

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Ensayo clínico de reto, para evaluar una cepa candidata a vacuna contra el cólera*

Manuel Díaz Jidy,¹ Antonio Pérez Rodríguez,² Roberto Fernández Llanes,³ Laura Bravo Fariñas,⁴ Hilda García Sánchez,⁵ Rodrigo Valera Fernández,⁶ Luís García Imia,⁷ Rafael Fando Calzada⁸ y Jorge Menéndez Hernández⁹

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: la cepa atenuada 638 *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Ogawa, ha demostrado ser bien tolerada e inmunogénica por vía oral en estudios realizados en voluntarios sanos. **OBJETIVO:** se evaluó la protección conferida contra el cólera, en un ensayo clínico de reto, para el escalado tecnológico y farmacéutico de este candidato vacunal como ingrediente activo a escala industrial. **MÉTODOS:** en el estudio participaron 21 voluntarios sanos, 12 de ellos recibieron el candidato vacunal, y 9 ingirieron un placebo; 28 d después, todos recibieron una dosis infectante de una cepa virulenta de *V.cholerae*. **RESULTADOS:** la diarrea se registró en 7 de los 9 placebos, mientras que ninguno de los voluntarios vacunados presentó diarrea. Los voluntarios placebos del grupo sanguíneo O, tuvieron diarreas con mayor frecuencia e intensidad. Todos los voluntarios en el grupo placebo excretaron *V. cholerae* mientras que solo 3 (25 %) de los 12 vacunados la excretaron. **CONCLUSIONES:** en este modelo de ensayo de reto, la cepa 638 demostró proteger contra la diarrea producida por una cepa virulenta de *V. cholerae*.

Palabras clave: reto, cólera, excreción, grupo sanguíneo O.

INTRODUCCIÓN

El número de casos y países afectados por el cólera, aumentaron en 2008, comparados con 2007. La Organización Mundial de la Salud registró 190 130 casos y 5 134 defunciones, con un porcentaje de casos fallecidos de 2,7 %.

Esto representó un aumento de 7,6 % en el número de casos y 27 % de los fallecidos.¹ Hasta el momento actual no existe una vacuna totalmente efectiva contra el cólera.²

Desde 1992, en Cuba se han venido realizando grandes esfuerzos en el desarrollo de una vacuna contra el cólera. Como resultado de este

¹ Especialista de II Grado en Medicina Interna. Investigador Auxiliar. Profesor Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Ciudad de La Habana, Cuba.

² Doctor en Ciencias de la Salud. Especialista de II Grado en Epidemiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Ciudad de La Habana, Cuba.

³ Especialista de II Grado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Profesor Auxiliar. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Ciudad de La Habana, Cuba.

⁴ Doctora en Ciencias Biológicas. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Ciudad de La Habana, Cuba.

⁵ Doctora en Ciencias de la Salud. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁶ Especialista de II Grado en Microbiología. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁷ Doctor en Ciencias de La Salud. Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁸ Doctor en Ciencias Básicas. División de Biotecnología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁹ Especialista de II Grado en Epidemiología. Departamento de Ensayos Clínicos del Instituto Finlay. Ciudad de La Habana, Cuba.

* Código del Registro Público Cubano de Ensayos Clínicos: RPCEC00000072. Número de referencia del CEDMED: 438/06.004.03B.

proyecto, se han evaluado más de 30 cepas candidatas vacunales vivas atenuadas para inmunización oral. Estas cepas sufrieron la eliminación de los genes que codifican para la toxina de cólera del cromosoma bacteriano, lo cual ocasiona la atenuación de la virulencia de la bacteria y elimina su capacidad para producir el cólera clínico.^{3,4}

La cepa atenuada 638 de *Vibrio cholerae* procede de una segunda generación de cepas modificadas genéticamente, derivada de la cepa virulenta C7558 *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa, aislada durante la epidemia del Perú en 1991, la cual posee el serogrupo, biotipo y serotipo, más expandidos actualmente en el mundo.⁵ A esta cepa se le retiraron los genes productores de la toxina colérica y se le adicionó un marcador genético,⁶ por lo que fue seleccionada como candidata vacunal, al ser inmunogénica y poco reactogénica en los estudios clínicos realizados previamente en 42 voluntarios sanos.^{7,8} Los estudios clínicos de reto para el cólera son difíciles y costosos, por no existir un modelo animal satisfactorio que reproduzca por sí solo todos los síntomas y signos de la enfermedad, por lo cual se deben realizar en un número muy reducido de voluntarios.

Como se sabe, la tasa de mortalidad del cólera es prácticamente nula en voluntarios adecuadamente atendidos y experimentos de este tipo ya se habían realizado por otros investigadores sin mayores complicaciones.⁹⁻¹³

Al disponer de una cepa candidata vacunal, se hizo un estudio para evaluar la protección que esta confería contra la colonización de *V. cholerae* y las diarreas que produce, antes de su escalado tecnológico y farmacéutico, como ingrediente farmacéutico activo,¹⁴ siguiendo los principios de las buenas prácticas clínicas.^{15,16}

Como complemento, se evaluó la mayor susceptibilidad de los voluntarios del grupo placebo del grupo O a tener diarreas coléricas.

MÉTODOS

Se realizó un estudio de reto controlado, aleatorizado, a doble ciegas, con una cepa virulenta de *V. cholerae* para determinar la eficacia protectora de la cepa atenuada 638 administrada por vía oral, en voluntarios adultos sanos del sexo masculino.

Se confeccionó el protocolo y este cumplió estrictamente con todos los principios de la ética médica y científica, de las reglas internacionales de este tipo de estudio de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas Clínicas¹⁷ y la Declaración de Helsinki de 2001.¹⁸

El protocolo se aprobó por los Comités de Ética Médica del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK), y del Centro Nacional de Seguridad Biológica (CNSB), así como por la autoridad reguladora del Ministerio de Salud Pública de Cuba, el Centro para el Control de la Calidad de los Medicamentos (CECMED).

Para la contención biológica se adaptó una sala hospitalaria del IPK para utilizarla como unidad de aislamiento para riesgos biológicos (UARB), con capacidad para 18 voluntarios, en la cual ya se habían realizado con éxito 15 ensayos desde 1997, con la finalidad de evaluar la reactogenicidad e inmunogenicidad de diferentes cepas atenuadas candidatas a vacunas contra cólera.⁷

Este ensayo clínico se realizó en el IPK en 2003, donde participaron 21 voluntarios sanos; en la primera etapa, 12 de ellos tomaron la cepa 638 *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa a una dosis de 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) dispensada en 30 mL de una solución de bicarbonato de sodio al 1,33 % y 9 del grupo placebo que ingirieron solo 30 mL de una solución de bicarbonato de sodio al 1,33 % que la hacía indistinguible de la anterior, después de 28 d a todos se les administró una dosis de 7×10^5 UFC de la cepa virulenta 3008 *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa aislada durante la epidemia de cólera en Argentina en 1992, que es estándar de reto, en el Centro de Desarrollo de Vacunas de EE. UU.

Durante 5 d posteriores al inóculo virulento se observaron, recogieron y pesaron todas las deposiciones de heces fecales, se realizaron además coprocultivos, al siguiente día, al tercero y quinto día, con el fin de identificar la excreción de *V. cholerae*.

Al quinto día de ingerida la cepa virulenta a todos los voluntarios se les administró 300 mg de doxiciclina, con el fin de esterilizar el tubo digestivo de *V. cholerae* y de esta forma poder detener la excreción de la cepa virulenta al medio ambiente. Los voluntarios solo fueron dados de alta hospitalaria, al tener tres coprocultivos seriados

negativos de *V. cholerae*, para evitar la diseminación de la cepa en la comunidad.

Procesamiento estadístico

Se calcularon frecuencias absolutas y relativas de acuerdo con los objetivos previstos.

Se estimó el valor del riesgo relativo (RR) como medida de asociación de acuerdo con las hipótesis planteadas, es decir, para medir protección el RR debe ser menor que 1 y para evaluar la susceptibilidad al cólera del grupo sanguíneo O entre los placebos el RR sería mayor que 1. Es necesario destacar que los estudios de reto se realizan con un grupo reducido de voluntarios, por lo que no siempre se encuentran valores de RR y en otros los valores son pequeños. Se estimó el intervalo de confianza al 95 % (IC 95 %), se calculó además el valor de p y se consideraron significativos los valores inferiores a 0,05.

La información se procesó en una base datos en el sistema Microsoft Excel. El cálculo de las medidas utilizadas en el estudio analítico se realizó en Epi Info versión 6.0.

RESULTADOS

En este ensayo los voluntarios vacunados con la cepa candidata vacunal 638, *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa, así como los voluntarios del grupo placebo fueron retados con la cepa virulenta

3008 del serogrupo biotipo y serotipo homóloga. Se encontraron los resultados que aparecen a continuación.

Ninguno de los 12 voluntarios previamente inmunizados presentó diarreas, ni otros síntomas clínicos asociados al cólera (tabla 1).

Se observó también que 7 (77 %) de los 9 voluntarios del grupo placebo, presentaron diarreas con un promedio de 14 deposiciones durante el estudio, un rango entre 3 y 34 diarreas. El volumen total de deposiciones fue en promedio de 2 231 g, que oscila en un rango de 330 a 5 731 g.

El voluntario que presentó el mayor volumen de deposiciones diarreicas fue necesario anticiparle la administración de la doxiciclina para acelerar su mejoría clínica y evitar complicaciones.

En el ensayo de reto, con la cepa 638, los tres voluntarios no vacunados del grupo sanguíneo O presentaron deposiciones diarreicas con intensidad variable. Los del grupo sanguíneo O, presentaron las diarreas más voluminosas, una catalogada como severa, otra moderada y un voluntario presentó diarreas ligeras, pero fue más voluminosa que las diarreas ligeras presentadas por el grupo sanguíneo no O (tabla 2).

Al exponer los voluntarios a una cepa virulenta de *V. cholerae* y evaluar su excreción en las heces fecales, como expresión de colonización se encontró que de los 12 voluntarios vacunados 28 d antes con la cepa 638, solo 3 (25 %) excretaron en una ocasión y los 9 (100 %) de los no vacunados, excretaron tres en una ocasión y seis en dos ocasiones o más (tabla 3).

TABLA 1. Respuesta al reto de voluntarios vacunados y no vacunados en relación con el volumen y número de las diarreas

Voluntarios	No.	Diarreas	Volumen	Número de deposiciones
Vacunados	12	0	-	-
No vacunados	9	7 (77,7 %)	2 231 g (330-5 731)	14 (3-34)

TABLA 2. Respuesta al reto de los voluntarios no vacunados del grupo sanguíneo O y grupo no O, en relación con la intensidad de las diarreas

Voluntarios	No.	Con diarreas	Ligeras	Moderadas	Severas
Grupo O	3	3 (100 %)	1	1	1
Grupo no O	6	4 (67 %)	4	0	0

TABLA 3. Comparación de la excreción de la cepa virulenta entre los voluntarios vacunados y los del grupo placebo

Voluntarios	No.	Excreción	1 coprocultivo	2 coprocultivos o más
Vacunados	12	3 (25 %)	3	0
Placebos	9	9 (100 %)	3 (33,4 %)	6 (66,4 %)

DISCUSIÓN

Se demostró que 100 % de los voluntarios inmunizados con la cepa candidata vacunal 638, no presentaron ni diarreas ni otros síntomas, por lo que el RR no pudo ser estimado. Ello evidenció una total protección contra el cólera.

Se comparó el presente estudio con el realizado por *Tacket* y otros,¹⁹ porque utilizó la cepa vacunal atenuada CVD111 del mismo serogrupo, biotipo y serotipo que la cepa candidata a vacuna 638. Los voluntarios participantes fueron retados en ambos estudios con la cepa virulenta 3008, del serogrupo, biotipo y serotipo homólogo, administrada a la misma dosis.

En el trabajo de *Tacket* reportó 83,3 % de protección contra la diarrea, resultados que fueron inferiores al alcanzado en Cuba con la cepa candidata vacunal 638 donde se obtuvo 100 % de protección. Los voluntarios del grupo placebo retados por *Tacket*, 87,5 % presentaron diarreas con un volumen medio de 2 534 g, en un rango de (984-7 703) y una media del número de deposiciones diarreicas por voluntario de 14. En un rango de 6 a 46, en nuestro estudio los resultados obtenidos fueron similares, donde 77,7 % de los voluntarios del grupo placebo presentaron diarreas con un volumen medio de 2 231 g, que oscila en un rango de 330 a 5 731 con una media de 14 deposiciones por voluntario, en un rango que fluctuó entre 3 y 34 deposiciones diarreicas.

Estos resultados evidencian que los voluntarios cubanos del grupo placebo tuvieron, igual capacidad para infectarse con el cólera, al exponerlo a la cepa virulenta 3008 que los voluntarios estadounidenses, en el estudio de *Tacked*.

Otros autores han realizado ensayos clínicos de reto. *Levine*⁹ en un estudio constituido por 4 grupos diferentes de voluntarios, en 3 de ellos utilizó la cepa vacunal oral CVD 103 procedente de la cepa clásica Inaba 596B y sus resultados

de protección contra la diarrea, fueron de 88, 82 y 67 %, respectivamente, en el cuarto grupo utilizó la vacuna oral de células vivas, CVD 103 HgR, derivada de la cepa 569 B de *V. cholerae* O1 biotipo clásico, serotipo Inaba la cual alcanzó una protección contra la diarrea de un 62 %. Esta última cepa fue manipulada genéticamente para suprimir el gen que codifica la subunidad A de la enterotoxina colérica, a la vez que mantiene la subunidad B, tiene además la inserción de un marcador de resistencia al mercurio.

En otros estudios de reto¹² realizados con el fin de determinar la duración de la protección de la cepa vacunal CVD 103 HgR, un grupo de voluntarios fueron retados con la cepa patógena *V. cholerae* homóloga a los 8 d y otro a los 6 meses de ser vacunados donde obtuvieron 100 % de protección contra la diarrea, pero es de señalar que la cepa utilizada no se corresponde con la cepa circulante en estos momentos, por lo que sus resultados deben ser considerados con cautela.

*Kenner*²⁰ realizó un ensayo de reto con la cepa vacunal Peru-15, derivada de la cepa C6709 O1 El Tor Inaba y la retó con una cepa homóloga, con resultados de solo 60 % de protección contra la diarrea.

*Cohen*²¹ hizo un estudio de reto en voluntarios con la cepa vacunal Peru-15 el Tor Inaba; 3 meses después fue retada con cepa virulenta *V. cholerae* O1 El Tor Inaba del serogrupo, biotipo y serotipo homóloga, con 96 % de protección.

Estos otros estudios tienen la desventaja que utilizaron cepas no predominantes de esta séptima pandemia. La cepa 638 tiene la ventaja de pertenecer al serogrupo, biotipo y serotipo más expandidos hoy en el mundo.⁵

En el ensayo de reto, con la cepa 638, los tres voluntarios no vacunados del grupo sanguíneo O presentaron deposiciones diarreicas con intensidad variable. Se encontró un RR= 1,5 (IC 95 %: 0,85-2,64), es decir, una ligera asociación del gru-

po sanguíneo O con la ocurrencia de diarreas dentro del grupo placebo. Este resultado no fue estadísticamente significativo ($p=0,2568$) quizá por el poco número de voluntarios incluidos en el estudio.

En la literatura mundial está establecido, sin conocerse la causa exacta, que las personas del grupo sanguíneo O tienen mayor probabilidad de padecer la enfermedad clínica y presentar las formas más graves,^{22,23} tal como sucedió en nuestro experimento.

En su estudio de reto *Tacket*¹⁹ reportó, que de los 18 voluntarios anteriormente protegidos con la cepa CVD111, los 3 que presentaron diarreas, aunque catalogadas como ligeras, pertenecían al grupo sanguíneo O, lo cual evidenció una mayor vulnerabilidad de voluntarios de este grupo sanguíneo.

Referente a la excreción de la cepa virulenta 3008 de *V. cholerae* por las heces como expresión de colonización, se encontró que de los 12 voluntarios inmunizados previamente con la cepa 638, excretaron 3 (25 %) y en una sola ocasión, mientras que los 9 (100 %) de los no vacunados excretaron, 3 en una ocasión y 6 en 2 ocasiones o más, como evidencia de una mayor colonización de la cepa virulenta en este último grupo.

Se encontró un $RR=0,25$ (IC 95 %: 0,09-0,67) $p=0,0005$ significativa, como indicador de protección contra la colonización entre los vacunados, al compararlo con el grupo placebo. La excreción se tomó como elemento de protección, porque la inmunidad local (mucosal) desarrollada por la primoinfección con la cepa vacunal a nivel de intestino dificulta la colonización de la cepa virulenta. Esto es coincidente con la disminución de la excreción de *V. cholerae* en el grupo vacunado durante la etapa de reto.

En el estudio *de Tacket*, de los 18 voluntarios previamente vacunados con la cepa CVD111, 12 (66,7 %) excretaron la cepa virulenta utilizada para el reto y los 8 del grupo placebo, todos excretaron. Esto expresa que la cepa 638 fue más efectiva que la cepa CVD111, para evitar la excreción, como expresión de colonización de la cepa virulenta.

Este fue el primer estudio de reto realizado en Cuba, donde se demostró que la cepa candidata vacunal 638 protegió contra por la colonización de la cepa virulenta de *V. cholerae* 3008 y por ende, contra la diarrea.

AGRADECIMIENTOS

Reciban un merecido reconocimiento, todo el personal médico y paramédico de los diferentes centros que participaron en el experimento, por su gran dedicación y empeño, muy especialmente a los voluntarios que con su altruismo hicieron posible la realización de este complicado experimento.

Challenge clinical trial for evaluation of a vaccine candidate strain against cholera

ABSTRACT

INTRODUCTION: live attenuated oral *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Ogawa strain 638 has demonstrated to be well tolerated and immunogenic when administered orally in studies carried out in healthy volunteers. OBJECTIVES: to evaluate the protection against cholera infection in a challenge clinical trial, for the technological and pharmaceutical scale-up of this vaccinal candidate as active ingredient at industrial level. METHODS: a total of 21 healthy volunteers were involved in this trial; the vaccine candidate was administered to 12 of them and the remaining nine were given the placebo. Twenty eight days later, all of them received an infective dose of a *V. cholerae* virulent strain. RESULTS: diarrheas were observed in 7 out of 9 placebos whereas not a single vaccinated volunteer showed diarrheas. More frequent and intense loose stools were found in the placebo volunteers with O-blood group. All volunteers in the placebo group excreted *V. cholerae*, but only three (25%) out of the 12 vaccinated volunteers did so. CONCLUSION: in this challenge clinical trial model, the 638 strain proved to protect people against the diarrhea caused by a virulent *V. cholerae* strain.

Key words: challenge, cholera, excretion, O blood group.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Cholera: global surveillance summary, 2008. *Wkly Epidemiol Rec.* 2009;84(31):309-14.
2. Organización Mundial de la Salud. Epidemias mundiales e impacto del cólera, noviembre 2008 [citado 4 Feb 2009]. Disponible en: <http://www.who.int/topics/cholera/impact/es/index.html>
3. Benitez JA, Silva A, Rodríguez BL, Fando R, Campos J, Robert A, et al. Genetic manipulation of *V.cholerae* for vaccine development: construction of live attenuated El Tor vaccine strains. *Arch Med Res.* 1996;27:275-83.
4. Robert, A, Silva A, Benitez JA, Rodriguez BL, Fando R, Campos J, et al. Tagging a *V.cholerae*; El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin/tease gene using a novel report enzyme, *Clostridium thermocellone* endogluconase A. *Vaccine.* 1996;14:1517-22.
5. Organización Mundial de la Salud. Cólera: nota informativa No. 107, noviembre de 2008 [citado 4 Feb 2009]. Disponible en : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/es/index.html>
6. García H, Año G, Cedré B, Balmaseda T, Maestre JL, Díaz Jidy M, et al. Selección de cepas atenuadas de *V.cholerae*

- para la obtención de candidatos vacunales atenuados orales contra cólera. *Rev Cubana Med Trop.* 2005;57:92-104.
7. Benítez JA, García LG, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, et al. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX-negative, hemagglutinin/ protease-defective. El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect Immun.*1999;67:539-45.
 8. Talavera A, Año G, García H, Moreira T, Delgado R, Riverón L, et al. Process development for Cuba cholera vaccine based on the attenuated strain *Vibrio cholerae* 638. *Vaccine.* 2006;24:3746-9.
 9. Levine MM, Kaper JB, Herrington D, Ketley J, Lososky G, Tacket CO, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD103 and CVD103HgR. *Lancet.* 1988;2:2467-70.
 10. Tacket CO, Lososky G, Nataro JP, Comstock L, Michalski J, Edelma R, et al. Initial clinical studies of CVD 112 *V. cholerae* O139 live oral vaccine: safety and efficacy against experimental challenge. *J Infect Dis.* 1995;172:883-6.
 11. Sack DA, Tacket CO, Cohen MB, Sack B, Lososky G, Shimko J, et al. Validation of a volunteer model of cholera with frozen bacteria as the challenge. *Infect Immun.*1998;66:1968-72.
 12. Tacket CO, Cohen MB, Wasserman SS, Lososky G, Livio H, Kotloff K, et al. Randomized, double-blind, multicentered trial of the efficacy of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103 HgR in preventing cholera after challenge with *V. cholerae* O1 El Tor Inaba three months after vaccination. *Infect Immun.* 1999;67:6341-5.
 13. Coster TS, Killen, KP, Waldor MK, Beattie DT, Spriggs DR, Kenner JR, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of live attenuated *V. cholerae* O139 vaccine prototype. *Lancet.* 1997;345:949-52.
 14. Reed G. Promising Phase I/II trial for Cuban vaccine candidate amidst Growing Cholera Threat. *Medic Review* (serial in Internet). 2007[cited 2009 Oct 11]. Disponible en: <http://www.medicc.org/cubahealthreports/chr-article.php?&a=1038>
 15. International ethical guidelines for biomedical research involving human subjects. Geneva: WHO; 1993.
 16. Guidelines and review procedures for research involving human subjects. Washington, D.C.: PAHO; 1995.
 17. Ros F. Ética de los ensayos clínicos. Asociación Catalana de Estudios Bioéticos. 2005. (citado 5 Jun 2009). Disponible en: <http://www.aceb.org>
 18. Bulletin of the World Health Organization. Ethical principles for medical research involving human subjects. Geneva: World Health Organization; 2001. p. 373-4.
 19. Tacket CO, Lososky G, Nataro JP, Michalski J, Kaper JB, Levine MM. Volunteer studies investigating the safety and efficacy of live oral El Tor *V.cholerae* O1 vaccine strain CVD 111. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56:533-7.
 20. Kenner JR, Coster TS, Taylor DN, Trofa AF, Barrera Oro M, Hyman T, et al. Perú-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *V. cholerae* O1. *J Infect Dis.* 1995;172:1126-9.
 21. Cohen MB, Giannella RA, Bean J, Taylor DN, Parker S, Hooper A, et al. 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;7(4):1965-70.
 22. Chaudhuri A. Cholera and blood-groups. *Lancet.* 1977;2:404.
 23. Harris JB, Khan AI, LaRocque RC, Dorer DJ, Chowdhury F, Faruque AS, et al. Blood group, immunity, and risk of infection with *Vibrio cholerae* in an area of endemic city. *Infect Immun.* 2005;73(11):7422-7.

Recibido: 18 de enero de 2010. Aprobado: 4 de marzo de 2010.
 Dr. Manuel Díaz Jidy. Instituto de Medicina Tropical. "Pedro Kourí". Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½. Marianao 13. AP 601. Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf. 2020451. Correo electrónico: jidy@ipk.sld.cu