

CENTRO DE INVESTIGACIÓN. PRODUCCIÓN DE VACUNAS Y SUEROS, INSTITUTO "FINLAY"

## Estudio del patrón de excreción y la capacidad protectora en conejos inmunizados de forma oral con cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor

MC. Hilda María García Sánchez,<sup>1</sup> Lic. Luis García Imia,<sup>2</sup> Téc. Reynaldo Oliva Hernández,<sup>3</sup> Lic. José Luis Pérez Quiñoy,<sup>4</sup> Lic. Bárbara Cedré Marrero,<sup>5</sup> Téc. Roxana Domínguez Iriarte<sup>6</sup> y DC. Jorge Benítez Robles<sup>7</sup>

### RESUMEN

Con el fin de estudiar los patrones de excreción, colonización y la capacidad protectora de cepas vivas atenuadas de *Vibrio cholerae* O1 El Tor, se inmunizaron conejos Nueva Zelanda con estas cepas y su correspondiente parental, con 2 dosis por el modelo de inoculación oral en conejos adultos. Fueron retados 2 semanas después de la segunda dosis por el modelo de intestino ligado, con cepas altamente virulentas de *V. cholerae* O1 serotipos Ogawa e Inaba y serogrupo O139. Se comprobó que las cepas manipuladas de forma genética no afectan los patrones de excreción, cuando se compara con su parental. Se observó en el reto una disminución en los niveles de colonización de las cepas virulentas de ambos serotipos; tanto en los conejos inmunizados con las cepas atenuadas como con la parental en comparación con animales controles inmunizados con la cepa *Escherichia coli* K-12, lo que indica que hubo cierto grado de protección. En el caso de los animales retados con la cepa O139 se demostró que la protección es específica para cada serogrupo pues en este caso no se observó disminución de la colonización.

**Descriptor DeCS:** VACUNA CONTRA EL COLERA/inmunología; VACUNAS ATENUADAS/inmunología; VIBRIO CHOLERAEE/aislamiento purificación; CONEJOS/inmunología; HECES/microbiología; ESQUEMA DE INMUNIZACION.

El cólera constituye una preocupación emergente para la salud pública en muchas partes del mundo. La aparición de la epidemia de cólera en América Latina y el surgimiento en Asia de una enfermedad causada por *Vibrio cholerae* O139, la primera cepa serogrupo No-O1 causante de cólera que se ha identificado, indica que esta enfermedad se mantendrá como un problema en los próximos años.<sup>1</sup> Ante la imposibilidad de garantizar una atención médica adecuada y condiciones de vida higiénicas para esta gran masa de población, la obtención de una vacuna segura, eficaz y barata contra

el cólera, continúa siendo una línea priorizada de la Organización Mundial de la Salud y de muchos laboratorios e investigadores en el mundo.<sup>2</sup>

En la actualidad se trabaja intensamente en 2 variantes orales de vacunas contra esta enfermedad. Una de ellas, con resultados más alentadores, se basa en la administración oral de cepas vivas de *V. cholerae* que mediante manipulación genética se les elimina su toxicidad aunque conservan la capacidad de reproducirse y colonizar el intestino. Partiendo de la premisa de que la propia enfermedad confiere una sólida

<sup>1</sup> Master en Ciencias. Bacteriología-Micología. Instituto "Finlay".

<sup>2</sup> Licenciado en Bioquímica. Investigador Auxiliar. Instituto "Finlay".

<sup>3</sup> Técnico en Medicina Veterinaria. Instituto "Finlay".

<sup>4</sup> Licenciado en Biología. Instituto "Finlay".

<sup>5</sup> Licenciada en Microbiología. Investigadora Agregada. Instituto "Finlay".

<sup>6</sup> Técnico en Química Industrial. Instituto "Finlay".

<sup>7</sup> Doctor en Ciencias Biológicas. Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

protección y que la capacidad de colonizar el intestino es indispensable para alcanzar una correcta presentación antigénica en la mucosa intestinal, se explican los mejores niveles de protección de esta variante, en estudio en humanos, cuando se compara con la otra variante de células inactivadas por métodos físicos o químicos.<sup>3-5</sup>

Hasta el momento no existe un modelo animal ideal para evaluar la colonización de *V. cholerae*, pero el modelo de inoculación oral en conejos adultos puede ser usado para el estudio de inmunogenicidad de cepas candidatas a vacunas vivas orales de *V. cholerae*. En este modelo es necesario neutralizar la acidez gástrica antes de la inoculación para lograr una buena colonización.<sup>6</sup>

En nuestro laboratorio se han obtenido cepas vivas atenuadas de *V. cholerae* O1 desprovistas de la región genómica que codifica para la síntesis de los principales factores de virulencia de este germen. La construcción de estas cepas se realizó a partir de una cepa epidémica de aislamiento clínico en Perú.<sup>7</sup>

El objetivo de este trabajo fue estudiar los patrones de excreción, colonización y la capacidad protectora de cepas vivas atenuadas de *V. cholerae* O1 administradas de forma oral en 2 dosis a conejos retados posteriormente con cepas virulentas.

## MÉTODOS

**Cepas.** Las cepas utilizadas fueron C7258 *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa y C6706 El Tor Inaba, aisladas de pacientes en Perú en 1993, y SG 251 *V. cholerae* No-O1 serogrupo O139 aislada de un paciente en la India; donadas por Ph.D *Richard Finkelstein* de la Universidad de Missouri, EE.UU.; 81 y 87 *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa (ctxA<sup>-</sup>, ctxB<sup>-</sup>, zot, ace<sup>-</sup>, orfU<sup>-</sup>, cep<sup>-</sup>) mutadas por técnicas de ingeniería genética en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, a partir de la cepa C7258. Como control se utilizó la cepa de *Escherichia coli* K-12 no toxigénica.

**Animales.** Se inocularon conejos blancos Nueva Zelanda entre 9 y 11 semanas, y entre 2,2 y 2,5 kg de peso al inicio del experimento.

**Condiciones de cultivo.** Las cepas se cultivaron en erlenmeyers de 250 mL con 50 mL de medio caldo triptona soya (TSB), inoculados con 3 mL de un cultivo de 18 h. Se agitó a 200 ciclos/min entre 5 y 6 h a 37 °C. Se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) y la concentración de células se ajustó a 10<sup>9</sup> UFC/mL.<sup>8</sup>

**Esquema de inmunización.** Se retiró el alimento a los animales 12 h antes de la inoculación y luego fueron

sedados con pentobarbital intravenoso. La acidez gástrica se neutralizó con cimetidina y bicarbonato de sodio 50 mg/kg de peso y 5 %, respectivamente. Treinta minutos antes de la inoculación se administraron 15 mL de cimetidina y bicarbonato de sodio, y otros 15 mL de este último 15 min antes de la inoculación. Todo esto fue realizado por intubación gástrica. Los inóculos contenían 1 mL de cultivo ajustado a 10<sup>9</sup> UFC/mL en 14 mL de hidrolizado ácido de caseína, extracto de levadura (CAYE). Luego de la inoculación los animales fueron mantenidos de forma individual y se les restringió el alimento, no así el agua durante las siguientes 12 h.<sup>9</sup> Se inmunizó con 2 dosis con iguales concentraciones, espaciadas 28 d.

## ASLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN

**Muestras.** Las muestras de heces e hisopado rectal se recogieron a partir de las 6 h posteriores a cada inoculación a intervalos de 3 h durante 1 d, en medio agua peptona alcalina y se incubaron entre 6 y 8 h a 37 °C. Los cultivos crecidos se sembraron por agotamiento en medio selectivo tiosulfato citrato sales biliares (TCBS) durante 18 a 24 h a 37 °C. Las colonias características de *V. cholerae* se seleccionaron para pruebas bioquímicas preliminares.<sup>10,11</sup>

**Pruebas bioquímicas de selección.** Las colonias características del género *Vibrio* fueron sembradas por punción y estría en agar hierro y 2 azúcares de Kligler y agar hierro lisina. A los tubos que presentaron las características de *Vibrio* se les realizaron las pruebas de la oxidasa, cuerda y serología.<sup>10</sup>

**Modelo intestino ligado.** Dos semanas después de la segunda dosis los animales inoculados con 2 dosis de las cepas C7258, 81, 87 y K-12, se aclimataron desde 1 semana antes de la operación en el local donde se realizó ésta y a una temperatura entre 22 y 25 °C. Los animales no se alimentaron durante las 24 h previas al experimento aunque pudieron beber libremente. Se utilizó como anestésico pentobarbital a razón de 25 mg/kg de peso. Se realizaron ligaduras de alrededor de 5 cm de longitud alternadas con ligaduras de 2 cm; la inoculación se realizó en los segmentos mayores con 0,5 mL de una suspensión de 10<sup>7</sup> células/mL de las cepas C7258, C6706 y SG251. Luego de la sutura los animales fueron mantenidos durante 18 h en jaulas individuales sin alimentar pero con agua *ad libitum*. Transcurrido ese tiempo los animales se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital y se efectuó la necropsia. En caso de haber ocurrido acumulación de fluido en los segmentos inoculados se procedió a la determinación de su volumen y UFC. El fluido acumulado (FA) se expresa en mL/cm.<sup>12-14</sup>

Los fragmentos de intestino se lavaron con PBS, se pesaron y se homogeneizaron en un Ultraturax 15 seg a 13 500 r.p.m., posteriormente se calculó el número de UFC/mL por gramo de intestino.<sup>15</sup>

## RESULTADOS

En la tabla 1 se presentan los resultados de la identificación de *V. cholerae* O1, aislada de muestras de heces e hisopado rectal de animales inoculados con 2 dosis de las cepas C7258, 81 y 87 durante las 24 h posteriores a cada una de las inmunizaciones.

**TABLA 1.** Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa en muestras de heces e hisopado rectal de conejos inmunizados oralmente con 2 dosis de  $10^9$  UFC

Cepa	Muestra / Tiempo(h)	1ra. dosis	2da.dosis
C7258	Heces	6	+
		12	+
		18	+
	Hisopado rectal	6	+
		12	+
		18	+
81	Heces	6	+
		12	+
		18	+
	Hisopado rectal	6	+
		12	+
		18	+
87	Heces	6	+
		12	+
		18	+
	Hisopado rectal	6	+
		12	+
		18	+

Los animales excretan las cepas inoculadas entre las 6 y 18 h posteriores a la primera inoculación y ya a las 24 h no se logra aislar el microorganismo en las muestras de heces. Después de la segunda dosis, sólo se aísla el microorganismo inoculado en las muestras correspondientes a las 6 h posteriores a la inoculación. Este comportamiento es el mismo si el animal está inoculado con la cepa mutada o con su parental virulento.

Los resultados del estudio de colonización intestinal en el modelo de intestino ligado con cepas altamente virulentas se muestran en la tabla 2. Los niveles de concentración celular de las cepas de reto de ambos serotipos, en intestino lavado y homogenizado,

así como el volumen de fluido acumulado (FA), son inferiores en los animales inoculados, tanto con células atenuadas por manipulaciones genéticas, como en su parentales correspondientes, al compararlos con animales controles no inoculados, eso no ocurre con la cepa de reto del serogrupo O139.

**TABLA 2.** Cuantificación de *Vibrio cholerae* en muestras de fluido acumulado e intestino lavado de conejos inmunizados oralmente con 2 dosis de *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa

Cepa de inmunización*	Cepa de reto	FA (mL/cm)** (Log UFC/ML)	FA (Log UFC/ML)	Intestino*** (Log UFC/g)
C7258*****	C7258	0,03	NC****	NC
	C6706	0,92	$2,4 \times 10^8$	NC
	SG251	1,39	$4,34 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$
81	C7258	0,45	NC	NC
	C6706	0,4	$7,2 \times 10^9$	NC
	SG251	1,7	$6,8 \times 10^9$	$3,3 \times 10^8$
K-12	C7258	1,27	$2,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
	C6706	1,28	$4,4 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$
	SG251	1,16	$7,5 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$

\* Animales inoculados con 2 dosis de  $10^8$  UFC de *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa o *E. coli* K-12, los días 0 y 28.

\*\* Fluido acumulado por centímetro de intestino ligado en el modelo Ileal Loop realizado 14 d después de la segunda dosis. Todos los animales están retados con la cepa C7258.

\*\*\* Cuantificación de la cepa de reto en fragmentos de intestino lavados con PBS y homogeneizados en un ultraturax 15 s a 13 500 r.p.m.

\*\*\*\* No crecimiento a la dilución de trabajo ( $10^{-4}$ ).

\*\*\*\*\* El conejo inmunizado con la cepa parental C7258 indujo una significativa disminución del número celular de las cepas virulentas de reto y líquido acumulado en los segmentos intestinales.

## DISCUSIÓN

En los últimos años se han obtenido en el laboratorio y probado en humanos varias cepas de *V. cholerae* O1 modificadas genéticamente de manera que han perdido parte o la casi totalidad de sus factores de virulencia. Existe un compromiso entre la capacidad de colonizar el intestino por parte de estas cepas, su reatogenicidad y su inmunogenicidad. Es evidente que la capacidad de adherirse y proliferar en la mucosa condiciona las características inmunogénicas del preparado.<sup>5,16,17</sup>

En el presente estudio se reveló que el patrón de excreción del microorganismo inoculado es el mismo para ambos tipos de cepas, luego de las 2 dosis, lo que evidencia que las manipulaciones genéticas realizadas para la atenuación de la cepa, no afectaron su patrón de excreción (tabla 1). No obstante, posterior a la segunda dosis se observa una excreción del microorganismo sólo

en las primeras 6 h lo que refleja que la inmunidad de mucosa adquirida luego de la primera dosis afecta la colonización intestinal y la proliferación del segundo inóculo.

En estudios de inmunogenicidad en humanos de una cepa viva atenuada de *V. cholerae* O1 (CVD 103 HgR) se han encontrado que, ya sea por una dosis inicial o por inmunidad natural adquirida por contactos previos con el microorganismo, los niveles de colonización intestinal que se alcanzan después de una segunda dosis son más bien bajos.<sup>16-18</sup> Este hecho, corroborado en el presente estudio, apoya la posibilidad de alcanzar protección luego de la administración de una dosis única de cepas vivas atenuadas de *V. cholerae*.

Tanto los animales inoculados con las cepas atenuadas como los que recibieron la cepa salvaje adquirieron niveles apreciables de protección ante el reto realizado por el modelo de intestino ligado con cepas de *V. cholerae* altamente virulentas, que constituye uno de los modelos más utilizados en la evaluación de la virulencia de *V. cholerae*. Esto se hace evidente por los valores de fluido acumulado y por el número de UFC por gramo de intestino homogeneizado, diferentes entre los animales inmunizados con ambos tipos de cepas al compararlos con los animales controles inmunizados con la cepa *E. coli* K-12, no se observa protección cuando se enfrenta con la cepa del serogrupo O139 (tabla 2). Esta cepa *V. cholerae* No-O1 puede ser considerada el segundo agente causal del cólera, porque provoca una enfermedad que no se diferencia a la ocasionada por *V. cholerae* O1 ya que comparten algunas características con el serogrupo O1, incluyendo la producción de toxina de cólera.<sup>19,20</sup> Basado en datos epidemiológicos, una exposición natural con el serogrupo O1 parece brindar una insignificante o ninguna protección frente a *V. cholerae* O139.<sup>19</sup> Se cree que este nuevo serogrupo puede ser el agente causal de la octava pandemia del cólera.<sup>21,22</sup>

La aplicación de las cepas vivas atenuadas como vacunas efectivas contra el cólera es en la actualidad una de las variantes más favorecidas en la búsqueda de un preparado vacunal en verdad efectivo contra la enfermedad.<sup>16</sup> Las cepas atenuadas 81 y 87 utilizadas en el presente trabajo conservan su patrón de excreción en el modelo del conejo adulto e indujo en la confrontación en intestino ligado, una significativa disminución del número celular de las cepas virulentas de reto y líquido acumulado en los segmentos intestinales; todo ello incrementa la posibilidad de utilizar estas cepas 81 y 87 en estudios preliminares de reactividad e inmunogenicidad en humanos.

## SUMMARY

In order to study the excretion patterns, colonization and protective capacity of live attenuated strains of *Vibrio cholerae* O1. El Tor, rabbits were immunized in New Zealand with these strains and their corresponding parental strains. 2 doses were administered by the model of oral inoculation in adult rabbits. Rabbits were rotated 2 weeks after the second dose by the model of ligated intestine with highly virulent strains of *V. cholerae* O1 Ogawa and Inaba serotypes and O139 serogroup. It was proved that the genetically manipulated strains do not effect the excretion patterns when they are compared with their parental strains. It was observed in the challenge a decrease in the levels of colonization of virulent strains of both serotypes, not only among the rabbits immunized with the attenuated strains, but also among those immunized with the parental strains in comparison with control animals immunized with the strain of *Escherichia coli* K-12, which means that there was certain degree of protection. In the case of the animals challenged with the O139 strain it was demonstrated that the protection is specific for each serogroup, since in this case there was no reduction of the colonization.

**Subject headings:** CHOLERA VACCINE/immunology; VACCINES, ATTENUATED/immunology; VIBRIO CHOLERAEE/isolation & purification; RABBITS/immunology; FECES/microbiology; IMMUNIZATION SCHEDULE.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Cholera in 1994. Wkly Epidemiol Rec 1995; (28-29):201-11.
2. Balakrish NG, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Mukhopadhyay AK, Takeda T, Shimada. Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. J Infect Dis 1994;169:1029-34.
3. Simaryuntak SC, Witham N, Punjabi N, Heppner DG, Losonsky G, Totosudirjo H, et al. Safety and immunogenicity of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-Hgr in 5-9 year old Indonesian children. Lancet 1992;340(19):689-94.
4. Jertborn M, Svennerholm AM, Holmgren J. Evaluation of different immunization schedules for oral cholera B subunit -whole cell vaccine in Swedish volunteers. Vaccine 1993;11(10):1007-12.
5. Taylor DN, Killeen KP, Hack DC, Kenner JR, Coster TS, Beattie DT, et al. Development of a live, oral, attenuated vaccine against El tor cholera. J Infect Dis 1994;170:1558-23.
6. Cray WCJR, Tokunaga E, Pierce N. Successful colonization and immunization of adult rabbits by oral inoculation with *Vibrio cholerae* O1. Infect Immunol 1983;41(2):735-41.
7. Benítez JA, Silva AJ, Rodríguez BL, Fando R, Campos J, Robert A, et al. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strain. Arch Med Res 1996 (en prensa).
8. Gunhild J, Svennerholm AM, Holmgren J. Expression and detection of different biotype associated cell-bound Haemagglutinins of *Vibrio cholerae* O1. J Gen Microbiol 1989;135:111-20.
9. Kabir S. Preparation and immunogenicity of bivalent cell-surface protein-polysaccharide conjugate of *Vibrio cholerae* O1. J Med Microbiol 1987;23:9-18.
10. CDC/NCID, OPS. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Edición en español, Programa especial de publicaciones, OPS.1994.

11. Nakasone N. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 recently isolated in Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987;81:876-8.
  12. De SN, Chatteyee DN. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J Pathol Bacteriol* 1953;66:559-62.
  13. Mathias J, Carlson GM, DiMarino AJ, Bertiger G, Morton HE, Cohen S. Intestinal myoelectric activity in response to live *Vibrio cholerae* and cholera enterotoxin. *J Clin Invest* 1976;58:91-6.
  14. Kind ChD, Davis RH, Guenaut RL, Kaper JB, Mathias JR. Effects of *Vibrio cholerae* recombinant strains on rabbit ileum in vivo. *Gastroenterology* 1991;101:319-24.
  15. Pierce FN, Cray WC, Kaper JB, Mekalanos JJ. Determinants of immunogenicity of a booster dose of *Vibrio cholerae* O1 in rabbits. *Infect Immunol* 1988;56(1):142-8.
  16. Kaper JB, Levine MM. Recombinant attenuated *Vibrio cholerae* strain used as live oral vaccine. *Res Microbiol* 1990;141:901-6.
  17. Cryz SJ, Levine MM, Lonsansky G, Kaper JB. Safety and Immunogenicity of booster dose of *Vibrio cholerae* CVD 103 HgR live oral vaccine in Swiss adults. *Infect Immunol* 1992;60(9):3916-7.
  18. Tacket Co, Losansky G, Nataro JP. Onset and duration of protective immunity in challenged volunteers after vaccination with live oral cholera vaccine CVD 103 HgR. *J Infect Dis* 1992;166:837-41.
  19. Bhattacharya SK, Bhattacharya MK, Nair GB, Dutta D, Moitra A, Mandal BK, et al. Clinical profile of acute diarrhea cases infected with the new epidemic strain of *Vibrio cholerae* O139: designation of the disease as cholera. *J Infect* 1993;27:11-5.
  20. Lebens M, Holmgren J. Structure and arrangement of cholera toxin genes in *Vibrio cholerae* O139. *FEMS Microbiol Lett* 1994;117:197-202.
  21. World Health Organization. Epidemic diarrhea due to *Vibrio cholerae* Non-O1. *Wkly Epidemiol* 1993;68:141-8.
  22. Swerdlow DL, Ries AA. *Vibrio cholerae* non-O1 the eighth pandemic? *Lancet* 1993;342:382-3.
- Recibido: 11 de septiembre de 1996. Aprobado: 12 de diciembre de 1997.  
 Lic. *Hilda María García Sánchez*. Instituto "Finlay". Ave. 27, No. 19805, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. AP 16017, CP 11600.