) a 100 μ g/mL y polimixina B (Pol) a 100 U/mL.

Expresión de MshA y TcpA

Las cepas de *V. cholerae* evaluadas fueron cultivadas en medio LB para el estudio de la expresión de MshA. Se tomó una colonia fresca de cada cepa y se inoculó en 50 mL de caldo de cultivo, cultivándose en zaranda durante toda la noche a 37 °C y 200 r/min. Para inducir la expresión de la proteína TcpA en las cepas de biotipo El Tor y O139, se empleó el medio AKI.²⁴ En este caso, las cepas fueron crecidas primero a 30 °C en condiciones estáticas durante 4 h y posteriormente, incubadas a 37 °C en zaranda a 200 r/min durante 16 h. La cepa de biotipo Clásico 569B fue cultivada en LB pH 6,5 a 30 °C. En cada caso, la biomasa bacteriana fue sedimentada por centrifugación y utilizada para preparar lisados celulares. Cantidades equivalentes de los lisados celulares fueron analizados por inmunotransferencia.

La técnica de inmunotransferencia se realizó según Ausubel y cols.²⁵ Primero, las muestras se sometieron a una electroforesis de proteína (SDS-PAGE), utilizando geles al 15 % de poliacrilamida. A continuación, se transfirieron las proteínas que contenía el gel a una membrana de nitrocelulosa utilizando un voltaje de 36 V durante 3 h. Luego la membrana fue bloqueada con PBS-leche 5 % durante 1 h, lavada tres veces con PBS-Tween 20 0,05 % e incubada durante 2 h con el anticuerpo monoclonal (AcM) 2F12F1, específico para MshA, y 10E10E1, para TcpA, con agitación a 37 °C.^{26,27} La membrana se lavó nuevamente tres veces con PBS-Tween 20 0,05 % y se puso en contacto con el conjugado anti-IgG-ratón-peroxidasa durante 1 h, luego se empleó el 4-cloronaftol como cromógeno para el revelado.

Ensayo de infección *in vitro* con VGJ-Kan ϕ y CTX-Kan ϕ

Para evaluar la susceptibilidad de las cepas en estudio a la infección con los fagos VGJ ϕ y CTX ϕ , la cepa de *V. cholerae* 569B se empleó en cada uno de los experimentos como cepa donadora del fago.¹⁹ En estos casos, se empleó una cepa infectada con versiones de los fagos cuyos genomas portan un gen que confiere resistencia a kanamicina (569B/VGJ-Kan ϕ y 569B/CTX-Kan ϕ). Para la infección, la cepa donadora se cultivó 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. Este filtrado se empleó como fuente de los fagos.

Para el experimento de infección *in vitro* con CTX ϕ , una alícuota de cada cepa en estudio se estrió en placas de agar-sangre y estas últimas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Una colonia se inoculó en 5 mL de caldo AKI y se cultivó en condiciones que estimulan la producción de la fimbria TcpA, como se explicó anteriormente. En los experimentos con VGJ ϕ se emplearon cultivos frescos en LB de cada cepa receptora.

En ambos experimentos, se usaron 200 μ L del sobrenadante libre de células (filtrado), o diluciones de este cuando se precisó titular la suspensión de fago, para infectar 25 μ L de un cultivo fresco de la cepa usada como receptora. La mezcla se incubó durante 20 min a temperatura ambiente y seguidamente 25 μ L de diluciones seriadas 10⁰, 10⁻¹ y 10⁻² de la suspensión celular se sembraron paralelamente en medio sólido de LB y LB suplementado con Kan (LB-Kan). Se dejaron crecer a 37 °C toda la noche, para luego determinar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) resistentes a Kan (Kan^R), correspondientes a los vibriones infectados. En el caso de los ensayos con CTX ϕ , una alícuota de cada

Tabla 1. Relación de cepas y fagos utilizados en este trabajo.

Cepas/Fagos	Características	Origen/Referencia
<i>Vibrio cholerae</i>		
569B	Tipo salvaje; serogrupo O1, biotipo Clásico, serotipo Inaba.	Aislada en Calcuta, India (1945).
CRC132	Mutante $\Delta CTX\Phi$ <i>hapA::celA</i> derivado de la cepa salvaje de <i>Vibrio cholerae</i> O139 CRC266.	22
CRC3222	Mutante $\Delta mshA$, derivado de la cepa de <i>V. cholerae</i> CRC132, móvil.	22
CRC3241	Mutante $\Delta mshA$, derivado de la cepa de <i>V. cholerae</i> CRC132, no móvil.	22
MV16	Mutante $\Delta(CTX\Phi, dif, TLC)$ derivado de la cepa salvaje de <i>V. cholerae</i> O1, El Tor N16961.	Donada por F.X. Barre (2005).
Fagos		
VGJ-Kan Φ	Kan ^R , fagemidio derivado de la forma replicativa de VGJ Φ que porta el Ori R6K con un marcador de resistencia a Kan insertado en su genoma.	18
CTX-Kan Φ	Kan ^R , fagemidio derivado de la forma replicativa de CTX Φ que porta el casete de Kan del pUC4K insertado en su genoma.	18

cepa receptora se centrifugó y, luego de reconstituir el sedimento en igual volumen de PBS, se utilizó para la detección de TspA mediante inmunotransferencia.

Ensayo de infección *in vivo* con CTX-Kan Φ

Se utilizó el modelo del ratón lactante para evaluar la capacidad de las cepas atenuadas de *V. cholerae* para infectarse *in vivo* con CTX-Kan Φ . Para ello, se empleó el procedimiento descrito por Richardson.²⁸ Los ratones Balb/c lactantes (de 3 a 5 d de nacidos) se separaron de sus madres 3 h antes del experimento y se asignaron aleatoriamente a los grupos experimentales (siete ratones por grupo). Se prepararon cultivos frescos en LB de las cepas a evaluar, se determinó la absorbancia a 600 nm y se ajustó la suspensión para garantizar un contenido aproximado de 10⁵ UFC en 50 μ L. A 5 mL de esta suspensión se le adicionaron 50 μ L de azul de Evan, preparado al 1 % en disolución salina estéril. Una alícuota de 50 μ L de la suspensión a evaluar se inoculó en cada ratón, por intubación gástrica con una cánula. Al concluir, se realizaron diluciones seriadas de cada 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. Los ratones inoculados se mantuvieron separados de las madres durante 20 h. De cada grupo experimental se seleccionaron aleatoriamente cinco ratones a los que se les inoculó por vía intragástrica 50 μ L de una suspensión del fago CTX-Kan Φ , previamente titulado. El resto de los ratones de cada grupo sirvieron de controles negativos de la infección, para conocer el nivel de mutación espontánea a Kan de cada cepa. Se esperó 3 h para determinar el contenido intestinal de vibriones. Para ello, los ratones se sacrificaron en atmósfera de cloroformo y sus intestinos delgados se extrajeron. Estos órganos se pesaron, lavaron tres veces con disolución salina y cada uno se homogenizó 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 de

diluciones seriadas en placas de LB suplementadas con Pol o con Pol y Kan. Este procedimiento tiene un límite de detección de 200 UFC por intestino. Se realizaron dos experimentos independientes empleando la misma suspensión de fago.

Técnicas de Biología Molecular

Para detectar la presencia de ADN correspondiente al fago CTX-Kan Φ , en vibriones recuperados del intestino de los ratones en los experimentos de infección *in vivo*, se empleó la técnica de *Southern blotting*. El ADN cromosomal de *V. cholerae* fue preparado según la metodología descrita por Ausubel y cols.²⁵ La técnica de hibridación *Southern blotting* se realizó esencialmente según Sambrook y col.²³ Las muestras de ADN, digeridas previamente con la enzima *Xba*I, fueron corridas en un gel de agarosa al 0,8 % y transferidas a una membrana de nylon del tipo Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech), siguiendo un procedimiento de transferencia alcalina que utiliza capilaridad descendente.²⁹ Para el marcaje y detección de las sondas se utilizó el sistema no radioactivo *DIG labelling and detection Kit* (Boehringer Mannheim). Como sondas se emplearon los fragmentos de ADN correspondientes al gen que confiere la resistencia a Kan (s-Kan) y un fragmento del genoma de CTX Φ correspondiente a la región denominada *core* (s-core).³⁰

Análisis estadísticos

Se empleó el paquete *GraphPad Prism*, versión 4 para Windows, y el nivel de significación se fijó en 0,05. El método de comparación empleado se indica en la sección de Resultados.

RESULTADOS

Susceptibilidad a la infección por el fago VGJ Φ

Con el empleo de técnicas de ingeniería genética, a la cepa *V. cholerae* O139 CRC266 se le eliminó de su cromosoma el genoma del fago CTX Φ , que contiene todos

los genes involucrados en la morfogénesis y regulación de este fago, con lo que se obtuvo el mutante atoxigénico CRC13.³¹ Tomando como base la experiencia anterior con cepas de serotipo O1,²⁰ la cepa CRC13 fue modificada mediante la inserción del gen heterólogo *celA* en el locus de *hapA* y se obtuvo la cepa CRC132.²² Posteriormente, se realizó el reemplazamiento alélico del gen salvaje *mshA* de esta cepa por una variante mutada y se obtuvieron los clones CRC3222 y CRC3241, los cuales constituyen variantes móvil y no móvil, respectivamente, descendientes de CRC132.²²

La incapacidad de los mutantes CRC3222 y CRC3241 para producir la subunidad mayoritaria de la fimbria MSHA fue comprobada por inmunotransferencia con el AcM 1F12F10 (Fig. 1). La cepa control 569B y la parental CRC132 expresan un producto inmunorreactivo con dicho AcM, lo que indica que estas cepas producen la subunidad estructural de la fimbria MSHA, mientras que los clones CRC3222 y CRC241 no producen esta proteína (Fig. 1).

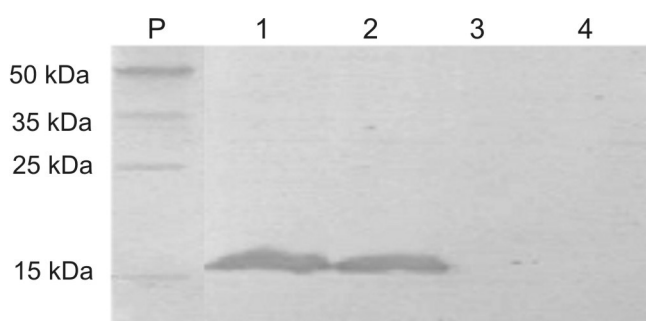


Fig. 1. Análisis por inmunotransferencia de la expresión de MshA. P, Patrón de peso molecular Broad Range Protein Molecular Weight Markers (Promega). 1) 569B, control positivo que expresa MshA. 2) CRC132. 3) CRC3222. 4) CRC3241. Se empleó el anticuerpo anti-MshA 2F12F1.

El genoma del fago VGJ ϕ tiene la propiedad de recombinar con el de CTX ϕ y formar un genoma híbrido que se ensambla en las partículas de VGJ ϕ y transmite los genes de la toxina colérica, restableciendo así la producción de toxina y la virulencia a cepas atenuadas de esta bacteria.¹⁹ De ahí que la susceptibilidad a la infección con VGJ ϕ sea una medida de la susceptibilidad al fago híbrido y constituya un aspecto importante de seguridad de las cepas atenuadas con fines vacunales. Se ha reportado anteriormente que algunos fagos filamentosos como CTX ϕ son capaces de infectar la célula hospedera, incluso en ausencia del receptor, utilizando co-receptores, aunque por un mecanismo mucho menos eficiente que el mecanismo normal de infección.^{32,33} Es por ello que resulta de interés determinar la susceptibilidad de las cepas en estudio de recuperar los genes que codifican a CT a través de VGJ ϕ , por algún mecanismo independiente de su receptor. Esta evaluación se realizó mediante un ensayo de infección con el fago VGJ-Kan ϕ , el cual porta un gen que confiere resistencia a Kan. Para ello, se expuso una dosis del orden de 10^6 vibriones a 10^8 partículas de fago VGJ-Kan ϕ . No hubo diferencias entre el número de UFC detectadas en las placas de LB y LB-Kan, correspondientes a la cepa control 569B y a CRC132 (Prueba U de Mann Whitney, $P > 0,05$), lo que indica que prácticamente todas las células expuestas fueron susceptibles a la infección con VGJ-Kan ϕ . En cambio, nunca se detectó infección de las cepas CRC3222

y CRC3241 (Tabla 2). Como se esperaba, los mutantes fueron completamente resistentes a la infección con este fago a una multiplicidad de infección de 10^2 .

Tabla 2. Susceptibilidad de las cepas de *Vibrio cholerae* a la infección con el fago VGJ-Kan ϕ .

Cepas de <i>V. cholerae</i>	Lg (Transductantes de VGJ-Kan ϕ) ¹
569B	6,36 \pm 0,31
CRC132	6,80 \pm 1,23
CRC3222	ND ²
CRC3241	ND ²

¹ Los valores corresponden a la media \pm SD de cuatro experimentos independientes, los cuales se realizaron con la misma preparación de fago. Al sembrar 10^7 células de las cepas receptoras en LB-Kan no creció ningún mutante espontáneo Kan^R.

² ND Ningún transductante Kan^R detectado. Límite de detección: 8 UFC.

Susceptibilidad a la infección por el fago CTX ϕ El Tor

La susceptibilidad a CTX ϕ El Tor se determinó por exposición de 10^7 vibriones cultivados en condiciones de expresión de TcpA entre 10^5 y 10^6 partículas de fago El Tor CTX-Kan ϕ . Se realizaron cuatro experimentos independientes en los que se estudiaron las cepas CRC3222 y CRC3241, así como los controles KHT52, MV16 y 569B. Estos controles se seleccionaron porque KHT52 es resistente a la infección con CTX ϕ , ya que no expresa el receptor del fago, y el resto, porque no presenta inmunidad a la infección por CTX-Kan ϕ El Tor:¹⁷ la cepa MV16 por carecer de ADN de CTX ϕ en su genoma, y 569B, por poseer variantes clásicas de dicho fago. Entre 10^4 y 10^5 vibriones de las cepas controles MV16 y 569B resultaron infectados (Fig. 2A). En cambio, nunca se detectó infección de las cepas KHT52, CRC3222 y CRC3241 (límite de detección: 9 vibriones infectados). Estos resultados indican que las cepas obtenidas se infectan *in vitro* significativamente menos por el fago CTX ϕ que los controles positivos empleados y por tanto exhiben menos riesgo de recuperar la virulencia. La resistencia de los mutantes estudiados a la infección por CTX ϕ es un resultado inesperado, considerando su falta de inmunidad a la infección con este fago.

Con el objetivo de conocer si existían dificultades con la expresión de TCP en CRC3222 y CRC3241 que impidieran la infección por CTX ϕ , se analizó la expresión de TcpA, subunidad principal de la fimbria TCP, por inmunotransferencia de lisados de los cultivos de las cepas que se evaluaron en el experimento anterior. Para ello se usó el AcM anti-TcpA 1E10E5.²⁷

Todas las cepas analizadas expresaron TcpA *in vitro*, excepto KHT52, el control negativo del experimento (Fig. 2B), por lo que la resistencia a la infección en estas condiciones no está relacionada con la imposibilidad de expresión de esta fimbria. Existen estudios que indican que CRC3222 y CRC3241 colonizan adecuadamente el intestino de ratones lactantes.²² Un requisito para que una cepa colonice es que exprese la fimbria TCP, por lo que CRC3222 y CRC3241, al colonizar el intestino de dicho modelo animal, deben ser susceptibles a la infección. Para hacer esta evaluación, un grupo de ratones neonatos se inoculó con MV16, CRC3222 y CRC3241, y luego de 24 h se les administró el fago CTX-Kan ϕ . La siembra de los extractos intestinales provenientes de estos ratones en LB y LB-Kan dio lugar a colonias de las cepas MV16,

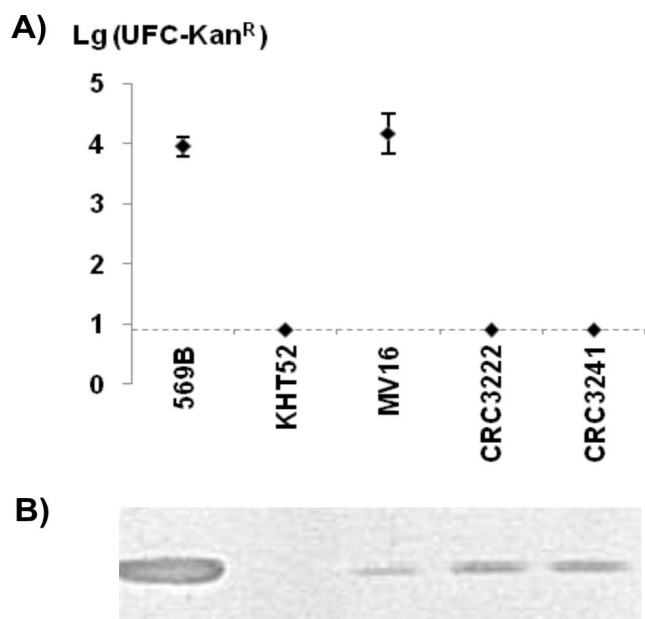


Fig. 2. Susceptibilidad a la infección in vitro con CTX-Kanφ (A) y expresión de TcpA, subunidad principal de la fimbria TCP (B) en las cepas de *Vibrio cholerae* 569B, KHT52, MV16, CRC3222 y CRC3241. Las barras indican las desviaciones estándares. La línea horizontal discontinua representa el límite de detección.

CRC3222 y CRC3241 infectadas con CTX-Kanφ. En los grupos no se detectó la aparición de mutantes espontáneos Kan^R. Los resultados indicaron que los clones CRC3222 y CRC3241 son capaces de infectarse con CTXφ durante la colonización del intestino del ratón neonato (Fig. 3). No se observaron diferencias significativas entre la cantidad de vibriones infectados y el total de vibriones recuperados del contenido intestinal murino de ninguna de las cepas en estudio, ni tampoco entre los niveles de infección de los dos mutantes *mshA* evaluados (Prueba U de Mann Whitney, $P > 0,05$). Teniendo en cuenta lo anterior, se concluyó que las cepas CRC3222 y CRC3241 solo deben ser vulnerables a la infección con CTXφ durante la colonización intestinal, condición en la que se expresa TCP, y que la diferencia de ambas cepas en cuanto a la motilidad, no afecta su susceptibilidad a la infección con este fago.

La enzima *Xba*I tiene un sitio único de corte en el genoma de CTXφ y en el de CTX-Kanφ. Si el genoma de este último se encuentra en forma de plasmidio en las cepas infectadas, se debe esperar una banda de aproximadamente 8 kb al hibridar con las sondas s-Kan y s-core, que reconocen las zonas correspondientes al casete de resistencia a Kan y a una región del genoma del fago CTXφ, respectivamente. Por otro lado, la integración en el cromosoma bacteriano debe producir un fragmento de mayor tamaño que incluye parte del genoma del fago y de las zonas adyacentes al sitio de integración.

Para comprobar que las colonias resistentes a kanamicina correspondían a transductantes de CTX-Kanφ y en ese caso, conocer la forma del genoma de dicho fago presente en estas, se purificó el ADN de varios clones infectados. El ADN se digirió con la enzima *Xba*I y se realizó un estudio por *Southern blotting* empleando las sondas s-Kan y s-core. En los cuatro clones de las dos cepas analizadas se pudo comprobar la presencia de una banda de 8,1 kb y de otra de más de 20 kb que hibridan con ambas sondas empleadas (Fig. 4). La banda menor correspondió a la forma replicativa de CTX-Kanφ, al

migrar a la misma altura que el control de ADN del fago empleado. Las bandas de mayor tamaño indicaron la integración de este fago en el genoma de las cepas de *V. cholerae*. De esta forma, se comprobó que el fago CTXφ además de integrarse en el genoma de las cepas CRC3222 y CRC3241 se mantiene replicándose extra-cromosomalmente.

La integración de CTXφ en el genoma de *V. cholerae* puede ocurrir tanto en el sitio *dif1* como *dif2*, ubicados en cada uno de los cromosomas de *V. cholerae*,³⁴ aunque CTXφ generalmente no se integra en el sitio *dif2*, se han encontrado cepas de biotipo Clásico y El Tor donde esto sí ocurre.^{35,36} La integración en estos dos lugares pudiera

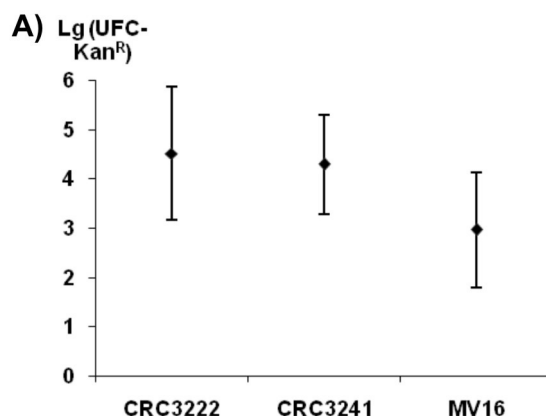


Fig. 3. Sensibilidad a la infección in vivo con el fago CTX-Kanφ de las cepas de *Vibrio cholerae* CRC3222, CRC3241 y MV16 (control). En el eje vertical se presenta el valor de la media del logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias resistentes a kanamicina, producidas por la infección de cada cepa con CTX-Kanφ. Las barras indican las desviaciones estándares.

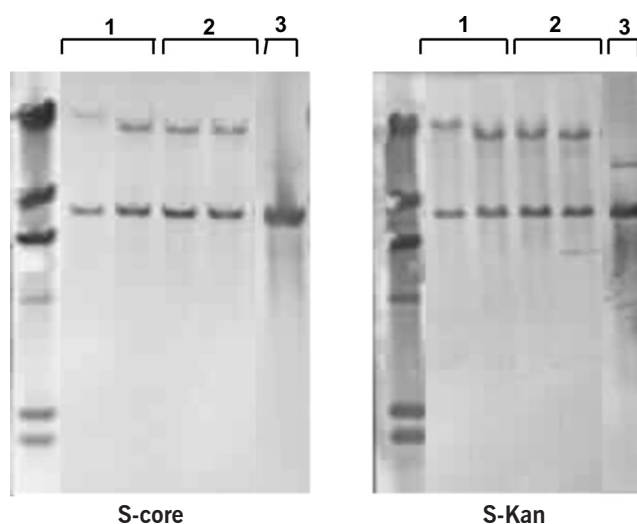


Fig. 4. Análisis por Southern blotting de cepas de *Vibrio cholerae* luego de la infección in vivo con CTX-Kanφ. Las muestras de ADN digeridas con la enzima *Xba*I corresponden a dos clones representativos de 1, CRC3222 y 2, CRC3241, así como a 3, la forma replicativa de CTX-Kanφ. Como patrón de peso molecular, en la primera carrilera se aplicó ADN de fago lambda digerido con la enzima *Hind*III; el tamaño de las bandas, en orden descendente, corresponde a 23; 9,4; 6,5; 4,3; 2,3 y 2 kb. Las sondas utilizadas se indican debajo de cada panel.

explicar la existencia de bandas altas de diferente tamaño en la cepa CRC3222. Estudios posteriores en los que se secuencien las regiones de unión entre el genoma del fago y la bacteria serán necesarios para comprobar esta hipótesis.

DISCUSIÓN

El empleo de vacunas vivas atenuadas implica la liberación al ambiente de un gran número de organismos vivos. Este hecho incrementa la probabilidad de contacto entre las cepas vacunales y las cepas toxigénicas presentes tanto en el medio ambiente como en el tracto gastrointestinal de los individuos vacunados. Es por ello que la transferencia genética horizontal adquiere particular relevancia en el desarrollo de esta estrategia de vacunas, considerando la gran variedad de mecanismos de movilidad genética horizontal que operan en *V. cholerae*, entre los que se pueden destacar la isla patogénica VPI,³⁷ que codifica TCP, y los fagos filamentosos CTX ϕ y VGJ ϕ .^{15,18}

Han sido propuestos varios métodos para reducir la posibilidad de reversión a la virulencia por parte de estos candidatos vacunales. Sin embargo, la eliminación de los genes que codifican el receptor TCP no puede ser considerada entre ellos, por cuanto este pelo es indispensable para el proceso de colonización intestinal y por consiguiente, para la inducción de una respuesta inmune protectora y duradera al emplearse como vacuna.³⁸ Entre las propuestas para evitar la readquisición de CTX ϕ se destacan la eliminación de los sitios de inserción de este fago en el genoma bacteriano,³⁹ para prevenir su integración, y la inclusión del gen represor *rstR* El Tor, para proveer a las cepas vacunales de inmunidad contra CTX ϕ de este biotipo, que es el predominante en la actual pandemia de cólera.⁴⁰

En este trabajo se estudiaron variantes de *V. cholerae* que portan un alelo mutado del gen *mshA*, receptor del fago VGJ ϕ . Este fago es capaz de transmitir los genes que codifican la CT por un mecanismo que incluye la formación de un fago híbrido con CTX ϕ . Este fago híbrido (HybP ϕ) mantiene la capacidad de infectar mediante MSHA y es capaz de integrar su genoma sitio-específicamente en el cromosoma de *V. cholerae*. De esta forma garantizan la permanencia de los genes tóxicos en la célula hospedera, permitiendo la conversión de una cepa no toxigénica de *V. cholerae* en virulenta.¹⁹

La expresión de TCP por una célula es un prerrequisito para su susceptibilidad a CTX ϕ , y el nivel de expresión de esta fimbria, un factor importante que afecta la frecuencia de infección.¹⁵ Los resultados demuestran que las cepas CRC3222 y CRC3241 solo se infectaron con CTX ϕ durante la colonización del intestino del ratón y fueron incapaces de hacerlo en condiciones de cultivo de laboratorio, que en cambio, permitieron la expresión del receptor TCP. Estos resultados indican que en estas cepas, la infección con CTX ϕ es un proceso que requiere determinados niveles de expresión de TCP que solo se alcanzan en condiciones *in vivo*. La obtención de títulos de infección *in vivo* muy superiores a los encontrados durante los experimentos *in vitro* corrobora los resultados obtenidos por otros autores.^{15,41} Se han obtenido diferentes variantes atenuadas portadoras del gen *rstR* El Tor, que confiere inmunidad contra la infección por fagos procedentes de vibriones del mismo biotipo. Estudios de susceptibilidad a la infección con CTX ϕ por parte de estas cepas han demostrado que esa estrategia reduce significativamente la posibilidad de infección con CTX ϕ , al comparar esos resultados con los de variantes isogénicas que no portan el gen *rstR*, aunque las cepas

atenuadas continúan siendo vulnerables a la infección con el fago durante la colonización intestinal.^{41,42}

MSHA es un receptor más disponible que TCP en *V. cholerae*, considerando que su expresión no está restringida a condiciones específicas de crecimiento, sino que es constitutiva, a diferencia de TCP, cuya expresión depende de condiciones muy particulares del intestino y de una regulación precisa en cada biotipo y hasta en cada cepa en particular.¹⁹ Por tanto, un fago híbrido como HybP ϕ podría tener ventajas sobre CTX ϕ para transmitir los genes de CT, bajo ciertas condiciones como las encontradas en el ambiente.

La fimbria MSHA es además el receptor de otros fagos específicos de *V. cholerae* como VEJ ϕ , que también es capaz de transmitir los genes de CT por un mecanismo similar al de VGJ ϕ .⁴³ Existen resultados que avalan que HybP ϕ (portando el genoma de CTX ϕ El Tor) es capaz de sortear la inmunidad de fagos y transmitir los genes tóxicos hacia una gran variedad de cepas, independientemente de su serotipo o biotipo y de que tengan en su genoma copias del gen *rstR* portado por el fago híbrido.¹⁹ Estos resultados indican que una cepa vacunal atenuada podría potencialmente readquirir los genes de CTX ϕ en el ambiente por infección por un fago como HybP ϕ lo cual hace a muchas cepas vacunales diseñadas para ser resistentes a la infección con CTX ϕ el Tor, vulnerables a retornar a la virulencia. Por otra parte, HybP ϕ es capaz de integrarse en un sitio del cromosoma de *V. cholerae* diferente al sitio *attB* empleado por VGJ ϕ y CTX ϕ ,¹⁹ por lo que modificaciones genéticas previamente concebidas para evitar la reversión estable a la virulencia de candidatos vacunales, serían inefectivas para prevenir la integración de un fago como HybP ϕ .

En este estudio se demostró que las cepas CRC3222 y CRC3241 no expresan la subunidad proteica *mshA* y resultaron resistentes a la infección con VGJ ϕ , lo cual disminuye al mínimo la probabilidad de readquisición de CTX ϕ por mediación de un fago híbrido como HybP ϕ que emplee como receptor a MSHA.

El problema de la readquisición de los genes de CT, luego de la liberación al ambiente de candidatos vacunales durante campañas masivas de vacunación en regiones de cólera endémico, continúa siendo un problema a resolver. Por esta razón, obtener candidatos vacunales vivos provistos de ciertas barreras que impidan o limiten la adquisición y diseminación de fagos capaces de transmitir los genes de la toxina del cólera es un objetivo de cualquier investigación en este campo. En este sentido, el desarrollo de candidatos vacunales que no expresen MSHA en su superficie parece una estrategia adecuada, aun más si se tiene en cuenta que esta fimbria no desempeña un papel esencial en la colonización ni en la generación de una respuesta inmune protectora en humanos.

CONCLUSIONES

Las cepas CRC3222 y CRC3241 constituyen mutantes atenuados de *V. cholerae* O139 con mejores características de seguridad por cuanto solo se infectaron con CTX ϕ durante la colonización del intestino murino y fueron completamente resistentes a la infección con VGJ ϕ , por lo que no pueden readquirir los genes que codifican la toxina del cólera mediante la infección con fagos del mismo tipo que HybP ϕ .

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dhiman B. History of Cholera. En: Dhiman B, Greenough III BW, editors. Cholera. New York, NY: Plenum Publishing Corporation; 1992:p.1-36.
2. Ramamurthy T, Garg S, Sharma R, Bhattacharya SK, Nair GB, Shimada T *et al*. Emergence of novel strain of *Vibrio*

- cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. Lancet. 1993;341(8846):703-704.
3. World Health Organization. Oral cholera vaccines use in complex emergencies: What next?: World Health Organization, Cairo, Egypt WHO/CDS/CPE/ZFK/2005.5 2005.
4. Waldor MK, Tschape H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. J Bacteriol. 1996;178(14):4157-4165.
5. Faruque SM, Siddique AK, Saha MN, Asadulghani, Rahman MM, Zaman K *et al.* Molecular characterization of a new ribotype of *Vibrio cholerae* O139 Bengal associated with an outbreak of cholera in Bangladesh. J Clin Microbiol. 1999; 37(5):1313-1318.
6. Basu A, Mukhopadhyay AK, Sharma C, Jyot J, Gupta N, Ghosh A *et al.* Heterogeneity in the organization of the CTX genetic element in strains 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. 1998;24(3):175-183.
7. Khetawat G, Bhadra RK, Nandi S, Das J. Resurgent *Vibrio cholerae* O139: rearrangement of cholera toxin genetic elements and amplification of *rrn* operon. Infect Immun. 1999;67(1):148-154.
8. Qadri F, Svennerholm AM, Shamsuzzaman S, Bhuiyan TR, Harris JB, Ghosh AN *et al.* Reduction in capsular content and enhanced bacterial susceptibility to serum killing of *Vibrio cholerae* O139 associated with the 2002 cholera epidemic in Bangladesh. Infect Immun. 2005;73(10):6577-6583.
9. Faruque SM, Sack DA, Sack RB, Colwell RR, Takeda Y, Nair GB. Emergence and evolution of *Vibrio cholerae* O139. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(3):1304-1309.
10. Sack DA, Sack RB, Nair GB, Siddique AK. Cholera. Lancet. 2004;363(9404):223-233.
11. Albert MJ, Alam K, Ansaruzzaman M, Qadri F, Sack RB. Lack of cross-protection against diarrhea due to *Vibrio cholerae* O139 (Bengal strain) after oral immunization of rabbits with *V. cholerae* O1 vaccine strain CVD103-HgR. J Infect Dis. 1994;169(1):230-231.
12. Cholera Working Group. International Centre for Diarrhoeal Diseases Research, Bangladesh. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. Lancet. 1993;342(8868):387-390.
13. World Health Organization. Weekly epidemiological record. Cholera 2005; Geneva; 2006.
14. World Health Organization. Cholera vaccines: a new public health tool? World Health Organization, Geneva, Switzerland WHO/CDS/CPE/ZFK/2002.
15. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 1996;272(5270):1910-1914.
16. Waldor MK, Rubin EJ, Pearson GD, Kimsey H, Mekalanos JJ. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTXphi are encoded by region RS2. Mol Microbiol. 1997;24(5):917-926.
17. Kimsey HH, Waldor MK. CTXphi immunity: application in the development of cholera vaccines. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(12):7035-7039.
18. Campos J, Martínez E, Suzarte E, Rodríguez BL, 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. 2003;185(19):5685-5696.
19. Campos J, Martínez E, Marrero K, Silva Y, Rodríguez BL, 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. 2003;185(24):7231-7240.
20. Benítez JA, 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 El Tor strain as a cholera vaccine candidate. Infect Immun. 1999;67(2):539-545.
21. Ryan ET, Calderwood SB. Cholera vaccines. Clin Infect Dis. 2000;31(2):561-565.
22. Ledón T, Campos J, Suzarte E, Marrero K, Rodríguez BL, Fando R. Modificaciones genéticas en mutantes atoxigénicos de *Vibrio cholerae* O139 que mejoran sus propiedades como candidatos vacunales Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2007;38(3):237-43
23. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989.
24. Iwanaga M, Yamamoto K. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. J Clin Microbiol. 1985;22(3):405-408.
25. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. Short protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995.
26. Falero G, Rodríguez BL, Valmaseda T, Pérez ME, Pérez JL, Fando R *et al.* Production and characterization of a monoclonal antibody against mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae*. Hybridoma. 1998;17(1):63-67.
27. Falero G, Rodríguez BL, Rodríguez I, Campos J, Ledón T, Valle E *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies to El Tor toxin co-regulated pilus of *Vibrio cholerae*. Hybrid Hybridomics. 2003;22(5):315-320.
28. Richardson SH. In *Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspectives. Washington: ASM press, 1994.
29. Chomczynski P. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. Anal Biochem. 1992;201(1):134-139.
30. Ledón T, Campos J, Suzarte E, Rodríguez BL, Marrero K, Fando R. El Tor and Calcutta CTXphi precursors coexisting with intact CTXphi in *Vibrio cholerae* O139 isolates. Res Microb. 2008;159:81-87.
31. Ledón T, Campos J, Suzarte E, Marrero K, Rodríguez BL, Moreno A *et al.* Obtención de mutantes atoxigénicos para inmunizar contra *Vibrio cholerae* O139. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2005;36(3):156-162
32. Bradley DE, Whelan J. *Escherichia coli* *tolQ* mutants are resistant to filamentous bacteriophages that absorb to the tips, not the shafts, of conjugative pili. J Gen Microbiol. 1989;135(7):1857-1863.
33. Heilpern AJ, Waldor MK. CTXphi infection of *Vibrio cholerae* requires the *tolQRA* gene products. J Bacteriol. 2000;182(6):1739-1747.
34. Huber KE, Waldor MK. Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD. Nature. 2002;417(6889):656-659.
35. Davis BM, Moyer KE, Boyd EF, Waldor MK. CTX prophages in classical biotype *Vibrio cholerae*: functional phage genes but dysfunctional phage genomes. J Bacteriol. 2000;182(24):6992-6998.
36. Nandi S, Maiti D, Saha A, Bhadra RK. Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: role of the CTXphi array and its position in the genome. Microbiology. 2003;149(Pt 1):89-97.
37. Karaolis DK, Johnson JA, Bailey CC, Boedeker EC, Kaper JB, Reeves PR. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(6):3134-3139.
38. Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, Mekalanos JJ, Taylor RK, Levine MM. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. J Exp Med. 1988;168(4):1487-1492.
39. Pearson GD, Woods A, Chiang SL, Mekalanos JJ. CTX genetic element encodes a site-specific recombination system and an intestinal colonization factor. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1993;90(8):3750-3754.
40. Liang W, Wang S, Yu F, Zhang L, Qi G, Liu Y *et al.* Construction and evaluation of a safe, live, oral *Vibrio cholerae* vaccine candidate, IEM108. Infect Immun. 2003;71(10):5498-5504.
41. Liu G, Yan M, Liang W, Qi G, Liu Y, Gao S *et al.* Resistance of the cholera vaccine candidate IEM108 against CTXPhi infection. Vaccine. 2006;24(11):1749-1755.
42. Fando R. Obtención, caracterización y evaluación de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* para fines vacunales (tesis doctoral). Facultad de Biología. Universidad de la Habana, 2004
43. Izquierdo Y, Campos J, Ledón T, Suzarte E, Marrero K, Rodríguez BL, Fando R. Aislamiento y caracterización de un nuevo fago filamentoso de *Vibrio cholerae* capaz de transducir los genes de la toxina colérica. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2007;38(3):228-36.