

RESPUESTA INMUNOLÓGICA DE VOLUNTARIOS FRENTE A LA INMUNIZACIÓN CON UNA CEPA VIVA ATENUADA DE *Vibrio cholerae*

Tania Valmaseda Pérez,¹ Boris L Rodríguez,² Bárbara Cedré,¹ Luis García,¹ Hilda García,¹ Alma Robert,² Jorge Benítez² y Gustavo Sierra¹

¹Instituto Finlay, ave. 27 No. 19805, La Lisa, AP 16017, CP 11600, Ciudad de La Habana, Cuba, Fax: (53-7) 33 6075, e-mail: finlayci@ceniai.sld.cu

²Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba.

Introducción

El cólera permanece como un problema emergente para la salud pública en muchas partes del planeta, como lo evidencia la aparición de la reciente epidemia en América Latina y el surgimiento en Asia de la cepa O139 (1). Ante esas realidades las vacunas se convierten en la medida más efectiva de control y prevención de la enfermedad. Con el desarrollo de la ingeniería genética y la biotecnología ha sido posible obtener vacunas vivas atenuadas que en una sola dosis de administración oral estimulen el sistema inmune de mucosa proporcionando una protección duradera. La principal dificultad en el uso de estas cepas atenuadas radica en que a un mantiene una elevada reactividad en ensayos en humanos, solo en el caso de la CVD 103 HgR, derivada de una cepa clásica de *Vibrio cholerae* O1 se logró una adecuada inmunogenicidad a simple dosis con una reactividad despreciable, pero dicha cepa fue menos efectiva contra cepas El Tor que es el biotipo predominante en la reciente pandemia (2).

Benítez y colaboradores desarrollaron por métodos de ingeniería genética una cepa viva atenuada candidata a una vacuna contra el cólera a partir de una cepa salvaje de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor, serotipo Ogawa (3, 4). En este trabajo presentamos los resultados obtenidos en la respuesta vibriocida, humoral y sérica de voluntarios inmunizados con dicha cepa.

Materiales y Métodos

Para el ensayo clínico se utilizó la cepa atenuada 638 de *V. cholerae* O1 El Tor, Ogawa, escogiéndose un grupo de 7 voluntarios, sexo masculino, entre 18-40 años de edad los cuales cumplieron los requisitos clínicos exigidos para la prueba.

La vacuna fue preparada el día de la inmunización y administrado a 5 de los voluntarios en una dosis oral única de 150 mL de bicarbonato de sodio 1,33 %, con una concentración real de $1,95 \times 10^9$ células/mL. El bicarbonato solo fue administrado como inóculo a los 2 voluntarios restantes (placebo).

Los voluntarios fueron chequeados clínicamente a diario y se tomaron muestras de heces fecales y saliva a diferentes tiempos para su posterior análisis. Las muestras de sangre fueron tomadas en los días 0, 7, 14, 21 y 28 posterior a la inoculación.

Se realizó la técnica de Vibriocida para la determinación de anticuerpos bactericidas en los sueros (5). El título de anticuerpos bactericidas se define como la mayor dilución del suero que inhibe completamente el crecimiento bacteriano.

La medición de anticuerpos IgG, IgM e IgA anti lipopolisacárido (anti-LPS) en suero fue realizada por la técnica de ELISA recubriendo placas de microtitulación con 25 µg/mL de LPS purificado El Tor, Ogawa, después de bloquear con leche descremada al 2 % se diluyeron las muestras convenientemente. El conjugado anti inmunoglobulínico específico fue añadido a la dilución de trabajo y luego revelada la reacción con o-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno en tampón citrato de sodio 0,1 M. La lectura fue realizada a 492 nm. El título anti-LPS se define como el inverso de la mayor dilución que alcanza valores de absorbancia superiores a 0,4.

Resultados y Discusión

Del total de vacunados, 3 de ellos fueron altamente positivos en la respuesta de anticuerpos vibriocidas, 1 fue moderadamente positivo, mientras que los 3 restantes no seroconvirtieron. Estos resultados se correlacionan con los títulos IgG, IgA e IgM anti LPS obtenidos por ELISA. Debe tenerse en cuenta que de los 3 voluntarios que no seroconvirtieron, 2 de ellos fueron placebo, mientras que al otro le fue administrada la misma dosis de vibrios que a los casos positivos. Este voluntario no respondió a la inmunización con la cepa atenuada de *V. cholerae*, una posible explicación puede encontrarse, en que el mismo presentaba desórdenes gastrointestinales que no fueron tomados en cuenta al inicio del ensayo.

En el presente experimento no se observaron efectos adversos lo que en conjunción con los altos títulos vibriocidas, los niveles de IgG, IgM e IgA y la alta correlación en todas las técnicas realizadas evidencian las potencialidades de la cepa en estudio para convertirse en una vacuna contra el cólera. En próximos experimentos deberá validarse dicha cepa con un número mayor de voluntarios y evaluar su eficacia protectora con experimentos de reto.

1. Shimada T, Nair GB, Deb BC, Albert JA, Sack RB, Takeda T. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. *Lancet* 1993;341:1347.

2. Levine MM, Kaper JB, Herrington D et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccine CVD 103 and CVD 103-HgR. *Infect Immun* 1988;2:467-70.

3. Benítez J, Silva A, Rodríguez B, Fando R, Campos J, Robert A et al. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. *Archives of Medical Research*. 1996; 27(3):275-283.

4. Robert A, Silva A, Benítez J, Rodríguez BL, Fando R, Campos J et al. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin/protease gene using a novel reporter enzyme: *Clostridium thermocellum* endoglucanase A. *Vaccines*. 1996;14:1517-1522.

5. Benenson SA, Saad A, Mosley WH. Serological studies in cholera. Vibriocidal antibody response of cholera patients determined by a microtechnique. *Bull WHO*. 1968;38:277-285.