



Centro de Investigación Producción de Vacunas

Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias de la Salud

“Validación y aplicación del ensayo vibriocida
modificado como criterio de inmunogenicidad en el
desarrollo clínico de vacunas orales contra el cólera”

Autor

MC. Bárbara Cedré Marrero

Tutores

Dr. C Hilda García Sánchez

Dr. C Gustavo Sierra González

Asesores

Dr. C Luis García Imia

Dr. Cs Arturo Talavera Coronel

Ciudad Habana

2009

Abreviaturas empleadas

AMPc	Adenosilmonofosfato cíclico
ADP	Adenosiltrifosfato
BHI	Infusión Cerebro Corazón
BPF	Buenas Prácticas de Fabricación
CAM	Complejo de ataque a la membrana
CTA	Subunidad A de la toxina de cólera
CTB	Subunidad B de la toxina de cólera
CDC	Centro para el Control de Enfermedades
CECMED	Centro Estatal para el Control de Medicamentos
CNSB	Centro Nacional de Seguridad Biológica
CNIC	Centro Nacional de Investigaciones Científicas
CVD	Centro para el Desarrollo de Vacunas
DO	Densidad óptica
HBsAg	Antígeno de superficie de la hepatitis B.
IPK	Instituto “Pedro Kouri”
LB	Caldo Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino
PP	Placas de Peyer
SS	Solución salina

TC	Toxina de cólera
TCP	Pili corregulado con la toxina
TMG	Título medio geométrico
TSB	Caldo Triptona Soya
UFC	Unidades formadoras de colonia
VHA	Virus de la hepatitis A
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

INDICE

Página

	RESUMEN	
1.	INTRODUCCION	1
	HIPOTESIS	3
	OBJETIVOS	4
	NOVEDAD CIENTÍFICA	4
	VALOR PRÁCTICO Y SOCIAL	5
2.	MATERIALES Y METODOS	6
	2.1. Ensayo Vibriocida	6
	2.2. Protocolo de Validación del ensayo .	5
	2.3. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por diferentes cepas vivas atenuadas candidatas a vacuna oral contra el cólera	8
	2.4. Evaluación de la respuesta vibriocida a diferentes dosis de la cepa atenuada 638	10
	2.5. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por la cepa atenuada 638 en voluntarios sanos en Ecuador	10
	2.6. Evaluación de la respuesta vibriocida en un ensayo de reto en voluntarios cubanos previamente inmunizados con <i>Vibrio cholerae</i> 638	11
	2.7. Evaluación de la actividad vibriocida del candidato vacunal 638 liofilizado en un ensayo de inmunogenicidad en voluntarios cubanos sanos	11
	2.8. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por el candidato vacunal 638 liofilizado en voluntarios aparentemente sanos en Mozambique	12
	2.9. Análisis estadístico	12
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	13
	3.1. Validación del ensayo Vibriocida.	13
	3.2. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por diferentes cepas vivas atenuadas candidatas a vacuna oral contra el cólera	15
	3.3. Evaluación de la respuesta vibriocida a diferentes dosis de la cepa atenuada 638	17
	3.4. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por la cepa atenuada 638 en voluntarios sanos en Ecuador	19
	3.5. Evaluación de la respuesta vibriocida en un ensayo de reto en voluntarios cubanos previamente inmunizados con <i>Vibrio cholerae</i> 638	20
	3.6. Evaluación de la actividad vibriocida del candidato vacunal 638 liofilizado en un ensayo de inmunogenicidad en voluntarios cubanos sanos	23
	3.7. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por el candidato vacunal 638 liofilizado en voluntarios aparentemente sanos en Mozambique	24
4.	CONCLUSIONES	29
5.	RECOMENDACIONES	30
6.	BIBLIOGRAFIA	

1. INTRODUCCION

El cólera es una enfermedad infecciosa, cuyo agente causal es *Vibrio cholerae* de los serogrupos O1 y O139 (Xu y col., 2009). Se caracteriza por la aparición de una diarrea acuosa incontrolada, que en casos no tratados conduce a la rápida deshidratación del paciente y a la muerte de un alto porcentaje de los mismos (Singh y col., 2001, Yan y col., 2007, Gaffga y col., 2007, Harris y col., 2009a). Según reportes de la OMS del 2007, solamente en África se produjo el 95 % de los casos y el 99 % de las muertes (Schaetti y col., 2009).

V. cholerae del serogrupo O1 se clasifica en dos biotipos, clásico y El Tor y cada uno de ellos a su vez en dos serotipos, Ogawa e Inaba. El biotipo El Tor, serotipo Ogawa, es la causa más frecuente de infección a nivel mundial como parte de la actual pandemia (Attridge y col., 2002, Eko y col., 2003, Calain y col., 2004, Ryan 2006, Ravichandran y col., 2006).

No todas las naciones con extensas comunidades rurales pueden lograr la infraestructura requerida o cambio en el comportamiento de los individuos para prevenir las epidemias de cólera. Para algunas comunidades, una simple dosis de vacuna que proteja contra el riesgo es el medio más eficaz para reducir la morbilidad y mortalidad (López y col., 2008).

Teniendo en cuenta que *V. cholerae* es una bacteria no invasiva, que genera una respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal, y que la propia enfermedad confiere una protección duradera, un preparado vacunal contra el cólera debe ser administrado por vía oral, de manera que estimule de forma efectiva el sistema inmune a ese nivel (Ryan y col., 2006, Liang y col., 2003). Dentro de este enfoque, se han evaluado dos variantes de vacuna: la

primera de ellas a base de células inactivadas y la segunda, consistente en cepas vivas atenuadas por técnicas de ingeniería genética **(Ryan y col., 2000)**.

Estudios epidemiológicos en áreas endémicas indican que la infección por cólera produce una inmunidad protectora de larga duración contra un eventual ataque de esta enfermedad, caracterizada por altos niveles de IgA secretora antibacteriana, lo que se traduce en una efectiva respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal **(Qadri y col., 2007)**. La medida directa de los anticuerpos en heces, puede ser problemático debido a la degradación proteolítica de los mismos y la medición de IgA en los lavados intestinales o por endoscopía pudiera ser más segura, pero estos métodos no son prácticos. Frecuentemente se miden marcadores sustitutos de la respuesta intestinal mediante el ensayo de células secretoras de anticuerpos o el ensayo de anticuerpos en sobrenadante de linfocitos, los cuales tienen la ventaja de la presencia transitoria en la sangre periférica de linfocitos de mucosa activados, que se encuentran aproximadamente a la semana de la presentación del antígeno a nivel intestinal antes de retornar a las superficies mucosas **(Qadri, 2003)**. Sin embargo, estos ensayos tienen el inconveniente de que se requiere equipamiento costoso y un mayor tiempo para la lectura de los resultados.

La prueba realizada con mayor frecuencia para la determinación de anticuerpos contra *V. cholerae* es el ensayo vibriocida por medio de una microtécnica, ya que se puede realizar con una mínima cantidad de suero y tiene alta sensibilidad **(OPS, 1994)**, además, la respuesta vibriocida sérica es la mejor correlación con la protección contra la colonización y la enfermedad **(Attridge y col., 2000, Attridge y col., 2002, Boutoninier y col., 2003, Asaduzzaman y col., 2004)**, la presencia de estos anticuerpos sirve como marcador de la secreción de anticuerpos IgA intestinales **(Crean y col., 2000)** y se considera la medida de

la inmunogenicidad de las vacunas orales cualquiera que sea su variante (**Richie y col., 2000**).

El ensayo tradicionalmente descrito por Benenson y col., en 1968, a pesar de que ha sido ampliamente usado para evaluar la respuesta inmune contra la infección clínica o experimental con *V. cholerae*, presenta el inconveniente de que para su lectura es necesario un espejo invertido con una lámpara y para una mayor confirmación de los resultados se requiere de la incubación de las placas en refrigeración hasta el otro día, para poder distinguir entre los pozos positivos y negativos. La modificación que se introduce en este trabajo, permite una lectura en el mismo día y por especialistas menos entrenados, el análisis de un mayor número de muestras simultáneamente y con equipamiento mínimo, lo que permite su aplicación en países del tercer mundo, principalmente en áreas rurales donde existe una alta prevalencia de la enfermedad.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La modificación y validación del ensayo vibriocida para la determinación de anticuerpos séricos contra *V. cholerae* contribuirá el desarrollo clínico de candidatos cubanos a vacuna viva atenuada de administración oral contra el cólera, potencialmente protectores, en diferentes poblaciones desde el punto de vista inmunológico.

Para dar respuesta a esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Demostrar la utilidad del ensayo vibriocida como criterio de inmunogenicidad y protección en el desarrollo de vacunas orales contra el cólera.

Objetivos específicos:

1. Validar el ensayo vibriocida modificado para la determinación de anticuerpos séricos contra *V. cholerae*.
2. Comparar diferentes cepas atenuadas candidatas a vacuna y dosis en términos de inducción de anticuerpos vibriocidas en voluntarios sanos.
3. Determinar la capacidad de un cultivo fresco de la cepa 638 de inducir anticuerpos vibriocidas en diferentes poblaciones.
4. Demostrar la capacidad protectora de los anticuerpos vibriocidas inducidos por la cepa 638 mediante un ensayo de reto en voluntarios sanos en Cuba.
5. Evaluar el posible impacto de la formulación y liofilización del producto sobre la respuesta de anticuerpos vibriocidas en voluntarios de áreas endémicas y no endémicas.

NOVEDAD CIENTÍFICA

En este trabajo se estableció por primera vez en Cuba el ensayo vibriocida, el cual se modificó y validó. Mediante este, se evaluó la respuesta de anticuerpos en humanos inmunizados por vía oral con candidatos vacunales obtenidos por la biotecnología cubana, en diferentes poblaciones desde el punto de vista inmunoepidemiológico, genético y socioeconómico. Además, este ensayo permitió establecer una asociación entre la respuesta vibriocida generada por el candidato vacunal 638 con la protección frente a reto virulento en voluntarios cubanos, lo que brinda una importante referencia para la respuesta de los candidatos y formulaciones evaluadas. Todo ello ha permitido el desarrollo clínico de nuevos candidatos vacunales contra el cólera. Es, sin dudas, uno de los estudios más

completos a nivel nacional e internacional en esta temática y está respaldado por numerosas publicaciones.

VALOR PRÁCTICO Y SOCIAL

En el desarrollo de cualquier candidato vacunal un aspecto esencial, que puede decidir el éxito, son las herramientas que se empleen como criterio de evaluación de la respuesta inducida. En este trabajo se aborda el desarrollo y aplicación de un método muy factible para la medición de la actividad bactericida de anticuerpos séricos contra *V. cholerae*, de gran utilidad para la evaluación de candidatos vacunales. En el método vibriocida desarrollado se introducen modificaciones que facilitan la lectura de resultados y su implementación. Fue además validado, lo que lo convierte en una técnica reproducible, confiable y disponible para otras aplicaciones. Este ensayo se empleó como herramienta fundamental en la selección y evaluación de cepas en el desarrollo de formulaciones vacunales a partir de estas y en la evaluación de la respuesta inducida en diferentes regiones y situaciones epidemiológicas. El hecho de que el cólera no sea un problema de salud en Cuba y que a pesar de ello se realicen investigaciones para el desarrollo de vacunas con resultados como los que se muestran, añade un gran valor social al trabajo, sobre todo para los países del llamado tercer mundo, que son lo más afectados con esta enfermedad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Ensayo Vibriocida

Este ensayo consiste en una reacción antígeno-anticuerpo-complemento. En esta prueba se empleó como antígeno las cepas de referencia *Vibrio cholerae* VC12 y VC13 pertenecientes al serogrupo O1, bñtipo Clásico, serotipo Ogawa e Inaba respectivamente y como fuente de complemento se utilizó suero de gazapo comercial (Pel Freez, USA). Se siguió el procedimiento descrito por Benenson y col., en 1968, al cual se le introdujo una modificación que consiste en que al medio de cultivo que se añade para detener la reacción dependiente del complemento, se le adiciona el indicador de pH, pñrpura de bormocresol y glucosa, ambos al 2 %. El ensayo se realiza en placas de microtitulación y se procede a la lectura por observación visual. El título se define como la mayor dilución del suero que causa inhibición completa del crecimiento bacteriano dado por la invariabilidad del color del medio de cultivo.

2.2. Protocolo de validación del ensayo.

Con el objetivo de demostrar mediante un estudio de laboratorio, que las características funcionales de una prueba la hacen adecuada para la aplicación analítica prevista, se llevó a cabo la validación de este ensayo, para lo cual se determinó la precisión, especificidad y robustez. La precisión incluye los ensayos de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

Precisión intraensayo (Repetibilidad): En este ensayo se evaluaron tres sueros de individuos inmunizados con la cepa atenuada 638 de serotipo Ogawa. Se realizaron 6 réplicas de cada uno y se determinó el porcentaje de coincidencia entre las determinaciones. Esta operación fue realizada por un solo analista, usando las mismas soluciones y equipos en todas las réplicas.

Precisión interensayos (Precisión intermedia): Para evaluar la precisión intermedia se realizó el mismo procedimiento que en el ensayo de repetibilidad, pero este fue ejecutado por dos analistas, en un mismo laboratorio usando soluciones preparadas por cada uno de ellos.

Precisión interlaboratorios (Reproducibilidad): Se realizaron seis réplicas de cada muestra por dos analistas diferentes, en distintos laboratorios, usando soluciones preparadas por cada uno de ellos.

Criterio de aceptación: Para los ensayos de precisión inter e intraensayo, el 50 % de las réplicas deberán tener el mismo título con una desviación máxima de una dilución y de dos diluciones para el ensayo de reproducibilidad.

Especificidad: Para determinar la especificidad del ensayo se usó como muestra un mezcla de sueros de voluntarios inmunizados con la cepa atenuadas 638, la cual se liofilizó con albúmina humana y cloruro de sodio y constituyó el control positivo para todos los ensayos y como antígeno una cepa de *Neisseria meningitidis*.

Criterio de aceptación: Para aceptar la especificidad del ensayo bactericida colorimétrico, todos los sueros evaluados deben resultar negativos para esta prueba.

Robustez El tercer parámetro que se evaluó fue la robustez del ensayo. Para su estudio se introducen deliberadamente variaciones razonables en las condiciones experimentales y se observa su influencia. Se escogieron seis variables diferentes y cada uno constituyó un ensayo y se comparó con el ensayo estándar. Las variables introducidas fueron las siguientes: Suspensión celular ajustada a un valor de DO de 1,0; muestras de suero descomplementado, uso de tampón fosfato salino, pH 7,2 como diluyente de los componentes de la reacción, tiempo de reacción antígeno-anticuerpo-complemento de 30 minutos, complemento humano, conservado a -70°C , uso del medio caldo Triptona Soya, de origen vegetal (MERCK, Alemania) y caldo Cerebro Corazón (CC) (MERCK, Alemania) para detener la reacción.

Criterio de aceptación Para decidir si un factor tiene una influencia significativa se compararon los títulos obtenidos en el ensayo estándar con los obtenidos evaluando los factores alternativos. En todos los ensayos el título debe ser el mismo con una desviación de una dilución.

2.3. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por diferentes cepas vivas atenuadas candidatas a vacuna oral contra el cólera.

Una vez validado el ensayo vibriocida, se empleó como criterio de inmunogenicidad en el desarrollo clínico de un candidato vacunal contra el cólera. Como primer paso se procedió a comparar diferentes cepas atenuadas candidatas a vacuna en términos de inducción de anticuerpos vibriocidas mediante el ensayo modificado y validado en este trabajo.

En este estudio se incluyeron para su evaluación, cepas atenuadas de primera, segunda y tercera generación pertenecientes a los serotipos Ogawa e Inaba, obtenidas en el CNIC,

Cuba, mediante manipulación genética (Tabla 1). La cepa JBK70 El Tor Inaba, es una cepa mutante obtenida en el CVD, EUA, que se empleó como control, pues en estudios en voluntarios demostró ser reactogénica y altamente inmunogénica (Levine y col., 1988).

Tabla 1. Características de las cepas de *Vibrio cholerae* O1 usadas en este trabajo.

Cepa vacunal	Cepa parental	Descripción
81 (1ra)	C7258 El Tor Ogawa	ctx A ⁻ ctxB ⁻ zot ⁻ ace ⁻ orfU ⁻ cep ⁻
638 (2da)	81 El Tor Ogawa	ctx A ⁻ ctxB ⁻ zot ⁻ ace ⁻ orfU ⁻ cep ⁻ hap::celA
1333 (2da)	C6706 El Tor Inaba	ctx A ⁻ ctxB ⁻ zot ⁻ ace ⁻ orfU ⁻ cep ⁻ hap::celA
638T (3ra)	638 El Tor Ogawa	mutante <i>thyA</i>

ctxA, gen para la subunidad A de la toxina colérica; *ctxB*, gen para la subunidad B de la toxina colérica; *zot*, gen para “zonula occludens toxin”; *cep*, gen para “core encoded pilus”; *orfU*, gen para “open reading frame U”; *ace*, gen para la “accessory cholera enterotoxin”; *hap*, gen para la hemaglutinina proteasa; *celA*, gen para la endogluconasa A de *Clostridium termocellum*; *hlyA*, gen para la hemolisina de *V. cholerae*; *thyA*, gen de auxotrofia para la timina.

Todos los ensayos realizados en Cuba se llevaron a cabo con voluntarios sanos en una sala de aislamiento del IPK. Cinco días después de la inmunización los voluntarios recibieron una dosis de 300 mg de doxiciclina y fueron dados de alta al finalizar el estudio después de haber demostrado mediante coprocultivos sucesivos que no excretaban en sus heces la cepa vacunal.

Las cepas se cultivaron en agar Cerebro Corazón (MERCK; Alemania) por 4 h a 37°C y se resuspendieron en SS estéril 0,85 %. Las soluciones resultantes se ajustaron en un espectrofotómetro Spectronic 401 (Pharmacia, Suecia) y se diluyeron hasta alcanzar la

dosis apropiada. Se verificó la concentración mediante conteo de viables en placas. Los voluntarios ingirieron 120 mL de bicarbonato de sodio al 1,33 %, para neutralizar la acidez gástrica y treinta minutos después recibieron una dosis oral de 10^9 UFC de la cepa correspondiente. Los individuos del grupo placebo, ingirieron bicarbonato de sodio al 1,33 %, solamente, con una apariencia indistinguible del preparado vacunal.

Se tomó muestra de sangre el día antes y a los 0 y 14 días después de la ingestión de la cepa vacunal o placebo para la determinación del título de anticuerpos vibriocidas. En todos los ensayos llevados a cabo en este trabajo el criterio de seroconversión fue el incremento de cuatro veces o más, en el título de anticuerpos vibriocidas entre el tiempo 0 y los 14 días luego de la inmunización, como se reporta para los ensayos clínicos realizados con otras vacunas de cólera (Cohen y col., 2002, Anh y col., 2005).

2.4. Evaluación de la respuesta vibriocida a diferentes dosis de la cepa atenuada 638.

Este ensayo se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas en el ensayo anterior, pero solo se evaluó la cepa 638 a tres dosis de células diferentes. Un grupo de 7 voluntarios ingirió 10^9 UFC, a 6 voluntarios se les administró 10^8 UFC y 7 recibieron 10^7 UFC.

2.5. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por la cepa atenuada 638 en voluntarios sanos en Ecuador.

Una vez seleccionada la cepa con los mejores resultados en cuanto a seguridad e inmunogenicidad y la dosis apropiada en voluntarios sanos en Cuba, se procedió a realizar un estudio Ecuador, país que había sido azotado por una epidemia en el año 1991 con el objetivo de comparar la respuesta inmune generada por el candidato vacunal 638 en una población diferente a la cubana desde el punto de vista inmunoepidemiológico. Este

estudio se realizó también bajo régimen de internamiento y los voluntarios fueron tratados con antibióticos cinco días después de la inmunización.

Se evaluó la cepa atenuada 638 en la dosis de 10^9 UFC a partir de un cultivo preparado en fresco. La preparación del inóculo se llevó a cabo de la misma forma que en Cuba. Se administró la cepa atenuada 638 a un total de 26 voluntarios y 19 recibieron placebo.

2.6. Evaluación de la respuesta vibriocida en un ensayo de reto en voluntarios cubanos previamente inmunizados con *Vibrio cholerae* 638.

Luego de haber sido demostrada la capacidad inmunogénica de la cepa 638 a partir de un cultivo fresco en diferentes poblaciones, se llevó a cabo un estudio de reto, controlado, aleatorizado, a doble ciego, con la cepa virulenta 3008 en voluntarios sanos en Cuba, con el objetivo de evaluar la eficacia protectora de la cepa 638 frente a una cepa virulenta de serogrupo, biotipo y serotipo homólogo. En el grupo vacuna, 15 voluntarios ingirieron una dosis oral de 10^9 UFC de un cultivo fresco de la cepa 638. En el grupo placebo, 12 voluntarios recibieron bicarbonato de sodio al 1,33 %.

El reto con la cepa virulenta se llevó a cabo 28 días después de la administración de la cepa 638. La preparación del inóculo de la cepa 3008 se realizó bajo el mismo procedimiento que para la cepa 368. Ambos grupos recibieron una dosis de reto oral de 10^5 UFC de un cultivo fresco de la cepa virulenta 3008 El Tor Ogawa.

2.7. Evaluación de la actividad vibriocida del candidato vacunal 638 liofilizado en un ensayo de inmunogenicidad en voluntarios cubanos sanos.

A partir de los resultados obtenidos con el cultivo fresco tanto en Cuba como en Ecuador y luego de la demostración de su eficacia protectora se pasó al desarrollo farmacéutico del

candidato vacunal liofilizado. Se llevó a cabo un ensayo clínico fase III aleatorizado, a doble ciego y placebo controlado para evaluar la seguridad e inmunogenicidad de una dosis de 10^9 UFC del candidato vacunal liofilizado administrado por vía oral y demostrar que la formulación y liofilización no afecta la inmunogenicidad del producto evaluado mediante el ensayo vibriocida. En este ensayo, 34 voluntarios ingirieron la vacuna y 14 recibieron placebo. Su IFA es la cepa atenuada 638 y los lioprotectores: leche descremada, peptona y sorbitol, además de un antiácido compuesto por bicarbonato de sodio, ácido ascórbico, manitol, lactosa anhidra, sacarina sódica y polivinilpirrolidona, El placebo también fue liofilizado y compuesto por los lioprotectores antes mencionados y el antiácido, excepto el IFA, el cual resultó indistinguible de la vacuna.

2.8. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por el candidato vacunal 638 liofilizado en voluntarios supuestamente sanos en Mozambique.

Otras cepas atenuadas han mostrado diferentes niveles de inmunogenicidad al ser evaluadas en áreas endémicas y no endémicas, por lo que se llevó a cabo un estudio de Fase III controlado, aleatorizado y a doble ciego con el candidato vacunal liofilizado, administrado por vía oral a una dosis del orden de 10^9 UFC en voluntarios adolescentes y adultos supuestamente sanos de ambos sexos en Mozambique. En este ensayo 80 individuos recibieron una dosis oral de la cepa 638 y 40 recibieron el placebo.

2.9. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics 5.0 para el procesamiento de los datos experimentales. Las diferencias significativas en los porcentajes de seroconversión entre los

grupos de vacunados y placebo se verificaron por la prueba exacta de Fisher y la comparación de los TMG mediante la prueba de Suma de Rangos de Wilcoxon. Los estudios de reto con la cepa 3008 fueron diseñados para detectar un 80% de eficacia protectora contra el cólera, mediante el test de χ^2 usando un ANOVA de dos colas con un valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Validación del ensayo Vibriocida

En el ensayo de repetibilidad y reproducibilidad, en las seis repeticiones realizadas para las tres muestras evaluadas, se obtuvo una coincidencia en los títulos del 100 %, siendo este valor de 60-80% en el ensayo de precisión intermedia, pero las variaciones siempre fueron de una dilución y la coincidencia fue mayor del 50 % por lo que cumplió con el criterio de aceptación.

Otro de los parámetros evaluados fue la especificidad. El objetivo de este ensayo fue comprobar si los anticuerpos presentes en las muestras de suero evaluadas eran específicos contra *V. cholerae*. Luego de un período de incubación apropiado, se procedió a la lectura de las placas y las muestras que habían resultado positivas en el ensayo vibriocida frente a *V. cholerae* resultaron negativas cuando se usó como antígeno una cepa de *N. meningitidis*.

Para evaluar la robustez del método se introdujeron deliberadamente algunas variables que no constituyen puntos críticos en el ensayo y se determinó el efecto de estos cambios en los títulos de anticuerpos.

Tabla 2. Títulos de anticuerpos vibriocidas obtenidos con las variables alternativas en relación al ensayo estándar en la prueba de robustez.

Parámetro		Título
Bacteria (DO)	0,9	1280
	1,0	1280
Muestras de suero	Normal	1280
	Descomplementado	2560
Fuente de complemento	Conejo	2560
	Humano	1280
Diluyente	Solución salina	2560
	PBS	2560
Tiempo de reacción Ag-Ac-C'	1 h	1280
	30 min.	2560
Medio de cultivo	Caldo LB	1280
	Caldo BHI	1280
	Caldo TSB	1280

Como se observa en la tabla 2 los títulos obtenidos al evaluar las muestras mediante el ensayo estándar en comparación con los factores alternativos, la diferencia observada en algunos casos fue de solo una dilución, lo que indica que la variación de algunos parámetros dentro de ciertos límites no afecta los resultados del ensayo.

3.2. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por diferentes cepas vivas atenuadas candidatas a vacuna oral contra el cólera.

En el presente trabajo, la inmunogenicidad de cepas atenuadas de *V. cholerae* administradas por vía oral, se evaluó a través de la determinación del título de anticuerpos vibriocidas modificado y validado. No hubo diferencias significativas entre los títulos alcanzados por las cepas atenuadas de primera y segunda generación el día 14, independientemente del serotipo. Las cepas 81 y 638, de serotipo Ogawa y la 1333 de serotipo Inaba, mostraron un 100 % de seroconversión, y los valores más altos de TMG el día 14 con respecto a la preinmunización. Sin embargo, sí hubo diferencias en cuanto al tipo de manipulación genética realizada. Esta diferencia fue significativa para el caso de la cepa 638T, la cual había sufrido una tercera mutación y se había convertido en una cepa auxotrófica a timidina y para la que se obtuvo TMG muy por debajo del observado para el resto de las cepas y con la cual solo seroconvirtieron la mitad de los voluntarios inmunizados (Tabla 3).

Se han reportado otros trabajos con mutantes indefinidos de *V. cholerae* con requerimientos de timidina, como el caso de la CVD102, que fue pobremente excretado en humanos y mínimamente inmunogénica con respecto a su parental, lo cual sugiere que la auxotrofia a la timidina produjo una sobreatenuación (**Levine y col., 1988**), lo que pudiera explicar de la misma forma los resultados obtenidos con la 638T.

Tabla 3. Comparación de la respuesta vibriocida inducida por diferentes cepas atenuadas candidatas a vacuna oral.

Anticuerpos vibriocidas	81 (1ra) n = 8	638 (2da) n = 8	1333 (2da) n = 9	638T (3ra) n = 9	JBK70 n = 8
TMG	18,34	21,81	14,69	11,66	11,89
(T0)	(10-80)	(10-80)	(10-40)	(10-40)	(10-20)
TMG	1974,02	2525,9	2764,95	86,4	1076,34
(T14)	(640-5120)	(640-5120)	(320-10240)	(20-1280)	(160-20480)
Seroconversión (%)	100 ^a	100 ^a	100 ^a	55,5 ^b	100 ^a
Incremento (veces)	107	115,7	188,2	7,4	90,52

TMG: Título medio geométrico.

Letras diferentes indican diferencias significativas para un valor de $p < 0,05$.

De este primer estudio se descartó la cepa 638T por su baja inmunogenicidad, la 81 porque a pesar de inducir niveles de anticuerpos de la misma magnitud que la 638 no fue tolerada por los voluntarios (datos no mostrados) y la 1333 por ser del serotipo heterólogo al de las cepas causantes de la actual pandemia, por lo que de todas las cepas evaluadas la 638 resultó el mejor candidato para los estudios posteriores.

3.3. Evaluación de la respuesta vibriocida a diferentes dosis de la cepa atenuada 638.

Una vez seleccionada la cepa 638 como la más prometedora de los candidatos atenuados evaluados en cuanto a seguridad e inmunogenicidad, se procedió a determinar la dosis óptima para su administración oral.

Los valores de la media geométrica de los títulos de anticuerpos vibriocidas en las muestras correspondientes al día 14 posterior al inóculo, y los valores de seroconversión se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de la respuesta de anticuerpos vibriocidas en voluntarios sanos después de la ingestión de la cepa atenuada 638 en diferentes dosis.

Anticuerpos vibriocidas	10⁷	10⁸	10⁹
	n = 7	n = 6	n = 7
TMG (T0)	21,21	19,74	20,08
(Rango)	(10-40)	(10-40)	(10-40)
TMG (T14)	390 ^a	1280 ^a	4637,30 ^b
(Rango)	(40-2560)	(320-2560)	(640-20480)
Seroconversión (%)	71,4	100	100
Incremento (veces)	18,3	64,8	230,9

TMG: Título medio geométrico.

Letras diferentes indican diferencias significativas para un valor de p<0,05.

Aunque el porcentaje de seroconversión fue semejante para las dosis más altas, hubo una diferencia entre las dosis de 10^8 y 10^9 en cuanto a niveles de anticuerpos alcanzados 14 días después de la administración del inóculo, donde los títulos de anticuerpos más altos se obtuvieron con la dosis de 10^9 . Aún con la dosis más baja, la cepa 638 indujo una considerable respuesta vibriocida pero inferior a la obtenida con las otras dosis.

En los estudios de inmunogenicidad iniciales llevados a cabo en países desarrollados, los voluntarios recibieron una dosis de 5×10^8 UFC con resultados altamente positivos. Sin embargo, en las pruebas iniciales con soldados tailandeses y niños indonesios, solo seroconvirtieron el 25 y 16 % de los inmunizados, respectivamente (**Su-Arehawaratana y col., 1992, Suharyono y col., 1992**). Cuando la dosis de vacuna se incrementó un orden, se encontró un marcado aumento en la seroconversión, por lo que la inmunidad protectora parece ser dosis dependiente (**Eko y col., 2003**).

De estos resultados se puede interpretar que la dosis definitiva a aplicar en vacunas de este tipo puede variar según sean las características inmunoepidemiológicas relacionadas con la enfermedad, del área en la que se va a intervenir.

Con el candidato 638 se obtuvo un 100% de seroconversión con la dosis de 10^8 , aunque se escogió la de 10^9 porque con esta fueron mayores los títulos de anticuerpos y estudios llevados a cabo en Bangladesh demostraron que la prevalencia y el título vibriocida aumentan con la edad y que por un aumento doble en el título la incidencia de cólera disminuye a la mitad (**Attridge y col., 2002, Harris y col., 2005**).

3.4. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por la cepa atenuada 638 en voluntarios sanos en Ecuador.

No obstante, los resultados obtenidos hasta este momento, la población en estudio no representa exactamente las características de una población abierta, mucho menos comparada con aquella a las que va dirigido el producto, por lo que se considera que candidatos vacunales de este tipo deben ser evaluados en ensayos controlados, utilizando grupos poblacionales más cercanos a la realidad. Por tal motivo, se llevó a cabo un estudio fase I-II en un área epidémica para la enfermedad en Guayaquil, Ecuador.

De los 26 voluntarios vacunados, un 88 % mostró un incremento de 4 veces o más en el título de anticuerpos vibriocidas, medidos 14 días luego de la vacunación (Tabla 5).

Tabla 5. Respuesta de anticuerpos vibriocidas en voluntarios sanos ecuatorianos inmunizados con un cultivo fresco de la cepa viva atenuada 638.

Anticuerpos vibriocidas	Vacunados	Placebos
TMG (T0)	21,14	20,78
(Rango)	(20-160)	(20-160)
TMG (T14)	892,63 ^a	22,44 ^b
(Rango)	(20-10240)	(20-320)
Seroconversión (%)	88,8 ^a	0 ^b
Incremento (veces)	42,22	1,0

TMG: Título medio geométrico.

Letras diferentes indican diferencias significativas para un valor de $p < 0,05$.

Estos resultados no difieren de los obtenidos en los ensayos realizados con voluntarios cubanos que no han tenido contacto previo con *V. cholerae*, de lo que se infiere que el candidato vacunal 638 podría ser utilizado para la prevención de brotes epidémicos donde existe la enfermedad, aunque es de señalar que los voluntarios ecuatorianos participantes en el estudio fueron seleccionados bajo los mismos criterios de inclusión que los considerados en Cuba y los títulos de anticuerpos antes de la inmunización con la 638 no difieren de los mostrados por los voluntarios cubanos, por lo que se considera necesario realizar este estudio en una población que comprenda diferentes estratos desde el punto de vista genético, inmunoepidemiológico y socioeconómico.

3.5. Evaluación de la respuesta vibriocida en un ensayo de reto en voluntarios cubanos previamente inmunizados con *Vibrio cholerae* 638.

Una vez demostrada la seguridad e inmunogenicidad de la cepa 638, se procedió a la evaluación de la capacidad protectora de los anticuerpos inducidos por dicha cepa, para lo cual se llevó a cabo un estudio de reto en la población cubana. Un mes después de la administración de un cultivo fresco de 10^9 UFC de la cepa 638, 12 vacunados y 9 placebos fueron retados con 10^5 UFC de la cepa virulenta 3008. Los voluntarios inmunizados mostraron altos títulos de anticuerpos con un valor máximo a los 14 días, comenzando a disminuir estos valores cerca de los 28 días. Cuando el grupo de voluntarios inmunizados con la cepa 638 fue retado con la cepa virulenta 3008 de biotipo y serotipo homólogo, no hubo un incremento en los títulos, lo que pone en evidencia que solo es necesario una única dosis de vacuna, ya que los anticuerpos inducidos por la misma son capaces de inhibir la colonización ante un segundo encuentro con el microorganismo y por lo tanto resultan potencialmente protectores (Figura 1). Todos los voluntarios que recibieron el placebo

expuestos a la 3008 seroconvirtieron con títulos de anticuerpos vibriocidas altos, pero desarrollaron diarrea característica a la de un episodio de cólera. Se interpreta de este análisis que los voluntarios cubanos son igualmente susceptibles a la infección y el cólera producido por la cepa salvaje 3008. En el caso del grupo placebo, ocurrió un fenómeno completamente contrario. Ante el reto, el cual constituyó para este grupo una primovacunación, los títulos alcanzados a los 14 días fueron elevados aunque ligeramente inferiores a los logrados con la cepa 638 en el grupo de vacunados, lo que puede estar dado por el hecho de que de los nueve individuos retados del grupo placebo, siete voluntarios (77,7 %) presentaron diarrea y tuvieron que ser tratados con antibióticos cuando aparecieron los primeros síntomas, lo que provocó la muerte de los organismos infectantes y por tanto una desventaja en comparación con el resto de los vacunados en los que la bacteria pudo estar en contacto con el sistema inmune por un tiempo más prolongado lo que se traduce en una respuesta inmune más potente.

Ninguno de los 12 vacunados mostró síntomas luego de la ingestión de la cepa virulenta. Estos resultados indican que al mes después de la ingestión de una única dosis de 10^9 UFC de la cepa 638, los voluntarios quedaban protegidos contra la infección y la enfermedad provocada por una cepa virulenta. El significativo incremento del TMG y el 100 % de seroconversión alcanzado después de los 14 días en el grupo de voluntarios inmunizados y la protección lograda frente a un reto virulento sugieren la alta inmunidad conferida por la cepa viva atenuada 638, lo cual quedó demostrado mediante el ensayo vibriocida.

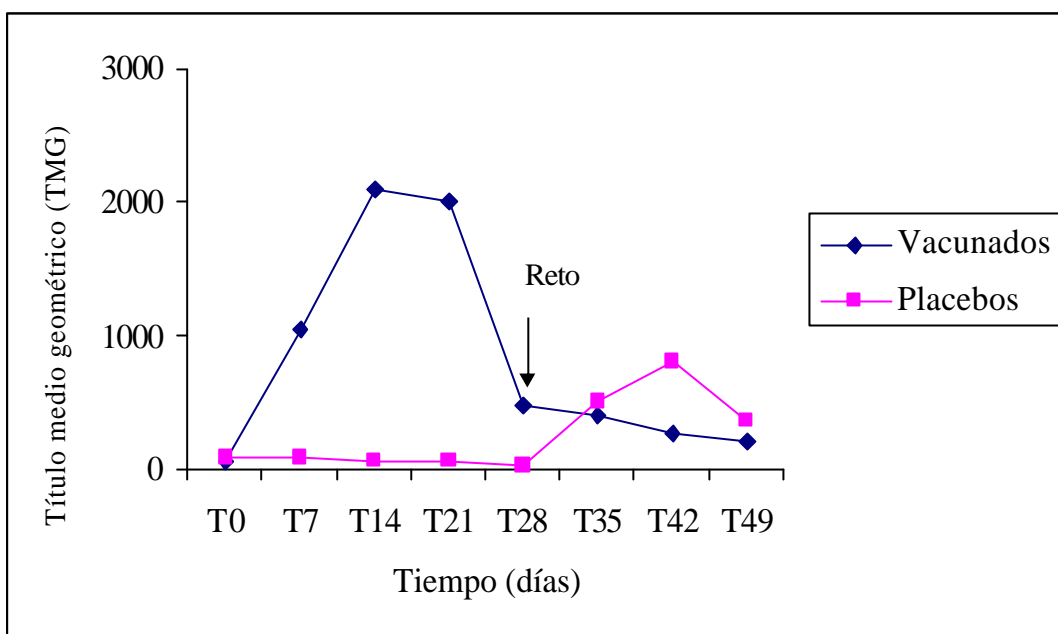


Figura 1. Cinética de anticuerpos vibriocidas en el suero de los voluntarios de los grupos de vacunados y placebos antes y después del reto con una cepa virulenta de biotipo y serotipo homologo al de la cepa vacunal.

Este estudio demuestra que una simple dosis oral conteniendo 10^9 UFC de un cultivo fresco de la 638 es inmunogénica y capaz de rendir una protección de al menos hasta 1 mes contra el cólera en un modelo de reto en voluntarios cubanos con la cepa virulenta 3008. La cepa 638 ha demostrado ser bien tolerada, inmunogénica y protectora contra la diarrea causada por una cepa virulenta después de una dosis oral a voluntarios sanos en un estudio de reto. La protección conferida por la vacunación con la 638 determinada por los niveles de anticuerpos vibriocidas, el mejor marcador indirecto para la protección, fue de un 100%.

3.6. Evaluación de la actividad vibriocida del candidato vacunal 638 liofilizado en un ensayo de inmunogenicidad en voluntarios cubanos sanos.

Los resultados obtenidos hasta el presente indican que la cepa 638 es segura, inmunogénica y protectora en individuos sanos y esto la hizo un candidato vacunal atractivo para la preparación de lotes de una formulación liofilizada bajo BPF para su desarrollo clínico.

Los resultados de la seroconversión y el TMG demostraron una respuesta vibriocida de los voluntarios vacunados con la cepa atenuada 638 contenida en la formulación liofilizada al mismo nivel que la observada en estudios previos con cultivos frescos de la misma cepa administrada de forma oral (Tabla 6).

Tabla 6 Respuesta de anticuerpos vibriocidas en voluntarios cubanos inmunizados con la formulación liofilizada de la cepa viva atenuada 638.

Grupo	% seroconversión	TMG Día 0 (Rango)	TMG Día 14 (Rango)
Vacunados	100 ^a	16,7 (10-80)	4681,95 ^a (160-40960)
Placebos	0 ^b	22,6 (10-80)	27,4 ^b (10-80)

TMG: Título medio geométrico.

Letras diferentes indican diferencias significativas para un valor de $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos, indican primero, que la vacuna logra vencer eficientemente la barrera gástrica y que alcanza la mucosa intestinal y segundo que activa al sistema inmune para producir una respuesta en la que se incluyen los anticuerpos vibriocidas. Los

resultados de la seroconversión en este estudio son comparables con los encontrados con las vacunas liofilizadas CVD103HgR (92%) y Perú 15 (98%) administradas a adultos norteamericanos sanos (Tacket y col., 1999, Cohen y col., 2002).

3.7. Evaluación de la respuesta vibriocida inducida por el candidato vacunal 638 liofilizado en voluntarios supuestamente sanos en Mozambique.

Una vez obtenida la formulación final del IFA y los resultados de la evaluación de su inmunogenicidad en la población cubana, se procedió a su aplicación en una zona endémica de la enfermedad.

Los títulos alcanzados después de la vacunación fueron elevados en muchos voluntarios a los 14 días de vacunados, y se obtuvo un alto porcentaje de seroconversión independientemente de los niveles de anticuerpos presentes antes de la inmunización (Tabla 7). En contraste con los ensayos conducidos en Cuba y Ecuador, los voluntarios mozambicanos no recibieron la dosis de doxiciclina luego de la inoculación, pues el estudio se realizó de forma ambulatoria y en un área endémica, lo que permitió la participación de un número mayor de voluntarios en el estudio. Esto pudo haber contribuido también a los altos valores de TMG observados en ese país, ya que el inóculo tuvo la ventaja de su persistencia y colonización en el intestino mucho más tiempo que en los ensayos de Cuba y Ecuador, lo que condujo a una respuesta inmune a nivel de mucosa mucho más fuerte por un contacto más prolongado entre *V. cholerae* y el sistema inmune mucosal.

Tabla 7. Respuesta de anticuerpos vibriocidas en voluntarios mozambicanos supuestamente sanos inmunizados con la formulación liofilizada de la cepa viva atenuada 638.

Grupo	% seroconversión	TMG Día 0 (Rango)	TMG Día 14 (Rango)
Vacunados	96,2 ^a	43,53 (10-640)	9056,34 ^a (10-81920)
Placebos	15 ^b	28,78 (10-320)	38,6 ^b (10-10240)

TMG: Título medio geométrico.

Letras diferentes indican diferencias significativas para un valor de $p < 0,05$.

La respuesta vibriocida en suero es el mejor correlato de protección para *V. cholerae* O1 y la mejor medida de una correcta estimulación de la inmunidad antibacteriana. Esta respuesta es fundamentalmente de tipo IgM y de corta duración y cae a los valores cercanos a los iniciales en un período entre 2 y 6 meses (**Viret y col., 1999**), pero es un marcador confiable de que se ha generado una inmunidad mucosal fuerte y duradera, toda vez que un alto porcentaje de voluntarios experimentalmente infectados o vacunados, han estado protegidos en experimentos de reto hasta 3 años después, a pesar de no tener una respuesta vibriocida alta (**Tacket y col., 1999**).

En este trabajo se introduce una modificación del método tradicionalmente usado en la evaluación de la inmunogenicidad de las vacunas contra el cólera, que permite una lectura más rápida y por analistas menos experimentados, que requiere equipamiento mínimo y

permite su aplicación en países del tercer mundo, principalmente en áreas rurales donde hay una alta prevalencia de la enfermedad.

En el presente trabajo se describen los resultados de los ensayos de inmunogenicidad realizados en Cuba, Ecuador y Mozambique con el candidato vacunal atenuado 638 obtenido en Cuba, ya sea administrado como cultivo fresco o en su formulación liofilizada, como parte de un grupo de estudios pilotos y de ensayos clínicos fase III llevados a cabo para estudiar la seguridad e inmunogenicidad del mismo a través de la determinación del título de anticuerpos vibriocidas. Este es el primer estudio del candidato vacunal cubano vivo atenuado *V. cholerae* 638 realizado en un área epidémica o endémica de cólera después de numerosos ensayos pilotos conducidos en Cuba, donde demostró ser seguro, inmunogénico y eficaz. Este estudio es importante porque los candidatos vacunales necesitan ser evaluados en poblaciones y localidades diferentes donde la respuesta y eficacia pueden variar grandemente (Qadri y col., 2006).

Tabla 8. Comparación de la respuesta vibriocida inducida por el candidato vacunal 638 en diferentes presentaciones y países.

	Cultivo fresco		Formulación liofilizada	
	Cuba	Ecuador	Cuba	Mozambique
TMG T14 (Rango)	3581,6 (640-20480)	892,63 (20-10240)	4681,95 (160-40960)	9056,34 (10-81920)
Seroc. %	100	88,8	100	96,2

TMG: Título medio geométrico

La cepa atenuada 638 mostró una elevada respuesta vibriocida en voluntarios cubanos comparable a la obtenida en Ecuador y Mozambique. Los valores de seroconversión obtenidos por el ensayo vibriocida fueron superiores al 80 % en todas las poblaciones estudiadas.

Las infecciones intestinales provocan una respuesta inmune mucosal con un gran compromiso de la respuesta IgAS. Los anticuerpos IgA, no fijan complemento por la vía clásica, por lo que se piensa que la inmunoexclusión que es un proceso que previene la adherencia de las bacterias a los receptores del hospedero sea el principal papel de la IgA en el intestino (**Bollinger y col., 2003**). La medida directa de los anticuerpos en heces, puede ser problemático debido a la degradación proteolítica de los mismos y la medición de IgA en los lavados intestinales o por endoscopia pudiera ser más segura, pero estos métodos no son prácticos. Frecuentemente se miden marcadores sustitutos de la respuesta intestinal como los anticuerpos vibriocidas séricos (**Qadri y col, 2003**).

El cólera fue considerado por mucho tiempo como el paradigma clásico de una diarrea toxigénica no inflamatoria, hasta que estudios ultraestructurales demostraron que en realidad, se producía un incremento de células inflamatorias tales como los polimorfonucleares y eosinófilos y otros marcadores de la inflamación como la lactoferrina en el intestino durante la infección con *V. cholerae* O1 en el estado agudo de la enfermedad, con propiedades bactericidas o bacteriostáticas. Aunque este incremento se observó predominantemente en las heces y las biopsias del intestino, también se apreció en la circulación sistémica (**Mathan y col., 1995**). Esto sugiere que la inmunidad lograda después de un episodio natural con cólera está mediada tanto por mecanismos de respuesta inmune específicos, como innatos.

Los anticuerpos séricos, especialmente, los de clase IgG penetran en el lumen intestinal donde están presentes proteínas del complemento. El mecanismo efector de la IgG e IgM sérica en cólera, una vez en el lumen, pudiera ser la lisis mediada por complemento, aglutinación, opsonización y fagocitosis (**Kirimanjeswara y col., 2005**).

Se ha especulado mucho acerca del papel de los anticuerpos vibriocidas en el suero en una enfermedad no invasiva como el cólera y sobre qué clase de anticuerpos juegan el papel fundamental en la inducción de una respuesta protectora y duradera, pero lo que está demostrado, es que cualquiera que sea el mecanismo, existe una estrecha correlación entre los anticuerpos vibriocidas inducidos por una infección clínica o por medio de la vacunación y la protección y que la determinación de estos anticuerpos ha servido como patrón para la búsqueda de una vacuna efectiva contra esta enfermedad.

Mediante la determinación del título de anticuerpos vibriocidas se pudo seleccionar un candidato vacunal que resultó ser inmunogénico y potencialmente protector en poblaciones donde no existe la enfermedad y en áreas epidémicas o endémicas, lo que permitió su desarrollo clínico para su evaluación en ensayos fase I-II.

4. CONCLUSIONES

1. El ensayo vibriocida para la determinación de anticuerpos séricos contra *V. cholerae* se modificó, validó y se empleó como criterio de inmunogenicidad y protección por haber demostrado una adecuada precisión, especificidad y robustez.
2. Mediante el ensayo vibriocida se pudo seleccionar a partir de un grupo de cepas atenuadas candidatas a vacuna contra el cólera, la más efectiva, así como la dosis óptima y ser desarrollada hasta su formulación final.
3. Se demostró la asociación entre la respuesta de anticuerpos vibriocidas y la protección frente a un reto con una cepa virulenta de *V. cholerae*.
4. La prueba vibriocida fue capaz de determinar una respuesta de anticuerpos inducida por un cultivo fresco de la cepa 638, de la misma magnitud en las diferentes poblaciones estudiadas, lo que demuestra su potencial protector en variados escenarios epidemiológicos.
5. El proceso de formulación final del candidato vacunal liofilizado no afectó la inmunogenicidad de la misma, evaluada por el ensayo vibriocida, lo cual tiene valor al decidir la tecnología y presentación final de la vacuna, así como su empleo en diferentes países.

5. RECOMENDACIONES

1. Establecer el ensayo vibriocida modificado como prueba de control de producto final.
2. Incluir en el ensayo de especificidad como cepa blanco otras bacterias enteropatógenas que muestren reacción cruzada con *V. cholerae*, así como sueros de individuos infectados con las mismas.
3. Evaluar la respuesta vibriocida en los ensayos clínicos de Fase I-II en adolescentes y niños en áreas endémicas de cólera y en Fase III en poblaciones expuestas a brotes epidémicos
4. Evaluar la capacidad protectora de los anticuerpos vibriocidas inducidos por el candidato vacunal 638, contra los serotipos homólogos y heterólogos de *V. cholerae* O1, durante el ensayo clínico de Fase III.
5. Evaluar la inmunogenicidad de la formulación y presentación final de la vacuna liofilizada 638 durante el ensayo clínico de Fase III.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1. Anh DC, Canh DG, Lopez AL, Thiem VD, Long PT, Son NH, Deen J, von Seidlein L, Carbis R, Han SH, Shin SH, Attridge S, Holmgren J, Clemens J.** Safety and immunogenicity of a reformulated vietnamese bivalent killed, whole-cell, oral cholera vaccine in adults. *Vaccine* 2005;25:1149-1155.
- 2. Asaduzzaman M, Ryan ET, John M, Hang L, Khan AI, Faruque AS, Taylor RK, Calderwood SB, Qadri F.** The major subunit of the toxin coregulated pilus TcpA induces mucosal and systemic immunoglobulin A immune responses in patients with cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Infect Immun.* 2004; 72(8):4448-4454.
- 3. Attridge SR, Johansson C, Trach DD, Qadri F, Svennerholm AM.** Sensitive assay for detection of bactericidal antibodies to *Vibrio cholerae* O139. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9 (2):383-387.
- 4. Bollinger RR, Everett ML, Palestrant D, Love SD, Lin SS, Parker W.** Human secretory immunoglobulin A may contribute to biofilm formation in the gut. *Immunology* 2003; 109:580-587.
- 5. Boutonier A, Dassay B, Duménil R, Guérolé A, Ratsitorahina M, Migliani R, Fournier JM.** A simple and convenient microtiter plate assay for the detection of bactericidal antibodies to *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio cholerae* O139. *J Microbiol Methods* 2003; 55 (3):745-753.
- 6. Chatterjee S, Chaudhuri K.** Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. Biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1762: 1-16

- 7. Cohen MB, Giannella RA, Bean J, Taylor DN, Parker S, Hoepfer A, Wowk S, Hawkins J, Kochi SK, Schiff G, Killen KP.** Randomized, controlled human challenge study of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of a single dose of Per μ -15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infect Immun* 2002; 70(4):1965-1970.
- 8. Cooper PJ, Chico ME, Losonsky G, Sandoval C, Espinel I, Sridhara R, Aguikar M, Guevara A, Guderian RH, Levine MM, Griffin GE, Nutman TB.** Albendazole treatment of children with ascariasis enhances the vibriocidal antibody response to the live attenuated oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *J Infect Dis* 2000; 182 (4): 1199-1206.
- 9. Crean TI, John M, Calderwood SB, Ryan E.** Optimizing the germfree mouse model for in vivo evaluation of oral *Vibrio cholerae* vaccine and vector strains. *Infect Immun* 2000; 68:977-981.
- 10. Eko FO, Schukovskaya T, Lotzmanova EY, Firstova VV, Emalyanova NV, Klueva SN, Kravtsov AL, Livanova LF, Kutyrev VV, Igietseme JU, Lubitz W.** Evaluation of the protective efficacy of *Vibrio cholerae* ghost (VCG) candidate vaccines in rabbits. *Vaccine* 2003; 8(21):3663-3674.
- 11. Gaffga NH, Tauxe RV, Mintz ED.** Cholera: a new homeland in Africa? *Am J Trop Hyg* 2007; 77(4):705-713.
- 12. Harris JB, Khan AI, LaRoque RC, Dorer DJ, Chowdhury F, Faruque AG, Sack DA, Ryan ET, Qadr F, Calderwood SB.** Blood group, immunity and risk of infection with *Vibrio cholerae* in an area of endemicity. *Infect Immun* 2005; 73 (11): 7422-7427.

- 13. Kirimanjeswara GS, Mann PB, Piloni M, Kennett MJ, Harvill ET.** The complex mechanism of antibody-mediated clearance of *Bordetella* from the lungs requires TLR4. *Immunol* 2005; 56:910-915.
- 14. Levine MM, Kaper JB, Herrington D, Losonsky G, Morris JG, Clements ML, Black RE, Tall B, Hall R.** Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. *Infect Immun* 1988;56 (1): 161-167.
- 15. Liang W, Wang S, Yu Fenggang, Zhang L, Qi Guoming, Liu Y, Gao S, Kan B.** Construction and evaluation of a safe, live, oral *Vibrio cholerae* vaccine candidate, IEM108. *Infect Immun* 2003; 71(10): 5498-5504.
- 16. Mathan MM, Chandy G, Mathan VI.** Ultrastructural changes in the upper small intestinal mucosa in patients with cholera. *Gastroenterology* 1995; 109:422-430.
- 17. OPS.** Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. En: Programa Especial de Publicaciones. Ed. Washington, DC. 1994.
- 18. Qadri F, Ryan ET, Faruque AS, Ahmed F, Khan AI, Islam MM, Akramuzzaman SM, Sack DA, Calderwood SB.** Antigen-specific immunoglobulin A antibodies secreted from circulating B cells are an effective marker for recent local immune responses in patients with cholera: comparison to antibody-secreting cell responses and other immunological markers. *Infect Immun* 2003; 71(8):4808-4814.
- 19. Qadri F, Chowdhury MI, Faruque SM, Salam MA, Ahmed T, Begum YA, Saha A, AL Tarique A, Seidlein LV, Park E, Killeen KP, Mekalanos JJ, Qureshi K, Molbak K, Sandstrom A, Kofoed PE, Rodríguez A, Diaz F, Aaby P, Svennerholm AM.** Breast milk reduces the risk of illness in children of mothers with cholera: observations from an epidemic of cholera in Guinea-Bissau. *J Pediatr Infect Dis* 2006; 25 (12): 1163-1166.

- 20. Ravichandran M, Ali SA, Rashid NH, Kurunathan S, Yean CY, Ting LC, Bakar AS, Lalitha P, Zaluiddin ZF.** Construction and evaluation of a O139 *Vibrio cholerae* vaccine candidate based on a *hemA* gene mutation. *Vaccine* 2006; 24(18):3750-3761.
- 21. Richie E, Punjab N, Sidharta Y, Peetosutan K, Sukandar M, Wasserman S, Lesmana M, Wangsasaputra F, Pandam S, Levine M, O'Hanley P, Cryz S, Simanjuntak C.** Efficacy trial of a single-dose live oral cholera vaccine CVD103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. *Vaccine* 2000; 18:2399-2410.
- 22. Ryan ET, Calderwood SB, Qadri F.** Live attenuated oral cholera vaccines. *Expert Rev Vacc* 2006; 5(4), 483-494.
- 23. Su-Arehawaratana P, Singharaj P, Taylor DN, Hoge C, Tropa A, Kuranont K, Migasena S, Pitisuttitha P, Lim YL, Losonsky G, Kaper JB, Wasserman SS, Cryz S, Echeverría P, Levine MM.** Safety and immunogenicity of different immunizations regimens of CVD 103HgR live oral cholera vaccine in soldiers and civilians in Thailand. *J Infect Dis* 1992; 165:1042-1048.
- 24. Suharyono S, Simanjuntak C, Witham N, Unjabi N, Hepnner DG, Losonsky G, Totosurdorjo H, Rifai AR, Clemens J, Lim YL, Burr D, Wasserman SS, Kaper JB, Sorenson K, Cryz S, Levine MM.** Safety and immunogenicity of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103HgR in 5 to 9 year old Indonesian children. *Lancet* 1992; 340:689-694.
- 25. Tacket CO, Losonsky G, Nataro JP, Michalsky J, Kaper JB, Levine MM.** Volunteer studies investigating the safety and efficacy of live oral El Tor *Vibrio cholerae* O1 vaccine strain CVD111. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56:533-537.

26. Tacket CO, Cohen MB, Wasserman SS, Losonsky G, Livio S, Kotloff K, Edelman R, Kaper JB, Cryz SJ, Giannella RA, Schiff G, Levine MM. Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentered trial of the efficacy of a single dose of live oral cholera vaccine CVD103-HgR in preventing cholera following challenge with *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba three months after vaccination. *Infect Immun* 1999; 67(12): 6341-6345.

27. Viret JF, Favre D, Wegmuller B, Herzog C, Que JU, Cryz SJ, Lang AB. Mucosal and systemic immune responses in humans after primary and booster immunizations with orally administered invasive and non-invasive live attenuated bacteria. *Infect Immun* 1999; 67 (7): 3680-3685

28. Wasserman SS, Losonsky GA, Noriega F, Tacket CO, Castañeda E, Levine M. Kinetics of the vibriocidal antibody response to live oral cholera vaccines. *Vaccine* 1994; 12 (11):1000-1003.

29. Xu G, Wang S, Zhuang L, Hackett A, Gu L, Zhang L, Zhang C, Wang H, Huang Z, Lu S. Intramuscular delivery of a cholera DNA vaccine primes both systemic and mucosal protective antibody responses against cholera. *Vaccine* 2009; 27(29):3821-3830.