



Revista CENIC. Ciencias Biológicas

ISSN: 0253-5688

editorial.cenic@cnic.edu.cu

Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Cuba

Ledón, Talena; Ferrán, Beatriz; Vichi, Joivier; Suzarte, Edith; Oliva, Reinaldo; Fando, Rafael

Evaluación en modelos animales de cepas vivas atenuadas de vibrio cholerae O139

Revista CENIC. Ciencias Biológicas, vol. 41, 2010, pp. 1-12

Centro Nacional de Investigaciones Científicas

Ciudad de La Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181220509014>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

**EVALUACIÓN EN MODELOS ANIMALES DE CEPAS VIVAS ATENUADAS DE
VIBRIO CHOLERAE O139.**

EVALUATION IN ANIMAL MODELS OF LIVE ATTENUATED STRAINS OF *VIBRIO CHOLERAE* O139.

Talena Ledón^{1*}, Beatriz Ferrán¹, Joivier Vichi², Edith Suzarte¹, Reinaldo Oliva³, Rafael Fando¹

¹ Departamento de Biología Molecular, División Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

² Centro Nacional de Salud Animal, Cuba

³ Instituto Finlay de Sueros y Vacunas.

Ave. 25 y 158 Cubanacán, Playa. Ciudad Habana, Cuba, AP 6412
2085236 ext 248

*Email: talena.ledon@cnic.edu.cu

EVALUACIÓN EN MODELOS ANIMALES DE CEPAS VIVAS ATENUADAS DE *VIBRIO CHOLERAES* O139

RESUMEN. CRC3222 y CRC3241 son mutantes *mshA* derivados de una cepa salvaje de *Vibrio cholerae* O139, estos fueron obtenidos mediante una serie de modificaciones genéticas que incluyó la delección de los genes del fago CTXfi. Dichos clones además están marcados con el gen heterólogo *ceLA*, el cual se insertó en el locus de *hapA*. Estudios previos han demostrado que estas cepas poseen características adecuadas para ser empleadas como vacunas vivas contra cólera; la virulencia y capacidad colonizadora de CRC3222 y CRC3241 fueron estudiadas en el modelo de ratón lactante. En este trabajo se evalúa su desempeño en el modelo de conejo adulto, el cual se utilizó para estudiar el potencial inmunogénico de estas cepas. Luego de la inoculación intraduodenal con una simple dosis de 10^9 UFC de CRC3222, CRC3241 y sus cepas parentales, se determinó tanto el título de anticuerpos IgG anti-LPS O139, como el de anticuerpos con actividad vibriocida presentes en el suero de los conejos inmunizados. Estos estudios indicaron que ambas cepas generaron una buena respuesta inmune, ya que se detectó un incremento de más de cuatro veces en los títulos de anticuerpos bactericidas de todos los conejos vacunados, con relación al suero pre-inmune. No se detectaron diferencias significativas en la respuesta de los mutantes *mshA*, con relación a sus cepas parentales, independientemente de su fenotipo de motilidad. Este experimento demostró que CRC3222 y CRC3241 son potenciales candidatos vacunales contra la infección con *Vibrio cholerae* O139.

PALABRAS CLAVE: *Vibrio cholerae* O139; vacuna; *mshA*; *hapA*.

ABSTRACT. CRC3222 and CRC3241 are *mshA* mutants derived from a *Vibrio cholerae* O139 strain by a series of genetic modifications, including deletion of CTXphi genome. They are also tagged with heterologous *ceLA* gene inserted within *hapA* locus. Previous studies have demonstrated these strains show suitable traits for a live cholera vaccine. The virulence and colonization ability of CRC3222 and CRC3241 strains were previously evaluated using suckling mouse model. The present work evaluates their performance in adult rabbit model which was used to study the immunity potential of those strains. After a single dose intraduodenal vaccination with 10^9 CFU of CRC3222, CRC3241 and their parental strains, both anti-O139 LPS IgG and vibriocidal antibodies present in the immunized-rabbit sera were determined. Immunization studies in the rabbit model indicated that CRC3222 and CRC3241 generate a good immune response as they elicited a fourfold increase in vibriocidal antibody titers in all vaccinated rabbits. No significant difference in the immunological response was detected between the two *mshA* mutants and their parental strain in this model; irrespective of their motility phenotype. This experiment showed that CRC3222 and CRC3241 are potential vaccine candidates against infection by *Vibrio cholerae* O139.

KEYWORDS: *Vibrio cholerae* O139; vaccine; *mshA*; *hapA*.

INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad entérica capaz de provocar epidemias que pueden transformarse en pandemias en cortos períodos de tiempo.¹ Esta patología es ocasionada por las variantes toxigénicas de *V. cholerae*, serogrupos O1 y O139, capaces de colonizar el intestino y producir la toxina del cólera (CT), principal factor de virulencia del microorganismo.² Los genes que codifican CT forman parte del genoma de un fago filamentoso denominado CTXφ, que es capaz de transmitir la toxina colérica entre cepas que expresen la fimbria TCP (del inglés *toxin co-regulated pilus*), receptor del fago.³

Estudios epidemiológicos en áreas endémicas indican que la infección con *V. cholerae* confiere inmunidad protectora de larga duración contra una segunda infección.⁴ La respuesta antibacteriana se considera el principal mecanismo de protección contra este microorganismo y está dirigida contra diferentes antígenos de la superficie celular, donde el LPS es el más importante.⁵

La mayor diferencia entre *V. cholerae* O1 y O139 reside en los componentes de la superficie celular. *V. cholerae* O139 posee un antígeno somático del lipopolisácarido (LPS) diferente al de O1 y además expresa un polisacárido capsular (CPS) que comparte epítopos con dicho LPS.⁶

La inmunidad preexistente contra *V. cholerae* O1 no ofrece protección contra vibrios pertenecientes al serogrupo O139, por lo que la Organización Mundial de la Salud, ante la continua reemergencia de este último, ha destacado la necesidad de disponer de una vacuna efectiva contra *V. cholerae* O139. Esta es una meta no alcanzada hasta el momento.⁷ El hecho de que este serogrupo se encuentre actualmente confinado al sudeste de Asia no elimina el peligro que representa pues tiene potencialidad para extenderse hacia otros continentes y comenzar lo que sería la octava pandemia de cólera.⁸

La inmunogenicidad de cualquier candidato vacunal debe ser evaluada en modelos animales antes de estudiar estos candidatos en voluntarios humanos. En cólera, el modelo más usado para evaluar la capacidad inmunogénica de formulaciones vacunales ha sido la inoculación oral o intraduodenal en conejos adultos. Este modelo en la variante intraduodenal ofrece la ventaja de estimular el sistema inmune mucosal sin la necesidad de neutralizar el ácido gástrico del estómago y además es de fácil ejecución.⁹

Las cepas CRC3222 y CRC3241 fueron desarrolladas en el Departamento de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, con el objetivo de ser empleadas como ingrediente farmacéutico activo (IFA) de una vacuna contra *V. cholerae* O139.¹⁰ Estas cepas son variantes móvil y no móvil, respectivamente, derivadas de la cepa toxigénica de *Vibrio cholerae* O139 CRC266 y se obtuvieron mediante una serie de modificaciones genéticas que incluyeron la eliminación del genoma del fago CTXφ y del gen *mshA*, así como la inserción del gen *celA* de *Clostridium thermocellum* en el locus del gen *hapA*, que codifica para la hemaglutinina proteasa (HA/P).^{11,12}

La caracterización fenotípica en cuanto a morfología, velocidad de crecimiento y capacidad de colonización del intestino en el ratón neonato indicó que las manipulaciones genéticas realizadas no provocan cambios en los mutantes CRC3222 y CRC3241 con respecto al parental atoxigénico y a la cepa salvaje.¹⁰ Para culminar la evaluación de estos mutantes se hace necesario estudiar su potencial inmunogénico en modelos animales, antes de proseguir su desarrollo como producto farmacéutico y su evaluación en voluntarios humanos.

Teniendo en cuenta dichos precedentes, este trabajo tiene como objetivo evaluar la inmunogenicidad de las cepas vivas atenuadas de *V. cholerae* O139 CRC3222 y CRC3241, en conejos inoculados de forma intraduodenal.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPAS BACTERIANAS

Para el estudio se emplearon diferentes cepas (Tabla 1) y se partió de conservaciones almacenadas a -70 °C en LB-glicerol al 20 %, las cuales fueron estriadas por agotamiento en placas de LB, para obtener colonias aisladas y luego cultivadas en placas de agar sangre. La identidad de las mismas se comprobó por siembra en TCBS y ensayo de actividad endoglucanasa.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ENDOGLUCANASA

Las placas de LB se cubrieron con una fina capa de agar-carboximetilcelulosa (0,3 % de agarosa y 0,3 % de carboximetilcelulosa en tampón fosfato-citrato: K₂HPO₄, 65 mM; ácido cítrico, 13 mM) y se incubaron durante 3 h a 70 °C. Transcurrido este tiempo las placas se tiñeron con rojo congo (Sigma) al 1 % durante 5 min. Para destear, se lavaron varias veces con NaCl 1M. Las colonias rodeadas de un halo transparente que contrasta con el fondo rojo se consideraron celA⁺.

INMUNIZACIÓN

Los animales empleados fueron suministrados por el Centro de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con sus correspondientes certificados de higiene, sanidad y calidad genética. A partir de un precultivo de LB crecido durante toda la noche, proveniente de colonias aisladas de placas de agar sangre, se inoculó un enlermeyer de 100 mL de LB y se creció a 37 °C, a 220 rpm, hasta una DO₆₀₀ de 1. Las células se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min y se resuspendieron en PBS después de haber retirado el sobrenadante.¹³

En el estudio se emplearon 20 conejos Nueva Zelanda blancos (1.5 - 1.8 Kg de peso). Los animales se mantuvieron en jaulas individuales a la temperatura y humedad relativa del ambiente y se les retiró el alimento 12 h antes de la inoculación. Los conejos fueron anestesiados con tiopental en dosis de 25 mg/Kg de peso y luego de una previa desinfección de la zona a utilizar, se realizó una laparotomía en la línea media del abdomen. El duodeno fue localizado y expuesto, posteriormente se inoculó 1 mL de la suspensión bacteriana en el espacio lumbar. Un grupo de al menos 3 conejos fue inoculado con cada una de las cepas. El alimento se les incorporó a los animales dos horas después de la inoculación.⁹

ENSAYO VIBRIOCIDA

Las muestras de suero de conejo fueron colectadas los días 0, 7, 14, 21, 28 y para el ensayo se realizaron diluciones dobles seriadas, comenzando por 1:10, en solución salina fisiológica. Los títulos vibriocidas de los sueros colectados se determinaron mediante la técnica de ensayo vibriocida colorimétrico optimizada para el serogrupo O139.¹⁴ *V. cholerae* MO45 se empleó como cepa diana, a una concentración inicial de 1 x 10⁶ UFC/mL. Como fuente de complemento se utilizó complemento humano purificado, a una concentración final de 25 %.¹⁵ Luego de 60 min de vibriolisis a 37 °C, se adicionaron 150 µL de medio indicador (caldo LB suplementado con glucosa al 1% y bromocresol púrpura 0.003%, preparado en solución alcohólica). La placa se incubó nuevamente entre 3 y 4 h a igual temperatura y se procedió a la lectura por observación visual. El título se definió como el inverso de la mayor dilución del suero en la que se apreció inhibición del crecimiento bacteriano, reflejado por la invariabilidad del color en el medio cultivo.¹⁶

DETERMINACIÓN DE IgG ANTI-LPS O139

La técnica de ELISA para determinar la presencia de IgG anti-LPS O139 se realizó esencialmente como ha descrito Benítez *et al.*¹⁷ Las placas de microtitulación de 96 pozos Maxisorp (Nunc, Dinamarca) fueron recubiertas con 50 µL de LPS de la cepa *V. cholerae* O139 MO45, a una concentración de 2.5 µg·mL⁻¹ en PBS, el cual fue purificado según Jonson *et al.*¹⁸ Los sueros fueron diluidos 1:100 en PBS-Tween 20 al

0.05 % y se realizaron diluciones triples seriadas hasta 1:218 700. Para la detección inmunológica se empleó el conjugado anti-IgG de conejo-HRP (Promega, USA), diluido 1:4000 en PBS-Tween 20 al 0.05 % con leche descremada al 1 %, y la reacción de revelado se desarrolló empleando o-fenildiamina (Sigma Chemical Co., Alemania). Los valores de DO de la dilución de 1:100 correspondientes a los sueros preinmunes se promediaron. La media calculada más tres veces la desviación estándar fue considerada como el valor de corte del experimento y el título se definió como el inverso de la mayor dilución con una DO₄₉₂ superior al del valor de corte.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para todos los análisis estadísticos realizados, se utilizó el programa GraphPad Prism versión 5.00. En todas las muestras se comprobó la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Bartlett. Para evaluar la significación estadística de las diferencias entre los grupos de datos obtenidos en los ensayos de ELISA y vibriocidas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskall Wallis y las comparaciones múltiples se realizaron por la prueba de Dunn's. Un valor de P< 0,05 fue considerado como criterio para diferencias significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ACTIVIDAD VIBRIOCIDA DE SUEROS DE CONEJOS INMUNIZADOS CON CEPAS DE *V. CHOLERAЕ* O139.

En el Departamento de Biología Molecular del CNIC se construyeron una serie de mutantes de *V. cholerae* O139 con fines vacunales (Tabla 1) que en estudios de virulencia y colonización en el modelo del ratón lactante mostraron índices adecuados que avalaban la continuación de sus estudios de inmunogenicidad.¹⁰

La realización de estudios de inmunogenicidad de cepas atenuadas de *V. cholerae* en animales es un paso necesario antes de la evaluación de un candidato vacunal en voluntarios. Dado que la mayoría de los animales se resisten de forma natural a una infección intestinal por este patógeno, diferentes tratamientos han tenido que emplearse para lograr la adherencia y una colonización efectiva. Entre los modelos más empleados en este sentido destaca el modelo intraduodenal de conejo.⁹

El ensayo bactericida o vibriocida, para el caso de *V. cholerae*, mide la funcionalidad de anticuerpos séricos capaces de lisar células en presencia de complemento exógeno. Este análisis serológico ha sido de gran utilidad pues constituye el único marcador actualmente reconocido de inmunidad protectora ante la infección con *V. cholerae* y de esta forma, ha permitido evaluar la efectividad de vacunas durante ensayos clínicos y preclínicos.¹⁹ A diferencia de las vacunas de células muertas, las vacunas de bacterias vivas atenuadas pueden inducir una alta respuesta de anticuerpos vibriocidas en una simple dosis.^{20,21} Es reconocido además, que la mayor fracción de anticuerpos vibriocidas está dirigida contra el LPS de la bacteria, por lo que para caracterizar la respuesta inmune de estos candidatos vacunales se determinó el título de anticuerpos con actividad bactericida contra una cepa homóloga, así como la presencia de anticuerpos tipo IgG anti-LPS total, en el modelo de inoculación intraduodenal de conejo.²² Se incluyeron en el estudio además de los mutantes atoxigénicos *hapA :: celA*, *mshA*⁻, CRC3222 y CRC3241, la cepa salvaje CRC266 y sus derivados atoxigénicos de primera y segunda generación CRC13 (*ctxΦ*⁻) y CRC132 (*ctxΦ*⁻, *hapA :: celA*) (Tabla1).

En el caso de la respuesta vibriocida (Tabla 2) se encontró seroconversión en todos los conejos inoculados, pues los títulos determinados fueron superiores a cuatro veces el título de los sueros preinmunes, cuyo valor asignado fue 10. El procesamiento estadístico utilizado no fue capaz de encontrar diferencias significativas entre la respuesta de las cepas, en los mismos tiempos, en comparación con sus respectivos parentales, lo que indica que la atenuación no influyó en la respuesta inmune inducida

por estos mutantes. No se pudo identificar un pico en la respuesta vibriocida durante el transcurso del tiempo ya que a partir de la primera medición (7 días) los títulos vibriocidas en cada cepa son estadísticamente similares.

RESPUESTA IGG ANTI LPS EN SUEROS DE CONEJOS INMUNIZADOS CON CEPAS DE *V. CHOLERAES* O139

A la respuesta bactericida tributan anticuerpos del isotipo IgG e IgM dirigidos principalmente contra el LPS.²³ Con el objetivo de conocer si se induce una respuesta correspondiente al isotipo IgG en este modelo, se realizó un ensayo de ELISA y se determinó la presencia de anticuerpos IgG anti-LPS O139.

La respuesta de anticuerpos séricos IgG contra el LPS inducida por las diferentes cepas de *V. cholerae* O139 evaluadas, mostró altos títulos desde los siete días, pero no es hasta los 14 días en que alcanza una meseta con valores máximos que se mantienen hasta el día 28, última determinación de nuestro ensayo (Tabla 3). No se encontraron diferencias significativas entre las respuestas de cada una de las cepas cuando se compararon los mismos tiempos, reafirmándose el resultado del ensayo vibriocida en el que cepas parentales y mutantes fueron capaces de inducir una respuesta inmunológica semejante.

Estos resultados indican que las delecciones e inserciones genéticas que se realizaron para la construcción de las cepas de última generación (*V. cholerae* O139 CRC3222 y CRC3241) no afectaron su capacidad de producir una respuesta inmune semejante a la de la cepa salvaje, en el modelo intraduodenal de conejo. Entre las modificaciones genéticas realizadas está la eliminación del profago CTXΦ que contiene los genes que codifican para la toxina colérica, la cual contribuye a la respuesta inmunológica protectora pero no como su componente principal, la respuesta bactericida.²⁴ También se inactivó el gen *hapA*, que codifica para la hemaglutinina proteasa (HA/P), la cual algunos autores plantean que facilita la penetración de la barrera de mucus,²⁵ por lo que contribuye a la virulencia de *V. cholerae*. Esta teoría no ha sido confirmada en modelos animales por cuanto en estudios con cepas mutantes *hapA*⁻ empleando ratones lactantes y conejos infantiles, no se han encontrado evidencias de que este gen sea un factor esencial en la virulencia.^{26,27} Sin embargo, HA/P ha sido asociada a la reactogenicidad en humanos de vacunas vivas atenuadas de *V. cholerae*,²⁸ lo cual se ha visto sustentado también por evidencias en estudios *in vitro* de que es capaz de perturbar la barrera paracelular de las células epiteliales intestinales en cultivo.²⁹ Adicionalmente en análisis histopatológicos de intestino de conejo, en el modelo RITARD, se ha asociado la infiltración de células inflamatorias con una respuesta dosis dependiente de HA/P.³⁰ Finalmente, el *pilus* MSHA, afectado en la última generación de mutantes, juega un papel importante en la persistencia de la bacteria en el ambiente acuático y en la transferencia horizontal de genes entre especies bacterianas, mediada por fagos,^{31,32} pero no se ha asociado a cambios en el desempeño de *V. cholerae* en modelos animales.

Las cepas CRC266 (salvaje toxigénica) y CRC13 (atoxigénica) mostraron diferencias significativas entre su respuesta IgG anti LPS a los 7d y el resto de los tiempos evaluados, no siendo así en el caso de las cepas mutantes CRC132, CRC3222 y CRC3241. Aun cuando estas cepas difieren en la expresión del gen *hapA* no se puede establecer una relación directa entre la mutación en dicho gen y la dilución de la respuesta IgG anti-LPS detectada, ya que otras mutaciones pudieran haber ocurrido durante el proceso de manipulación genética. Otros estudios deberán realizarse para precisar las causas de este hecho.

RELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA VIBRIOCIDA CONTRA *V. CHOLERAES* O139 Y LA RESPUESTA SISTÉMICA DE IGG ANTI-LPS O139.

Al analizar si existía correspondencia entre la respuesta vibriocida y la respuesta IgG sistémica anti-LPS en el modelo de conejo, se encontró una relación directa entre

ellas. Se apreció que en la cepa salvaje y en los mutantes *mshA* a medida que aumenta la respuesta IgG anti-LPS aumenta la respuesta vibriocida (Fig. 1). Sin embargo, el coeficiente de correlación de Spearman solo mostró valores significativos para las cepas mutantes. Esto presupone que el desfasaje temporal encontrado al cabo de los siete días, en la respuesta del isotipo IgG, entre la cepa CRC266 y las cepas mutantes *mshA*, podría ser la causa de la falta de correlación entre los títulos de IgG y los títulos vibriocidas inducidos por la cepa parental. De esta forma, la cepa salvaje y el mutante atoxigénico al cabo de los 7 días muestran una respuesta inmune más temprana, donde quizás el isotipo IgM tenga un aporte mayor a la actividad vibriocida. Estudios previos en humanos han mostrado una mejor correlación de la respuesta vibriocida con los títulos IgM que con los IgG,³³ este no parece ser el caso de los mutantes *mshA*, aunque desafortunadamente no pudo determinarse la respuesta del isotipo IgM por la no-disponibilidad del conjugado necesario.

Es significativo el hecho de que estas cepas vivas atenuadas, mutantes *mshA*, de *V.cholerae* O139 induzcan títulos altos de IgG anti LPS sérica similares a los de sus cepas parentales. Este isotipo de inmunoglobulina, junto al IgM, son responsables de la respuesta vibriocida *in vitro*.³⁴ Aunque los anticuerpos IgG son capaces de penetrar en el lumen del intestino, también son más susceptibles a la acción de proteasas que el isotipo de IgA secretora, inmunoglobulina mayoritaria en mucosas, y por tanto menos eficientes. Sin embargo, algunos autores proponen que estos anticuerpos podrían actuar a nivel del intestino, considerando la capacidad de los fragmentos Fab de aglutinar y agregar las bacterias, impidiendo la colonización o al menos reduciendo la severidad de la enfermedad.³⁵

Por otro lado, estudios en zonas endémicas han demostrado la relación entre el incremento del GMT de anticuerpos vibriocidas y la disminución de la incidencia de cólera.³⁶ Otros autores refieren que los anticuerpos séricos con actividad vibriocida son simples marcadores y otros anticuerpos, probablemente de origen local, proveen la protección.^{37,38} Al ser cólera una enfermedad entérica se ha supuesto que el isotipo IgA secretoria (sIgA) específica contra *V. cholerae*, que es secretado en el lumen del intestino, garantiza la respuesta protectora y sería la meta en una inmunización.³⁵ Sin embargo, la capacidad vibriocida *in vitro* de antisueros contra cólera sigue siendo el marcador estándar de la protección contra la enfermedad.^{23,39}

Los resultados de este trabajo indican que las modificaciones genéticas realizadas a las cepas CRC3222 y CRC3241 no afectaron su potencial inmunogénico en el modelo intraduodenal de conejo, en comparación con las cepas que les dieron origen, por cuanto fueron capaces de inducir la producción de anticuerpos séricos de clase IgG anti LPS O139, así como de anticuerpos con actividad bactericida *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Petri WA Jr, Miller M, Binder HJ, Levine MM, Dillingham R, Guerrant RL. Enteric infections, diarrhea, and their impact on function and development. *J Clin Invest.* 2008; 118(4):1277-1290.
2. Sur D, Deen JL, Manna B, Niyogi SK, Deb AK, Kanungo S et al. The burden of cholera in the slums of Kolkata, India: data from a prospective, community based study. *Arch Dis Child.* 2005; 90(11):1175-1181.
3. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 1996; 272(5270):1910-1914.
4. López AL, Clemens JD, Deen J, Jodar L. Cholera vaccines for the developing world. *Hum Vaccin.* 2008; 4(2):165-169.
5. Saha D, LaRocque RC, Khan AI, Harris JB, Begum YA, Akramuzzaman SM et al. Incomplete correlation of serum vibriocidal antibody titer with protection from *Vibrio cholerae* infection in urban Bangladesh. *J Infect Dis.* 2004; 189(12):2318-2322.

6. Boutonnier A, Dassy B, Dumenil R, Guenole A, Ratsitorahina M, Migliani R et al. A simple and convenient microtiter plate assay for the detection of bactericidal antibodies to *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio cholerae* O139. J Microbiol Methods. 2003; 55(3):745-753.
7. WHO. World Health Organization. Cholera 2005. Wkly Epidemiol Rec. 2006, 81(31):297-307
8. Agrawal G, Jalgaonkar SV, Jagtap PM, Kamlakar UP, Deogade NG. Emergence and re-emergence of *Vibrio cholerae* O139: an epidemiological study during 1993-2002 at Nagpur, Central India. Indian J Med Sci. 2003; 57(4):155-157.
9. García IL, Oliva HR, Cedré MB, Valmaseda PT, García SH, Talavera CA et al. Intraduodenal inoculation of adult rabbits for evaluating the immunogenicity of genetically attenuated *Vibrio cholerae* strains. Lab Anim Sci. 1998; 48(5):538-541.
10. Ferrán B. Modificaciones genéticas y caracterización preliminar de cepas atoxigénicas de *V. cholerae* O139 con fines vacunales. Tesis de Diploma. 2007.
11. 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 CNIC Ciencias Biológicas. 2005; 36(3).
12. 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 CNIC Ciencias Biológicas. 2007; 38(3):237-243.
13. Ledón T, Valle E, Valmaseda T, Cedré B, Campos J, Rodríguez BL et al. Construction and characterisation of O139 cholera vaccine candidates. Vaccine. 2003; 21(11-12):1282-1291.
14. Vichi J, Suzarte E, Ledón T, Fando R. Optimización del ensayo vibriocida colorimétrico para *V. cholerae* O139. Revista CNIC Ciencias Biológicas. 2010.
15. Shevach E. Complement. In: John Wiley and Sons, editor. *Current Protocols in Immunology*. New York: 2003: 13.5.1-13.5.17.
16. Cedré MB, García Sánchez HM, García Imia LG, Talavera CA. [Standardization and evaluation of the modified vibriocidal assay]. Rev Cubana Med Trop. 1999; 51(3):156-159.
17. 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.
18. Jonson G, Osek J, Svennerholm AM, Holmgren J. Immune mechanisms and protective antigens of *Vibrio cholerae* serogroup O139 as a basis for vaccine development. Infect Immun. 1996; 64(9):3778-3785.
19. Qadri F, Wenneras C, Albert MJ, Hossain J, Mannoor K, Begum YA et al. Comparison of immune responses in patients infected with *Vibrio cholerae* O139 and O1. Infect Immun. 1997; 65(9):3571-3576.
20. Coster TS, Killing K.P., Waldor MK, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of live attenuated *Vibrio cholerae* O139 vaccine prototype. Lancet. 1995; 345:949-952.
21. Kenner JR, Coster TS, Taylor DN, Trofa AF, Barrera-Oro M, Hyman T et al. Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. J Infect Dis. 1995; 172(4):1126-1129.
22. Año G, Valmaseda T, García H, Cedré B, Pino Y. Antigenicidad e Inmunogenicidad de una cepa de *Vibrio cholerae* inactivada. Biotecnología Aplicada. 2003; 20:9-13.
23. Clements ML, Levine MM, Young CR, Black RE, Lim YL, Robins-Browne RM et al. Magnitude, kinetics, and duration of vibriocidal antibody responses in North Americans after ingestion of *Vibrio cholerae*. J Infect Dis. 1982; 145(4):465-473.
24. Kaper JB. *Vibrio cholerae* vaccines. Rev Infect Dis. 1989; 11 Suppl 3:S568-S573.

25. Silva AJ, Leitch GJ, Camilli A, Benitez JA. Contribution of hemagglutinin/protease and motility to the pathogenesis of El Tor biotype cholera. *Infect Immun.* 2006; 74(4):2072-2079.
26. Hase CC, Finkelstein RA. Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. *J Bacteriol.* 1991; 173(11):3311-3317.
27. Finkelstein RA, Boesman-Finkelstein M, Chang Y, Hase CC. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect Immun.* 1992; 60(2):472-478.
28. García L, Jidy MD, García H, Rodríguez BL, Fernández R, Año G et al. The vaccine candidate *Vibrio cholerae* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. *Infect Immun.* 2005; 73(5):3018-3024.
29. Mel SF, Fullner KJ, Wimer-Mackin S, Lencer WI, Mekalanos JJ. Association of protease activity in *Vibrio cholerae* vaccine strains with decreases in transcellular epithelial resistance of polarized T84 intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 2000; 68(11):6487-6492.
30. Ghosh A, Saha DR, Hoque KM, Asakuna M, Yamasaki S, Koley H et al. Enterotoxicity of mature 45-kilodalton and processed 35-kilodalton forms of hemagglutinin protease purified from a cholera toxin gene-negative *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Infect Immun.* 2006; 74(5):2937-2946.
31. Reidl J, Klose KE. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol Rev.* 2002; 26(2):125-139.
32. 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.
33. Losonsky GA, Yunyongying J, Lim V, Reymann M, Lim YL, Wasserman SS et al. Factors influencing secondary vibriocidal immune responses: relevance for understanding immunity to cholera. *Infect Immun.* 1996; 64(1):10-15.
34. Croft NM, Hodges M. IgM: mucosal response in acute diarrhoeal disease of infants. *Scand J Gastroenterol.* 2005; 40(8):965-971.
35. Provenzano D, Kovac P, Wade WF. The ABCs (Antibody, B cells, and Carbohydrate epitopes) of cholera immunity: considerations for an improved vaccine. *Microbiol Immunol.* 2006; 50(12):899-927.
36. Losonsky GA, Lim Y, Motamedi P, Comstock LE, Johnson JA, Morris JG, Jr. et al. Vibriocidal antibody responses in North American volunteers exposed to wild-type or vaccine *Vibrio cholerae* O139: specificity and relevance to immunity. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997; 4(3):264-269.
37. Wasserman SS, Losonsky GA, Noriega F, Tacket CO, Castaneda E, Levine MM. Kinetics of the vibriocidal antibody response to live oral cholera vaccines. *Vaccine.* 1994; 12(11):1000-1003.
38. Sánchez JL, Taylor DN, Trofa AF, Kuschner RA, DeFraites RF, Craig SC et al. Safety and immunogenicity of the oral, whole cell/recombinant B subunit cholera vaccine in North American volunteers. *J Infect Dis.* 1993; 167(6):1446-1449.
39. 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.

Tabla 1. Relación de las cepas utilizadas en este estudio.

Cepas <i>V. cholerae</i> O139	Características	Origen/Referencia
CRC266	Tipo salvaje	Aislada en Calcuta, India (2000).
CRC13	Mutante $\Delta CTX\Phi$ derivado de la cepa CRC266.	11
CRC132	Mutante $hapA::celA$, derivado de la cepa atoxigénica CRC13.	12
CRC3222	Mutante $\Delta mshA$, derivado de la cepa CRC132, mótil.	12
CRC3241	Mutante $\Delta mshA$, derivado de la cepa CRC132 no mótil.	12

Tabla 2. Respuesta de anticuerpos vibriocidas en conejos inoculados intraduodenalmente con una simple dosis de 10^9 UFC/mL de cepas de *V. cholerae* O139.

Cepas	N	GMT (rango)					p^d
		7 d	14 d	21 d	28 d		
CRC266	4	640 (80-5120)	2559 (1280-5120)	2153 (1280-5120)	1811 (1280-2560)	0,550	2
CRC13	4	760 (160-1280)	1076 (640-1280)	760 (160-2560)	1076 (320-2560)	0,930	9
CRC132	3	807 (640-1280)	1279 (640-2560)	807 (640-1280)	807 (320-2560)	0,747	7
CRC322	4	190 (80-640)	760 (640-1280)	380 (160-640)	640 (320-1280)	0,082	8
CRC324	3	453 (160-1280)	2032 (1280-5120)	1811 (640-5120)	2032 (1280-5120)	0,546	3
	p^e	0,3972	0,1069	0,1078	0,2279		

N: número de conejos incoculados. ^d Comparación del logaritmo en base 10 del Título de la Media Geométrica (GMT, del inglés geometric mean titer) entre los diferentes tiempos post-inoculación. ^e Comparación del logaritmo en base 10 del GMT entre las diferentes cepas en un mismo día (Kruskal-Wallis).

Tabla 3. Respuesta IgG anti LPS en conejos inoculados intraduodenalmente con una simple dosis de 10^9 UFC de cepas de *V.-cholerae* O139

Cepas	N	GMT (rango)				p^d
		7 d	14 d	21 d	28 d	
CRC26	4	3155	21183	27861	24322	0,030
		(2700-8100)	(8100-24300)	(8100-218700)	(8100-72900)	4*
CRC13	4	1559	12217	16865 [†]	18492	0,021
		(300-2700)	(2700-24300)	(8100-24300)	(8100-24300)	4*
CRC13	3	8109	16826	29174	35075	0,494
		(900-24300)	(8100-72900)	(8100-218700)	(8100-218700)	8
CRC32	4	2697	6151	8090	8090	0,073
		(900-8100)	(2700-8100)	(2700-24300)	(2700-72900)	
CRC32	3	2051 [†]	9727	42072 [†]	35075	
		(300-8100)	(900-72900)	(8100-218700)	(8100-218700)	0,095
		p_e	0,3411	0,0594	0,1524	0,1373

N: número de conejos inoculados.[†] dato perdido.*diferencias significativas (Kruskall Wallis, $p < 0,05$). ^dComparación del logaritmo en base 10 del GMT entre los diferentes tiempos post-inoculación. ^e Comparación del logaritmo en base 10 del GMT entre las diferentes cepas en un mismo día.

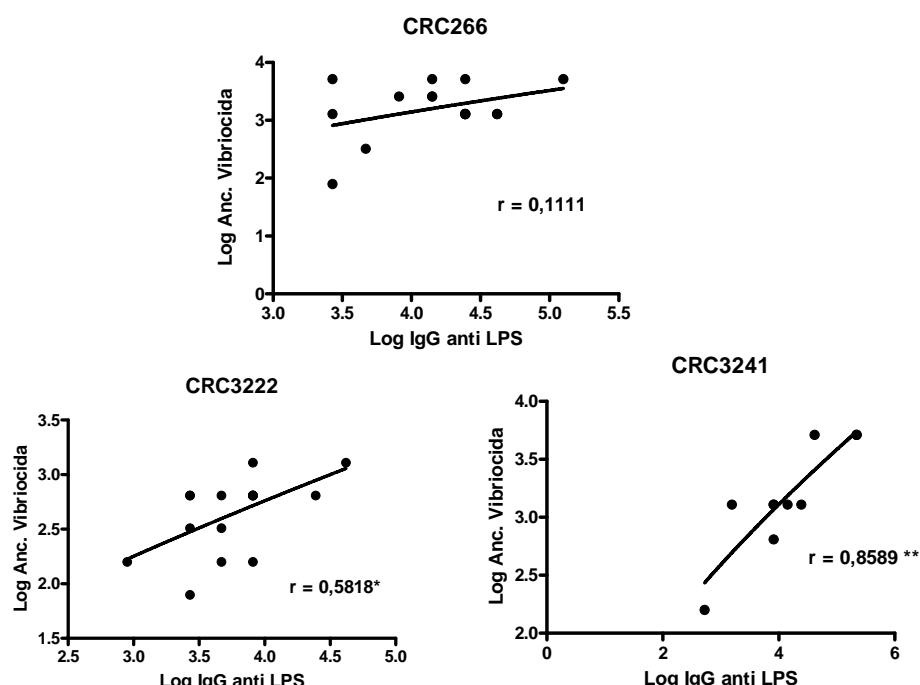


Fig. 1. Correspondencia de la respuesta vibriocida contra *V. cholerae* O139 y la respuesta sistémica de IgG anti-LPS O139.

Determinación del índice de correlación de Spearman. CRC266 (cepa salvaje),
CRC3222 y CRC3241 (cepas atenuadas con fines vacunales). (*) Correlación
significativa para $P = 0,05$; (**) Correlación significativa para $P = 0,01$.