

INSTITUTO FINLAY

## Selección de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* para la obtención de candidatos vacunales atenuados orales contra el cólera

Lic. Hilda María García,<sup>1</sup> Lic. Gemma Año,<sup>2</sup> Lic. Bárbara Cedré,<sup>3</sup> Lic. Tania Valmaseda,<sup>4</sup> Dr. Jorge Luis Maestre,<sup>5</sup> Dr. Manuel Díaz,<sup>6</sup> Lic. Mayelin Mirabal,<sup>7</sup> Lic. Arturo Talavera<sup>8</sup> y Lic. Luis García<sup>9</sup>

### RESUMEN

Se desarrolló una metodología para la selección de cepas de *Vibrio cholerae* O1 y O139 modificadas genéticamente, con el objetivo de obtener candidatos vacunales atenuados orales contra el cólera. A las cepas modificadas se les realizó caracterización microbiológica, susceptibilidad bacteriana y diferentes pruebas biológicas (dosis letal media, capacidad colonizadora, adherencia en ratones, intestino ligado e inoculación intraduodenal en conejos como pruebas de virulencia y potencia). Las cepas 81, 638, 638T y 1333 fueron evaluadas en ensayos clínicos para determinar su reactogenicidad e inmunogenicidad. Todas las cepas fueron sensibles a la tetraciclina y doxiciclina y mostraron su atenuación e inmunogenicidad en modelos animales, resultando las cepas 638 y 1333 inmunogénicas y no reactogénicas en voluntarios.

**Palabras clave:** Cepas atenuadas de *Vibrio cholerae*, candidatos vacunales, modelos animales y ensayos clínicos.

---

En el inicio del tercer milenio el cólera continúa siendo un problema de salud para muchos países del mundo.<sup>1</sup> Es una enfermedad que evoluciona con una infección intestinal aguda caracterizada por la aparición brusca de diarrea acuosa y abundante, vómitos, deshidratación, acidosis, colapso circulatorio y los enfermos no tratados pueden morir en las primeras 24 h de la aparición de los signos clínicos.<sup>2</sup>

Los serogrupos O1 y O139 de *Vibrio cholerae* son los agentes causales del cólera, los cuales secretan una enterotoxina, la toxina colérica (TC),

responsable de los signos y síntomas clínicos de la enfermedad.<sup>3</sup>

Es conocido que la infección natural o experimental con *V. cholerae* produce una sólida y duradera protección debido a una respuesta inmune local.<sup>4</sup> Esto hace que una de las vías para lograr una vacuna efectiva contra el cólera sea el empleo de cepas atenuadas administradas de forma oral.<sup>5</sup>

La utilización de pruebas biológicas en modelos animales en la fase de investigación básica es indispensable para evaluar la atenuación de la

---

<sup>1</sup> Doctora en Ciencias de la Salud. Instituto Finlay.

<sup>2</sup> Máster en Ciencias en Microbiología. Instituto Finlay.

<sup>3</sup> Máster en Ciencias Microbiología. Instituto Finlay.

<sup>4</sup> Máster en Ciencias en Bioquímica. Instituto Finlay.

<sup>5</sup> Especialista en II Grado en Microbiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK).

<sup>6</sup> Especialista de II Grado en Medicina Interna. IPK.

<sup>7</sup> Licenciada en Matemática. Instituto Finlay.

<sup>8</sup> Doctor en Ciencias Biológicas. Instituto Finlay.

<sup>9</sup> Doctor en Ciencias de la Salud. Instituto Finlay.

virulencia de las cepas, su capacidad de colonizar y de adherirse a la mucosa intestinal, así como la inducción de respuesta inmune en las cepas candidatas a vacunas vivas atenuadas contra el cólera.<sup>6</sup> Posterior a su evaluación en los modelos animales es necesario realizar ensayos clínicos, que tienen como objetivo evaluar la reactogenicidad mediante la observación de reacciones adversas. La diarrea es la principal reacción adversa y define la condición de reactogenicidad para una cepa atenuada administrada por vía oral. Por otra parte, la evaluación de la inmunogenicidad permite profundizar en diferentes aspectos de la respuesta inmune.

La adecuada utilización de los modelos animales y la evaluación en voluntarios permiten seleccionar cepas atenuadas no reactogénicas e inmunogénicas como candidatos vacunales.

En este trabajo se lleva a cabo la selección de cepas de *V. cholerae* modificadas genéticamente con vista a la obtención de candidatos vacunales atenuados contra el cólera.

## MÉTODOS

**Cepas:** las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo y sus referencias se detallan en la tabla 1. Se utilizaron un total de 11 cepas de *V. cholerae*, 7 correspondientes al serogrupo O1, serotipos Inaba y Ogawa, 3 al serogrupo O139 y 1 de *Escherichia coli*.

**Controles microbiológicos:** la identificación fisiológica, bioquímica y serológica de las cepas se realizó siguiendo la metodología recomendada en el manual de la Organización Panamericana de la Salud (OPS).<sup>2</sup>

Para observar la presencia del flagelo se realizó una coloración negativa y las células fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL- JEM 100 S. Las células se fijaron en rejillas de cobre de 200 mesh, previamente recubiertas con una fina membrana Formvar. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se realizó la coloración con acetato de uranilo acuoso a 5 %.<sup>7</sup>

La presencia de cápsula en las cepas atenuadas 251a y L911 del serogrupo O139, se analizó mediante MET. Las muestras se fijaron en glutaraldehído a 5 % en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0,1 M, antes de la coloración con ferritina policatiónica (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se realizaron cortes ultrafinos que fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo<sup>8</sup> y observados al MET. Se tomaron fotografías sobre las cuales se realizaron mediciones.

Se realizó la prueba del marcador vacunal que identifica a las cepas cubanas candidatas a vacuna contra cólera según Robert y otros. Esta prueba detecta la expresión de un marcador cromosómico, el gen *celA*, que codifica para la enzima endoglucanasa A de *Clostridium termocellum*.<sup>9</sup>

**TABLA 1.** Cepas bacterianas utilizadas

Características de las cepas parentales		Referencias
C7258	O1, El Tor Ogawa, epidémica, Perú 1991	Häse y otros, 1994
C6706	O1, El Tor Inaba, epidémica, Perú 1991	Häse y otros, 1994
SG251	O139, epidémica, India 1993	Ramamurthy y otros., 1993
Características de las cepas modificadas de 1 <sup>a</sup> generación		Referencias
81	C7258 [D <i>ctxAB</i> , <i>zot</i> , <i>ace</i> , <i>cep</i> , <i>orfU</i> ], <i>mshA</i> <sup>-</sup>	Benítez y otros, 1996
413	C6706 [D <i>ctxAB</i> , <i>zot</i> , <i>ace</i> , <i>cep</i> , <i>orfU</i> ]	Benítez y otros, 1996
251a	SG251 [D <i>ctxAB</i> , <i>zot</i> , <i>ace</i> , <i>cep</i> , <i>orfU</i> ], me	Año y otros, 1998
Características de las cepas modificadas de 2 <sup>a</sup> generación		Referencias
638	81, <i>hap::celA</i> <sup>+</sup>	Robert y otros, 1996
1333	413, <i>hap::celA</i> <sup>+</sup>	García y Benítez, 1996
L911	251a [ <i>hap::celA</i> <sup>+</sup> ], no motil	Ledon y otros, 2003
Característica de la cepa modificada de 3 <sup>a</sup> generación		Referencias
638T	638, <i>thyA</i>	Valle y otros, 2000

Nomenclatura de los genes que codifican para: *ctxA*: subunidad de la toxina A de la toxina colérica; *ctxB*: subunidad B de la toxina colérica; *zot*: toxina de la zona ocluida; *ace*: enterotoxina colérica accesoria; *cep*: core encoded pilus; *orfU*: marco de lectura abierto U; *mshA*: hemaglutinina sensible a manosa; *thy*: auxotrofia la timidina; *hap*: hemaglutinina/proteasa; *celA*: endoglucanasa A y me: mutante espontáneo. Los genes comprendidos en el cassette de virulencia están entre corchetes.

Como prueba de seguridad se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP), para detectar el gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la TC, siguiendo la metodología del manual de la OPS.<sup>2</sup> Los oligonucleótidos usados se diseñaron según *Fields* y otros,<sup>10</sup> y sintetizados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Cuba, con la secuencia nucleotídica siguiente: (CTX 2686: 5' CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G3'; de la posición 73 a 94) y (CTX 2687: 5' GCA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC 3', de la posición 611 a 636). El ADN amplificado de *ctxA* se detectó como una banda de 564 pares de bases (pb). Se utilizó como marcador de peso molecular el bacteriófago  $\phi$  174 [Promega].

*Susceptibilidad bacteriana:* se determinó empleando el sistema DIRAMIC 10, que es un sistema automatizado computadorizado que calcula el índice de inhibición en porcentaje, que cada antibacteriano es capaz de producir. En dependencia de los valores de dicho índice se establecieron los criterios cualitativos de sensibilidad siguientes: resistente (0-70 %), intermedio (71-79 %) y sensible (80-100 %).<sup>11</sup> Los antibacterianos probados fueron: tetraciclina (30 mg), doxiciclina (30 mg), cloranfenicol (30 mg), estreptomycin (10 mg), rifampicina (2 mg), kanamicina (30 mg), eritromicina (15 mg), ácido nalidíxico (30 mg), ciprofloxacina (5 mg), sulfametoxazol-trimetoprin (25 mg) y polimixina B (300 U).

*Ensayo para evaluar virulencia:* se determinó la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), según el método descrito por *Ujiye* y otros.<sup>12</sup> Se utilizaron ratones lactantes Balb/c de 2-4 d de nacidos con peso promedio de 1-5 g, suministrados por el Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los cálculos de la  $DL_{50}$  se realizaron según el método descrito por *Reed* y *Muench*.<sup>13</sup>

*Ensayo para evaluar capacidad colonizadora:* se utilizaron ratones con similares características. A cada grupo de 10 ratones se le administraron por vía oral, a través de una cánula, 50 mL de una suspensión celular ajustada a una concentración de  $10^5$  UFC en PBS azul de Evans 0,01 % y se sacrificaron 24 h después de la inoculación. Se extrajeron los intestinos, se pesaron en forma de mezcla (10 intestinos por cada mezcla) y por último se homogeneizaron

en un ULTRA-TURRAX T-25 (Janke & Kunkel, IKA) a 13 500 r.p.m. durante 15 s en PBS. Los homogenatos se sembraron en placas de tiosulfato citrato sales biliares sacrosa (TCBS) y se incubaron durante 18 h a 37 °C. Los resultados se expresaron como Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/g intestino.<sup>14</sup>

*Evaluación de la capacidad de adherencia a la mucosa intestinal:* se utilizaron, igualmente ratones con similares características. Se empleó la metodología similar a la de la prueba de colonización, realizándose las tomas de muestras de intestino para estudios de identificación microbiológica de *V. cholerae* y para el estudio anatomopatológico por la técnica hematoxilina-eosina, así como para el análisis inmunohistoquímico mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta.<sup>15</sup> Se utilizó una dilución 1/10 del anticuerpo policlonal anticélulas enteras de los serogrupos O1 y O139 obtenidos en conejos en el laboratorio. Se empleó un conjugado anti IgG-peroxidasa de conejo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), a una dilución 1/250.

*Ensayo de toxigenicidad:* se siguió el método reportado por *De* y *Chatterjee*,<sup>16</sup> con conejos blancos de Nueva Zelanda de 2-2,5 kg de peso, suministrados por el CENPALAB.

Los animales fueron inoculados con 0,5 mL de la suspensión bacteriana de  $10^7$  UFC en PBS estéril. A las 18 h posteriores a la inoculación, se sacrificaron con una sobredosis de 50 mg/kg de peso de pentobarbital sódico, se localizaron los segmentos inoculados y se midió el largo en centímetros, así como el volumen de fluido acumulado en su interior. Los resultados se expresaron como volumen de fluido acumulado (FA) en mL por cm de segmento intestinal.<sup>17</sup>

*Evaluación de la inmunogenicidad:* se realizó el modelo de conejo adulto inoculado por vía intraduodenal según el método descrito por *García* y otros.<sup>18</sup> Se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda de 2-2,5 kg de peso suministrados por el CENPALAB. La sangre de los animales inoculados, se colectó por punción en la vena central de la oreja a los 0 y 14 d después de la inoculación, que es el día de máxima respuesta serológicas.<sup>18</sup> Los sueros fueron colectados y almacenados a - 20 °C, hasta su análisis para la determinación de anticuerpos bactericidas mediante

el ensayo vibriocida y de anticuerpos IgG anti-LPS Ogawa a través de la técnica de ELISA.

Se determinó el título de anticuerpos vibriocidas por el método reportado por *Benenson* y otros,<sup>19</sup> con modificaciones según *Cedré* y otros,<sup>20</sup> en cuanto a la metodología para la determinación del punto final en la titulación. El título vibriocida se definió como el inverso de la mayor dilución del suero que causó inhibición completa del crecimiento bacteriano, determinado por la invariabilidad de color del medio al realizarse el examen visual.

Los anticuerpos IgG anti-LPS se midieron por ELISA siguiendo la metodología de *Pino* y otros.<sup>21</sup> El título se definió como el log del inverso de la dilución del suero que dio una lectura de densidad óptica de 0,4 por encima del blanco de la placa. Este valor se calculó mediante la interpolación en la ecuación de la recta de valores de DO por encima y por debajo de 0,4.<sup>18</sup>

*Selección de cepas atenuadas no reactogénicas e inmunogénicas por ensayos clínicos:* el estudio se realizó con voluntarios sanos de 18-40 años, con régimen hospitalario en el Instituto "Pedro Kourí" (IPK).

*Distribución de los ensayos clínicos:* para la ejecución de los ensayos clínicos se diseñó un estudio controlado, aleatorizado, a doble ciegas y con placebo. Se realizaron 9 ciclos, lo que implicó un máximo de 162 voluntarios seleccionados. Cada ciclo constituyó un estudio en paralelo con 2 grupos, 1 que recibió el inóculo con la cepa en estudio y otro que recibió placebo. El número de participantes por ciclo fue de 18 voluntarios, motivados por las características hospitalarias. La validez estadística del ensayo presupuso incluir un número de sujetos que por razones logísticas y de bioseguridad no pudieran estudiarse al unísono. Su ejecución fue planificada en varios ciclos metodológicamente idénticos, hasta alcanzar un acumulado mínimo necesario de sujetos para detectar el efecto esperado. La naturaleza del ensayo implicó que los sujetos que participaron parcial o en la totalidad de un ciclo no fueran, bajo ningún concepto, elegibles para otros ciclos.

*Consideraciones éticas y regulatorias:* Los ensayos clínicos para la selección de cepas no reactogénicas e inmunogénicas candidatas a vacuna oral contra el cólera se ajustaron

estrictamente a todos los principios de la ética médica y científica, cumplieron con las reglas internacionales en este sentido y se realizaron de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas Clínicas y la Declaración de Helsinki. Se presentó y se aprobó el protocolo de ensayos de reactogenicidad e inmunogenicidad por las autoridades reguladoras cubanas: Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED) y el Centro Nacional de Seguridad Biológica (CNSB). El protocolo se sometió a la consideración y aprobación del Comité de Ética del IPK y del Instituto Finlay. La participación voluntaria en los ensayos quedó conformada por escrito en la carta de consentimiento informado.

*Preparación y administración del inóculo:* Las cepas atenuadas fueron cultivadas en agar cerebro corazón (BHI) y resuspendidas en solución salina estéril 0,9 %. Las suspensiones resultantes se ajustaron en un fotocolorímetro Spectronic 401 a una concentración 1-5 x 10<sup>9</sup> UFC, por DO entre 0,60-0,65 a una  $\lambda$  de 540 nm. Posteriormente se diluyeron apropiadamente y se determinó el número de viables en placas.<sup>22</sup>

Los voluntarios ingirieron primeramente 120 mL de bicarbonato de sodio 1,33 % y pasados 30 min, cada voluntario ingirió una dosis única del inóculo o el placebo, en 30 mL de la misma solución según correspondió. Los voluntarios del grupo placebo recibieron bicarbonato de sodio que resultó indistinguible en apariencia del preparado vacunal.<sup>22</sup>

*Monitoreo de reacciones adversas:* luego de administrarse el inóculo y durante los 5 d posteriores, se observaron las posibles reacciones adversas como diarreas, vómitos, fiebre, náuseas, meteorismo, dolor abdominal y malestar general. Estas reacciones permitieron evaluar la seguridad y reactogenicidad de las cepas administradas. Al quinto día de la inoculación se administró 300 mg de doxiciclina en dosis única.

Desde el momento de la inoculación y hasta el quinto día se colectaron cada una de las deposiciones de los voluntarios en recipientes plásticos, las cuales fueron pesadas y evaluadas su consistencia, según una escala de 5 grados: grado 1: firme, grado 2: suave, grado 3: prácticamente líquida, grado 4: acuosa de color opaco, grado 5: agua de arroz.<sup>22</sup>

Los grados 1 y 2 se consideran como variaciones normales de las heces, mientras los grados 3-5 son considerados patológicos. Se tomó una muestra de cada deposición en un recipiente estéril para el correspondiente estudio bacteriológico. Definición de diarrea reactogénica: deposiciones de consistencia grado 3-5, que totalicen 200 g o más en 48 h o una de al menos 300 g.<sup>22</sup>

*Aislamiento, identificación y estabilidad genética de V. cholerae excretados en heces de voluntarios:* se realizó un coprocultivo por voluntario, que se repitió cada 24 h durante 5 d después de la inoculación y 3 d después de la administración del antibacteriano.

Para el aislamiento e identificación de las cepas, se sembraron directamente las muestras de heces en agar TCBS y Agua Peptona Alcalina (APA), con incubación a 37 °C por 24 h y 6-8 h, respectivamente. EL APA se resembró en agar TCBS. Las colonias con apariencia de *V. cholerae* en TCBS fueron sometidas a las mismas pruebas bioquímicas y serológicas descritas anteriormente<sup>2</sup> y la expresión del gen reportero *celA* en placas de agar Luria Bertani. Se determinó el número de microorganismos viables de las cepas atenuadas excretadas por gramo de heces.<sup>22</sup> Las muestras fueron recogidas cada 24 h durante los 5 d posteriores a la inoculación y antes de la administración del antibacteriano.

Para estudiar la estabilidad genética de las cepas atenuadas administradas a los voluntarios después de su paso por el tracto gastrointestinal, se utilizaron las pruebas de RCP y el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR). Para la RCP se siguió la metodología anteriormente descrita.<sup>2,10</sup>

Para la prueba del PLFR se realizó según Popovic y otros.<sup>23</sup> Se digirió el ADN con la enzima *BglI* (10 u/mL) [Promega]. Se utilizó como sonda para la hibridación una secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal. El marcaje de la sonda se realizó según lo descrito en el estuche comercial del sistema de detección y marcaje directo de ácidos nucleicos ECL (Amersham).

*Evaluación de la inmunogenicidad:* las muestras de sangre total se tomaron los días 0 y 14, posteriores a la inoculación por punción venosa.

Se centrifugaron 10 mL de sangre a 1 700 g a 4 °C durante 10 min, para la obtención del suero. Los sueros se almacenaron a - 20 °C hasta su uso para la determinación de anticuerpos vibriocidas y de anticuerpos IgA anti-LPS Ogawa o Inaba por ELISA.

En ambas técnicas se siguió la misma metodología descrita anteriormente en el ensayo de inoculación intraduodenal, con la diferencia de que para el ELISA de anticuerpos IgA anti-LPS Ogawa o Inaba se empleó el conjugado anti-IgA humano (Sigma).<sup>18,20</sup>

Los criterios de seroconversión se definieron como un incremento de la respuesta inmune de anticuerpos vibriocidas, de 4 veces el título inicial a los 14 d de inmunizado y de 2 veces en el valor del título de anticuerpos IgA anti-LPS Ogawa o Inaba en el ELISA.<sup>22</sup>

*Análisis estadístico:* el análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico SPSS sobre Windows, versión 10.0, así como el paquete estadístico R, versión 1.4.1. Se usó un nivel de significación estadística del 0,05 para todas las comparaciones.

El análisis de la  $DL_{50}$ , el índice de fluido acumulado, y de colonización intestinal se usó la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon, para mostrar diferencias estadísticamente significativas entre las cepas.

Para el análisis de la respuesta inmunológica se calcularon los títulos medios geométricos. Se usó ANOVA simple para comparar la media de los logaritmos de los títulos obtenidos tanto por ELISA como por el ensayo vibriocida.

Similares análisis se realizaron para los datos de los ensayos clínicos (aquí se hicieron comparaciones entre cepas usando la misma dosis). Se tabularon las reacciones adversas encontradas y se hicieron comparaciones entre cepas usando la prueba exacta de Fisher siempre que los datos lo permitieron.

Cuando se analizó la seroconversión en la respuesta inmunológica tanto por ELISA como por el ensayo vibriocida, se definió como un incremento de al menos 4 veces del título final comparado con el título inicial. Se estimaron los porcentajes de seroconversión en cada grupo y se realizaron comparaciones de los porcentajes de cada cepa en una misma dosis. Para estas comparaciones se

usó la prueba chi cuadrado o la de Fisher, según lo permitieron los datos.

## RESULTADOS

Al observar al microscopio óptico las células de las cepas atenuadas utilizando la técnica de coloración de Gram, se observaron bacilos gramnegativos con morfología de coma bacilo en la mayoría de las cepas, la morfología bacilar de las cepas 638T y L911 cambió con respecto a la de sus cepas parentales, observándose como bacilos rectos alargados.

Independientemente de la manipulación genética realizada, todas las cepas atenuadas fueron indistinguibles en pruebas bioquímicas a sus cepas parentales y reaccionaron de forma intensa y rápida con los antisueros correspondientes a sus cepas parentales.

Al examinar las cepas estudiadas al microscopio óptico por la técnica en fresco se observaron bacterias móviles, con excepción de la cepa L911 del serogrupo O139 que fue no móvil a diferencia de su cepa parental 251a.

Mediante la siembra en agar semisólido se pudo corroborar la movilidad de las cepas del serogrupo O1 estudiadas, lo que se evidenció por un crecimiento radial alrededor del sitio de inoculación, excepto para la cepa atenuada L911.

El flagelo polar se observó a través de ME en todas las cepas atenuadas de ambos serogrupos.

Al observar los cortes ultrafinos por MET, de la superficie de las cepas atenuadas del serogrupo O139, se visualizó una cápsula electrodensa gruesa, marcada con ferritina, asociada a la pared celular de la cepa virulenta MDO12 (control positivo), con un grosor de la zona externa al límite citoplasmático de alrededor de 35 a 40 nm, a diferencia de la cepa VC12 (control negativo) del serogrupo O1, cuyo grosor de la superficie celular midió 20 nm, con ausencia del marcaje con ferritina. En las cepas candidatas vacunales 251a y L911 se apreció una capa electrodensa fina rodeando completamente las células.

Las cepas modificadas 638, 638T, 1333 y L911 de segunda y tercera generación, a las cuales se les insertó en el nivel cromosómico el gen *celA* de *C. thermocellum* como marcador vacunal, expresaron la enzima endoglucanasa A, la cual

produjo la degradación de la carboximetil celulosa, visualizándose a través de la aparición de un halo traslúcido alrededor de las colonias.

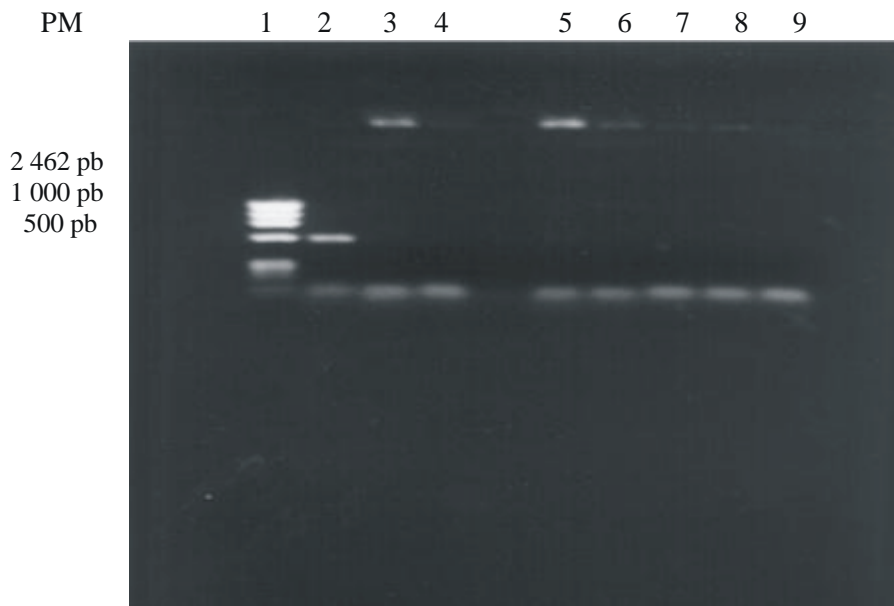
En la prueba de RCP se observó una banda de 564 pb correspondiente a la cepa hipertoxigénica 569 B, utilizada como control positivo, correspondiente al gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina colérica. Esta banda no se observó en el producto amplificado del ADN cromosómico de las cepas modificadas genéticamente, a las cuales se les eliminó el profago CTXf, que incluye los genes que codifican para la toxina de cólera (fig. 1).

Los resultados del estudio de la susceptibilidad bacteriana de todas las cepas atenuadas, obtenidos por el sistema DIRAMIC 10, no mostraron diferencias con sus correspondientes cepas parentales en cuanto al índice de inhibición del crecimiento que cada antibacteriano fue capaz de producir ( $p=0,052$ ).

Todas las cepas fueron sensibles a tetraciclina, doxiciclina, cloranfenicol y estreptomycin (excepto las cepas O139 que resultaron resistentes a este último antibacteriano). También resultaron sensibles a rifampicina, kanamicina, eritromicina, ácido nalidixico y ciprofloxacina (con la excepción de las cepas O139, 81, 413 y 638, que lograron valores intermedios). Por último se comprobó la susceptibilidad al sulfametoxazol-trimetoprim (excepto las cepas del serogrupo O139 que resultaron resistentes a este antibacteriano) y todas las cepas fueron resistentes a la polimixina B.

Los resultados del cálculo de la  $DL_{50}$  en la evaluación de la virulencia de las cepas modificadas genéticamente de primera, segunda y tercera generación, difirieron de forma significativa con respecto a sus cepas parentales ( $p < 0,05$ ), alcanzando las cepas modificadas, valores de 2 a 3 órdenes superiores. Los valores de  $DL_{50}$  fueron mayores de  $10^6$  UFC, lo que permitió comprobar la atenuación de las cepas modificadas en el modelo animal utilizado.

Independientemente de la modificación genética realizada a las cepas de *V. cholerae* de ambos serogrupos O1 y O139, no se afectó la capacidad de colonizar el intestino de ratones neonatos. No existieron diferencias significativas entre las cepas parentales y las modificadas genéticamente ( $p > 0,05$ ). La cepa L911 y la cepa



Líneas: 1 (marcador de peso molecular fago fX174 digerido con *Hae* III); 2 (Control positivo: cepa 569B); 3 al 8 (corresponden a las cepas: 81, 638, 638T, 1333, 251a y L911); 9 (Control de reactivos: agua estéril).

**Fig. 1.** Electroforesis en gel de agarosa 1 % de los productos de amplificación por RCP de la subunidad A de la toxina colérica. Cepas modificadas genéticamente de los serogrupos O1 y O139.

auxotrófica 638T, en las que se produjo un cambio de su morfología de coma-bacilo a bacilo más alargado y recto, colonizaron el intestino delgado de ratones neonatos, de igual forma que sus parentales 251a y 638, respectivamente. Todas las cepas modificadas cumplieron con los criterios de aceptación para esta prueba, debido a que su concentración se incrementó entre  $10^2$ - $10^3$  UFC con respecto al inóculo inicial.

Al observar al microscopio óptico los cortes histológicos, realizados a la mucosa intestinal de ratones inoculados por vía oral con cepas de *V. cholerae* virulentas y genéticamente modificadas, se observaron bacterias adheridas a la superficie de las células del intestino delgado. Esta adherencia provocó cambios en el nivel intestinal, edema en las criptas y presencia de escasas células inflamatorias de la lámina propia de la mucosa.

Mediante la técnica de inmunoperoxidasa, utilizando anticuerpos policlonales anticélulas enteras de los serogrupos O1 y O139, se evidenció en muestras de intestino una reacción positiva frente a los anticuerpos específicos de ambos serogrupos. Se apreciaron reacciones positivas en la luz del órgano y encima de la capa superficial del epitelio intestinal, con la presencia de abundantes bacterias. Esto se corroboró con los aislamientos microbiológicos obtenidos en los cultivos realizados,

en los que se identificó por bioquímica y serología la presencia de *V. cholerae* de los serogrupos O1 y O139.

Se observaron diferencias entre las cepas modificadas de primera, segunda y tercera generación y las cepas parentales epidémicas ( $p < 0,05$ ) en cuanto a los fluidos acumulados promedio obtenidos en el modelo de intestino ligado en conejo adulto. No se observaron diferencias entre las cepas modificadas y la cepa de *E. coli* K-12 ( $p > 0,05$ ), con valores inferiores a 1 mL/cm. Esta prueba en unión a la de RCP fueron controles de seguridad, que dieron información acerca de la toxigenicidad y atenuación de las cepas modificadas genéticamente.

No se encontraron diferencias significativas en los títulos de anticuerpos vibriocidas inducidos por las cepas parentales y por las atenuadas ( $p > 0,05$ ) a los 14 d después de la inoculación por vía intraduodenal en el modelo de conejo adulto, excepto para las cepas 413 y L911 donde los TMG de anticuerpos vibriocidas inducidos fueron más bajos que el resto (40,0 y 56,0 respectivamente).

Resultados similares se obtuvieron en los títulos de anticuerpos IgG anti LPS, donde tampoco se encontraron diferencias en la inducción de anticuerpos por las cepas parentales y atenuadas ( $p > 0,05$ ). La cepa L911 no cumplió con el criterio de aceptación para esta prueba debido a la baja cantidad de anticuerpos inducidos (0,630).

Todas las cepas modificadas genéticamente resultaron atenuadas e inmunogénicas en las pruebas biológicas en modelos animales a excepción de la cepa L911, que fue no inmunogénica en el modelo de inoculación intraduodenal. Por este criterio todas las cepas fueron elegibles para ser evaluadas en ensayos clínicos y corroborar su seguridad, inmunogenicidad y capacidad de protectora.

En la tabla 2, aparece la ocurrencia de diarrea reactiva según la dosis administrada de las cepas atenuadas. Ningún voluntario que ingirió placebo excretó *V. cholerae* en las heces. No hay diferencias significativas en la *media geométrica* (MG) de las UFC de los cultivos positivos entre las cepas 638 y 1333 ( $p > 0,05$ ).

Los síntomas como dolor abdominal, meteorismo, acidez, dolor de cabeza, vómitos y fiebre fueron de corta duración y de carácter leve con ambas cepas. No se detectaron diferencias significativas con respecto a los síntomas ( $p > 0,05$ ) entre los que ingirieron las cepas atenuadas y los que recibieron placebo (Datos no mostrados).

Cuando se aumentó la concentración del inóculo a  $10^8$  UFC se presentó un caso con diarrea reactiva grado III, con un solo episodio y un peso promedio mayor de 300 g entre los que ingirieron la cepa 638, no así con la 1333. No hubo diferencia significativa entre la MG de las UFC de los cultivos positivos de ambas cepas excretadas por los voluntarios ( $p > 0,05$ ). No hubo diferencia ( $p > 0,05$ ) con respecto a los otros síntomas clínicos analizados entre los voluntarios que ingirieron la cepa y los que ingirieron placebo.

Con una dosis de  $10^9$  UFC, se evaluaron 3 cepas atenuadas de primera, segunda y tercera generación, todas del mismo serogrupo. Con la cepa 81 (parental de la 638) se presentaron 6 casos con diarrea reactiva de los 12 que la ingirieron, aunque el peso promedio de la diarrea fue menor que 300 g, con un rango de 1-11 episodios de diarreas por voluntario antes de las 48 h. En los voluntarios que ingirieron la cepa 638 (parental de la 638T), 2 de 38 presentaron diarrea reactiva. Cuando se administró la cepa auxotrófica 638T de tercera generación ningún voluntario tuvo diarrea.

No hay diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en la ocurrencia de diarrea entre los inoculados con las cepas 638, 638T y los placebos, pero sí entre 81 y las cepas 638 y 638T ( $p < 0,05$ ).

Todos los voluntarios inoculados con la cepa 81 presentaron cultivos positivos. La cepa 638 fue aislada en 29 de los 38 voluntarios y con la 638T, 3 de 9 tuvieron cultivos positivos en sus heces. La MG de los cultivos positivos de la 81 fue superior a los de las cepas 638 y 638T, detectándose diferencias significativas entre 81 y las 2 cepas restantes ( $p < 0,01$ ). Ninguno de los placebos mostraron cultivos positivos de *V. cholerae*.

El resto de las reacciones adversas fueron de corta duración y de carácter leve cuando se administró la dosis de  $10^9$  y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos inoculados con las cepas, ni entre los voluntarios inoculados ni en los placebos ( $p > 0,05$ ).

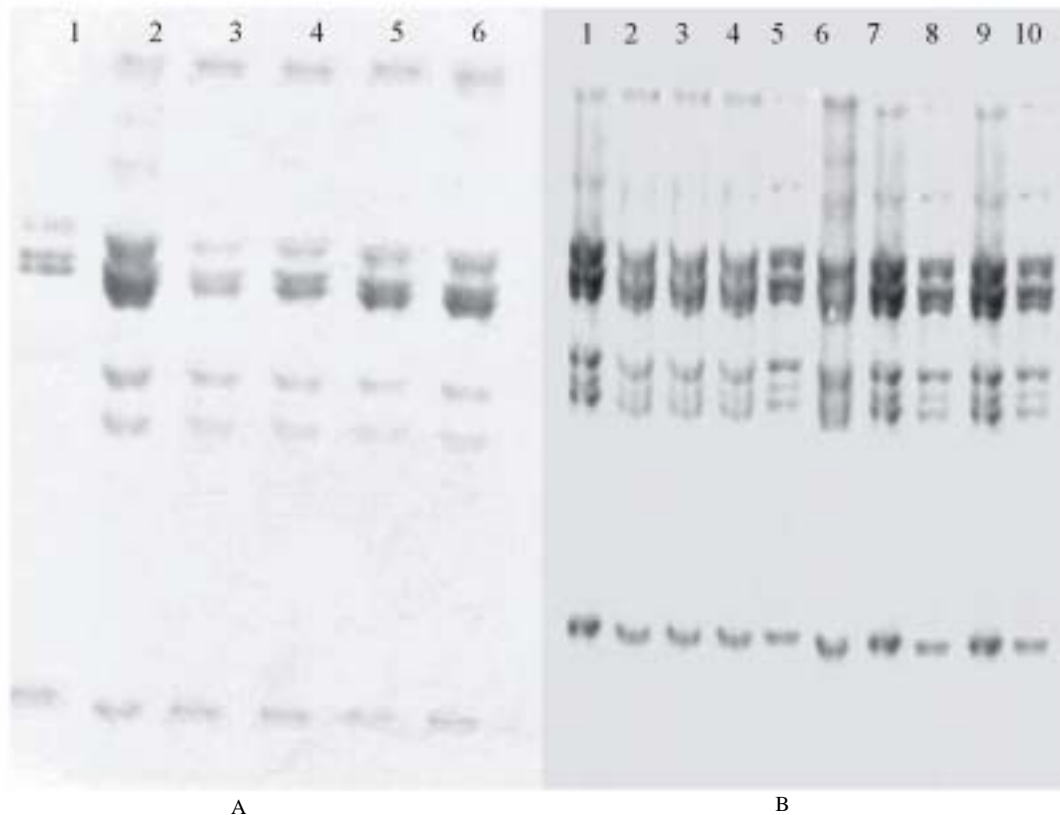
Los cultivos positivos de las heces se identificaron por pruebas bioquímicas y serológicas

**TABLA 2.** Respuesta clínica y bacteriológica de los voluntarios inmunizados con las cepas atenuadas a diferentes dosis

Dosis <sup>1</sup>	Cepa	No. de voluntarios con diarrea <sup>2</sup> > 200 g/No. total (%)	Episodio por voluntarios con diarrea	Grado	Media del peso promedio (g)	No. de voluntarios con cultivos positivos en las heces/No. total	MG <sup>3</sup> de las UFC/g de los cultivos positivos
$10^7$	638	0/7 (0)	0	-	-	3/7	$7,10 \times 10$
	1 333	0/5 (0)	0	-	-	5/5	$7,63 \times 10$
$10^8$	638	1/6 (16)	1	III	680	6/6	$3,63 \times 10^4$
	1 333	0/5 (0)	0	-	-	5/5	$2,88 \times 10^4$
$10^9$	81	6/12 (50)	(8, 11, 2, 1, 2, 5)	III	200	12/12	$1,26 \times 10^5$
	638	2/38 (5,2)	(1, 2)	III	275	29/38	$1,90 \times 10^2$
	638T	0/9 (0)	0	-	-	3/9	$1,63 \times 10$

<sup>1</sup> Dosis administradas expresadas en UFC; <sup>2</sup> Diarrea reactiva: deposiciones de consistencia grado 3-5, que totalicen 200 g o más en 48 h o una de al menos 300 g; <sup>3</sup> MG: media geométrica. Ninguno de los placebos con la dosis  $10^7$  y  $10^8$  presentó signos ni síntomas adversos encontrados en los voluntarios inoculados. Un placebo del ensayo clínico donde se inoculó la dosis  $10^9$  presentó una diarrea grado III, 180 g pero no se detectó cultivo positivo en las heces.





Líneas de A: 1 cepa 638 del lote de siembra de trabajo, 2-6 cepas excretadas por voluntarios inmunizados con la cepa 638.  
Líneas de B: 1 cepa 1333 del lote de siembra de trabajo, 2-11 cepas excretadas por voluntarios inmunizados con la cepa 1333.

**Fig. 2.** Patrones de PLFR de las cepas aisladas de voluntarios inmunizados con las cepas 638 (A) y 1333 (B).

como *V. cholerae* O1 de los serogrupos Ogawa o Inaba y las cepas de segunda y tercera generación se identificaron, además, por la presencia del marcador vacunal (la enzima endogluconasa A). Las cepas evaluadas no se aislaron en las heces de los voluntarios que recibieron placebo ni tampoco después de la administración de la doxiciclina.

Con la prueba de RCP se corroboró que las cepas atenuadas después de pasar por el tracto gastrointestinal de los voluntarios, no adquirieron los genes de la toxina colérica porque no se identificó el gen de la subunidad A de dicha toxina en ninguna de las cepas aisladas de heces.

Todos los patrones de PLFR de las cepas aisladas de los voluntarios resultaron iguales al de las cepas 638 y 1333 antes de ser administrada a los voluntarios. No se observaron variaciones en el polimorfismo del cromosoma de las cepas aisladas de voluntarios como consecuencia de su paso a través del tracto gastrointestinal (fig. 2).

En la tabla 3 se muestran los resultados de inmunogenicidad en voluntarios después de 14 d de inmunizados, con dosis diferentes de las cepas atenuadas 81, 638, 638T y 1333.

En cuanto a los valores de TMG de anticuerpos vibriocidas e IgA anti-LPS por ELISA, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas atenuadas 81, 638 y 1333, independientemente de la dosis administrada. Sí se encontraron diferencias significativas entre los vacunados y placebos, así como entre 638T y sus cepas parentales 81 y 638 ( $p=0,02$  y  $p=0,03$  respectivamente). Los voluntarios que cumplieron el criterio de seroconversión alcanzaron relativamente altos títulos de anticuerpos vibriocidas ( $> 640$ ), excepto para la cepa 638 en la dosis más baja ( $10^7$ ) y la cepa 638T ( $10^9$ ) cuyos valores alcanzados fueron 390,1 y 74,1 respectivamente y un porcentaje de seroconversión de 57,1 y 44,4, respectivamente.

**TABLA 3.** Respuesta serológica de voluntarios inmunizados con las cepas 81, 638, 638T y 1333 a diferentes dosis de UFC/mL

Dosis <sup>1</sup>	Cepas	TMG <sup>2</sup> de los anticuerpos vibriocidas			TMG de IgA anti-LPS		
		Antes de inocular la cepa	14 d después	% de seroconversión	Antes de inocular la cepa	14 d después	% de seroconversión
10 <sup>7</sup>	638	36,2	390,1	57,1	0,3	2,8	57,1
	1 333	17,4	1 940,1	100,0	0,2	1,5	80,0
10 <sup>8</sup>	638	31,8	640,0	83,3	0,2	2,6	100,0
	1 333	11,5	2 940,7	100,0	0,2	1,6	80,0
10 <sup>9</sup>	81	15,0	2 281,0	100,0	0,2	1,2	66,7
	638	28,8	1 211,8	81,6	0,2	1,5	73,7
	638T	11,6	74,1	44,4	0,2	0,3	0,0

## DISCUSIÓN

Las pruebas utilizadas en este trabajo fueron suficientes y adecuadas para confirmar la identidad hasta género y especie de los candidatos vacunales y por lo tanto, no fue necesario realizar una caracterización más completa del microorganismo con pruebas bioquímicas adicionales, así como la utilización de otras recomendadas para la identificación de *V. cholerae*.

Al MET se observó que todas las cepas atenuadas presentaban flagelo polar característico de cepas de *V. cholerae*. La estructura flagelar de la bacteria combinada con una respuesta quimiotáctica puede aumentar la probabilidad de interacciones con regiones específicas de la mucosa intestinal y pudiera ayudar a la resistencia de eliminación de la bacteria por la peristalsis, además de que la estructura flagelar contiene sitios involucrados en la adherencia.<sup>7</sup>

A pesar de observarse el flagelo en todas las cepas, no todas fueron móviles. La cepa del serogrupo O139 (L911) resultó no móvil por pruebas microbiológicas, este fenotipo no impediría su selección como candidato vacunal porque las cepas no móviles Perú 15 y Bengal 15 resultaron no reactivas, inmunogénicas y protectoras cuando se probaron en ensayos clínicos con voluntarios sanos.<sup>24,25</sup>

Las cepas atenuadas del serogrupo O139 poseen una cápsula polisacárida, similar al serogrupo no-O1, lo que la diferencia del O1. Se ha comprobado que las cepas O139 capsuladas colonizan mejor y que el polisacárido de la cápsula, al igual que el LPS son estructuras inmunogénicas.<sup>26</sup> Otros autores señalan que esta cápsula

es la que confiere a las cepas O139 más resistencia a la lisis mediada por anticuerpo y complemento y le permite a este serogrupo producir bacteremia.<sup>24</sup>

La prueba de identificación del gen reportero *celA* como marcador vacunal permitió identificar a las cepas atenuadas de segunda y tercera generación. Este gen reportero que codifica la actividad  $\beta$  endogluconasa,<sup>1-4</sup> que no está presente en otras bacterias entéricas, se puede detectar fácilmente en agar LB con carboximetilcelulosa teñido con rojo congo,<sup>9</sup> siendo una prueba rápida, útil, simple y sensible. Al igual que la cepa atenuada vacunal licenciada, CVD 103 Hg-R, que tiene como marcador vacunal el gen de resistencia al mercurio, estos candidatos vacunales de segunda y tercera generación tienen en el nivel cromosómico un marcador que permite diferenciarlos de otros vibrios y otras cepas entéricas.<sup>9</sup>

La prueba de RCP fue apropiada para corroborar la seguridad genética de cepas atenuadas candidatas a vacuna. Esta prueba tiene el potencial de ser no solo más rápida, sino también más específica y sensible que las establecidas para el diagnóstico de la TC.

Todas las cepas candidatas a vacuna oral contra cólera fueron sensibles a los antibacterianos actualmente recomendados por la OMS para el tratamiento del cólera, así como para otras drogas de uso común como la ciprofloxacina que es también eficaz contra el cólera y trimetoprim-sulfametoxazol (excepto las cepas del serogrupo O139).

En este trabajo se utilizó por primera vez el sistema DIRAMIC 10,<sup>11</sup> para la determinación del patrón de susceptibilidad de *V. cholerae* frente a diferentes antibacterianos. Este sistema calcula el

índice de inhibición que cada antibacteriano es capaz de producir, permitiendo hacer el diagnóstico en solo 4 h y tiene una correspondencia con el método de Bauer-Kirby de 84, 65 % y puede detectar eficazmente en 4 h, 92 % de los antibacterianos sensibles por el método Bauer-Kirby.<sup>11</sup>

Para estudiar la infección de *V. cholerae* se han desarrollado diversos modelos animales, algunos de los cuales han proporcionado información relevante de la enfermedad humana, a pesar de las limitaciones existentes, dadas porque la infección natural con *V. cholerae* no ocurre en animales y que hasta el momento no se ha descrito ningún modelo animal que reproduzca los signos y síntomas de la enfermedad.<sup>12,16</sup>

Las pruebas biológicas permitieron esclarecer, que las cepas modificadas genéticamente de *V. cholerae* cumplían con los criterios de atenuación, seguridad e inmunogenicidad (excepto las cepas 413 y L911), para ser probadas en voluntarios. La cepa 413 no fue seleccionada porque además de no poseer marcador vacunal que permite diferenciarla de otras cepas de *V. cholerae*, indujo más bajos títulos de anticuerpos vibriocida que el resto de las cepas en las muestras de sueros, aunque indujo anticuerpos IgG. El fenotipo de bacilo recto alargado y no móvil de la cepa L911 a diferencia de su cepa parental, no inhibió su capacidad de colonización en el modelo del ratón neonato, pero sí su capacidad de inducir anticuerpos vibriocidas e IgG en el suero de conejos inoculados por el modelo de inoculación intradudenal. Por esta razón esta cepa no fue seleccionada como candidato vacunal para inmunizar voluntarios.

De los resultados anteriores se seleccionaron las cepas de segunda generación 638 y 1333, y la de tercera generación 638T como candidatas para ensayos clínicos, porque además de cumplir todos los criterios de prototipos vacunales, al igual que la mayoría de las cepas, se diferencian de las de primera generación por poseer un marcador vacunal que las distingue de cualquier vibrio o bacteria entérica.

Los ensayos clínicos relacionados con el cólera, han evaluado fundamentalmente la reactividad e inmunogenicidad de las cepas atenuadas, así como la protección de voluntarios vacunados frente a un reto con cepas virulentas.<sup>27</sup>

La cepa 81 de primera generación modificada genéticamente, que mostró una marcada atenuación en modelos animales, no se seleccionó como candidato vacunal por no tener el marcador vacunal, pero si se evaluó en voluntarios para compararla con las cepas de segunda y tercera generación obtenidas a partir de esta, la cual no provocó diarrea severa cuando se evaluó en voluntarios sanos, sin embargo mantuvo una reactividad residual en cuanto al número de episodios de diarrea, y al peso promedio de las deposiciones. De los voluntarios, 3 padecieron diarrea reactiva grado III con más de 5 deposiciones.

La cepa 81 se consideró inaceptable como candidata vacunal por su reactividad, aunque provocó una potente respuesta vibriocida; mientras que 638 resultó no reactiva e inmunogénica en voluntarios, a pesar de que la única diferencia entre estas cepas radica en la inserción del gen *celA* en el sitio del gen *hap*. Una hipótesis que justifique la reactividad de cepas atenuadas CTXf de *V. cholerae* ha sido la síntesis de otros factores de virulencia no completamente identificados.<sup>22</sup> Es posible que HAP sea uno de los que contribuya a la reactividad de cepas atenuadas, como la 81.

Las cepas 638 y 1333, cuando se evaluaron en ensayos clínicos, fueron consideradas no reactivas y mantuvieron la inmunogenicidad mostrada en animales en las diferentes dosis evaluadas, con excepción de la cepa 638 a la dosis de  $10^7$ , en la que el porcentaje de seroconversión fue significativamente más bajo.

Las cepas 638 y 1333 fueron recuperadas de voluntarios inoculados, indicando que colonizan apropiadamente el intestino delgado humano. Además, no adquirieron los genes de la subunidad A de la TC y sus cromosomas se mantuvieron estables al pasar por el tracto gastrointestinal como se demostró con las pruebas de RCP y PLFR, así como que se mantuvo estable el gen reportero *celA* durante este proceso.

La cepa de tercera generación 638T se derivó a partir de la cepa 638, incluyendo dentro de sus modificaciones una auxotrofia dependiente a la timidina.<sup>28</sup> Esta cepa, a pesar de que colonizó de forma adecuada en el modelo del ratón neonato y fue inmunogénica en conejos, fue pobremente

excretada (por humanos) y muy poco inmunogénica en ensayos en humanos, lo que la hizo no aceptable como candidato vacunal.

Hoy día se dispone solamente de una cepa atenuada licenciada como vacuna oral contra el cólera, denominada CVD 103 HgR (*V. cholerae* O1 clásico Inaba), muy atractiva por ser bien tolerada y por conferir una protección en estudios de reto en humanos de 60 % con cepas del biotipo El Tor y 100 % contra el clásico.<sup>27</sup> Sin embargo, se carece de una cepa con estas características pertenecientes al biotipo El Tor, que es el predominante en el nivel mundial.<sup>27</sup>

En este trabajo se demostró la atenuación y estabilidad genética de 2 cepas candidatas vacunales del biotipo El Tor 638 y 1333. Como resultado de estos ensayos y de las pruebas clínicas realizadas se han podido catalogar como seguras e inmunogénicas y promisorios candidatos vacunales contra el cólera El Tor.

#### AGRADECIMIENTOS

A la colaboración a los investigadores y técnicos del Laboratorio Clínico y de Microbiología y a las enfermeras de la Subdirección de Atención Médica del Instituto "Pedro Kour" (IPK), por su contribución en los ensayos clínicos. A los doctores Jorge Menéndez y Juan Francisco Infante, a la técnica Gloria Roura y al licenciado Rafael Fando.

#### Selection of attenuated *Vibrio cholerae* strains to obtain oral attenuated candidate vaccines against cholera

#### SUMMARY

A methodology was developed for the selection of genetically modified strains of *Vibrio cholerae* O1 and O139 aimed at obtaining oral attenuated candidate vaccines against cholera. The modified strains underwent microbiological characterization, bacterial susceptibility and different biological tests (mean lethal dose, colonizing capacity, adherence in mice, ligated intestine and intraduodenal inoculation in rabbits as virulence and potency tests). The strains 81, 638, 638T and 1333 were evaluated in clinical trials to determine their reactogenicity and immunogenicity. All the strains were sensitive to tetracycline and doxycycline. They showed their attenuation and immunogenicity in animal models. The strains 638 and 1333 proved to be immunogenic and non reactogenic in volunteers.

**Key words:** Attenuated strains of *Vibrio cholerae*, candidate vaccines, animal models and clinical trials.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bajaj JK, Baradker VP, Joshi SG, Damle AS, Kayararte RP, Deshmukh AB. Epidemiology of cholera-a five year study. J Commun Dis 2001;33(4):282-5.
2. CDC/NCID.OPS. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. En. Programa especial de publicaciones, 1994.
3. Davis BM, Waldor MK. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. Curr Opin Microbiol 2003;6(1):35-42.
4. Jertborn M. Immune response in human after oral cholera vaccination. Res Microbiol 1987;140:456-63.
5. Levine MM, Tacket CO. Recombinant live cholera vaccines. En: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O, eds. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular and global perspectives. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994. p. 395-414.
6. García L, Benítez J. Hacia el desarrollo de una vacuna eficaz contra el cólera. VaccaMonitor 1996;5(2):2-6.
7. Richardson SH. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae* analysis of motility mutants in three animal models. Infect Immun 1991;59:2727-36.
8. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 1963;17:208.
9. Robert A, Silva A, Benítez JA, Rodríguez BL, Fando R, Campos J. Taggin a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin protease gene using a novel reporter enzyme, *Clostridium thermocellum* endoglucanase A. Vaccine 1996;14:1517-22.
10. Fields PI, Popovic K, Wachsmuth K, Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. J Clin Microbiol 1992;30:2118-21.
11. Contreras R, Marrero ML, Roura G, Barranco N, González I. Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana por el sistema DIRAMIC. Resultados preliminares. Biotech Aplíc 1991;8(1):64-9.
12. Ujiye A, Nakatomi M, Utsunomiya A, Mitsui K. Experimental cholera mice. First report on the oral infection. Trop Med 1968;10:65-71.
13. Reed LJ, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg 1938;27:493-7.
14. Cedré B, García H, Fariñas M, Talavera A, Infante JF. Intestinal colonization of the infant mouse model by attenuated and *Vibrio cholerae* strain. Arch Med Res 1998;29(3):231-4.
15. Vacca LL. Laboratory Manual of histochemistry. New York:Raven Press Books; 1985.p. 27-32, p.118-9, p.541-9.
16. De SN, Chatterjee DN. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. J Pathol Bacteriol 1953;66:559-63.
17. García H, García L, Oliva R, Pérez JL, Cedré B, Domínguez R, Benítez J. 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. Rev Cubana Med Trop 1998;50(2):115-9.
18. García L, Oliva R, Cedré B, Valmaseda T, García H, Talavera A. Intraduodenal inoculation of adult rabbit for evaluating the immunogenicity of genetically attenuated *Vibrio cholerae* strains. Lab An Sc 1998;48(6):538-41.
19. Benenson AS, Saad A, Mosley K. The vibriocidal antibody response of cholera patients determined by a microtechnique. Bull WHO 1968;38:277-85.

20. Cedré B, García HM, García LG, Talavera A. Estandarización y evaluación del ensayo vibriocida modificado. *Rev Cubana Med Trop* 1999;51(3):156-9.
21. Pino Y, Valmaseda T, Medina Y, Cedré B, Año G, García H. Validación de un ensayo de ELISA para la determinación de anticuerpos anti-LPS de *Vibrio cholerae*. *VacciMonitor* 2003;12(1):10.
22. Benítez JA, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B. Preliminary assesment of the safety and immunogenicity of a new CTX-negative, haemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect Immun* 1999;67:539.
23. Popovic T, Bopp CH, Olsvik O, Wachsmuth K. Epidemiologic application of standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* O1. *J Clin Microbiol* 1993;31(9):2472-82.
24. Cohen MB, Giannella RA, Bean J, Taylor DN, Parker S, Hooper A. Randomized, controlled human challenge study of the safety, immunogenicity and protective efficacy of a single dose of Perú-15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infect Immun* 2002;70(4):1965-70.
25. Cosler TS, Killing KP, Waldar MK. Safety, immunogenicity and efficacy of live attenuated *Vibrio cholerae* O139 vaccine prototype. *Lancet* 1995;346:945-9.
26. Año G, García H, Talavera A, Valmaseda T, Fando R, Cedré B. Caracterización microbiológica de cepas de *Vibrio cholerae* O139. *VacciMonitor* 1998;7(8):2-6.
27. World Health Organization. *Weekly Epidemiol Record* 2001;76(16):117-24.
28. Valle E, Ledón T, Cedré B, Campos J, Valmaseda T, Rodríguez B. Construction and characterization of a non proliferative El Tor Ogawa vaccine candidate derived from strain 638. *Infect Immun* 2000;68:6411-8.

Recibido: 10 de noviembre de 2004. Aprobado: 16 de mayo de 2005.

Lic. *Hilda García Sánchez*. Instituto Finlay. Ave. 27 No. 19805, La Coronela, La Lisa. Ciudad de la Habana, Cuba. AP 16017, CP 11600, Teléf: 53(7)2716557, 2731218; Fax: 53(7)2086075. Coreo electrónico: hgarcia@finlay.edu.cu; hgarcia@yahoo.com