

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Departamento de Genética

Dirección de Biotecnología

Título:

**OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE CEPAS
ATENUADAS DE *Vibrio cholerae* PARA FINES VACUNALES.**

**TESIS EN OPCIÓN AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

Autor

Lic. Rafael Fando Calzada

Tutor

Dra. Ana María Riverón

La Habana, 2004

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas hicieron posible este trabajo, entre ellos:

Boris y Javier, junto a quienes inicié esta travesía y han contribuido a mi formación y a esta tesis de forma apreciable, también Talena, la siguiente en abordar, que hizo la proteólisis junto a Cary; luego Karen y Edith, que se condujeron solas durante la larga incubación de esta tesis, después Eriel, que me ayudó con los bacteriófagos, entonces Víctor que dió su mano oportuna, Arle, que preservó las cepas, y Elsa y Juana, que mantuvieron el orden, la limpieza y el suministro de café.

Los miembros del Departamento de Bacterias Enteropatógenas y el Colectivo de Ensayos Clínicos del Instituto Finlay, en especial, Luis, Hilda, Baby, Gemma, Jorge, Rodrigo, José Luis, Rey y Tania que hicieron posible el protocolo, y la evaluación inmunológica y bacteriológica de la cepa 63_g.

Los compañeros del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, en especial, Jidy, Roberto, Danielito, Miralles, Teresita, Sara, Antonio, Vilma y las restantes enfermeras, que hicieron la evaluación en voluntarios con toda amabilidad, rigor y seriedad.

Mi tutora, la Dra Ana María Riverón, que contribuyó notablemente a mi formación, me encausó en el procesamiento estadístico y me condujo entusiasta y rigurosamente.

Lily, Roberto y Celso, que revisaron exhaustivamente el documento y lo nutrieron de oportunas sugerencias en tiempo récord, al igual que los profesores Teresita y Juan Grillo, que hicieron las oponentías de predefensa.

Carlos Gutiérrez y Blanca Hung que apoyaron este proyecto con total resolución.

Los cuarenta y cinco sujetos experimentales: JAH, LERM, LPP, AHC, TBE, JLMV, JCG, BSC, YCV, JJP, JSP, YCA, AOS, ECQ, RMC, RPW, JLC, SJSC, EMB, CRV, ALC, JIGG, RSU, MAAC, RGO, EMG, AAA, JEMF, VTA, SSR, NAM, AGM, JAV, AGP, YRL, EJH, OPV, WVS, MCZ, JVM, AMT, ARR, AVP, RJ y YSL., que manifestaron su voluntariedad y comprendieron la importancia del estudio.

David, Vallin, Anselmo, Sarracent y Miguel, que me apoyaron, me tendieron sus manos hermanas y me alentaron a concluir.

Richard Finkelstein, que donó las cepas C6706, C7258, 569B, el plasmidio pCH2, el anticuerpo policlonal dirigido contra Hap y la cepa Perú-15, que pidió a John Mekalanos. Jim Kaper, que donó el plasmidio pBB6, el pGP704 y las cepas movilizadoras. Carol O. Tacket, que donó la cepa de reto *V. cholerae* 3008.

A todos ellos, mi más sincera expresión de gratitud!

A mi esposa Liana Liz
y a los dos retoños,
Richard y Rubén.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Abs_{600 nm}: Absorbancia medida a 600 nm de longitud de onda

acfA: del inglés, *accessory colonization factor*, factor de colonización accesorio

AcM: anticuerpo monoclonal

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMP_c: del inglés *cyclic adenosin monophosphate*, monofosfato cíclico de adenosina

ANOVA: análisis de varianza

CECMED: Centro Estatal para el Control de Medicamentos

CMC: Carboximetil-celulosa

CtxA: subunidad A de la toxina colérica

CtxB: subunidad B de la toxina colérica

dNTP: del inglés *deoxynucleotide triphosphate*, trifosfato de desoxinucleótidos

EDTA: del inglés *etilendiaminotetracetic acid*, ácido etilendiamino tetraacético

ELISA, del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ensayo inmunoenzimático

H₂O-T: disolución de tween al 0.05% en agua destilada

Klenow: fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *Escherichia coli*

LPS: Lipopolisacárido

NAD: del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide*, dinucleótido de nicotinamida y adenina

PBS: del inglés *phosphate buffered saline*, disolución salina tamponada

PCR: del inglés *polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa

recA: gen codificante de la recombinasa A

rpm: revoluciones por minuto

SNK: prueba de Student-Newman-Kewls

TAE: Tampón Tris-Acetato-EDTA

UDO: unidades de densidad óptica

UFC: unidades formadoras de colonias

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	5
2.1	Microorganismos, medios de cultivo, procedimientos de microbiología y biología molecular.	5
2.2	Construcción del plasmidio suicida 1 a partir del vector pGP704 y el profago CTXΦ de <i>V. cholerae</i> 569B.....	7
2.2.1.	Detección de la actividad de los genes <i>ctxAB</i> del plasmidio suicida 1.....	7
2.2.2.	Detección de la expresión de toxina a partir de otros fragmentos del operón <i>ctxAB</i>	7
2.2.3.	Ensayos de protección a la nucleasa S1 para detectar transcritos de <i>ctxB</i> en el operón <i>ctxAB</i>	8
2.3.	Construcción del plasmidio suicida 2 a partir del vector pGP704, el gen <i>hap</i> de <i>V. cholerae</i> y el gen <i>ceiA</i> de <i>Cl. thermocellum</i>	8
2.4.	Procedimiento de obtención de CGM de generación 1 mediante la inserción del plasmidio suicida 1 al profago CTXΦ y su delección.	8
2.5.	Procedimiento de obtención de CGM de generación 2 por reemplazamiento del gen <i>hap</i> por el alelo interrumpido por <i>ceiA</i> presente en el plasmidio suicida 2.	9
2.6	Evaluación de los fenotipos de las CGM respecto a producción de toxina colérica, hemaglutinina proteasa y endoglucanasa A.....	9
2.7.	Evaluación de la pertinencia del uso de las CGM.....	10
2.7.1.	Ensayo de colonización y virulencia de las CGM en ratones lactantes.....	10
2.7.2.	Ensayo de infección de CGM con el fago CTXΦ.....	10
2.7.3.	Evaluación de caracteres de virulencia en las CGM infectadas por CTXΦ.	10
2.8.	Prueba de concepto de una CGM de generación 2 como cepa vacunal.....	11
2.9.	Análisis estadísticos.	12
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
3.1	Obtención del vector suicida 1, portador del profago CTXΦ modificado.....	13
3.1.1.	Actividad de los genes <i>ctxAB</i> presentes en el plasmidio suicida 1.	13
3.1.2.	Expresión de la toxina colérica a partir de porciones del operón <i>ctxAB</i>	14
3.1.3.	Mapeo del sitio de inicio de los transcritos específicos del gen <i>ctxB</i>	14
3.3.	Obtención de cepas de <i>V. cholerae</i> desprovistas del profago CTXΦ.	16
3.4	Obtención de cepas de <i>V. cholerae</i> que poseen el gen <i>hap</i> reemplazado por un alelo interrumpido por la inserción del gen <i>ceiA</i>	18
3.5.	Los fenotipos de las cepas genéticamente modificadas obtenidas.	19
3.6.	Pertinencia del uso de las CGM con fines vacunales.....	21
3.6.1	Virulencia de las CGM y colonización intestinal en ratones Balb/c lactantes.	21
3.6.2.	Susceptibilidad de las cepas a la infección por el fago CTXΦ El Tor.....	23
3.6.3	Caracteres de virulencia de las CGM infectadas con CTXΦ.....	24
3.7.	Resultados de la prueba de concepto de la cepa 63 ₈	25
3.8.	Consideraciones finales.....	31
4.	CONCLUSIONES.....	33
5.	RECOMENDACIONES	34
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

SÍNTESIS.

Ante la inexistencia de una vacuna contra *Vibrio cholerae* O1 de biotipo El Tor, el agente etiológico más frecuente del cólera, se construyen dos plasmidios suicidas: pAJF y pGPH6, destinados a atenuar la virulencia de cepas patógenas con fines vacunales. Al construir pAJF se descubre que en el gen *ctxA* del operón *ctxAB* del profago CTXΦ se inician transcritos codificantes de la subunidad CtxB de la toxina colérica. Luego, mediante el empleo de pAJF se deletiona el profago CTXΦ de las cepas C6706 (El Tor Inaba) y C7258 (El Tor Ogawa) y se obtienen 4₁₃, 4₁₇, 8₁, 8₂, 8₄, 8₇, y 8₈ y se demuestra que 4₁₃ y 8₁, a diferencia de C7606 y C7258, no producen toxina colérica *in vitro*, ni tienen efecto letal en ratones Balb/c lactantes. Luego, a las cepas 4₁₃ y 8₁ se les reemplaza el gen codificante de la hemaglutinina proteasa por un alelo interrumpido por el gen *celA* (endoglucanasa A) de *Clostridium thermocellum* proveniente del plasmidio pGPH6 y se demuestra que las cepas resultantes 63₈, 63₁ y 133₃ no producen Hap y sintetizan endoglucanasa A activa, lo que permite distinguir las mediante un ensayo simple. Se demuestra que la expresión de *celA* y la inactivación de *hap* no perjudican la atenuación ni la colonización intestinal de las cepas en ratones Balb/c lactantes y se concluye que *celA* es un gen marcador apropiado para *V. cholerae* y *hap* un locus útil donde insertarlo. Se identifica una mutación colateral en el gen *toxR* de la cepa 63₈ que limita la expresión de la fimbria TCP y atenúa la colonización y se encuentra que 63₈ solo se infecta con el bacteriófago CTXΦ tras colonizar el intestino, a diferencia de 8₁, 63₁, 4₁₃ y 133₃ que son susceptibles *in vitro*. Se demuestra que tras infectarse con CTXΦ, las cepas 8₁, 63₁, 4₁₃ y 133₃ producen la toxina colérica y tienen efecto letal en ratones lactantes, a diferencia de 63₈ que permanece significativamente atenuada. Se demuestra además que 63₈ no se infecta con el fago VGJΦ, un mediador alternativo de la transmisión de CTXΦ y se concluye que 63₈ es más segura que las restantes. Se pasa entonces a la prueba de concepto de 63₈ en voluntarios, donde se obtiene que una dosis oral de 10⁹ UFC induce síntomas ligeros a una frecuencia indistinguible del placebo, despierta una respuesta sérica de anticuerpos inhibidores del crecimiento bacteriano y protege a un grupo reducido de voluntarios de contraer el cólera al retarlos con la cepa patogénica 3008 (El Tor Ogawa). Se concluye que se debe avanzar a la fase de desarrollo tecnológico de 63₈ y a la evaluación clínica de lotes producidos cumpliendo las buenas prácticas de manufactura.

AUTOBIBLIOGRAFÍA

1. García L, Díaz Jidy M, García H, Rodríguez BL, Fernández R, Año G, Cedré B, Valmaseda T, Suzarte E, Ramírez M, Pino Y, Campos J, Menéndez J, Varela R, González D, González I, Pérez O, Serrano T, Lastre M, Miralles F, Del Campo J, Maestre JL, Pérez JL, Talavera A, Pérez A, Ledón T, Marrero K y Fando R. The vaccine candidate *V. Cholerae* 638 is protective against cholera in healthy volunteers. Enviada a Infection and Immunity (2004).
2. Benítez JA, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, Pérez A, Campos J, Rodríguez BL, Pérez JL, Valmaseda T, Pérez O, Pérez A, Ramírez M, Ledón T, Díaz-Jidy M, Lastre M, Bravo L, y Sierra G. (1999). Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX Φ -negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor candidate cholera vaccine strain. INFECTION & IMMUNITY, Feb. Vol. 67, No. 2, p.539-45.
3. Campos J, Fando R, Silva A, Rodríguez BL y Benítez JA. (1998). Replicating function of the RS1 element associated with *Vibrio cholerae* CTX Φ prophage. FEEMS Microbiology letters. Vol 164, 141-147.
4. Fando R, Rodríguez B.L., Campos J, Robert A, Pérez JL, García L, Silva A, Benítez JA. (1997). Promoter activities in the *V. cholerae* ctx Φ phage. INFECTION & IMMUNITY 65: 1561-1565.
5. Robert A, Silva A, Benítez JA, Rodríguez BL, Fando R, Campos J, Finkelstein RA, Boesman-Kinkelstein M, Sengupta D. (1996). Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin/ protease gene using a novel reporter gene: Clostridium thermocellum endoglucanase A. VACCINE 14: 1517-1522.
6. Benítez JA, Silva A, Rodríguez BL, Fando R, Pérez JL, Oliva R, Campos J, Robert A, García H, García L, Torres C y Ledón T (1995). Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: Construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. ARCH MED RES 27: 275-283.

PATENTES

1. Javier Campos, Rafael Fando, Talena Ledón, Boris Rodríguez, Edgar Valle, Anisia Silva y Jorge Benítez. Nuevos candidatos vacunales de *V.cholerae* y método de obtención. Concedida en Cuba (Resolución 2675/2000) y EE UU (Pat. No.: US 6,723,323B1).

1. INTRODUCCIÓN.

El cólera es una enfermedad diarreica aguda causada por la acción de la toxina colérica que produce *V. cholerae* en el intestino delgado humano. Tiene una incidencia mundial anual de 5 a 7 millones de casos (Ryan y Calderwood, 2000) y en la actualidad su agente etiológico más frecuente es *Vibrio cholerae* de serogrupo O1 y biotipo El Tor (Sack y cols, 2004). La vacunación preventiva se acepta como la forma más asequible de controlar el problema a corto plazo. Una vacuna óptima contra el cólera deberá tener una eficacia protectora mayor o igual que 80%, ser efectiva a los 7 días y su acción perdurar por 5 años en todos los grupos de riesgo (Levine y Kaper, 1993; Levine y Kaper, 1995). Las vacunas parenterales se han rechazado ya que inducen efectos adversos y solo confieren protección al 50% de los vacunados durante un período inferior a 6 meses (Finkelstein, 1995).

Las estrategias actuales de obtención de vacunas buscan inmunógenos orales inductores de una respuesta inmune protectora en la mucosa intestinal (Holmgren y cols, 1992; Finkelstein, 1995, Trach y cols, 2002). En lo fundamental, se estudian dos variantes, una de bacterias inactivadas y otra de microorganismos vivos atenuados. La vacuna oral de vibriones inactivados por calor y formalina no induce efectos adversos significativos, pero requiere de 2 a 3 dosis y confiere una protección inferior al 50% en niños e individuos de grupo sanguíneo O y su eficacia protectora en adultos es 62 % al primer año y se reduce al 50 - 53 %, al tercer año (OMS, 2004). La otra variante de vacuna oral, la de cepas vivas atenuadas, se considera más promisorias, dada la similitud de la infección por el agente inmunizante y la de un episodio de cólera que confiere protección inmunológica a más del 80 % de los individuos por 3 años o más (Levine y cols, 1981).

Un ejemplo de cepa viva atenuada es CVD103-HgR (biotipo Clásico), el inmunógeno de la vacuna Orochol, licenciada en Canadá y Europa. Su evaluación reciente en Indonesia mostró que es bien tolerada pero que no protegió en población abierta contra el cólera producido por vibriones de biotipo El Tor (Richie y cols, 2000). Ello significa que se requiere la obtención de candidatos vacunales de biotipo El Tor (Cohen y cols, 2002).

Existe un solo candidato vacunal vivo de biotipo El Tor en fase de investigación clínica, la cepa atenuada Perú-15 (Cohen y cols, 2002). Ella no produce toxina colérica, tiene el gen *recA* inactivado, no es mótil y es resistente a estreptomycin (Kenner y cols, 1995). Su eficacia protectora contra el cólera ocasionado ante el reto con la cepa patogénica N16961 (El Tor Inaba) fue del 93 %; sin embargo, el 54% del grupo vacunado tuvo infecciones subclínicas (Cohen y cols, 2002) y su eficacia protectora en población abierta aún se desconoce. Como consecuencia, la inexistencia de una vacuna de cólera establecida, barata, segura, efectiva y de amplio uso (Tacket y cols, 1999; Trach y cols, 2002), justifica la atenuación, caracterización y evaluación de nuevos candidatos vacunales vivos de biotipo El Tor.

La atenuación de cepas de *V. cholerae* requiere retirar los genes *ctxAB* codificantes de la toxina colérica residentes en el profago CTXΦ (Waldor y Mekalanos, 1996). En los vibriones de biotipo El Tor, el ADN de este profago posee en cada extremo una secuencia de 2,4 kb (RS) de 99,6% de identidad y de igual orientación (Waldor y cols, 1997). Ello posibilita delecionar el profago por recombinación homóloga entre secuencias repetidas en sentido directo (Michalski y cols, 1993; Roth y cols, 1996). Sin embargo, detectar un evento tan

poco frecuente, requiere insertar en el profago un marcador de resistencia a antibióticos que ayude a detectar su delección. Ello justifica subclonar un fragmento de CTX Φ en un vector suicida para integrarlo al profago por recombinación homóloga.

La FDA dispuso que las cepas atenuadas CVD103HgR y Perú-15 fueran marcadas para distinguirlas de los vibriones patogénicos (Kaper y cols, 1997); así, en ellas se introdujeron marcadores de resistencia al mercurio y la estreptomina, respectivamente. La obtención de cepas atenuadas competitivas requiere introducirles un marcador de identidad. La expresión del gen de la endoglucanasa A (CelA) de la bacteria termófila *Clostridium thermocellum* confiere actividad celulolítica $\beta(1-4)$ glucán-glucano hidrolasa a cepas de *E. coli* (Cornet y cols, 1983). Esta actividad se detecta cubriendo las colonias crecidas en placa con agar indicador de carboximetil-celulosa y posterior tinción con rojo congo. El hecho de que *V. cholerae* no posee genes codificantes de proteínas con actividad celulolítica, justifica el estudio de *celA* como marcador para cepas atenuadas con fines vacunales; para lo cual, este gen debe insertarse en un sitio del genoma.

El gen *hap* codifica para la hemaglutinina proteasa (Hap), una potencial toxina accesoria de *V. cholerae* (Mel y cols, 2000) cuyo papel en la patogénesis no se ha dilucidado (Zhou y cols, 2004). Sin embargo, Hap aglutina eritrocitos de diferentes especies (Hanne y Finkelshtein, 1982), degrada proteolíticamente la lactoferrina, la mucina (Hase y Finkelstein, 1991) y la ocludina (Wu y cols, 2000), activa la subunidad A de la toxina colérica (Booth y cols, 1984), incrementa la enterotoxicidad de *V. cholerae* en íleon de conejos si la mucosa se trata con Hap antes de inocular la bacteria (Ichinose y cols, 1994) y disminuye la resistencia transepitelial de monocapas de las líneas celulares T84 (epitelio intestinal) (Mel y cols, 2000) y MDCK-I (epitelio renal) (Wu y cols, 1996). Estas características justifican que la inserción de *celA* se haga en el gen *hap* de las cepas atenuadas y se mida el efecto de esta mutación de la cepa atenuada sobre su desempeño como cepa vacunal en modelos animales y voluntarios.

Una desventaja de las vacunas vivas atenuadas de cólera es la posible readquisición de los genes de la toxina colérica a través del bacteriófago CTX Φ (Waldor y Mekalanos, 1996). Este fago también puede incorporarse a las cepas auxiliado por la transducción especializada que hace el fago VGJ Φ (Campos y cols, 2003). Por ello, investigar la susceptibilidad a la infección de estos dos bacteriófagos y el retorno o no a la virulencia de las cepas, es de interés a fin de distinguir las más seguras.

Una dificultad común a todas las vacunas de cólera es la inexistencia de un modelo animal competente para evaluar su eficacia. Ello obliga irremisiblemente a una prueba de concepto en voluntarios sanos: el ensayo de reto. En este los sujetos reciben la cepa atenuada por vía oral y luego, entre uno y tres meses, ingieren una dosis infectiva de bacterias virulentas de biotipo y serotipo homólogos. Los criterios de medida son la ocurrencia del cólera y la excreción del agente de reto en vacunados y controles (Tacket y cols, 1997; Tacket y cols, 1999; Cohen y cols, 2002). Es por ello que las cepas atenuadas más promisorias deben someterse a una prueba de eficacia en voluntarios sanos antes de pasar al proceso productivo.

En concordancia, el objetivo general del presente trabajo fue atenuar la virulencia de cepas patógenas de *V. cholerae* O1 del biotipo El Tor y evaluar su utilidad para inmunizar por vía oral contra la enfermedad. La hipótesis que lo guió fue:

Hipótesis.

La atenuación de cepas de *V. cholerae* (El Tor) por delección del profago CTXΦ y el marcaje con el gen *celA*, interrumpiendo el gen de la hemaglutinina proteasa, originan cepas de fácil identificación, cuya ingestión protege a voluntarios sanos contra el cólera ocasionado al retar con la cepa *V. cholerae* 3008 un mes después.

Objetivos.

1. Modificar cepas de *V. cholerae* O1 de biotipo El Tor mediante remoción del profago CTXΦ y reemplazo del gen de la hemaglutinina proteasa por un alelo interrumpido con el gen *celA* de *Cl. thermocellum*,
- 2.1 Determinar si las cepas modificadas están atenuadas, se identifican fácilmente y retienen capacidad colonizante del intestino delgado de ratones Balb/c lactantes,
- 2.2 Determinar si las cepas modificadas se infectan por el bacteriófago CTXΦ y si ello incrementa la virulencia al producirse la toxina colérica,
3. Determinar si la administración oral de una de las cepas obtenidas se tolera bien y protege contra un reto de 10⁵ UFC de la cepa virulenta *V. cholerae* 3008.

Tareas.

- 1.1. Construcción de dos plasmidios suicidas derivados de pGP704, uno portador de un fragmento del profago CTXΦ donde el gen *ctxA* esté inactivo y el otro portador de un alelo del gen de la hemaglutinina proteasa (*hap*) interrumpido por el gen de la endoglucanasa A (*celA*) de *Clostridium thermocellum*.
- 1.2. Utilización de los plasmidios construidos para delecionar el profago CTXΦ de dos cepas patogénicas de *Vibrio cholerae* O1 de biotipo El Tor para reemplazarles el gen *hap* por el alelo interrumpido por el gen *celA*.
- 1.3 Verificación de que las cepas obtenidas no producen la toxina colérica *in vitro* y que el reemplazo de *hap* por el alelo interrumpido elimina la expresión de Hap, posibilita que la bacteria sintetice endoglucanasa A y sea identificable por un ensayo simple.
- 2.1 Evaluación en ratones Balb/c lactantes de la capacidad de colonización y la atenuación de las cepas obtenidas.
- 2.2 Evaluación de la susceptibilidad de las cepas obtenidas a la infección por los bacteriófagos VGJΦ y CTXΦ, empleando bacteriófagos modificados cuyos genomas portan un gen que confiere resistencia a la kanamicina.
- 2.3 Evaluación de la producción de toxina colérica *in vitro* y el potencial letal en ratones Balb/c lactantes, de las cepas modificadas infectadas por CTXΦ.
- 3.1 Evaluación en voluntarios de una de las cepas genéticamente modificadas, atendiendo a la inducción de efectos adversos, la excreción en las heces fecales, la respuesta inmunológica y la protección contra el cólera inducido experimentalmente.

Novedad científica

Básica

1. El hallazgo inesperado de un transcrito específico para la expresión de la subunidad B de la toxina colérica que inicia en el gen codificante de la subunidad A, es la primera demostración de la existencia de un me-

canismo de control transcripcional contribuyente a la síntesis de más subunidades CtxB que CtxA y devela un mecanismo que puede funcionar también en otros operones de toxinas binarias.

Aplicada

1. La obtención de cepas desprovistas de CTX Φ , marcadas con el gen de la endoglucanasa A de *Cl. thermocellum* e inhabilitadas en la expresión de la hemaglutinina proteasa, con fines vacunales no ha sido reportada previo al desarrollo de este trabajo, lo que garantizó el acceso a propiedad intelectual y hace que su aplicación pueda extenderse a las cepas del serotipo O139.
2. La cepa 63₈ es la primera cepa atenuada de *V. cholerae* del biotipo El Tor y serotipo Ogawa que ha sido bien tolerada e inmunogénica en voluntarios.
3. Los estudios en voluntarios con bacterias vivas atenuadas y la implementación del ensayo de reto (infección experimental) no tiene antecedentes en Cuba.
4. La protección inmunológica contra el reto de la cepa virulenta 3008 provista por 63₈ (O1, El Tor, Ogawa), constituye la prueba de concepto de esta cepa vacunal.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismos, medios de cultivo, procedimientos de microbiología y biología molecular.

Cepas bacterianas. Se emplearon las cepas de *Vibrio cholerae* C7258 (Patogénica, O1, El Tor, Ogawa, Perú, 1991); C6706 (Patogénica, O1, El Tor, Inaba, Perú, 1991); 569B (Patogénica, O1, Clásico, Inaba, India, 1945); JBK70 mutante $\Delta ctxAB$ de N16961; Levine y cols., 1988); SG251a (*Vibrio cholerae* SG251 $\Delta CTX\Phi$; Ledón y cols., 2003); 3008 (Patogénica, O1, El Tor, Ogawa, cepa de reto; Tacket y cols., 1997); VC12 (Patogénica, O1, Clásica, Ogawa; Benenson y cols., 1968) y Perú-15 ($\Delta CTX\Phi$, $\Delta attRS1$, *recA::Phtp-cxB*, no mótil, *Str*; Kenner y cols., 1995). Se empleó además, la cepa *Escherichia coli* SM10 λ pir (*thi thr leu tonA lacY supE recA::RP4-2Tc::Mu* (λ pirR6K) Km^r; Miller y Mekalanos, 1988)

Medios de cultivo. Se empleó medio rico LB (Sambrook y cols, 1989), para propagar *V. cholerae* y *E. coli*; agar TCBS (Oxoid, CM333), para el cultivo selectivo de *V. cholerae*; caldo TSB (Booth y cols, 1983) para la expresión de hemaglutinina proteasa; agar BHI (Oxoid, CM225), para cultivar las cepas a inocular en voluntarios; agar sangre, para cultivar *V. cholerae* antes de inocular caldos AKI; caldos AKI, para la expresión de toxina colérica, y agua de peptona alcalina (NaCl, 1%; peptona, 1%; pH 8,5), como medio de enriquecimiento para *V. cholerae*. Los medios de cultivo se complementaron, cuando fue necesario, con Ampicilina (Amp), 100 μ g/ml; kanamicina (Kan), 50 μ g/ml; tetraciclina (Tet), 5 μ g/ml; polimixina B (polB), 10 U/ml y cloranfenicol (Cm), 16 μ g/ml.

Cultivo en medio AKI para inducir la expresión de la toxina colérica y la proteína TcpA. Se empleó el procedimiento de Iwanaga y Yamamoto (1985). Una colonia crecida en agar sangre se inoculó en 10 ml de caldo AKI contenidos en tubos de cultivo. Se incubó estático a 30°C durante 4 h, se transfirió a un erlenmeyer de 50 ml y se incubó con agitación orbital de 200 rpm a 37°C durante 16 h.

Cultivo en TSB para expresión de la Hemaglutinina proteasa. Una alícuota de 10⁶ vibriones se inoculó en 50 ml de caldo TSB sin glucosa y se cultivó durante 20 h a 30°C en zaranda orbital termostata a 100 rpm (Booth y cols, 1983). La presencia de Hap en los sobrenadantes se analizó por *Western blot* usando geles de 12,5 % de poliacrilamida como se describe en.

Procedimientos de Biología Molecular. Las enzimas y reactivos para biología molecular se adquirieron de Promega y se utilizaron acorde con sus recomendaciones. La separación electroforética de ADN se efectuó en geles de agarosa al 0,7 % preparados en tampón Tris-acetato-EDTA (Sambrook y cols, 1989). La transformación de *E. coli* se hizo en células competentes preparadas por tratamiento con CaCl₂ (Sambrook y cols, 1989) y la de *V. cholerae* con plasmidios replicativos se hizo por electrotransformación (Stoebner y Payne, 1988). Los plasmidios se purificaron por el método de lisis alcalina (Bimboim y Doly, 1979)

Purificación de ADN total e hibridación de ácidos nucleicos. El ADN total de *V. cholerae* se extrajo siguiendo el procedimiento de purificación con hexadecil-trimetil amonio, descrito por Ausubel y cols (1995) y la hibridación de ácidos nucleicos tipo *Southern blot*, se hizo según orienta el juego de reactivos "*DIG-DNA labeling and detection kit*" (Boehringer Mannheim, Cat No. 1093657). Para el marcado de las sondas se empleó 1 μ g de ADN molde, dUTP marcado con digoxigenina, cebadores hexanucleotídicos y klenow. La sonda No. 1

se preparó a partir de una mezcla del fragmento *Pst* I - *Hinc* II, portador de los genes *orfU*, *ace*, *zot*, *ctxA* y *ctxB*, del plasmidio pBB6 (Figura 1) y el fragmento *Ava* I - *Sph* I, portador de los genes *cep* y *orf U*, del plasmidio pAB1. La sonda No. 2 se obtuvo a partir del fragmento *Not* I - *EcoRV*, portador del extremo 3' la región intergénica situada cuesta abajo del gen *ctxB*, el gen *rstR* y parte de *rstA* del plasmidio pUJΔEV. La sonda No. 3 se creó a partir del fragmento *Hind*III, codificante del gen *hap*, del plasmidio pCH2, y la sonda No. 4 a partir del fragmento *Hind*III, que porta el gen *celA*, del plasmidio pCT104 (Figura 1).

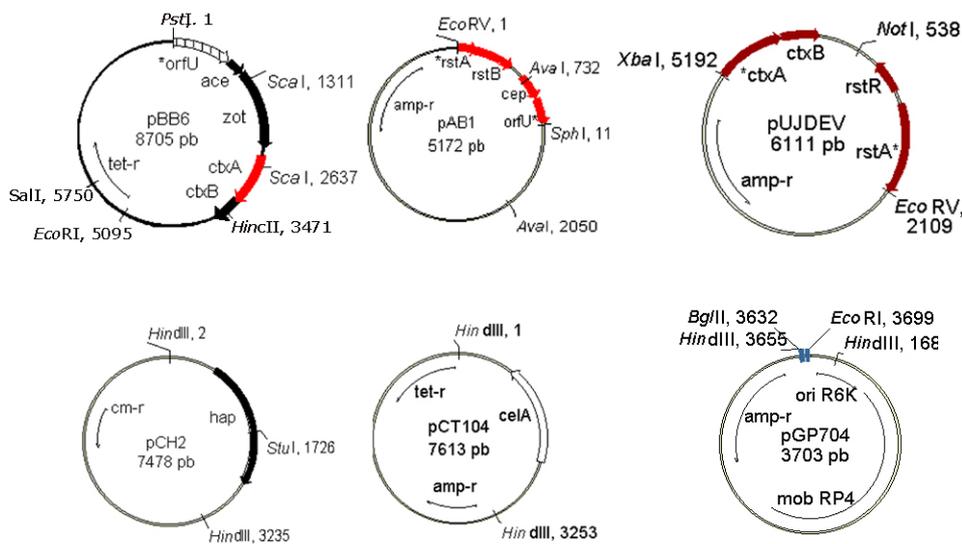


Figura 1. Mapas genéticos de los plasmidios utilizados:

pBB6 (Baudry y cols, 1991)
 pAB1 (Robert A., comunicación personal)
 pUJΔEV (Campos J., comunicación personal)
 pCH2 (Hase y Finkelstein, 1991)
 pCT104 (Cornet y cols, 1983)
 pGP704 (Miller y Mekalanos, 1988)
 Abreviaturas:
 orfU, región parcial del gen codificante de la proteína de adsorción del fago CTX ϕ ; ace, gen de la enterotoxina accesoria a la toxina colérica; zot, gen de la toxina de las uniones estrechas; ctxA y ctxB, genes de las subunidades A y B de la toxina colérica; tet-r, gen de resistencia a tetraciclina; rstA y rstB, genes de las proteínas necesarias para la replicación y la integración de CTX ϕ ; amp-r, gen de resistencia a ampicilina; hap, gen de la hemaglutinina proteasa; cm-r, gen de resistencia al cloranfenicol; celA, gen codificante de la endoglucanasa A; oriR6K, origen de replicación del plasmidio R6K, dependiente de la proteína π ; y mobRP4, origen de transferencia conjugativa del plasmidio RP4.

Para hibridación de ácidos nucleicos tipo *Southern blot*, se digirió 1 μ g de ADN total ó 10 ng de plasmidio con la enzima de restricción apropiada y los fragmentos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.6% y se transfirieron a membranas HybondTM-N (Amershan, RPN 303N) en condiciones alcalinas por el procedimiento de Chomczynski (1992). Las membranas se homearon a 80°C durante 0,4 h y en lo adelante se trataron como indican las instrucciones del juego de reactivos de *Southern "DIG-DNA labeling and detection kit"* (Boehringer Mannheim, Cat No. 1093657), para la hibridación y la detección.

ELISA de captura de la toxina colérica por el receptor GM1 (GM1-ELISA). Se siguió el proceder de Dube y cols (1990) que emplea el gangliósido GM1 como antígeno de recubrimiento. Se emplearon patrones de cuantificación de holotoxina, (rango, 1,488 - 0,012 pmol ml⁻¹) y de subunidad B, rango (2,193 - 0,018 pmol ml⁻¹) y se usó el AcM anti-CtxA 1G10G5 o el AcM anti-CtxB 4E1G5. El revelado con H₂O₂ como sustrato y O-fenilendiamina como cromógeno y la parada de la reacción se hizo de la forma tradicional.

Western blot para detección de las proteínas Hap, CelA y TcpA. La separación electroforética de proteínas se hizo por un método similar al descrito por Laemli (1970), empleando geles de 12,5% de acrilamida (Sambrook y cols, 1989). Los antígenos se transfirieron de los geles a las membranas de nitrocelulosa por el procedimiento de Towbin y cols. (1979). Se utilizaron los anticuerpos primarios (IgG de conejos dirigida contra Hap a 5 μ g ml⁻¹ (Hase y Finkelstein, 1991), IgG de conejos dirigida contra CelA a 10 μ g ml⁻¹, o el AcM anti-TcpA 10E10E1 a 5 μ g ml⁻¹ (Falero y cols, 2003)). Las membranas se revelaron por incubación en H₂O₂ al 0,4% disuelto en salina tamponada con Tris (NaCl, 0,9 %; Tris, 10 mM, pH 7,5) en presencia de 4-cloro-1-

naftol (Sigma) a 0,5 mg ml⁻¹.

2.2 Construcción del plasmidio suicida 1 a partir del vector pGP704 y el profago CTXΦ de *V. cholerae* 569B.

Se realizó una deleción *Sca* I al plasmidio pBB6. La molécula resultante se cortó con *Pst* I, los extremos 3' protuberantes se emparejaron con T4-ADN polimerasa en presencia de 0,1 mM de los 4 dNTPs y se ligaron con T4 ADN-ligasa, en presencia de 1 µg de un adaptador octamérico que posee un sitio de reconocimiento para *Eco*R I (Promega). El plasmidio obtenido por inserción del adaptador *Eco*R I se cortó con *Eco*R I y *Sal* I y el fragmento *Eco*RI de talla mayor se purificó de geles de agarosa y se ligó al vector pGP704 (Figura 1) digerido con *Eco*R I. El vector recombinante obtenido por la incorporación del inserto *Eco*R I mencionado se propagó y purificó (plasmidio suicida 1). Células competentes de *E. coli* SM10λpir se transformaron con el plasmidio suicida purificado y la cepa resultante se conservó congelada a -80°C (cepa donante 1).

2.2.1. Detección de la actividad de los genes *ctxAB* del plasmidio suicida 1.

La cepa JBK70 se transformó con el plasmidio replicativo obtenido tras deleccionar el fragmento *Scal* del pBB6 y con los plasmidios controles pBR322 y pBB6. Los transformantes se seleccionaron en LB-Tet y se cultivaron en LB-Tet (5 ml) por 12 h a 37°C con agitación de 200 rpm. La presencia de toxina colérica se determinó en los sobrenadantes de los cultivos por medio del GM₁-ELISA.

2.2.2. Detección de la expresión de toxina a partir de otros fragmentos del operón *ctxAB*.

Subclonación de segmentos del profago CTXΦ de pBB6 hacia pUC18. El fragmento *Hind* III - *Pst* I, de 4,5 kb del plasmidio pBB6 se escindió y se ligó con pUC18 digerido con *Pst* I y *Hind* III. El plasmidio recombinante que poseyó el inserto de 4,5 kb se propagó y purificó (plasmidio portador del operón *ctxAB* completo).

Subclonación de una porción del operón *ctxAB* del profago CTXΦ en pUC19 cuesta abajo del terminador transcripcional *rrmBT1T2*. El fragmento *Scal* - *Hind* III portador de una porción del operón *ctxAB* se escindió del plasmidio anterior y se ligó al plasmidio pUCTTD digerido con *Hinc* II y *Hind* III, un derivado del pUC19 que posee el terminador transcripcional *rrmBT1T2* en el sitio *Eco*RI. El plasmidio recombinante derivado de pUCTTD que incorporó el inserto, se propagó y purificó (plasmidio portador del fragmento 1).

Subclonación de una porción más corta del operón *ctxAB* del profago CTXΦ en pUC19 cuesta abajo del terminador transcripcional *rrmBT1T2*. El fragmento *Clal* - *Hinc* II se escindió del plasmidio portador del operón *ctxAB* completo y se ligó al plasmidio pUCTTD digerido con *Acc* I y *Hind* III. El plasmidio recombinante, derivado de pUCTTD por la incorporación del inserto, se propagó y se purificó (plasmidio portador del fragmento 2).

Detección de la expresión de la toxina colérica a partir de las construcciones anteriores. La cepa SG251a se electrotransformó con cada uno de los plasmidios anteriores por separado. Los transformantes se seleccionaron en LB-Amp, se cultivaron en 5 ml de caldo LB-Amp bajo agitación de 200 rpm durante 20 h a 37°C. La cantidad de toxina secretada al medio de cultivo se evaluó mediante GM₁-ELISA empleando los anticuerpos 1G10G5 y 4E1G5 en paralelo.

2.2.3. Ensayos de protección a la nucleasa S1 para detectar transcritos de *ctxB* en el operón *ctxAB*.

Purificación de ARN de *V. cholerae*. Las cepas C7258, SG251a y SG251a transformada con pC se crecieron en medio AKI y la cepa 569B se creció en LB, todas a 37°C y 200 rpm hasta una D.O._{600 nm} = 0.6 unidades. El ARN se extrajo con tiocianato de guanidinio y fenol-cloroformo ácido (Chomczynski y Sacchi, 1987).

Preparación de la sonda. Se hizo una reacción de PCR unidireccional a partir de 100 pmoles del oligo CTB1 (5' agg tgt tcc atg tgc ata tgc 3') y 10 ng de ADN del plasmidio portador del operón *ctxAB* completo digerido con Xba I. La mezcla de reacción contuvo además, Tris-HCl, 10 mM; KCl, 50 mM; pH 8,3; MgCl₂, 2 mM, dATP, 10 μM; dCTP, dGTP y dTTP 50 μM; [α-³²P]dATP, 50 μCi y Taq ADN polimerasa, 2 U. La reacción se realizó durante 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C. La sonda de ADN de simple cadena sintetizada se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa alcalina (Sambrook y cols, 1989).

Hibridación, digestión y electroforesis. Una alícuota de 50 μg de cada ARN se mezcló con 10⁵ cpm de la sonda radiactiva sintetizada en el paso anterior. Ello se hizo en 20 μl de tampón de hibridación compuesto por EDTA, 5 mM; PIPES, 50 mM, pH 7,0 y TCA, 3 M. Los ácidos nucleicos se desnaturalizaron durante 0,25 h a 75°C y la mezcla se incubó durante 16 h a 45°C. La reacción se diluyó en 0,3 ml de tampón de reacción de nucleasa S1 (NaCl, 0,28 M; Acetato de sodio, 0,05M, pH 4,5; ZnSO₄, 4,5 mM) y la sonda libre remanente, así como los extremos protuberantes de simple cadena, se digirieron empleando 200 U de nucleasa S1 durante 45 minutos a 37°C. Los fragmentos protegidos se separaron en un gel de poliacrilamida al 3% para secuenciación de ADN (Sambrook y cols., 1989) y la talla del fragmento protegido se calculó respecto a un patrón de tallas moleculares, consistente en una mezcla de digestiones *Hae* III y *Hpa* I del plasmidio pUC19, cuyos fragmentos se desfosforilaron y se marcaron con [γ-³²P]ATP por el método de Maxam y Gilbert (1980), empleando el juego de reactivos *DNA 5'-end labeling kit* (Boehringer Mannheim, Cat No 702757).

2.3. Construcción del plasmidio suicida 2 a partir del vector pGP704, el gen *hap* de *V. cholerae* y el gen *celA* de *Cl. thermocellum*.

El fragmento portador del gen *celA* de *Cl. thermocellum* se escindió del plasmidio pCT104 (Figura 1) con la enzima *Hind* III, los extremos se rellenaron con Klenow y la preparación resultante se ligó al plasmidio pCH₂ (Figura 1) cortado con *Stu* I. El alelo recombinante del gen *hap* se escindió del plasmidio obtenido mediante un corte con *Hind* III y se ligó al vector pIJ2925 (Janssen y Bibb, 1993) igualmente digerido. El alelo recombinante se escindió nuevamente, ahora con la enzima *Bgl* II, desde el plasmidio formado y se ligó al pGP704 (Figura 1) digerido con *Bgl* II. El derivado de pGP704 que incorporó el inserto se propagó y purificó (plasmidio suicida 2). Una alícuota de células competentes de la cepa *E. coli* SM10λpir se transformó con el plasmidio suicida 2 y la cepa resultante se conservó por congelación (cepa donante 2).

2.4. Procedimiento de obtención de CGM de generación 1 mediante la inserción del plasmidio suicida 1 al profago CTXΦ y su delección.

El plasmidio suicida 1 se movilizó hacia las cepas *V. cholerae* C7258 y C6706 por conjugación con la cepa

donante 1. El ADN de diez colonias de exconjugantes resistentes a la ampicilina se digirió con *Hind*III y se analizó por *Southern blot* con la sonda No. 1 para identificar las cepas intermedias en que el plasmidio se integró al profago CTX Φ . Los exconjugantes en cuyo ADN se detectaron dos bandas *Hind* III menores de 16 kb con la sonda No. 1, se crecieron en medio rico sin selección para propiciar la delección del profago marcado por la inserción del plasmidio suicida 1. El ADN de los clones sensibles a la ampicilina se fragmentó con *Hind*III y se analizó por hibridación de ácidos nucleicos tipo *Southern*, empleando las sondas No. 1 y No. 2. Se identificaron como cepas desprovistas de CTX Φ , aquellas cuyo ADN no reaccionó con la sonda No. 1.

2.5. Procedimiento de obtención de CGM de generación 2 por reemplazamiento del gen *hap* por el alelo interrumpido por *ceI*A presente en el plasmidio suicida 2.

El plasmidio suicida 2 se movilizó hacia dos cepas de *V. cholerae* de generación 1, una descendiente de C7258 y la otra de C6706, por conjugación con la cepa donante 2. El ADN de diez exconjugantes resistentes a la ampicilina se digirió con *Xho*I y se analizó por *Southern blot* con la sonda No. 3, para identificar aquellos en que el plasmidio se integró al gen *hap*. Los exconjugantes en cuyo ADN se detectó una sola banda de alrededor de 16 kb, se crecieron en medio rico sin selección para propiciar la segregación del gen *hap* natural y los restos del vector pGP704. El ADN de los clones sensibles a la ampicilina se fragmentó con *Xho*I y se analizó por hibridación empleando las sondas No. 3 y No. 4. Se identificarían como cepas de segunda generación aquellas cuyos ADNs tuvieran un solo fragmento *Xho*I de 9,7 kb que hibridara con ambas sondas.

2.6 Evaluación de los fenotipos de las CGM respecto a producción de toxina colérica, hemaglutinina proteasa y endoglucanasa A

Evaluación de la producción de toxina colérica. Se hizo cultivo en medio AKI para inducir la expresión de toxina colérica en las CGM y GM₁-ELISA de los sobrenadantes de cultivo para cuantificar la toxina.

Detección de la proteína Hap. Se realizó por *Western Blot* a partir del sobrenadante de cultivo de los vibrios crecidos en medio inductor de la expresión de la enzima (Booth y cols, 1983)

Detección de la proteína CelA. Se realizó por *Western Blot* a partir una alícuota de 0,1 mg de proteínas de extractos celulares.

Detección de endoglucanasa A en geles de actividad de Beguin. Las proteínas de una alícuota de 0,1 mg de extracto celular se calentaron 15 minutos a 70°C y se fraccionaron por electroforesis en un gel de acrilamida al 12,5%. El gel de corrida se alineó con otro de agarosa al 0,7% y carboximetilcelulosa (CMC) al 0,7%, preparado en tampón fosfato citrato pH 6,3 (Beguin, 1983). Los geles superpuestos se incubaron 2 h a 60°C en cámara húmeda y a continuación se expusieron durante 5 minutos a una disolución acuosa de rojo congo (1%) y se destiñeron en NaCl 1M.

Detección de la actividad de CelA en colonias bacterianas. Se empleó el procedimiento de Comet y cols (1983) sobre colonias de *V. cholerae* cultivadas durante 14 h a 37°C en LB sólido. Las colonias se cubrieron con una capa fina de gel (5 ml por placa) de agar al 0,7% y carboximetilcelulosa al 0,3 %, fundido en tampón fosfato citrato pH 6,3. Las placas se incubaron 3 h a 70°C y luego se tiñeron durante 5 minutos con una disolución acuosa de rojo congo al 1 %. Se destiñó usando NaCl 1M y la actividad se detectaría por la presencia de un halo transparente alrededor de las colonias.

2.7. Evaluación de la pertinencia del uso de las CGM.

2.7.1. Ensayo de colonización y virulencia de las CGM en ratones lactantes.

Se empleó una modificación del procedimiento de Richardson (1994). Ratones Balb/c lactantes se separaron de sus madres 1 h antes del experimento y se asignaron aleatoriamente a los grupos experimentales. Las cepas progenitoras C7258 y C6706 y las CGM de primera y segunda generación se crecieron en LB sólido y a 37°C durante 16 horas. La biomasa se cosechó en 5 ml de disolución salina (NaCl, 0,9%) y la suspensión resultante se ajustó a una $Abs_{600\text{ nm}} = 20$ UDO para garantizar un contenido de 10^9 UFC cada 50 μl . A 5 ml de esta suspensión se le adicionaron 50 μl de azul de Evan preparado al 10% en NaCl al 0,9% estéril. Los inóculos de menor carga microbiana se prepararon por dilución de la suspensión anterior. Una alícuota de 50 μl de la suspensión apropiada se inoculó en cada ratón por intubación gástrica. Al concluir cada grupo experimental, 25 μl de diluciones seriadas 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 de la suspensión utilizada se sembraron por duplicado en placas de LB. Las placas se incubaron 24 h a 37°C y las colonias se contaron.

Una h después de inoculado cada grupo experimental se devolvió a su lecho materno. En los experimentos de virulencia, el número de ratones sobrevivientes se contó durante un mes. En los experimentos de colonización cada grupo experimental se muestreó ($n = 3$ ratones cada vez) a las 24, 72 y 120 h de inoculados, para determinar el contenido intestinal de vibriones. Para ello, los tres ratones se sacrificaron en atmósfera de cloroformo y sus intestinos delgados se extrajeron inmediatamente; se lavaron tres veces con disolución salina (NaCl; 0,9%); se les midió su longitud (L) y su diámetro (d) y se homogenizaron, cada uno en 2 ml de PBS, empleando un disruptor de cuchillas Ultraturrax T25. El número de bacterias recuperado del intestino delgado de cada ratón se contó por siembra en placas, a partir de 20 μl de diluciones seriadas 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 y 10^4 . Este procedimiento tiene un límite de detección de 100 UFC por intestino. Los resultados se reportaron en UFC por cm^2 de área intestinal; la cual se calculó: $A (\text{cm}^2) = L \times 2\pi \times (d/2)$.

2.7.2. Ensayo de infección de CGM con el fago CTX Φ .

Las CGM se cultivaron en medio AKI para expresión de T_{cpA}. La cepa donante 569B (CTX_{kn}- Φ) (Campos y cols, 2003a) se cultivó en LB-Kan (37°C, 200 rpm, hasta $Abs_{600\text{ nm}} = 2,0$). El sobrenadante, portador de los vibriones se filtró (0,2 μm) y 200 μl del filtrado se mezclaron con 20 μl de biomasa del cultivo de la CGM. La mezcla se incubó 0,3 h a 25°C y 25 μl de diluciones seriadas 10^0 , 10^1 y 10^2 se sembraron en placas de LB-kan. Las UFC resistentes a kanamicina, correspondientes a los vibriones infectados, se contaron a las 16 h de incubación a 37°C. En paralelo, una alícuota de 0,1 ml del cultivo de la CGM expuesta a CTX Φ se centrifugó. El sedimento se reconstituyó en 0,1 ml de PBS y se hizo *Western blot* para detección de T_{cpA}.

2.7.3. Evaluación de caracteres de virulencia en las CGM infectadas por CTX Φ .

Evaluación de producción de toxina. Se midió por GM1-ELISA en los sobrenadantes de cultivos AKI de las CGM infectadas por CTX Φ .

Potencial letal sobre ratones lactantes. Se empleó un ensayo de virulencia como el descrito en 2.7.1., con una dosis de inóculo de 10^5 UFC.

2.8. Prueba de concepto de una CGM de generación 2 como cepa vacunal

Procedimiento de selección de voluntarios. Se captaron hombres de edades comprendidas entre 18 y 40 años, en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas, el Instituto Finlay y el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Antes de admitirlos, se evaluaron por los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión. Individuos que posean un examen clínico normal.

Criterios de exclusión. Individuos que tienen antecedentes conocidos de inmunodeficiencia, enfermedad cardiovascular, respiratoria, renal, hepática, gastrointestinal, neurológica, desorden endocrino, psiquiátrico o del sistema reticuloendotelial; antecedentes de alergia a las tetraciclinas, historia previa de vacunación o padecimiento de cólera, historia de terapia con antibióticos o gammaglobulinas en los 7 días anteriores a la inoculación, ensayo para anticuerpos VIH 1 o VIH 2 positivo, positividad al antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpos IgM contra hepatitis A o IgG contra la hepatitis C detectables, positivo en el bacteriológico de heces fecales para patógenos entéricos, desaprobado el examen escrito, o estar sometido a algún medicamento incompatible con el estudio.

Diseño del estudio. Los estudios se realizaron en la Unidad de Aislamiento para el Control de Riesgos Biológicos del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), autorizados por el Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED) y el Centro Nacional de Seguridad Biológica (CNSB). Se admitieron 45 individuos, los cuales se asignaron aleatoriamente y a doble ciego al grupo vacuna (24 sujetos) o al grupo placebo (21 sujetos). El reto con la cepa patogénica 3008 se planificó esperando una incidencia del cólera del 80% en el grupo placebo y menor del 20% en el grupo vacunado. Se calculó entonces que la n necesaria era de 12 vacunados y 8 receptores de placebo para detectar con una potencia estadística del 80 % una eficacia protectora contra el cólera del 80 % ($P = 0,05$, binomial de una cola).

Preparación de los inóculos. Una colonia de la cepa *V. cholerae* 3008 ó de la CGM se estrió en cuñas de agar BHI y las placas se incubaron durante 5 h a 37°C. La biomasa se cosechó en salina estéril y la Abs_{600nm} de la suspensión resultante se midió y se ajustó a 0,5. El inóculo consistió en 2 ml de la suspensión de la cepa genéticamente modificada o en 1 μ l de la cepa 3008 mezclada con 30 ml de $NaHCO_3$ al 2%.

Conteo de los vibriones en los inóculos. Diez μ l de diluciones seriadas de factor diez se sembraron en LB sólido, se incubó 24 h a 37°C y las colonias se contaron. Los datos se reportaron como UFC en cada inóculo.

Procedimiento de inoculación. Los voluntarios ingirieron, en ayunas, 120 ml de bicarbonato de sodio al 2% y 30 minutos después, el inóculo de la CGM, el placebo, o el reto, según correspondió. Los sujetos no ingirieron alimentos hasta 1,5 h después de inoculados.

Seguimiento clínico. La ocurrencia de diarreas, meteorismos, cólicos, vómitos, cefalea y fiebre se siguió durante los cinco días posteriores a la inoculación. El volumen de cada vómito se midió.

Muestras. Todas las deposiciones se colectaron en bolsas plásticas y su consistencia se clasificó en una escala de 5 gradaciones: grado 1, sólida y formada; grado 2, formada pero blanda; grado 3, pastosa; grado 4; líquida opaca; o grado 5, agua de arroz. Una alícuota de 10 ml de sangre se extrajo a cada voluntario el día de la inoculación y a los 7, 14, 21 y 28 días. El suero se conservó por congelación a -80°C.

Cuantificación de la excreción bacteriana. Un gramo de heces fecales de la primera deposición diaria se

dispersó en 1 ml de disolución salina. El contenido de vibriones en la suspensión resultante se contó por siembra duplicada de 10 μ l de diluciones seriadas 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 en agar TCBS. Los resultados se expresaron en UFC g^{-1} de heces fecales.

Cuantificación de anticuerpos inhibidores del crecimiento bacteriano en el suero. Se usó el método de Beneson y cols (1968) en placas de microtitulación de 96 pocillos. Diluciones seriadas 1:2 del suero (25 μ l) se depositaron en pocillos duplicados. La cepa indicadora VC12 (biotipo Clásico, serotipo Ogawa) se cultivó en cuñas de LB, 3 h a 37°C, se cosechó en salina y se ajustó a 1×10^7 UFC ml^{-1} por densitometría. La fuente de complemento, suero humano de grupo sanguíneo A, del banco de sangre de Marianao, se diluyó 1:5 en salina estéril. Este y la cepa indicadora se mezclaron en igual proporción y 25 μ l de la suspensión resultante se añadieron en cada pozo. La mezcla se incubó 1 h a 37°C y luego se combinó con 150 μ l de caldo BHI estéril conteniendo glucosa y bromocresol púrpura. Se incubó a 37°C por 3 h adicionales para propiciar el crecimiento bacteriano. La placa se leyó por inspección visual y el título se consideró como el recíproco de la mayor dilución de suero que inhibió el crecimiento bacteriano.

ELISA para cuantificación de IgA humana dirigida contra el LPS de *V. cholerae*. Los pocillos se incubaron 12 h a 4°C con LPS Ogawa preparado a 25 μ g ml^{-1} en PBS. El suero se añadió en diluciones seriadas 1:2 de las muestras de suero efectuadas a partir de 1:50. Los pocillos se incubaron 2 h a temperatura ambiente con anti-IgA humana (SIGMA) conjugada a peroxidasa, diluida 1:2000 en PBS-T. Se lavó nuevamente la placa y el revelado y la lectura se hicieron como en el GM₁-ELISA.

Definiciones. Las reacciones se clasificaron como ligeros si se toleraron fácilmente por los voluntarios y no interfirieron con sus actividades diarias, se clasificaron como moderados si interfirieron con las actividades diarias y como severos si impidieron la realización de las mismas. Una temperatura axilar de 38°C o superior se consideró fiebre. Se definió diarrea como la ocurrencia de una deposición de 300 g de los grados 3 al 5 o la ocurrencia de más de un episodio de un total de 200 gramos o más en 48 h. Se definió cólera como la ocurrencia de diarreas con la excreción de la cepa virulenta de reto. Un episodio fue moderado si el volumen diarreico alcanzó de 3 a 5 litros y severo, si sobrepasó los cinco litros. El título de anticuerpos inhibidores del crecimiento de los vibriones se definió como el inverso de la mayor dilución de suero que inhibió la proliferación de *V. cholerae*, detectable por invariabilidad del color a la inspección visual. El título de IgA anti-LPS, se definió como el valor recíproco de la mayor dilución que produjo un valor de absorbancia 0,4 unidades por encima del valor del suero pareado control en igual dilución.

2.9. Análisis estadísticos.

En general, se siguieron las recomendaciones de Cara H. Olsen (2003), se empleó el paquete Statistica (StatSoft, Inc, 1998) y el nivel de significación se fijó en 0,05. El método de comparación empleado se indica en cada caso en la sección de Resultados y Discusión.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Obtención del vector suicida 1, portador del profago CTXΦ modificado.

El fragmento del profago CTXΦ contenido en pBB6 se modificó por delección del fragmento *ScaI* y se obtuvo pBSCT5 (Figura 2). En el sitio *PstI* de pBSCT5 se clonó un adaptador que tiene un sitio de corte *EcoRI* y se obtuvo pBSCT64. El fragmento *EcoRI* que porta el profago modificado se escindió de pBSCT64 y se clonó en el sitio *EcoRI* del vector suicida pGP704. El vector suicida resultante se denominó pAJF (Figura 2). La cepa movilizadora *E. coli* SM10λpir se transformó con pAJF para disponer de una cepa donante del mismo.

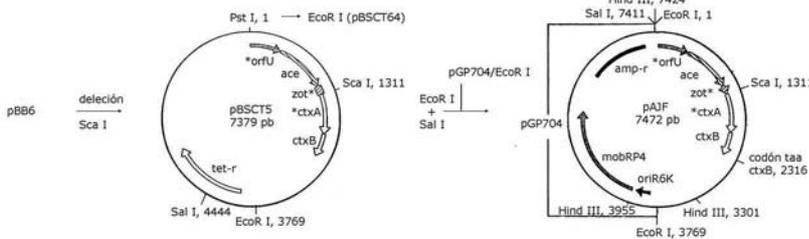


Figura 2. Obtención del vector suicida pAJF. Abreviaturas: orfU*, ace, zot, ctxA, tet-r, amp-r, mobRP4 y oriR6K conservan el significado atribuido en la Figura 1. La zona de pAJF que proviene de pGP704 se indica.

El plasmidio pAJF posee dos regiones homólogas al profago CTXΦ de los vibriónes del biotipo El Tor, una a cada lado del sitio *ScaI*. La que se ubica en posición 5' tiene 1,3 kb y la que se encuentra en posición 3' tiene 1 kb y se extiende solo hasta el final del gen *ctxB*. Estos tamaños son más de 10 veces el que se necesita para que ocurra la recombinación homóloga (Roth y cols, 1996). De ahí que el plasmidio suicida pAJF pueda emplearse con la intención de integrarlo al profago CTXΦ y marcarlo para su delección de las cepas patogénicas de *V. cholerae* responsables de las epidemias actuales.

3.1.1. Actividad de los genes *ctxAB* presentes en el plasmidio suicida 1.

La actividad de los genes *ctxAB* del plasmidio pAJF se infirió a partir de los datos aportados por el plasmidio replicativo pBSCT5 introducido en la cepa atoxigénica *V. cholerae* JBK70. En los sobrenadantes de los transformantes no se detectó la subunidad CtxA de la toxina colérica, lo que refleja que *ctxA* está inactivo; en cambio si se detectó CtxB, lo que indica que el gen *ctxB* es activo (Figura 3). La expresión de CtxB es un hallazgo inesperado, dado que la delección *ScaI* en el plasmidio pBB6 retiró el promotor que controla la transcripción del operón *ctxAB*. Este resultado sugirió que además del promotor del operón existe otro específico dentro de *ctxA* para el gen *ctxB*, que no se ha descrito aún.

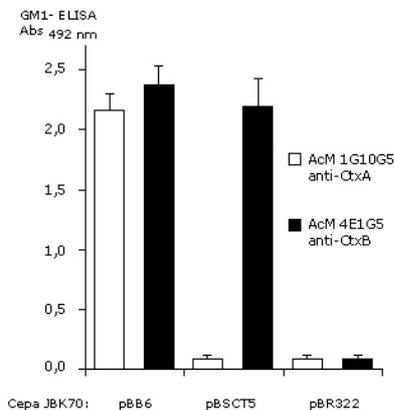


Figura 3. Expresión de las subunidades CtxA y CtxB de la toxina colérica por *V. cholerae* JBK70 transformado con pBSCT5, medida por medio del GM1-ELISA con los anticuerpos monoclonales (AcM) anti-CtxA y anti-CtxB. Barras de error, desviación estándar de la media.

Al medir la subunidad CtxA en el sobrenadante de la cepa *V. cholerae* JBK70(pBSCT5), la absorbancia fue similar a la de la cepa control negativo JBK70(pBR322) y 10 veces menor que la de la cepa control positivo JBK70(pBB6) (barras claras). Sin embargo, la señal de detección de la subunidad CtxB al evaluar la cepa JBK70(pBSCT5) fue similar a la del control positivo y 10 veces mayor que la de los controles negativos (barras oscuras); lo que indica que los transformantes produjeron la subunidad CtxB de la toxina colérica.

3.1.2. Expresión de la toxina colérica a partir de porciones del operón *ctxAB*.

Se examinó la capacidad de los genes *ctxAB* presentes en los tres plasmidios mostrados en la Figura 4 para dirigir la expresión de las subunidades de la toxina colérica en la cepa SG251a. Este hospedero se seleccionó por estar desprovisto del profago CTXΦ y no producir toxina colérica (Ledón y cols, 2003).

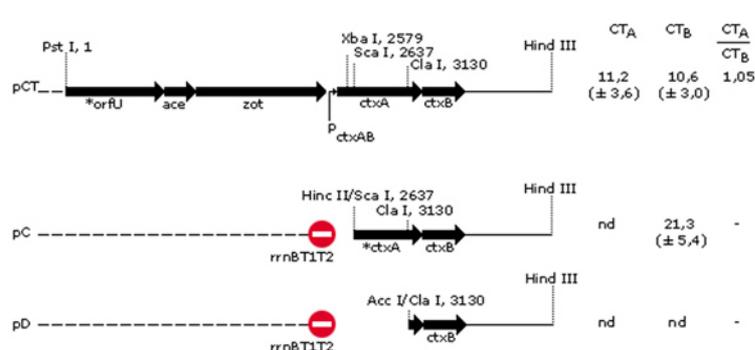


Figura 4. Producción de las subunidades de la toxina del cólera por la cepa SG251a, transformada con los plasmidios replicativos pCT, pC y pD. Los nucleótidos se enumeran comenzando en el sitio Pst I y los plasmidios se alinean por el gen *ctxB*. Los espacios indican secuencias delecionadas. Símbolos y abreviaturas: Línea fina, ADN cromosómico de *V. cholerae*; línea discontinua, secuencia de vector pUC19; rrnBT1T2, terminador transcripcional; n.d., no detectable (< 0,01 pmol ml⁻¹). CT_A y CT_B son el promedio de 8 determinaciones de la concentración de toxina (pmol ml⁻¹), medidas con los AcMs anti-CtxA y anti-CtxB, respectivamente, en GM1-ELISA.

La cepa *V. cholerae* SG251a transformada con pCT expresó y secretó la toxina colérica hacia el sobrenadante (Figura 4, pCT). El cociente CT_A/CT_B = 1 indicó que la cantidad de toxina fue la misma al cuantificarla con el AcM anti-CtxB o con el AcM anti-CtxA. La cepa SG251a transformada con pC expresó CtxB pero no CtxA (Figura 4, pC), indicando que en ausencia del promotor del operón P_{ctxAB}, la porción del operón subclonada en pC permite aún la transcripción de *ctxB*. Este resultado sugiere que la región del gen *ctxA* ubicada cadena abajo del sitio *ScaI* posee un promotor específico para la expresión de *ctxB*. Nótese que al construir pC se delecionó el promotor del operón y la porción 5' de *ctxA*. La cepa SG251a transformada con pD no expresó CtxA, ni CtxB, lo que indica que la porción del operón subclonada en pD no permite la síntesis de transcritos *ctxB*. Dado que pD solo se diferencia de pC en que no contiene el fragmento *ScaI-ClaI* (Figura 4, pC y pD), ello sugiere que el promotor específico para la expresión de *ctxB* que se ha supuesto, se localiza entre estos dos sitios ubicados en la zona codificadora del gen *ctxA*.

3.1.3. Mapeo del sitio de inicio de los transcritos específicos del gen *ctxB*.

El ARN de la cepa hospedero SG251a no protegió la sonda y esta se degradó completamente (Figura 5, carril 2). El ARN extraído de la cepa *V. cholerae* SG251a transformada con pC protegió un fragmento de 529 ± 4 bases (Figura 10, carril 3). El ARN obtenido de las cepas tipo salvaje C7258 (carril 4) o 569B (carril 5) protegió la sonda completa de 761 nucleótidos y también un fragmento de 529 bases. Se concluye que además del transcrito bicistrónico del operón que protege la sonda completa de 761 nucleótidos, existe un transcrito específico para el gen *ctxB* que protege los 529 nucleótidos del extremo 5' de la sonda.

El tamaño del fragmento protegido ubica el sitio de inicio transcripcional en la zona codificante de *ctxA*, 460 nucleótidos antes del codón de iniciación de *ctxB*, correspondiente al nucleótido 2811, representado en la Figura 5C. En posición 5' a este sitio, donde debe radicar el promotor que lo origina, existen dos regiones correctamente espaciadas que cumplen el consenso de las secuencias -35 y -10. Puesto que el inicio transcripcional corresponde más del 90% de las veces a una purina, el sitio real de inicio del transcrito probablemente sea la G que precede al nucleótido 2811 o la A, 2 pb cadena abajo. Este resultado explica la producción de subunidades CtxB a partir de pBSCT5 e indica que, en adición a los transcritos bicistrónicos del operón

de ser un mecanismo general para alcanzar la proporción correcta de subunidades en las toxinas binarias.

3.2. Obtención del vector suicida 2 portador de un alelo del gen de la hemaglutinina proteasa (*hap*) de *V. cholerae* interrumpido por el gen *celA* de *Cl. thermocellum*.

El plasmidio suicida 2, denominado pGPH6, porta en el sitio *Bgl*II un alelo de *hap* interrumpido por el gen *celA* de *Cl. thermocellum* (Figura 6). El pGPH6 tiene dos regiones, de 1,7 y 1,5 kb, homólogas al locus cromosómico de *hap* en *V. cholerae*. Ellas son 20 veces mayores que el tamaño requerido para la recombinación homóloga con el gen *hap* salvaje. De ahí que el plasmidio suicida pGPH6 pueda ser empleado con la intención de modificar cepas de *V. cholerae* mediante el reemplazo del gen *hap* salvaje por el alelo *hap::celA*.

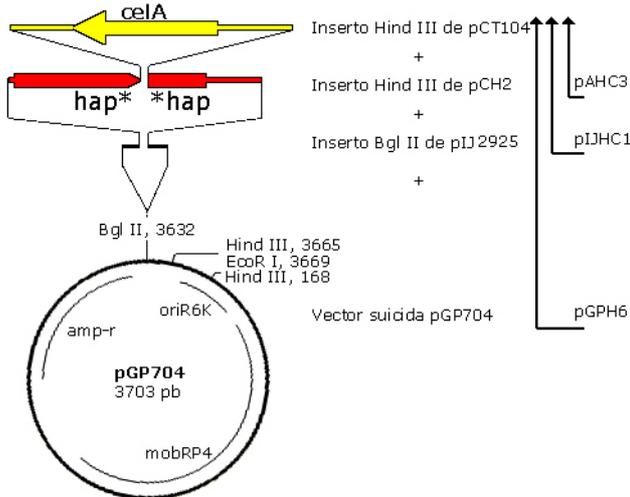


Figura 6. Construcción del vector suicida pGPH6. Abreviaturas. *celA*, *hap*, *amp-r*, *oriR6K* y *mobRP4*, conservan el significado atribuido en la Figura 1; *hap** y **hap*, son los fragmentos de *hap* después de interrumpido por el sitio *Stu*I con el gen *celA*.

El fragmento *Hind*III, de 3,2 kb, que contiene al gen *celA* en pCT104, se donó en el sitio *Stu*I de pCH2 y se obtuvo pAHC3, donde el gen *hap* está interrumpido por el ADN de *Cl. thermocellum* procedente de pCT104. El fragmento *Hind*III que porta el alelo *hap::celA* en pAHC3, se donó en el sitio de donación múltiple del plasmidio pIJ2925 (Janssen y Bibb, 1993), obteniendo así a pIJHC1, de donde el fragmento *Bgl*II, de 6,5 kb, se escindió y se donó en pGP704, lo que produjo a pGPH6.

3.3. Obtención de cepas de *V. cholerae* desprovistas del profago CTXΦ.

El profago CTXΦ de las cepas progenitoras C6706 y C7258, de biotipo El Tor, está compuesto por ADN del RS2 y del módulo de morfogénesis (MM); y adyacente por su extremo 3' tiene al profago satélite RS1Φ (Figura 7A, estructura P, Heidelberg y cols, 2000). Esta estructura se ubica en un fragmento de ADN *Hind*III de 16,6 kb (Figura 7B, carril 1, ejemplo de la cepa C7258). Tras movilizar a pAJF por conjugación hacia *V. cholerae* C6706 y C7258, el profago CTXΦ de estas cepas se marcó por la integración de pAJF al módulo de morfogénesis (Figura 7A, estructura C) en los exconjugantes C67_{8,4} y C72₈. Ello se detectó por la presencia de dos bandas *Hind*III, una de 8,3 y otra de 11,5 kb, que hibridaron con la sonda No. 1 en experimentos de hibridación de ácidos nucleicos (Figura 7B, carril 2, ejemplo de C72₈). La delección del profago recombinante CTXΦ::pAJF de C67₄ y C72₈ (*amp-r*) por recombinación homóloga entre el RS2 y el RS1Φ (Figura 7A, evento D) se propició por medio de 10 pases sucesivos en medio rico sin ampicilina y se detectó en las cepas 4₁₃ y 4₁₇, descendientes de C67₄ y en las cepas 8₁, 8₂, 8₄, 8₇ y 8₈, descendientes de C72₈. Ellas se identificaron porque su ADN no poseyó ningún fragmento *Hind*III que hibridara con la sonda No. 1 (Figura 7B, carril 3, ejemplo de 8₁). Este resultado demostró que estas siete cepas quedaron desprovistas del módulo de morfogénesis de CTXΦ donde radican los genes *orfU*, *ace*, *zot*, *ctxA* y *ctxB*. Por otra parte, en el ADN de las cepas 4₁₃, 4₁₇, 8₁, 8₂, 8₄, 8₇ y 8₈, un fragmento *Hind*III de aproximadamente 9,5 kb hibridó con la sonda No. 2 (Figura 7B, carril 4, cepa ejemplo: 8₁). Esta talla coincidió con la que debe obtenerse si las cepas retienen un profago RS1Φ solitario (Figura 7A, estructura S1) tras la delección de CTXΦ por recombinación homóloga entre el

RS2 y el RS1Φ.

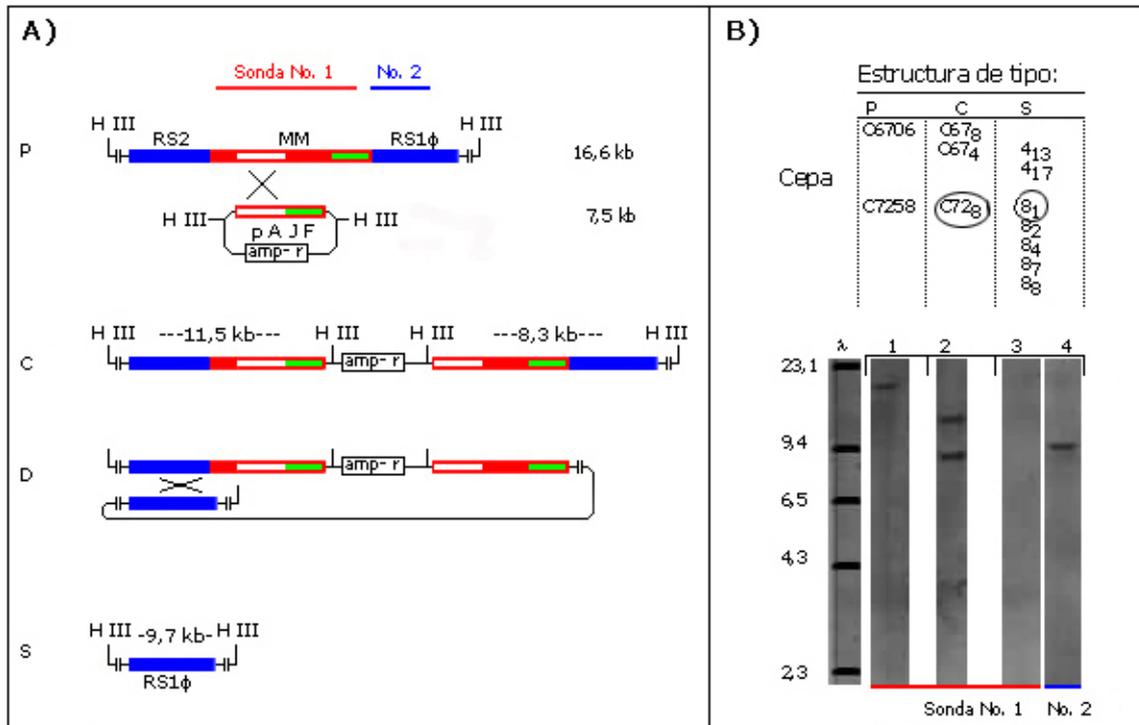


Figura 7. Obtención de cepas desprovistas de CTXΦ.

(A) Guía para identificar por *Southern blot* con las sondas No. 1 y 2, las cepas progenitoras (P), los exconjugantes con pAJF integrado a CTXΦ (C) y las cepas desprovistas de CTXΦ (S), producto de la recombinación homóloga entre RS2 y RS1Φ (D).

(B) Hibridación tipo *Southern blot* de digestiones *Hind*III del ADN de C7258 (carril 1), C72g (carril 2) y 8₁ (carriles 3 y 4), con las sondas No. 1 y No. 2.

El procedimiento de obtención de las cepas fue similar al de construcción de la cepa CVD110 (Michalski y cols, 1993), de ahí que, al igual que CVD110, no deben producir cólera en el humano. Además, dado que se deletó el profago CTXΦ, las cepas no revertirán a la virulencia por variación genética puntual.

La presencia de un profago RS1Φ solitario en 4₁₃, 4₁₇, 8₁, 8₂, 8₄, 8₇, y 8₈ no se observa como un riesgo de diseminación ambiental de viriones, porque la síntesis del genoma de ADN de RS1Φ requiere dos profagos repetidos en igual sentido y porque RS1Φ es un fago satélite dependiente de las proteínas de morfogénesis de CTXΦ (Moyer y cols, 2001; Davis y Waldor, 2000). Por el contrario, RS1Φ al portar el gen *rstR*, es un atributo de seguridad contra la readquisición de CTXΦ, ya que RstR reprime la expresión de *rstA*, cuyo producto génico es necesario para la replicación del genoma de los fagos CTXΦ que ingresen a la bacteria (Waldor y cols, 1997; Kimsey y Waldor, 1998). De ahí que se espera que *rstR* le confiera a las cepas obtenidas inmunidad contra la infección por el fago CTXΦ, procedente de vibriones de biotipo El Tor. Aunque el grado de inmunidad debe ser investigado, este elemento hace atractivas a las cepas obtenidas. Sin embargo estas cepas tienen la desventaja, respecto a las cepas de la competencia Perú-15 y CVD103HgR, de no estar marcadas como requiere la FDA (Kaper y cols, 1997). De ahí, que se decidiera introducir el gen codificante de la endoglucanasa A en su cromosoma, con la intención de distinguir las mediante un ensayo simple.

3.4 Obtención de cepas de *V. cholerae* que poseen el gen *hap* reemplazado por un alelo interrumpido por la inserción del gen *celA*.

Las cepas *V. cholerae* 4₁₃ y 8₁, obtenidas por delección del profago CTXΦ, se seleccionaron arbitrariamente para reemplazarles el gen natural de la hemaglutinina proteasa (*hap*) por el alelo recombinante interrumpido por el gen *celA* del plasmidio suicida pGPH6. El gen *hap* de 4₁₃ y 8₁ mapeó en un fragmento *Xho*I de 6,5 kb (Figura 8A, estructura P y 8B, carril 1, ejemplo de 8₁). Tras movilizar pGPH6 hacia 4₁₃ y 8₁, su integración al gen *hap* se detectó en los exconjugantes resistentes a ampicilina 13₁ - 13₁₀, derivados de 4₁₃ y en 6₁ - 6₄, 6₉ y 6₁₀, derivados de 8₁. Ellos se identificaron porque en sus ADNs, la sonda No. 3 hibridó con un solo fragmento de restricción *Xho*I, de talla cercana a los 23 kb (Figura 8B, carril 2, ejemplo de 6₃), que es la talla esperada tras la inserción de pGPH6 al gen *hap* (Figura 8A, estructura C).

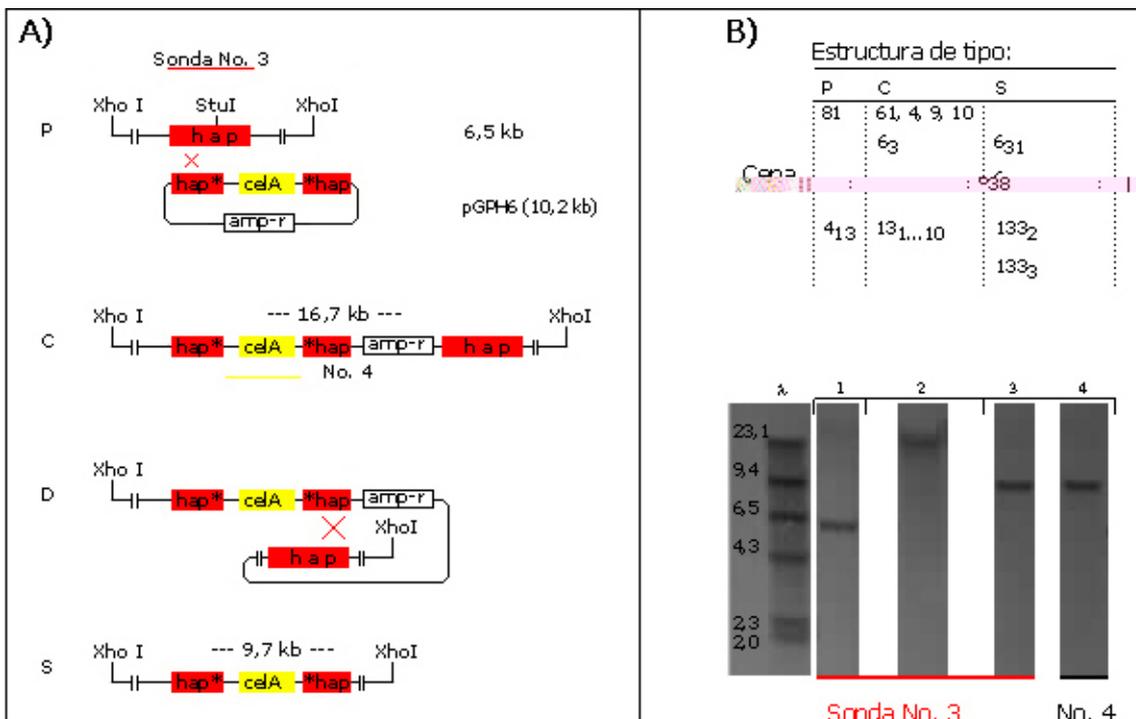


Figura 8. Reemplazo del gen *hap* por un alelo interrumpido por *celA* en las cepas 4₁₃ y 8₁.

(A) Guía para identificar por *Southern blot* con las sondas No. 3 y No. 4, las cepas progenitoras (P), los exconjugantes con pGPH6 integrado a *hap* (C) y las cepas que retuvieron el alelo de *hap* interrumpido por *celA* (S) tras el evento de segregación alélica (D).

(B) Hibridación tipo *Southern blot* de digestiones *Xho*I del ADN de 8₁ (carril 1), 6₃ (carril 2) y 6₃ (carriles 3 y 4), con las sondas No. 3 y No. 4.

Las cepas precursoras 6₃ y 13₃ se sometieron a 10 pases sucesivos en medio rico sin ampicilina para propiciar la segregación del gen *hap* natural por recombinación homóloga con el gen **hap* modificado (Figura 8A, evento D). Se detectaron un total de 21 clones sensibles a la ampicilina, de ellas, 3 provenientes de 13₃ que se denominaron 133₁-133₃, y las restantes 18 provenientes de 6₃, que se nombraron 63₁, 63₂,..., 63₁₈. En las cepas 133₂, 133₃, 63₁, 63₄, 63₈, 63₁₀, 63₁₅ y 63₁₆ ocurrió el reemplazo de *hap* por el alelo interrumpido por *celA*. Ellas se identificaron porque su ADN presentó un fragmento *Xho*I de aproximadamente 9,7 kb al analizarlo con las sondas No. 3 y No. 4 por hibridación de ácidos nucleicos tipo *Southern blot* (Figura 8B, carriles 3 y 4, cepa ejemplo: 63₈). Esta talla concuerda con la suma de los 3,2 kb del fragmento que contiene a *celA*, más

los 6,5 kb del fragmento *XhoI* donde radica *hap* en su estado natural. Estas se denominaron 'cepas de generación 2'.

La inserción en *hap* de genes codificantes de proteínas heterólogas para obtener cepas vivas atenuadas de cólera con finalidad vacunal es un aspecto novedoso, solo antecedido por los mutantes obtenidos por inserción de un gen que confiere resistencia a kanamicina, para estudios de patogénesis en conejos, hechos por Hase y Finkelstein en 1991 y por Finkelstein y cols, en 1992.

3.5. Los fenotipos de las cepas genéticamente modificadas obtenidas.

Producción de toxina colérica por las cepas progenitoras y las CGM. La concentración promedio de toxina colérica secretada al medio de cultivo AKI, detectada mediante el ensayo GM₁-ELISA con el anticuerpo monoclonal 1G10G5 –anti CtxA, fue de $1,1 \pm 0,1$ y $2,1 \pm 0,2$ pmol ml⁻¹ de holotoxina, en las cepas progenitoras C6706 y C7258, respectivamente. Entretanto, las cepas 4₁₃, 133₃, 8₁, 63₁, y 63₈ no produjeron toxina colérica detectable en el ensayo (límite de detección 0,01 pmol ml⁻¹). Estos resultados demostraron que la delección del profago CTXΦ del genoma de las cepas virulentas C7258 y C6706 redujo la producción de la toxina colérica *in vitro*, hasta alcanzar niveles no detectables con el ELISA empleado. La ausencia de producción de toxina garantiza que las cepas obtenidas no causen cólera severo (Sack y cols, 2004; Cohen y cols, 2002 y Tacket y cols, 1999) y que puedan estudiarse como cepas vacunales.

Producción de la hemaglutinina proteasa por las cepas progenitoras y las CGM. La hemaglutinina proteasa desnaturizada por calentamiento a 100°C en presencia de SDS, detectable en *Western blot* como una banda que migra a la altura de 36 kD, se encontró en los sobrenadantes de cultivo de las cepas progenitoras virulentas C7258, C6706 y en sus descendientes, genéticamente modificados, 8₁ y 4₁₃ (Figura 9, carriles 1, 2, 5 y 6), pero no en los sobrenadantes de las cepas *V. cholerae* 63₁, 63₈ ó 133₃ (Figura 9, carriles 3, 4 y 7). Estos resultados indican que la interrupción del gen *hap* por *celA* redujo la síntesis de Hemaglutinina proteasa a niveles inferiores a los que detecta el *Western blot* empleado, lo que sustenta su inactivación.

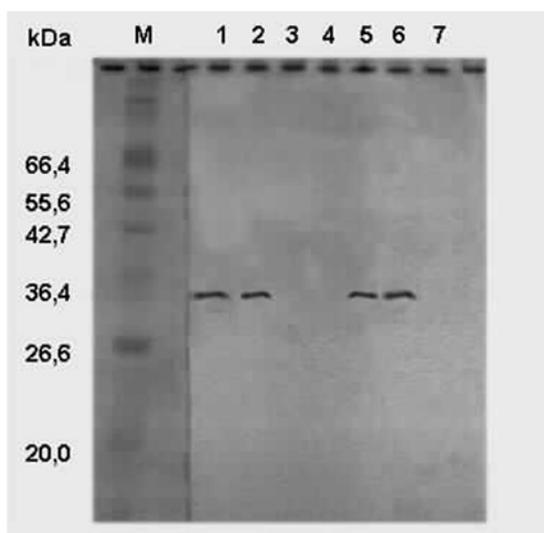


Figura 9. Detección de la expresión de la hemaglutinina proteasa (Hap) mediante *Western blot* de cultivos TSB de las cepas.

carril 1, C7258;
carril 2, 8₁;
carril 3, 63₁;
carril 4, 63₈;
carril 5, C6706;
carril 6, 41₃;
carril 7, 133₃.

Las cepas se cultivaron en caldos TSB (triptona, 1,7%; peptona, 0,3%; K₂HPO₄, 0,25%; NaCl, 0,5%) durante 20 horas a 30°C, bajo agitación de 100 rpm, según Booth y cols (1983). Los sobrenadantes se esterilizaron por filtración, se concentraron diez veces y se analizaron por *Western blot*.

La inactivación de *hap* reduce la actividad proteolítica extracelular de *V. cholerae* (Zhou y cols, 2004), disminuye su habilidad para penetrar geles de mucina (Silva y cols, 2003) e impide la expresión de esta posible toxina accesoria (Mel y cols, 2000), lo que debe redundar en un mejor perfil de seguridad de las cepas 133₃,

63₁ y 63₈.

Producción de endoglucanasa A. Una banda de peso molecular aparente de 42 kDa, correspondiente a la endoglucanasa A, se identificó por *Western blot* en los extractos de las cepas 133₃, 63₁ y 63₈, (Figura 10A, carriles 2, 4 y 5). Por el contrario, esa banda no apareció en los carriles correspondientes a las cepas 4₁₃ y 8₁ (Figura 10A, carriles 1 y 3). Estos resultados indican que las cepas *V. cholerae* 133₃, 63₁ y 63₈ expresan el gen *celA* que interrumpe al gen *hap* en su genoma. Sin embargo, la talla de esta proteína es menor que la de 56 kDa, producida por *C. thermocellum* (Petre y cols, 1981) y que las de 47 y 49 kDa, producida por *S. Cerevisiae* (Silva y cols, 1991) o que la de 49 y 52 kDa producida por *E. coli* (Schwarz y cols, 1986). Sin embargo, este tamaño coincide con el del núcleo catalítico de la enzima, de 42 kDa, obtenido por digestión papaínica (Souchon y cols, 1996).

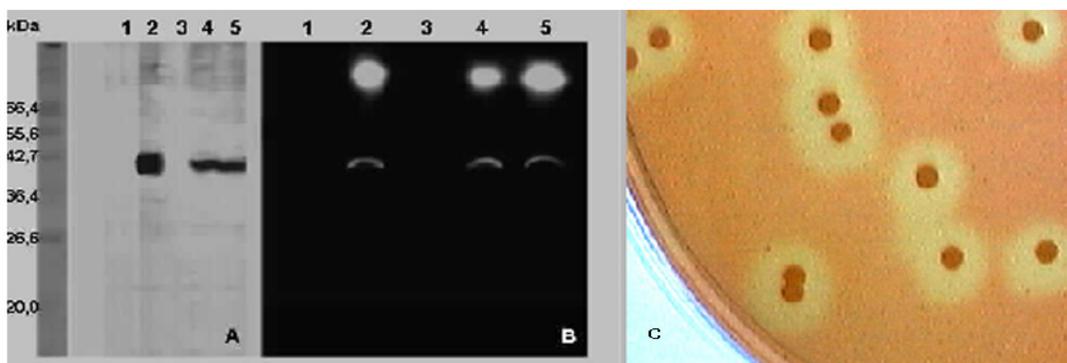


Figura 10. Detección del producto del gen marcador *celA* mediante: *Western blot* (A) y geles de actividad de Beguin (B) en las cepas 4₁₃, carril 1; 133₃, carril 2; 8₁, carril 3; 63₁, carril 4 y 63₈, carril 5 y (C) mediante ensayos de actividad en colonias aisladas de la cepa 63₈ expuestas a agar indicador de carboximetilcelulosa. El marcador de tallas moleculares "Protein marker, Broad range (Biolabs, cat No. 770S)" se alineó a la izquierda de los geles en A y B para tener un estimado de las tallas moleculares de CelA.

En los extractos de las cepas 133₃, 63₁ y 63₈ se detectaron dos especies moleculares que degradan la carboximetilcelulosa en geles de Beguin, una migró a la altura de 42 kDa y la otra por encima de los 66,4 kDa (Figura 10B, carriles 2, 4 y 5). En los extractos de las cepas 4₁₃ y 8₁ no se detectó actividad (Figura 10B, carriles 1 y 3). Ello indicó que la endoglucanasa A sintetizada por 133₃, 63₁ y 63₈ es funcional. La banda de tamaño superior a los 66,4 kDa debe corresponder con agregados activos de la enzima que no se disocian por el tratamiento térmico de 70°C, durante 15 minutos (Beguin, 1983). Dado que el polipéptido de 42 kDa producido por *V. cholerae* fue activo (Figura 19 B), se sugiere que en este hospedero la proteína CelA se modifica proteolíticamente hasta alcanzar la talla del núcleo catalítico mediante un proceso diferente al de los restantes hospederos.

Al crecer colonias de de 63₈ sobre medio sólido, exponerlas al agar indicador de carboximetilcelulosa, teñir con rojo congo por 5 minutos y lavar con NaCl 1M por 10 minutos, alrededor de las colonias de 63₈ se detectaron halos de hidrólisis de la carboximetilcelulosa (Figura 10C). Ello indicó que la actividad de la endoglucanasa A es fácilmente detectable y permite identificar y trazar las cepas, cumpliendo así los requisitos impuestos por la FDA a los candidatos vacunales vivos atenuados. El uso de este marcador confiere ciertas ventajas sobre los marcadores empleados en las cepas de la competencia. En la cepa de la competencia CVD103HgR el marcador es un gen que confiere resistencia a mercurio (Kaper y cols, 1997) y en la cepa Pe-

rú-15, uno que confiere resistencia a streptomycin (Kenner y cols, 1995). Una ventaja de utilizar *celA*, en lugar de marcadores dependientes de dosis de otros productos, es que en *V. cholerae* no hay actividad celulolítica de fondo. Por otra parte, el método de detección de CelA se realiza en 2 a 3 h, sólo requiere colonias crecidas en medio sólido y detecta cantidades de endoglucanasa inferiores a un nanogramo (Beguin, 1983). La técnica es particularmente aplicable en laboratorios mínimamente equipados y en estaciones de trabajo en experimentos de campo. Una simple colonia de vibriones expresando CelA se puede detectar incluso dentro de un césped de otras bacterias crecidas en placas. En cambio, el uso del gen de resistencia a mercurio de la cepa CVD103HgR tiene el inconveniente que su detección se realiza por un proceso poco reproducible (Kaper JB, 1999, comunicación personal) y la resistencia a estreptomycin obtenida en la cepa Perú-15 (Kenner y cols, 1995) tiene el inconveniente de ser un marcador de resistencia a antibiótico que además atenúa la velocidad de crecimiento de la cepa (Mekalanos, comunicación personal). Estos elementos ofrecen a las cepas de segunda generación obtenidas por marcado con *celA*, ventajas para su utilización sobre las cepas de la competencia.

3.6. Pertinencia del uso de las CGM con fines vacunales.

3.6.1 Virulencia de las CGM y colonización intestinal en ratones Balb/c lactantes.

Se midió la sobrevivencia de ratones lactantes de la línea Balb/c infectados por intubación gástrica con 10^3 , 10^4 y 10^5 UFC de las cepas patógenas *V. cholerae* C6706 y C7258 para seleccionar la dosis de trabajo. Se obtuvieron las curvas de Kaplan-Meier y los tiempos de sobrevivencia se compararon utilizando la prueba Log-rank. El vehículo sin carga bacteriana no produjo efecto letal, en cambio, la muerte de todos los ratones inoculados con la cepa C6706 se produjo en un término de 8 días y la de todos los inoculados con la cepa C7258, en cuatro días (Figura 11). En todos los casos, la siembra por agotamiento del extracto intestinal condujo al crecimiento de *V. cholerae*.

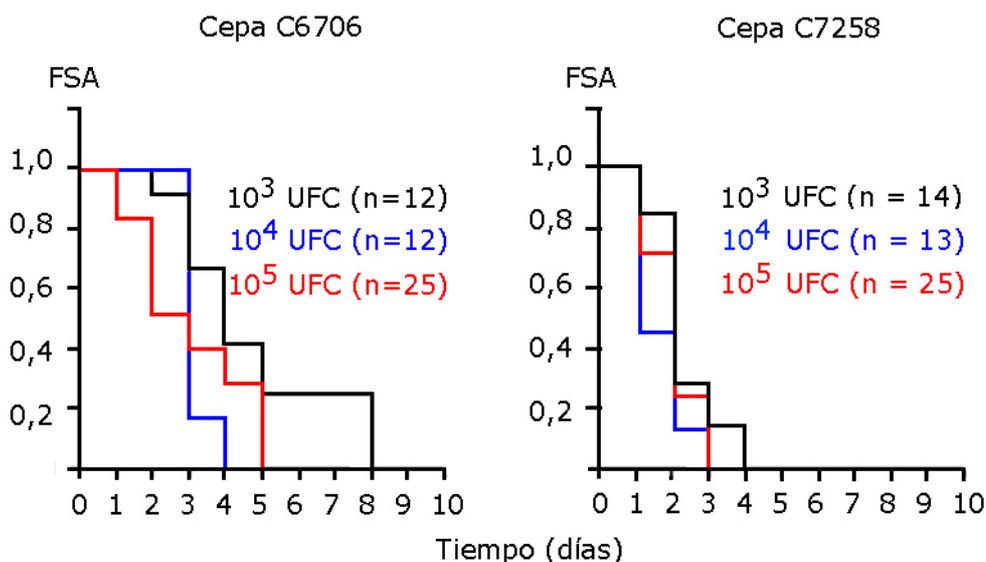


Figura 11. Sobrevivencia de ratones lactantes de la línea Balb/c tras inocularles 10^3 , 10^4 ó 10^5 UFC de las cepas progenitoras C6706 y C7258. En cada cuadro se indica la dosis y el total de animales evaluado por cada dosis. FSA, frecuencia de sobrevivencia acumulada.

La mediana del tiempo de supervivencia de los ratones que recibieron 10^3 UFC de C6706 fue 3 días y difirió significativamente de la de 2 días que se obtuvo en los receptores de 10^4 UFC (Log-rank, $P = 0,0234$). La mediana del tiempo de supervivencia en los animales infectados por 10^5 UFC fue también de 2 días y no difirió significativamente de la de los infectados por 10^4 UFC (Log-rank, $P = 0,7262$). Ello indica que la cepa C6706 y sus derivados deben usarse a las dosis de 10^4 o preferiblemente 10^5 UFC en que se logra el efecto letal más fulminante.

En el caso de la cepa C7258, el tiempo de supervivencia en respuesta a 10^3 UFC (mediana = 1 día) no difirió significativamente del correspondiente a 10^4 UFC (mediana = 0,5 días) (Log-rank, $P = 0,0518$), ni este difirió significativamente del correspondiente a 10^5 UFC (mediana = 1 día) ($P = 0,2220$). Ello indica que la cepa C7258 y sus descendientes genéticamente modificados pueden usarse a las dosis de 10^3 , o preferiblemente 10^4 ó 10^5 UFC para evaluaciones de virulencia en ratones lactantes.

Contrario a lo ocurrido a los ratones inoculados con las cepas progenitoras virulentas, los 75 receptores de 10^5 UFC de *V. cholerae* 4_{13} , 133_3 , 8_1 , 63_1 ó 63_8 , sobrevivieron hasta el fin del experimento (adultez, 28 días). Se concluyó que 4_{13} , 133_3 , 8_1 , 63_1 y 63_8 estaban atenuadas respecto a sus progenitores C6706 y C7258. Estos resultados se corresponden con los de Richardson (1994) quien reconoció que el efecto letal de *V. cholerae* en ratones lactantes se debía al efecto de la toxina colérica e indican además que las cepas atenuadas obtenidas no producen otras toxinas con efecto letal a esta especie. Algunas toxinas descritas en los vibrios son la hemolisina (Zhang y Honda, 1999), la lecitinasas (Fiore y cols, 1997), la toxina WO7 (Walia y cols, 1999), la proteína citotónica S-CEP (Sathyamoorthy y cols, 2000; McCardell y cols, 2000) y la toxina RtxA (Lin y cols, 1999; Fullner y cols, 2001). La hemolisina, la lecitinasas y la toxina RtxA están codificadas en el genoma de las cepas obtenidas (no mostrado). Se desconoce si las restantes también; pero si lo están, ninguna de ellas parece tributar al efecto letal de *V. cholerae* en este modelo.

La cantidad de UFC por cm^2 detectadas en el intestino delgado de los ratones lactantes a las 24, 72 y 120 h de inoculados, se empleó como medida de su colonización. Las cepas 4_{13} , 133_3 , 8_1 y 63_1 colonizaron el intestino delgado de todos los ratones lactantes estudiados, obteniéndose valores en el rango $10^3 - 10^7$ UFC cm^2 desde el primero hasta el quinto día, independientemente de la cepa estudiada (Tabla 1). Estos resultados indicaron que ni la inactivación de *hap* ni la expresión de la endoglucanasa A originan defectos de colonización evidenciables en este modelo.

Tabla 1. Colonización del intestino delgado de ratones Balb/c lactantes por las cepas genéticamente modificadas.

Cepa	Inóculo (rango)	Log ₁₀ UFC cm^2 recuperadas del intestino delgado (rango) a:		
		1 día	3 días	5 días
4_{13}	5,6 (5,3 - 5,7)	5,2 (4,4 - 6,3)	5,4 (4,7 - 5,8)	6,0 (5,8 - 6,9)
133_3	5,5 (5,0 - 5,9)	4,6 (3,5 - 5,5)	5,8 (4,2 - 6,5)	5,7 (4,7 - 6,2)
8_1	5,3 (5,0 - 5,9)	6,0 (5,2 - 6,3)	5,2 (4,7 - 5,8)	5,7 (4,5 - 6,2)
63_1	5,3 (5,0 - 5,9)	5,2 (4,7 - 5,9)	5,5 (4,4 - 5,9)	5,9 (4,7 - 6,1)
63_8	5,6 (5,1 - 6,8)	2,3 (2,1 - 2,5)	3,6 (2,1 - 5,9)	3,2 (2,0 - 5,8)

De la cepa 63_8 , se recobraron entre 10^2 y 10^6 UFC cm^2 de intestino delgado a las 24 y las 72 h post-inoculación (Tabla 1). Los valores de UFC cm^2 observados a estos tiempos difieren significativamente de los

correspondientes a la cepa 63₁ (U Mann-Whitney, P = 0,04117, 24 h; P = 0,01307, 72 h). A las 120 h, 63₈ se recobró de los homogenados intestinales de todos los ratones lactantes receptores de 10⁵ UFC y las diferencias de colonización respecto a 63₁ no alcanzaron significación estadística (U Mann-Whitney, P = 0,086480). Se concluyó que la cepa 63₈, a diferencia de las restantes, coloniza el intestino delgado murino de forma atenuada, una propiedad que no está relacionada con la interrupción de *hap* por *ceIA*.

Entre todas las obtenidas, la cepa 63₈ fue la más atenuada; presentó doble atenuación, de virulencia y de colonización. A partir de estos experimentos, la cepa 63₈ se perfiló como el primer candidato vacunal contra el cólera a ser evaluado en voluntarios.

3.6.2. Susceptibilidad de las cepas a la infección por el fago CTXΦ El Tor.

La susceptibilidad a la infección por el fago transmisor de los genes de la toxina colérica CTXΦ (Waldor y Mekalanos, 1996) se determinó tras exponer 10⁷ vibrones cultivados en condiciones de expresión de la fimbria receptora TCP, a 10⁵-10⁶ partículas del fago CTXKn-Φ procedente del biotipo El Tor. Las cepas controles Perú-15 y 569B formaron 10⁴ a 10⁵ UFC resistentes a kanamicina (Figura 12). En cambio, la cepa 8₁ produjo entre 10² y 10³; la cepa 63₁ formó menos de 10², y las cepas 4₁₃ y 133₃, entre 10² y 10⁴. Las diferencias entre los valores de las cepas controles y las restantes fueron significativas (SNK, α = 0,05). En contraste, nunca se detectó infección de la cepa 63₈ (límite de detección 9 vibrones infectados). Estos resultados indican que las cepas obtenidas se infectan *in vitro* significativamente menos por el fago CTXΦ que los controles empleados y por tanto exhiben menos riesgo de recuperar la virulencia, especialmente la cepa 63₈ que no se infectó. Dado que las diferencias entre 8₁ y 63₁ o entre 4₁₃ y 133₃ no fueron significativas, se concluye que el reemplazo de *hap* por el alelo *hap::ceIA* no modifica la susceptibilidad a la infección por CTXΦ. La resistencia de 63₈ a la infección por CTXΦ fue un hallazgo inesperado, causa por la que se evaluó la expresión de la subunidad principal de la fimbria receptora TCP.

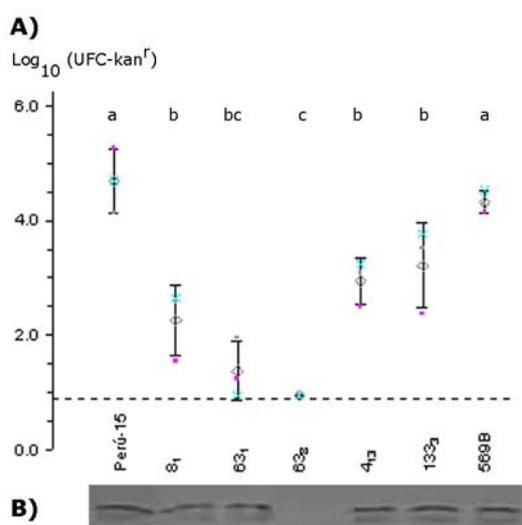


Figura 12. Sensibilidad al fago CTXKn-Φ (A) y expresión de la subunidad principal de la fimbria receptora TCP (TcpA) en las cepas Perú-15, 8₁, 63₁, 63₈, 4₁₃, 133₃ y 569B (B).

En el eje vertical se presentan los valores del logaritmo decimal del número de unidades formadoras de colonias resistentes a kanamicina producidas por la infección de cada cepa con CTXkn-Φ. Las barras de error indican las desviaciones estándares. Las cepas Perú-15 y 569B sirvieron de control. Letras desiguales indican diferencias significativas (Prueba SNK paramétrica, α = 0,05). Línea horizontal discontinua, límite de detección.

En *Western blot* con el AcM anti-TcpA 1E10E5 (Falero y cols, 2003) se detectó que 63₈ no expresa la subunidad TcpA de la fimbria TCP, a diferencia de las restantes cepas atenuadas 8₁, 63₁, 4₁₃ y 133₃ (Figura 12B). Ello indicó que la causa por la que 63₈ no se infecta es la falta de expresión *in vitro* del receptor de CTXΦ. La

sensibilidad de 63₈ a CTXΦ se examinó entonces *in vivo*. A un grupo de cinco ratones lactantes inoculado con 10⁵ UFC por vía intragástrica 72 h antes, se les administró 10⁵ - 10⁶ partículas del fago CTXkn-Φ por la misma ruta y se incubó durante 24 horas adicionales. La cantidad promedio geométrica de vibriones infectados fue 2,4 × 10³ UFC (rango, 1 × 10² - 1 × 10⁵) de un total de 1,1 × 10⁷ UFC (7 × 10⁶ - 2 × 10⁷) recuperadas del intestino murino. Se concluyó que la cepa 63₈ es vulnerable a la infección por CTXΦ durante la colonización intestinal.

La presencia de un profago RS1Φ en 8₁, 63₁, 63₈, 4₁₃ y 133₃ explica que se infecten menos que las cepas control, dado que RS1Φ porta un gen *rstR* que ofrece inmunidad contra la infección por fagos procedentes de vibriones del mismo biotipo (Kimsey y Waldor, 1998; Liang y cols, 2003). Se debe recordar que la cepa control Perú-15, de biotipo El Tor, está desprovista del gen *rstR* (Kenner y cols, 1995) y que la cepa control 569B tiene un *rstR* de fagos procedentes del biotipo Clásico que no ofrece inmunidad contra fagos provenientes del biotipo El Tor (Kimsey y Waldor, 1998). Estos datos sugieren que el elemento RS1Φ remanente en las cepas atenuadas ejerce inmunidad contra CTXΦ El Tor y constituye un elemento que incrementa la seguridad al limitar la readquisición de CTXΦ proveniente de cepas de biotipo El Tor. Sin embargo, este elemento no impide de forma absoluta la readquisición de los genes *ctxAB*, por lo que es de interés conocer cómo se comportan los caracteres de virulencia en estas cepas tras la readquisición de CTXΦ.

3.6.3 Caracteres de virulencia de las CGM infectadas con CTXΦ.

Expresión de la toxina colérica. La concentración promedio de toxina producida por estas cepas en medio AKI fue 0,08 ± 0,01 pmol ml⁻¹ en la cepa 4₁₃ (CTXkn-Φ); 1,6 ± 0,3 pmol ml⁻¹ en la cepa 133₃ (CTXkn-Φ); 9,8 ± 3,4 pmol ml⁻¹ en la cepa 8₁ (CTXΦ-kn); 2,0 ± 1,2 pmol ml⁻¹ en la cepa 63₁ (CTXΦ-kn) y 0,12 ± 0,01 pmol ml⁻¹ en la cepa 63₈. Estos resultados indicaron que la infección de las cepas atenuadas 4₁₃, 133₃, 8₁, 63₁ y 63₈ por el fago CTXΦ-kn subvierte su atoxigenicidad.

Potencial letal en ratones lactantes. Se midió la sobrevivencia de ratones Balb/c lactantes inoculados con 10⁵ UFC de las CGM por intubación gástrica. Todas las CGM, excepto 63₈ (CTXΦ-kn), produjeron efecto letal en todos los animales (Figura 13). Este hallazgo sugiere que la producción de toxina colérica a partir del fago CTXΦ revierte a la virulencia a las cepas que colonizan normalmente el intestino de los ratones lactantes pero no a las que poseen una atenuación de colonización como la descrita para la cepa 63₈.

La mediana del tiempo de sobrevivencia fue 1 día en los ratones inoculados con 8₁(CTXΦ), 63₁(CTXΦ) y 133₃CTXΦ); fue 3 días en los que recibieron la cepa 4₁₃(CTXΦ) y 28 días en los receptores de la cepa 63₈(CTXΦ-kn), que produjo el deceso de solo 4 de los 18 animales inoculados. El significado más simple e importante de estos resultados es que la cepa 63₈ es más segura que las restantes aún cuando pudiera readquirir el fago CTXΦ en el tracto gastrointestinal, lo cual es un elemento de pertinencia a favor de su utilización. No obstante, la estabilidad de este fenotipo y la del genotipo que lo origina deberá ser estudiada.

La diferencia entre los tiempos de sobrevivencia debido a la acción de las cepas 8₁(CTXΦ) y 63₁(CTXΦ) no alcanzó significación estadística (Log-rank, P = 0,20971). En contraste, la diferencia entre los tiempos de sobrevivencia en respuesta a 8₁(CTXΦ) y 63₈(CTXΦ) sí la alcanzó (Log-rank, P = 0.00000). Las diferencias entre tiempos de sobrevivencia tampoco fueron significativas entre 8₁(CTXΦ) y C7258 (Log-rank, P = 0,63856).

Por ello, se concluye que al infectarse con CTX Φ la cepa 8₁ recobra la virulencia de su cepa progenitora C7258, mientras que 63₈ permanece significativamente atenuada.

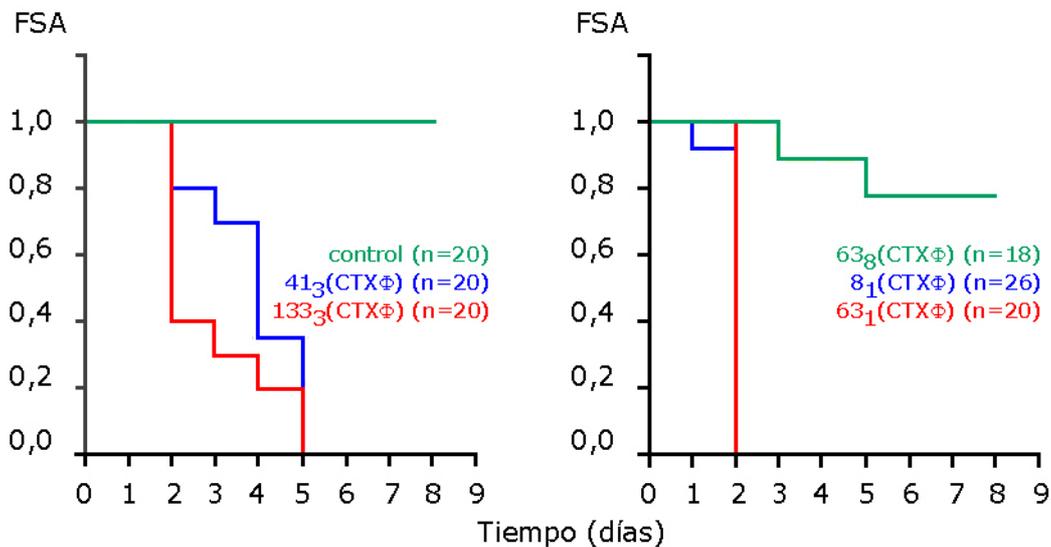


Figura 13. Sobrevivencia de ratones Balb/c lactantes inoculados por intubación gástrica con 10^5 UFC de las cepas genéticamente modificadas infectadas por el fago CTX Φ . En cada cuadro se indica la cepa y el número total de animales inoculados (n). FSA, frecuencia de supervivencia acumulada; control, vehículo. Los 14 sobrevivientes a 63₈ estuvieron vivos hasta el final del experimento (día 28).

Por otro lado, la diferencia entre los tiempos de supervivencia debido a la administración de la cepa 41₃(CTX Φ) y 133₃(CTX Φ) no alcanzó significación estadística (Log-rank, $P = 0,06397$). De forma similar, la diferencia entre los tiempos de supervivencia en respuesta a 133₃(CTX Φ) y C6706 (dosis 10^5) tampoco alcanzó significación estadística (Log-rank, $P = 0,76639$), lo que permite concluir que la cepa 133₃ al infectarse con CTX Φ recobra el potencial letal de su cepa progenitora inicial C6706, para los ratones lactantes.

Estos resultados indican que la readquisición del fago CTX Φ en las cepas 8₁, 63₁, 41₃ y 133₃ subvierte la atenuación, pero que en cambio, la cepa 63₈ permanece significativamente atenuada tras readquirir CTX Φ , aún cuando produce toxina colérica.

Los resultados expuestos en la sección 3.6 denotaron la pertinencia de seleccionar la cepa 63₈ para su evaluación preclínica. Esta evaluación, realizada en el Instituto Finlay, demostró su atoxicidad, colonización, inmunogenicidad y efecto protector en conejos (García, 2001; García H. y cols, 1998; García L. y cols, 1998), comprobó su atoxicidad y colonización en ratones lactantes (Cedré y cols, 1998) y demostró su atoxicidad sobre íleon humano *ex vivo* (Burgos y cols, 1999). Los resultados preclínicos fueron satisfactorios y permitieron pasar a la fase de evaluación en voluntarios.

3.7. Resultados de la prueba de concepto de la cepa 63₈.

Respuesta clínica a la ingestión de la cepa 63₈. Ningún individuo tuvo reacciones adversas severas que impidieran sus actividades diarias. Todas las reacciones inducidas por la administración de 63₈ o el placebo fueron ligeras, excepto un individuo vacunado que tuvo cefalea moderada. La reacción más importante observada fue la diarrea ligera, que se presentó en el 16 % de los vacunados y en el 9 % de los receptores de placebo; la diferente incidencia no alcanzó significación estadística (PEF de 2 colas, $P = 0,6662$). La diferencia entre el número de episodios diarreicos por voluntario sintomático en el grupo vacuna (mediana = 3; ran-

go, 1-5) y el grupo placebo (mediana = 4; rango, 3 - 5) tampoco alcanzó significación estadística (U de Mann-Whitney, P = 0,4874), ni el volumen total excretado por individuo: (grupo vacuna: mediana = 520 g; rango, 300 - 780 vs grupo placebo: mediana = 655 g; rango 420 - 890 g) (U de Mann-Whitney, P = 0,8000). La diferencia de incidencia de meteorismo, cólicos ó cefalea, no alcanzó significación estadística entre el grupo vacuna y el placebo (Tabla 2). No hubo emesis o fiebre. Estos resultados sugieren que la ingestión de 63₈ no es más reactógena que la ingestión de NaHCO₃ en voluntarios sanos.

Tabla 2. Reacciones tras la ingestión de 10⁹ UFC de la cepa atenuada *Vibrio cholerae* 63₈.

Reacción tipo:	Número de voluntarios que presentaron reacciones de intensidad:						Valor de P ^(g)
	No reacción ^a		Ligera ^b		Moderada ^c		
	V ^e	P ^f	V	P	V	P	V ^e vs P ^f
Diarreas	20	19	4	2	-	-	0,6662
Meteorismo	11	11	13	10	-	-	0,7683
Cólicos	17	15	7	6	-	-	1,0000
Cefalea	18	18	5	3	1	0	0,4689
Vómitos	24	21	-	-	-	-	-
Fiebre	24	21	-	-	-	-	-

^aausencia de reacciones, ^breacción fácilmente tolerable y de corta duración que no interfiere con las actividades diarias, ^creacción que interfiere con las actividades diarias pero no las impide, ^dreacción que impide la realización de las actividades diarias del individuo, ^ereceptor de vacuna, ^freceptor de placebo, ^g Prueba exacta de Fischer de dos colas.

Los candidatos vacunales de biotipo El Tor precedentes, JBK70 y CVD110, se consideraron muy reactógenos porque indujeron diarreas moderadas en el 50 al 70% de los voluntarios norteamericanos que los ingirieron, cuyos volúmenes alcanzaron los 1,8 litros (2 a 13 deposiciones por voluntario) (Levine y cols, 1988; Tacket y cols, 1993). De igual forma, la cepa CVD 111 (Tacket y cols, 1997), aunque fue mejor tolerada y estuvo a punto de ser aceptada, indujo diarreas líquidas en 8 - 12% de los individuos no inmunes en que se evaluó. El número de episodios con deposiciones líquidas fue superior a 3, varios individuos tuvieron 6 y 3 individuos tuvieron más de 10 episodios, razón por la cual la cepa fue rechazada como candidato vacunal (Taylor y cols, 1999).

Por el contrario, la cepa vacunal de biotipo clásico CVD103HgR, considerada no reactógena, produjo diarreas solo en el 0,5 al 11% de los voluntarios, dependiendo de la población diana (Tacket y cols, 1999; Kotloff y cols, 1992; Su-Arehawaratana y cols, 1992). La cepa vacunal El Tor Perú-15, considerada no reactógena, produjo diarreas líquidas en 2 de 40 voluntarios (Cohen y cols, 2002). Sin embargo, al comparar estos resultados con los de 63₈, hay una diferencia importante que debe ser considerada. La definición de diarrea utilizada en los estudios precedentes fue de 4 o más deposiciones líquidas en 24 h. Si aplicamos este criterio, 63₈ no produjo diarreas en ningún voluntario. En base a estos elementos se sugiere que se continúe el estudio de la cepa 63₈ como cepa atenuada para una vacuna de cólera.

Al estudiar cepas atenuadas de cólera en voluntarios, el meteorismo y los cólicos ligeros son de carácter local y menor importancia. Al estudiar 63₈, estas reacciones fueron igualmente referidos por vacunados y receptores del placebo; sin embargo, la reacción de tipo meteorismo incidió en más del 50% probablemente como

efecto placebo. Alternativamente, es probable que el modo de efectuar la encuesta clínica induzca a los voluntarios a una respuesta positiva. En estudios futuros la pregunta del clínico debe ser ¿Qué se siente ud.? y no ¿Siente ud. meteorismos?

La ocurrencia de un episodio de cefalea de intensidad moderada demanda seguimiento futuro pues la aparición frecuente de este síntoma puede implicar el rechazo del uso de la cepa.

Tomados de conjunto, los resultados sugieren que 63₈ es una cepa segura que puede ser incluida en una preparación vacunal viva de cólera y que la expresión de *celA* en ella no ejerce efectos indeseados sobre el hospedero expuesto. Así, 63₈ es la única cepa de biotipo El Tor y serotipo Ogawa que ha resultado bien tolerada en voluntarios, pues todas las anteriores indujeron efectos adversos en un grado diferente que el placebo. Se puede interpretar que la reducción del potencial patogénico asociado con inactivación de la actividad biológica de Hap, clasificada como una potencial toxina accesoria (Fullner y cols, 2001), contribuye a que 63₈ sea bien tolerada.

Las causas por las cuales la mayoría de las cepas atenuadas de cólera son reactógenas no han sido dilucidadas, ni tampoco las causas por las cuales algunas son bien toleradas (Zhou y cols, 2004). La literatura ha descrito solo tres cepas de *V. cholerae* suficientemente atenuadas para su uso en humanos, la cepa CVD 103HgR (Δ *ctxA*, *ctxB*⁺, *hylA::merR*, *RtxA*⁻, *HapR*⁻, no móvil), la cepa Perú-15 [Δ (CTX ϕ , RS1 ϕ , attRS, *dif*, *rtxA*), *recA::Phtp-ctxB*, no móvil, Str] y ahora la cepa 63₈ (Δ CTX ϕ , *hap::celA*, *ToxR*⁻, MSHA⁻). Desde el punto de vista genético, además de la delección del gen codificante de la subunidad CtxA o la delección del profago CTX ϕ , la cepa CVD103 HgR y Perú-15 tienen en común la falta de motilidad y la ausencia de producción de RtxA. Ninguna de estas dos propiedades es común a la cepa 63₈. Una hipótesis no demostrada plantea que la motilidad contribuye a la penetración de la capa mucosa y tributa a la virulencia de las cepas patógenas y a la reactogenicidad de las cepas atenuadas al posibilitar la interacción directa vibrión - enterocito (Mekalanos y Sadoff, 1994; Mekalanos y cols, 1995). En cuanto a la toxina RtxA, se conoce que despolimeriza los filamentos de actina y destruye las monocapas de células T84 polarizadas (epitelio intestinal de colon) cultivadas *in vitro*, lo cual conduce a la disminución de la resistencia transepitelial, por lo que se cree que puede originar reactogenicidad (Fullner y cols, 2001; Fullner, 2003). Si estudios posteriores mostraran la necesidad de rondas sucesivas de atenuación en la cepa 63₈, se deberá pensar en una de estas dos mutaciones o en ambas. Pero, dado que probablemente existan restricciones de propiedad intelectual, se deberá concebir una estrategia dirigida a solventar la dificultad, como por ejemplo la interrupción de *rtxA* o genes codificantes de proteínas necesarias a la motilidad, mediante la inserción de genes codificantes de antígenos heterólogos que confieran protección contra otras enfermedades del tracto gastrointestinal.

Excreción fecal de la cepa 638. La cepa 63₈ se detectó, al menos una vez en 21 de 24 vacunados (87.5%) (Tabla 3). El período de incubación para el inicio de la excreción tuvo un valor de la mediana igual a 3 días (cuartil inferior, C.I. = 1 día; cuartil superior, C.S. = 4 días). La excreción duró por una mediana de dos días (C.I. = 1 día; C.S. = 3 días). Solo 3 voluntarios excretaron durante los 5 días de vigilancia. La media geométrica de las UFC de *V. cholerae* excretadas por gramo de heces fecales fue $7,3 \times 10^4$ (C.I. = $9,6 \times 10^3$; C.S. =

$4,3 \times 10^5$) entre los excretores. Como se indica en la Tabla 3, el número máximo de voluntarios excretando la cepa simultáneamente se alcanzó a los días 4 y 5. Ninguno de los 21 voluntarios que ingirió el placebo excretó 63_8 , sugiriendo que la transmisión entre individuos es poco probable. Estos resultados indican que 63_8 coloniza el tracto gastrointestinal humano.

Tabla 3. Excreción de la cepa 63_8 en 24 voluntarios que ingirieron una dosis oral de 10^9 UFC.

Medida	Excreción ^a de la cepa 63_8 en el tiempo					
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Total
Excretores/Total	6/24	11/24	12/24	17/24	16/24	21/24
UFC g ⁻¹ (M. G.) ^b	$2,2 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$9,3 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$
Mínimo	$3,4 \times 10^3$	$9,2 \times 10^2$	$1,3 \times 10^4$	$3,3 \times 10^2$	$6,6 \times 10^2$	$3,3 \times 10^2$
Máximo	$1,5 \times 10^6$	$4,6 \times 10^7$	$2,3 \times 10^6$	$1,7 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$

^a Límite de detección del ensayo: 1×10^2 UFC/g de heces fecales. Ningún receptor de placebo excretó *V. cholerae*. ^b Media geométrica.

La excreción fecal de la cepa 63_8 por el 87,5 % de los voluntarios durante una mediana de 2 días, refleja que su dispersión por excreción fecal es menor que la de los vibriones de tipo salvaje. Se puede interpretar que la inactivación del gen *hap* impide la expresión de la proteasa mayoritaria Hap de estos vibriones y con ello la actividad asociada desprendedora de los vibriones de los sitios de colonización, propuesta por Finkelstein y cols (1992). Ello reduciría el desprendimiento de las bacterias del mucus y el epitelio hacia la luz intestinal y se traduciría en una disminución de la excreción fecal de la bacteria. La menor duración de la excreción es una propiedad común a las otras cepas que son bien toleradas en humanos: CVD 103Hg-R y Perú-15. La cepa CVD103HgR se excreta en un número reducido de los individuos que la ingieren, entre el 0 y el 15 % (Tacket y cols, 1999; Cryz y cols, 1995); la cepa Perú-15 se excreta en bajas cuentas y con un período de incubación de 3 días (Cohen y cols, 2002). Esta propiedad se asocia además, con una menor percepción de riesgo ambiental, relacionado con la liberación de un microorganismo genéticamente modificado al entorno natural (Merril y cols, 2002; Viret y cols, 2004).

Respuesta inmunológica inducida por 638. El 96% (23 de 24) de los vacunados respondió con un incremento de cuatro o más en el título de anticuerpos inhibidores del crecimiento (Tabla 4). La respuesta se detectó a los 7 días, alcanzó niveles máximos a los 14 y 21 días y a los 28 días no había retornado aún a los niveles pre-inoculación. Entre los 23 individuos que respondieron, el promedio geométrico del recíproco del título al día 14 de la inoculación fue 1837. Ningún receptor de placebo seroconvirtió.

Un número menor de vacunados, equivalente al 50% (12 de 24), respondió con un incremento de dos en los títulos de anticuerpos séricos de clase IgA dirigidos contra el LPS homólogo al de la cepa 63_8 (O1, El Tor, Ogawa) (Tabla 4). La respuesta se detectó a los 7 días, se hizo máxima a los 14 y a los 21 y 28 días iba decayendo. La media geométrica del recíproco del título en el día 14 post-inoculación alcanzó un valor de 387. Ningún receptor de placebo seroconvirtió. Estos resultados indican que la cepa 63_8 interactúa con el sistema inmunológico subyacente al epitelio intestinal y despierta una respuesta inmunológica contra los vibriones.

Tabla 4. Respuesta inmunológica tras la ingestión de una dosis oral de 10^9 UFC de *Vibrio cholerae* 63₈.

Respuesta	Serocon- versión n/total	Media geométrica (rango) del recíproco del título en individuos que alcanzaron el criterio de seroconversión a:				
		Pre- inoculación	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
Anticuerpos inhibidores crecimiento	23/24 ^(*)	32 (a) (20 - 160)	918 (bc) (20 - 10240)	1837 (c) (320 - 20480)	1036 (c) (160 - 20480)	394 (b) (160 - 20480)
IgA anti-LPS	12/24 ^(**)	< 50 (d) (< 50)	196 (e) (50 - 1259)	387 (f) (115 - 1585)	155 (e) (50 - 501)	100 (ed) (50 - 372)

Los receptores del placebo, exhiben valores en el rango de preinoculación informado para los vacunados.

^(*)Seroconversión: incremento de cuatro veces en el recíproco del título de anticuerpos inhibidores del crecimiento bacteriano respecto a los valores preinoculación.

^(**)Seroconversión: incremento de dos veces en el recíproco del título respecto al valor preinoculación.

Los recíprocos de los títulos vibriocidas son diferentes a distintos tiempos ($P = 0,000$; ANOVA de Friedman, χ^2 (N = 23, gl = 4) = 57,4619). Letras comunes (a, b, c) indican diferencias no significativas en la comparación a posteriori (SNK no paramétrico, $p < 0,05$).

Los recíprocos de los títulos de IgA anti-LPS son diferentes a diferentes tiempos ($P = 0,000$; ANOVA de Friedman, χ^2 (n = 12, gl = 4) = 35,30435). Letras comunes (d, e, f) indican diferencias no significativas en la comparación a posteriori (SNK no paramétrico, $p < 0,05$).

Se conoce que una infección por *V. cholerae* estimula primordialmente la formación de células productoras de IgM, seguido de las células productoras de IgA, dirigidas contra el LPS bacteriano (Qadri y cols, 1999; Viret y cols, 1999). Ello se traduce en la seroconversión con anticuerpos de clase IgM fundamentalmente y en menor grado de IgA, los cuales son marcadores indirectos de la presencia de sus células formadoras en la circulación sistémica. La IgM funciona como aglutinante y bactericida de *V. cholerae*, mientras la IgA es solo aglutinante y ambas ejercen función antiadherente (Majumdar y Ghose, 1981; Ezekowitz y cols, 2001). La respuesta en suero detectada tras la administración de una dosis oral de 10^9 UFC de la cepa 63₈ se correspondió con la producida por un episodio de cólera ya que se encontraron anticuerpos inhibidores del crecimiento de *V. cholerae* en el 96 % de los vacunados y anticuerpos de clase IgA contra el LPS Ogawa en el 50% (Tabla 4), sin que ninguno de los 21 individuos del grupo placebo seroconvirtiera con anticuerpos de estos tipos. Dado que la inhibición del crecimiento de *V. cholerae* por anticuerpos aglutinantes del suero no se detecta en diluciones superiores a 320 y la inhibición por bacteriolisis mediada por el complemento si (Finkelstein, 1962) y dado que en todos los individuos los títulos obtenidos en respuesta a 63₈ estuvieron por encima de 320, entonces es probable que todos los individuos respondieran con anticuerpos bactericidas, que es el mejor marcador indirecto de protección. Sin embargo, la inexistencia de un marcador predictivo totalmente fiel, obliga a realizar estudios de reto para evaluar el efecto protector de la respuesta.

Efecto protector de la respuesta inmunológica. Se retó a 12 individuos vacunados y 9 receptores de placebo con una dosis oral de $8,5 \times 10^5$ UFC de la cepa patogénica *V. cholerae* 3008. Nueve sujetos eran de grupo sanguíneo O que son más vulnerables al cólera, cinco en el grupo vacuna y cuatro en el grupo placebo. Los 9 individuos provenientes del grupo placebo se infectaron y excretaron la cepa 3008, comparado con 3 de 12 en el grupo vacuna (Tabla 5). La diferencia es significativa (PEF, $P = 0,0011$) e indica que 63₈ protegió significativamente contra la infección por *V. cholerae* 3008.

Aunque, tanto en los 9 placebos como los 3 vacunados excretores, la mediana del tiempo de incubación para

el inicio de la excreción fue un día, la mediana del valor de UFC por gramo de heces fecales difirió significativamente entre los individuos excretores del grupo placebo ($2,3 \times 10^6$; C.I. = $3,3 \times 10^5$, C.S. = $1,6 \times 10^7$) y los excretores del grupo vacunado ($2,1 \times 10^4$; C.I. = $6,6 \times 10^3$, C.S. = $3,4 \times 10^5$) (U de Mann-Whitney, $p = 0,0165$). Ello sugiere que 63₈ induce una respuesta que limita significativamente la proliferación y la magnitud de la excreción de la cepa patogénica 3008 en el intestino humano.

Tabla 5. Respuesta clínica y bacteriológica al reto con la cepa *Vibrio cholerae* 3008 en individuos vacunados con 63₈ e individuos del grupo placebo.

Parámetro	Valor para sujetos:		P ^(a)
	Vacunados	Placebos	
Total	12	9	-
Individuos excretores de la cepa de reto	3	9	0,0011
Individuos con cólera	0	7	0,0003
Individuos con cólera severo (≥ 5 kg)	0	2	0,1714

^(a) Valores de P (prueba exacta de Fisher de dos colas) comparando la incidencia en placebos y en vacunados.

La mediana de la duración de la excreción difirió significativamente entre los individuos del grupo placebo (mediana = 4, C.I. = 4, C.S. = 5) y los del grupo vacuna (mediana = 0, C.I. = 0, C.S. = 1) (U de Mann-Whitney, $P = 0,00306$). Ello indicó que la inmunización con la cepa 63₈ limita la duración de la excreción de la cepa de reto 3008.

Ninguno de 12 individuos vacunados con 63₈ padeció cólera al ser retados con las 8×10^5 UFC de la cepa patogénica 3008. De forma contraria, 7 de 9 individuos del grupo placebo padecieron cólera (PEF, $P = 0,0003$) (Tabla 5). Ello indicó que un mes después de la ingestión de la cepa 63₈ los sujetos estaban protegidos contra el cólera experimental que causa la cepa 3008. Dos de los 7 sujetos con cólera fueron casos severos que excretaron más de 5 litros y requirieron rehidratación endovenosa. El volumen medio de diarrea en los retados del grupo placebo fue 2231 ml (rango, 330 - 5731 ml) con un número promedio de episodios diarreicos igual a 14 (rango, 3 -34) y un promedio máximo de excreción de vibriones igual a $2,3 \times 10^6$ UFC ml⁻¹. Estos datos indican que los voluntarios del estudio eran susceptibles a la infección, los síntomas y la enfermedad provocados por la cepa 3008.

Todos los individuos del grupo vacunado se mantuvieron asintomáticos mientras los individuos del grupo placebo, 3 tuvieron cefalea — uno de ellos moderada—, uno tuvo vómitos, uno tuvo fiebre, dos tuvieron malestar general y uno tuvo deshidratación. Uno de los individuos con cólera severo presentó solo diarreas; el otro tuvo también síntomas de grado moderado: meteorismos, malestar general, cefalea durante 4 días, cólicos y deshidratación. También tuvo náuseas grado severo y emesis — $V = 260$ ml—. Este sujeto fue tratado con doxiciclina a las 24 h del reto para erradicar la infección.

Todos estos datos sugieren que la respuesta inmunológica generada por una dosis oral de 10^9 UFC de la cepa 63₈, administrada a voluntarios sanos en condiciones controladas, es protectora a corto plazo (1 mes) contra la reinfección por *V. cholerae* de biotipo y serotipo homólogo y contra el padecimiento de la enfermedad y sus síntomas.

En cólera, la protección al reto se acepta como una evidencia de eficacia por la FDA (Clemens y cols, 2001). Por ello, en este trabajo se evaluó si la cepa 63₈ confería protección contra el cólera en el modelo de reto en voluntarios sanos, siguiendo las indicaciones de Sack y cols de 1998. La demostración de que un candidato vacunal vivo y atenuado de cólera es seguro, inmunogénico y protector facilita el paso de la fase de investigación a la fase de desarrollo farmacéutico. La enfermedad producida por la cepa 3008 en los individuos del grupo placebo es comparable a la descrita por Tacket y cols (1997) en norteamericanos. La incidencia de diarreas en norteamericanos (NA) fue en 7 de 8 sujetos; el volumen promedio de la diarrea fue 2534 ml (984 - 7703). El promedio de episodios diarreicos por voluntarios fue 14 con rangos de 6 - 46. La media del máximo de excreción de la cepa 3008 en NA fue $9,3 \times 10^6$ CFU g⁻¹. Estos datos son comparables a los observados en voluntarios cubanos e indican la certeza de la protección ofrecida por la ingestión de 10⁹ UFC de la cepa 63₈ contra *V. cholerae* 3008 y descartan la existencia de una menor susceptibilidad en los sujetos de este estudio al agente de reto. Pudo concluirse entonces que la mutación de *hap* y la expresión de la endoglucanasa A no tiene efectos deletéreos que impidan el correcto desempeño de esta cepa vacunal.

El 50% de los individuos vacunados que fueron al reto y resultaron protegidos no habían seroconvertido con anticuerpos séricos de clase IgA. Se interpreta que la seroconversión con anticuerpos de clase IgA contra el LPS en suero debe ser tomada con precaución como indicador de que hubo interacción de los vibriones con el sistema inmune mucosal y no como un marcador de protección, aún cuando se acepta que la protección a nivel mucosal se ejerce fundamentalmente por anticuerpos de clase IgA. La cantidad de IgA sérica específica guarda proporción directa con la cantidad de células formadoras de IgA anti-LPS en la circulación sistémica. Una interpretación a la existencia de protección en ausencia de seroconversión de IgA es que la cantidad de células formadoras de IgA no sobrepasa el límite requerido para que se detecte la respuesta sistémica de IgA, pero que si alcanza el necesario para que tras su retorno a los sitios efectores en la mucosa intestinal la respuesta de IgA local prevenga efectivamente la colonización del patógeno en la dosis utilizada.

Desde el punto de vista del alcance, a partir del estudio realizado solo se puede concluir que la cepa 63₈ protege contra una dosis de $8,5 \times 10^5$ UFC de la cepa 3008 al mes de efectuada la inmunización. No es posible anticipar si la respuesta inmunológica estimulada por la cepa 63₈ será efectiva en lograr protección contra mayores dosis de vibriones virulentos. Se conoce que el incremento del inóculo aumenta la incidencia del cólera y la severidad de la enfermedad en sujetos no vacunados (Morris y cols, 1995). Por razones de ética, para estudios en voluntarios no se usan dosis superiores a la mínima necesaria para producir el cólera en el 80% de los individuos, por lo que nada sustituye los estudios fase III en regiones endémicas.

La protección al reto provista por 63₈ permite sugerir el pase a la etapa de desarrollo farmacéutico en buenas prácticas de manufactura para estudios clínicos fase I, II y III. Se deberá evaluar también si 63₈ protege contra el cólera a más largo plazo.

3.8. Consideraciones finales.

La obtención de una vacuna para prevenir el cólera causado por *V. cholerae* de biotipo El Tor es un objetivo no alcanzado y prioritario debido a que los vibriones de este biotipo son los causantes de la pandemia actual y han adquirido endemismo en más de cien países del mundo (Sack y cols, 2004; Zhou y cols, 2004; Cohen

y cols, 2002, Trach y cols, 2002). La atenuación genética de cepas patógenas aisladas de pacientes de cólera y su evaluación como inmunógenos vivos por vía oral contra la enfermedad, ocupa parte de los esfuerzos para obtener una vacuna (Cohen y cols, 2002; Tacket y cols, 1999).

La obtención de cepas vivas atenuadas para inmunizar contra el cólera por la ruta oral demanda la solución de dos problemas fundamentales: 1) disminuir la reactogenicidad sin comprometer la inmunogenicidad y 2) incrementar la seguridad ambiental debido a la potencial reversión de la atenuación por readquisición de los genes de la toxina colérica del fago CTX Φ . Se ha demostrado que la cepa 63₈ exhibe atributos favorables en ambos sentidos, por lo que es recomendable continuar su evaluación.

De acuerdo con el conocimiento actual, la causa por la cual los candidatos vacunales vivos atenuados de cólera son reactógenos se analiza bajo la hipótesis inflamatoria (Mekalanos y cols, 1995; Silva y cols, 1996) que atribuye la reactogenicidad a una respuesta inflamatoria local debida a la colonización del microorganismo y su interacción con el epitelio. Se ha propuesto que la hemolisina A, la toxina RTX y la hemaglutinina proteasa son los factores responsables de inducir una respuesta inflamatoria mucosal y de los síntomas observados (Fullner, 2003; Fullner y cols, 2002). Sin embargo, un triple mutante de estos genes no se ha evaluado en voluntarios con el fin de demostrarlo. Los resultados de este trabajo indican que la cepa 63₈ es aceptablemente tolerada por los humanos. Rodríguez y cols, (2001) informaron que 63₈ induce una menor expresión de mediadores inflamatorios en células de la línea de epitelio de colon humano (HT29-18N2) que otras cepas reactógenas. En esta tesis se informa además que 63₈ es resistente *in vitro* a la infección por CTX Φ , que una dosis oral de 10⁹ UFC confiere protección inmunológica contra el cólera y que aún cuando adquiriera el fago CTX Φ su nivel de atenuación es mucho mayor que el de las restantes cepas obtenidas. Estas propiedades ubican a la cepa 63₈ como una cepa atenuada promisorio para inmunógeno funcionalmente activo de una vacuna de cólera.

4. CONCLUSIONES.

1. En el gen *ctxA* del operón *ctxAB* del profago CTXΦ de *V. cholerae* se inician transcritos codificantes de la subunidad CtxB de la toxina colérica.
2. Las cepas *V. cholerae* 4₁₃ y 8₁, derivadas de C6706 y C7258, carecen del profago CTXΦ y son atoxigénicas.
3. Las cepas *V. cholerae* 63₁, 63₈ y 133₃, derivadas de 8₁ y 4₁₃, tienen el gen *hap* interrumpido por el gen *ceaIA* de *Clostridium thermocellum*, no producen hemaglutinina proteasa y se identifican fácilmente por la expresión de la endoglucanasa A.
4. Las cepas 8₁, 4₁₃, 63₁, 63₈ y 133₃ colonizan el intestino delgado de ratones Balb/c lactantes sin ejercer efecto letal.
5. Las cepas *V. cholerae* 8₁, 63₁, 4₁₃ y 133₃ tras infectarse con el fago CTXΦ producen la toxina colérica y ejercen efecto letal en ratones Balb/c lactantes.
6. La cepa 63₈ solo se infecta con CTXΦ El Tor durante la colonización intestinal y tras infectarse permanece significativamente atenuada.
7. La inoculación oral de 10⁹ UFC de la cepa 63₈ previno a voluntarios sanos de contraer el cólera ante un reto de 10⁵ UFC de la cepa virulenta 3008 un mes después.

5. RECOMENDACIONES

1. Se deberá investigar la naturaleza de la mutación que impide el funcionamiento de la fimbria MSHA en 63₈ para mejorar la caracterización de la cepa.
2. Se deberá evaluar en voluntarios otros candidatos vacunales Δ CTX Φ , *hap::ceIA*, como 63₁ y 133₃, para estudiar el papel de la Hemaglutinina proteasa en la reactogenicidad de cepas atenuadas.
3. Se deberá evaluar la estabilidad genética de la cepa 63₈ partiendo de los aislados obtenidos durante todos los ensayos en voluntarios.
4. Se deberá pasar a la fase de desarrollo tecnológico de la cepa 63₈, cumpliendo las buenas prácticas de manufactura y coordinar la realización de estudios clínicos fase I, II y III con el producto final formulado y liofilizado.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Ausubel F, Brent MR, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, y Struhl K** (1995) Short Protocols in molecular Biology. John Wiley & Sons Inc, New York, USA
2. **Baudry B, Fasano A, Ketley J y Kaper JB** (1992) Cloning of a gene (zot) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **60** (2): 428-434
3. **Beguin P** (1983) Detection of cellulase activity in polyacrylamide gel using congo red stained agar replicas. *Analyt Biochem* **131**:333-336
4. **Benenson A, Saad S y Mosley A** (1968) Serological studies in cholera. 2. The vibriocidal antibody response of cholera patients determined by a microtechnique. *Bull W. H. O.* **38**: 277-285
5. **Birnboim HC, Doly JA** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**: 1513
6. **Booth BA, Boesman-Finkelstein M y Finkelstein RA** (1983) *Vibrio cholerae* soluble hemagglutinin/protease is a metalloenzyme. *Infect Immun* **42** (2): 639-644
7. **Booth BA, Boesman-Finkelstein M y Finkelstein RA** (1984) *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease nicks cholera enterotoxin. *Infect Immun* **45** (3): 558-560
8. **Burgos M, Pérez JL, García L, Sierra G, Benítez J, Galindo F, Silberstein C, Ibarra C** (1999) Diarrheagenicity evaluation of attenuated *V. cholerae* O1 and O139 strains in the human intestine *ex vivo*. *Vaccine* **17**(7-8):949-956
9. **Campos J, Martínez E, Marrero K, Rodríguez BL, Suzarte E, Ledón T y Fando R** (2003) Novel type of Specialized Transduction for CTX Φ or its satellite Phage RS1 mediated by filamentous phage VGJ Φ in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol* **185**(24):7231-7240
10. **Cao C, Shi C, Li P y Ma Q** (1997) A promoter responsible for over-expression of cholera toxin B subunit in cholera toxin A subunit structure gene. *Yi Chuan Xue Bao* **24**(1): 78-86
11. **Cedré B, García L, García H, Fariñas M, Talavera A, Infante JF** (1998) Intestinal colonization of the infant mouse model by attenuated and virulent *Vibrio cholerae* strains. *Archives of Medical Research* **29**(3):231-234
12. **Clemens JD, Sack DA, e Ivanoff B** (2001) Misleading negative findings in a field trial of killed, oral cholera vaccine in Peru. *J Infect Dis* 2001 Apr 15; **183**(8):1306-9
13. **Cohen MB, Giannella RA, Bean J, Taylor DN, Parker S, Hoepfer A, Wowk S, Hawkins J y cols.** (2002) Randomized, controlled human challenge study of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of a single dose of Peru-15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infect Immun* **70** (4): 1965-1970
14. **Cornet P, Millet J, Beguin P y Aubert JP** (1983) Characterization of two cel (cellulose degrading) genes of *Clostridium thermocellum* coding for endoglucanases. *Biotechnology* **1**: 589-594
15. **Cryz SJ, Jr., Kaper J, Tacket C, Nataro J y Levine MM** (1995) *Vibrio cholerae* CVD103-HgR live oral attenuated vaccine: construction, safety, immunogenicity, excretion and non-target effects. *Dev*

16. **Chomczynski P** (1992) One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Anal Biochem* **201** (1): 134-139
17. **Chomczynski P y N Sacchi** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**:156-159
18. **Davis BM y Waldor MK** (2000) CTX ϕ contains a hybrid genome derived from tandemly integrated elements. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:8572-8577
19. **DeGrandis S, Ginsberg J, Toone M, Chimie S, Friesen J y Brunton J** (1987) Nucleotide sequence and promoter mapping of the *Escherichia coli* Shiga-like toxin operon of bacteriophage H-19B. *J Bacteriol* **169**:4313-4319
20. **Dubey RS, Lindblad M y Holmgren J** (1990) Purification of El Tor cholera enterotoxins and comparisons with classical toxin. *J Gen Microbiol* **136 (Pt 9)**: 1839-1847
21. **Ezekowitz A, Pamer E, y Hyday CA** (2001) Adaptive immunity to infection. In Immunobiology. The immune system in health and disease 5^{ta} edición. Charles A. Janeway, Jr., Paul Travers, Mark Wastport, Mark J Shlomchik. Chapter 9. The humoral immune response. 2001. Pp 341-380
22. **Falero G, Rodríguez BL, Rodríguez, I Campos J, Ledón T, Valle E., Silva Y, Marrero K, Suzarte E, Valmaseda T, Moreno A, y Fando R** (2003) Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to El Tor Toxin Co-regulated Pilus of *Vibrio cholerae*. *Hybridoma and Hybridomics* **22(5)**:315-320
23. **Finkelstein RA** (1962) Vibriocidal antibody inhibition (VAI) analysis: a technique for the identification of the predominant vibriocidal antibodies in serum and for the detection and identification of *Vibrio cholerae* antigens. *The J of Immunol* **59(2)**:264-271
24. **Finkelstein RA** (1995) Why do we not yet have a suitable vaccine against cholera? *Adv Exp Med Biol* **371B**: 1633-1640
25. **Finkelstein RA, Boesman-Finkelstein M, Chang Y y Hase CC** (1992) *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect Immun* **60** (2): 472-478
26. **Fiore AE, Michalski JM, Russell RG, Sears CL y Kaper JB** (1997) Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **65** (8): 3112-3117
27. **Fullner KJ** (2003) Activation and suppression of the proinflammatory immune response by *Vibrio cholerae* toxins. *Microbes and Infection* **5**:1241-1247
28. **Fullner KJ, Boucher JC, Hanes MA, Haines GK, III, Meehan BM, Walchle C, Sansonetti PJ y Mekalanos JJ** (2002) The contribution of accessory toxins of *Vibrio cholerae* O1 El Tor to the proinflammatory response in a murine pulmonary cholera model. *J Exp Med* **195** (11): 1455-1462
29. **Fullner KJ, Lencer WI y Mekalanos JJ** (2001) *Vibrio cholerae*-induced cellular responses of polarized T84 intestinal epithelial cells are dependent on production of cholera toxin and the RTX toxin. *Infect Immun* **69** (10): 6310-6317

30. **García L** (2001) Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias de la Salud. Instituto Finlay. Departamento de Bacterias enteropatógenas.
31. **García H, García L, Oliva R y cols** (1998) 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* **50**(2):115-119
32. **García L, Oliva R, Cedré B, Valmaseda T, García H, Talavera A, Pérez JL, Sierra G** (1998) Intraduodenal inoculation of adult rabbits for evaluating the immunogenicity of genetically attenuated *Vibrio cholerae* strains. *Laboratory Animal Science* **48**(5): 538-541
33. **Habib NF y Jackson MP** (1992) Identification of a B subunit gene promoter in the Shiga toxin operon of *Shigella dysenteriae*1. *J Bacteriol* **174**(20):6498-6507
34. **Hanne LF y Finkelstein RA** (1982) Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **36** (1): 209-214
35. **Hase CC y Finkelstein RA** (1991) Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) gene and construction of an HA/protease-negative strain. *J Bacteriol* **173** (11): 3311-3317
36. **Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK y cols.** (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406** (6795): 477-483
37. **Holmgren J, Svennerholm AM, Jertborn M, Clemens J, Sack DA, Salenstedt R y Wigzell H** (1992) An oral B subunit: whole cell vaccine against cholera. *Vaccine* **10** (13): 911-914
38. **Ichinose Y, Ehara M, Honda T y Miwatani T** (1994) The effect on enterotoxicity of protease purified from *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol Lett* **115** (2-3): 265-271
39. **Iwanaga M y Yamamoto K** (1985) New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *J Clin Microbiol* **22** (3): 405-408
40. **Janssen GR y Bibb MJ** (1993) Derivatives of pUC18 that have *Bgl* II sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies. *Gene* **124**: 133 - 134
41. **Kaper JB, Tacket CO y Levine MM** (1997) Attenuated *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains as live oral cholera vaccines. In *New and Improved Vaccines Against Cholera*, 2nd edition, chapter 33. Editors: Myron M. Levine, Graeme C. Woodrow, James B. kaper and Gary S. Gobon. Marcel Dekker, INC. New York, pp 447-457
42. **Kenner JR, Coster TS, Taylor DN, Trofa AF, Barrera-Oro M, Hyman T, Adams JM, Beattie DT y cols.** (1995) Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J Infect Dis* **172** (4): 1126-1129
43. **Kimsey HH y Waldor MK** (1998) CTXΦ immunity: application in the development of cholera vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75** (12): 7035-7039
44. **Kotloff, KL, Wasserman SS, O'Donnell S, Losonsky GA, Kryz SJ y Levine MM** (1992) Safety

and immunogenicity in North Americans of a single oral dose of live oral cholera vaccine CVD103-HgR: results of a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover trial. *Infect Immun.* **60**:4430-4432

45. **Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685
46. **Ledón T, Valle E, Valmaseda T, Cedré B, Campos J, Rodríguez BL, Marrero K, García H, García L y Fando R** (2003) Construction and characterization of O139 cholera vaccine candidates. *Vaccine* **21**: 1282 - 1291
47. **Levine MM y Kaper** (1993) Live oral vaccines against cholera: an update. *Vaccine* **11** (2):207-212
48. **Levine MM y Kaper JB**(1995) Live oral vaccine: from principle to product. *Bull Inst Pasteur* **93**:243-253
49. **Levine MM, Black RE, Clements ML, Cisneros L, Nalin DR y Young CR** (1981) Duration of infection-derived immunity to cholera. *J Infect Dis* **143** (6): 818-820
50. **Levine MM, Kaper JB, Herrington D, Losonsky G, Morris JG, Clements ML, Black RE, Tall B y cols.** (1988) Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. *Infect Immun* **56** (1): 161-167
51. **Liang W, Wang S, Yu F, Zhang L, Qi G, Liu Y, Gao S, Kan B** (2003) Construction and evaluation of a safe, live, oral *Vibrio cholerae* vaccine candidate, IEM108. *Infect Immun.* 2003 **71**(10): 5498-504
52. **Lin W, Fullner KJ, Claytor R, Sexton JA, Rogers MB, Calia KE, Calderwood SB, Fraser C y Mekalanos JJ** (1999) Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**:1071-1076
53. **Lockman H y Kaper JB** (1983) Nucleotide sequence analysis of the A2 and B subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *J Biol Chem* **258** (22): 13722-13726
54. **Majumdar AS y Ghose AC** (1981) Evaluation of the biological properties of different classes of human antibodies in relation to cholera. *Infect Immun* **32**(1):9-14
55. **Maxam A y Gilbert W** (1980) Methods in enzymology (Colowick, S. P. and Kaplan N. O., eds). Vol **65**, p 499. Academic Press, New York
56. **McCardell BA, Kothary MH, Hall RH y Sathyamoorthy V** (2000). Identification of a CHO-cell elongating toxin produced by *Vibrio cholerae* O1. *Microbial Pathogenesis* **29**:1-8
57. **Mekalanos JJ y Sadoff JC** (1994) Cholera vaccines: fighting an ancient scourge. *Science* **265**:1387-1389
58. **Mekalanos JJ, Waldor MK, Gardel CL, Coster TS, Kenner, Killeen KP, Beattie DT, Trofa A, Taylor DN y Sadoff JC** (1995) Live cholera vaccines: perspectives on their construction and safety. *Bull Inst Pasteur* **93**:255-262
59. **Mel SF, Fullner KJ, Wimer-Mackin S, Lencer WI y Mekalanos JJ** (2000) Association of protease activity in *Vibrio cholerae* vaccine strains with decreases in transcellular epithelial resistance of polarized T84 intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **68** (11):6487-6492

60. **Merrel DS, Buttler SM, Qadri F, Dolganov NA, Alam A, Cohen MB, Calderwood SB Schoolnik G y Camilli A** (2002) Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature* **147** (6889):642-644
61. **Michalski J, Galen JE, Fasano A y Kaper JB** (1993) CVD110, an attenuated *Vibrio cholerae* O1 El Tor live oral vaccine strain. *Infect Immun* **61** (10):4462-4468
62. **Miller VL y Mekalanos JJ** (1988) A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol* **170** (6): 2575-2583
63. **Mishra L y Holmes RK** (1987) Transcription of cholera toxin operon in wild type and mutant strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **55**(6):1529-1532
64. **Morris JG, Genevieve LE, Johnson JA, Nataro JP, Panigrahi P y Levine MM** (1995) Clinical and immunologic characteristics of *Vibrio cholerae* O139 Bengal infection in North American volunteers. *The J Infect Dis* **171**:903-908
65. **Moyer KE, Kimsey HH y Waldor MK** (2001) Evidence for a rolling circle mechanism of phage DNA synthesis from both replicative and integrated forms of CTX Φ . *Mol Microbiol* **41**(2):311-323
66. **Olsen CH** (2003) Review of the use of statistic in Infection and Immunity. *Infect Immun.* **71**(12):6689-6692
67. **OMS** (2004) Cholera vaccines: a new public health tool? Report WHO meeting, 10 - 11 Dec 2002, Geneva, Switzerland
68. **Pearson GDN y Mekalanos J** (1982) Molecular cloning of *Vibrio cholerae* enterotoxin genes in *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 2976-2980
69. **Petre J, Longin R y Millet J** (1981) Purification and properties of an endo- β -1, 4-glucanase from *Clostridium thermocellum*. *Biochimie* **63**:629-639
70. **Qadri F, Ahmed F, Karim MM, Wenneras C, Begum YA, Abdus SM, Albert MJ y McGhee JR** (1999) Lipopolysaccharide- and cholera toxin-specific subclass distribution of B-cell responses in cholera. *Clin Diagn Lab Immunol* **6** (6): 812-818
71. **Richardson SH** (1994) Animal models in cholera Research. In *Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspectives. Wachmuth IK, Blake PA, Olsvik O. ASM Press, Washington, D.C., pp 203-225
72. **Richie EE, Punjabi NH, Sidharta YY, Peetosutan KK, Sukandar MM, Wasserman SS, Lesmana MM, Wangsasaputra FF y cols.** (2000) Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. *Vaccine* **18** (22): 2399-2410
73. **Rodríguez BL, Rojas A, Campos J, Ledon T, Valle E, Toledo W y Fando R** (2001) Differential interleukin-8 response of intestinal epithelial cell line to reactogenic and nonreactogenic candidate vaccine strains of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **69** (1): 613-616
74. **Roth JR, Benson N, Galitski T, Haack K, Lawrence JG y Miesel L** (1996) Rearrangements of the bacterial chromosome: formation and applications. En: *Escherichia coli* and *Salmonella*, cellular and

molecular biology. Segunda edición. Ed. Frederic C. Neidhardt, ASM press, Washington, D.C.

75. **Ryan ET y Calderwood SB** (2000) Cholera vaccines. *Clin Infect Dis* **31**: 561-565
76. **Sack DA, Sack BR, Nair GB y Siddique AK** (2004) Cholera. *Lancet* **363**: 223-233
77. **Sack DA, Tacket CO, Cohen MB, Bradley S, Losonsky GA, Shimko J, Nataro JP, Edelman R, Levine MM, Gianella RA, Schiff G y Lang D** (1998) Validation of a volunteer model of cholera with frozen bacteria as the challenge. *Infect. Immun* **66**(5): 1968-1972
78. **Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T** (1989) Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y
79. **Sathyamoorthy V, Hall RH, McCardell BA, Kothary MH, Ahn SJ, y Ratnayake S** (2000) Purification and characterization of a cytotoxic protein expressed *in vitro* by the live cholera vaccine candidate CVD103-HgR. *Infect Immun* **68**: 6062-6065
80. **Schwarz W, Grabnitz F y Staudenbauer W** (1986) Properties of a *Clostridium thermocellum* endoglucanase produced in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **51**:1293-1299
81. **Silva A, Benítez J y Hollenberg CP** (1991) Expresión del gen *celA* de *Clostridium thermocellum* codificador para la endoglucanasa A en *Saccharomyces cerevisiae*. *Biología Aplicada* **8**(1):76-81
82. **Silva A, Pham K y Benítez J** (2003) Haemagglutinin/protease expression and mucin gel penetration in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **149**: 1883-1891
83. **Silva TM, Schleupner MA, Tacket CO, Steiner TS, Kaper JB, Edelman R y Guerrant R** (1996) New evidence for an inflammatory component in diarrhea caused by selected new, live attenuated cholera vaccines and by El Tor and Q139 *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **64** (6): 2362-2364
84. **Souchon H, Beguin P y Alzari PM** (1996) Crystallization of a family 8 cellulase from *Clostridium thermocellum*. *Proteins: Structure, function and genetics* **25**:134-136
85. **StatSoft, Inc** (1998) Statistic for Windows (computer program Manual). Tulsa, OK: Statsoft, Inc., 2300 East 14th street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119. Web: <http://www.statsoft.com>
86. **Stoebner JA y Payne SM** (1988) Iron regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **56** (11): 2891-95
87. **Su-Arehawaratana P, Singharaj P, Taylor DN, Hoge C, Trofa A, Kivanont K, Misagena S, Pitisuttitham P, Lim YL, Losonsky LG, Kaper JB, Wasserman SS, Cryz S, Echeverria P y Levine MM** (1992) Safety and immunogenicity of different immunization regimens of CVD103HgR live oral cholera vaccine in soldiers and civilians in Thailand. *J Infect Dis* **165**:1042-1048
88. **Tacket CO, Cohen MB, Wasserman SS, Losonsky G, Livio S, Kotloff K, Edelman R, Kaper JB y cols.** (1999) Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentered trial of the efficacy of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El tor inaba three month after vaccination. *Infect Immun* **67** (12): 6341-6345
89. **Tacket CO, Kotloff KL, Losonsky G, Nataro JP, Michalski J, Kaper JB, Edelman R y Levine MM** (1997) Volunteer studies investigating the safety and efficacy of live oral El Tor *Vibrio cholerae* O1 vaccine strain CVD 111. *Am J Trop Med Hyg* **56** (5): 533-537

90. **Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, Cryz SJ, Edelman R, Fasano A, Michalski J, Kaper JB y cols.** (1993) Safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine candidate CVD 110, a delta ctxA delta zot delta ace derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis* **168** (6):1536-1540
91. **Taylor DN, Sánchez JL, Castro JM, Lebrón C, Parrado CM, Johnson DE, Tacket CO, Losonsky GA, Wasserman SS, Levine MM y Cryz S** (1999) Expanded safety and Immunogenicity of a bivalent, oral, attenuated cholera vaccine, CVD 103HgR plus CVD 111, in United States military personnel stationed in Panamá. *Infect Immun.* **67**:2030-2034
92. **Towbin H, Staehelin T, y Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350
93. **Trach DD, Cam PD, Ke NT, Rao MR, Dinh D, Hang PV, Hung NV, Canh DG y cols.** (2002) Investigations into the safety and immunogenicity of a killed oral cholera vaccine developed in Viet Nam. *Bull World Health Organ* **80** (1):2-8
94. **Viret JF, Dietrich G y Favre D.** (2004) Biosafety aspects of the recombinant live oral *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD103HgR. *Vaccine* **22**(19):2457-2469.
95. **Viret JF, Favre D, Wegmuler B, Herzog C, Que JU, Cryz SJ, Jr, Lang AB** (1999) Mucosal and systemic immune response in humans after primary and booster immunizations with orally administered invasive and non-invasive live attenuated bacteria. *Infect Immun* **67**:3680-5
96. **Waldor MK y Mekalanos JJ** (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272** (5270):1910-1914
97. **Waldor MK, Rubin EJ, Pearson GDN, Kimsey H y Mekalanos JJ** (1997) Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX Φ are encoded by region RS2. *Mol Microb* **24**(5): 917-926
98. **Walia K, Ghosh S, Singh H, Nair GB, Ghosh A, Sahni G, Vohra H y Ganguly NK** (1999) Purification and characterization of novel toxin produced by *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun* **67** (10): 5215-5222
99. **Wu Z, Milton D, Nybom P, Sjo A, Magnusson KE** (1996) *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/protease) causes morphological changes in cultured epithelial cells and perturbs their paracellular barrier function. *Microb Pathog* **21**(2):111-123
100. **Wu Z, Nibom P y Magnusson KE** (2000) Distinct effects of the *V. cholerae* haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol* **2**:11-18
101. **Zhang D y Honda T** (1999) Disappearance of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from erythrocyte membrane by hemolysis with thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* or *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin. *Microbiol Immunol* **43** (3): 303-305
102. **Zhou X, Gao DQ, Michalski J, Benítez JA y Kaper JB** (2004) Induction of Interleukin-8 in T84 cells by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **74**(1): 389 - 397