

Sistema de Lotes de Siembra de la cepa vacunal *Vibrio cholerae* 638

Carmen A. del Puerto, Hilda M. García, Bárbara Cedré, Gemma Año, Teresita Morales, Alfredo Alfaro, Erick Amat, Mayelín Mirabal, Franklin Sotolongo, Arturo Talavera.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana. Cuba.
E-mail: carmen@finlay.edu.cu

En la producción de biológicos, especialmente en aquellos obtenidos a partir de microorganismos, resulta imprescindible contar con un suministro de células caracterizado y estable, como punto de partida para la producción. El concepto de Sistema de Lotes de Siembra en dos niveles, en el cual el Lote de Siembra de Referencia es usado para generar el Lote de Siembra de Trabajo, es considerado el enfoque más práctico para lograr este propósito. En este trabajo se elaboraron los Lotes de Siembra de Referencia y de Trabajo de la cepa vacunal *Vibrio cholerae* 638, primera etapa de la fabricación de una vacuna contra el cólera, cumpliendo con los requerimientos de Buenas Prácticas de Producción (BPP), lo que constituye una exigencia de las autoridades regulatorias nacionales e internacionales. La caracterización de los lotes demostró que se lograron adecuados niveles de viabilidad y se conservaron inalterables las características de la cepa original en cuanto a identidad, pureza, atenuación de su virulencia, capacidad de colonizar el intestino delgado de ratones lactantes y de inducir una respuesta inmune.

Palabras claves: Lotes de Siembra, *Vibrio cholerae*, cepa atenuada.

Introducción

En el Instituto Finlay se trabaja para desarrollar una vacuna viva oral contra el cólera, a partir de la cepa atenuada *Vibrio cholerae* 638, a la que por técnicas de ingeniería genética se le han eliminado los genes que codifican para los principales factores de virulencia (1).

Históricamente se han originado preocupaciones referentes a la calidad de los productos biológicos derivados de microorganismos, debido a la presencia de contaminantes o a la variación en sus propiedades cuando estos microorganismos no son preservados adecuadamente. Se ha demostrado que dichas propiedades pueden afectar la calidad y seguridad del producto resultante por lo que se hace imprescindible el empleo de una adecuada metodología para su conservación (2).

El concepto de Sistema de Lotes de Siembra en dos niveles, en el cual el Lote de Siembra de Referencia es usado para generar el Lote de Siembra de Trabajo, constituye la manera más práctica para asegurar la identidad, pureza y estabilidad de los microorganismos empleados como materia prima para la fabricación de un

producto biológico, evitando así la pérdida de propiedades que pueden originarse por pases sucesivos o generaciones múltiples y constituye un requisito obligatorio en la producción de vacunas derivadas de microorganismos (2, 3).

La caracterización de los lotes de siembra es un aspecto crítico del control de un producto biológico o biotecnológico, su objetivo es confirmar la identidad, pureza y disponibilidad del microorganismo, para su uso como materia prima. De igual manera, todas las actividades relacionadas con la elaboración y caracterización de los Lotes de Siembra estarán documentadas (2).

El objetivo del presente trabajo fue establecer el Sistema de Lotes de Siembra de la cepa *Vibrio cholerae* 638 para la producción de vacunas contra cólera, mediante la elaboración y caracterización del Lote de Siembra de Referencia y un Lote de Siembra de Trabajo.

Materiales y Métodos

Cepa bacteriana: *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa, cepa 638 [ctx \equiv , celA $^+$], atenuada de segunda generación, obtenida a partir de la cepa

C7258, en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (4) y conservada por liofilización (Lote Maestro).

Documentación: Los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) para la elaboración y caracterización de los Lotes de Siembra de Referencia y de Trabajo, y las Especificaciones de Calidad (ESPE) de dichos lotes, se redactaron teniendo en cuenta la bibliografía especializada sobre la temática de la documentación en la industria farmacéutica, así como los documentos regulatorios de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) para productos biológicos y farmacéuticos (3,5,6,7,8).

Elaboración del Lote de Siembra de Referencia

Una ampollita del Lote Maestro liofilizado fue resuspendida con 1 mL de medio Luria Bertani (LB) e inoculada en 15 mL del mismo medio, incubándose a 37 °C durante 24 h. El cultivo se inoculó en un Erlenmeyer con 100 mL del mismo medio, el que se incubó a 37 °C y 200 rpm por 4 h en un agitador orbital termostatado.

Se comprobó la pureza del cultivo mediante tinción de Gram, y se centrifugó a 6000 rpm por 15 min, la biomasa se resuspendió en solución lioprotectora (9). Se tomaron 0,1 mL de suspensión para recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL). El resto se distribuyó en ampollitas de vidrio a razón de 0,4 mL en cada una, para su posterior liofilización, la que se realizó en un equipo Usifroid SMH15.

Una vez concluido el proceso, las ampollitas se sellaron al vacío, y fueron cuidadosamente identificadas con una etiqueta con los siguientes datos: género y especie, número de la cepa, número del lote y fecha de liofilización. Posteriormente se almacenaron a una temperatura adecuada (4 °C) para garantizar su estabilidad a largo plazo (10).

La preparación del lote se realizó por personal calificado, no se manipularon otros materiales biológicos en paralelo, por las mismas personas ni en las mismas instalaciones, con el objetivo de garantizar que no ocurriera contaminación cruzada (3, 6).

Caracterización del Lote de Siembra de Referencia

† **Ensayos de identidad:** Se realizó la observación de características culturales en Agar Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares-Sacarosa (TCBS), Agar sangre de carnero 5% y Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI), siembra en Agar Hierro Kligler y Agar Hierro Lisina, así como las pruebas de oxidasa, catalasa y cuerda. La determinación del serogrupo bacteriano se realizó mediante la técnica de aglutinación en lámina utilizando antiseros comerciales (Murex) (11). Para la identificación del marcador de la cepa vacunal, se detectó la expresión del gen que codifica la endogluconasa A de *Clostridium thermocellum* (4).

† **Ensayo de pureza:** Se realizó por observación microscópica del cultivo obtenido en agar BHI teñido por el método de Gram.

† **Viabilidad:** Se realizó el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) por diluciones seriadas hasta 10^{-8} y siembra en superficie en agar LB, a los 0, 1, 3, 6 y 12 meses después de la liofilización. Se consideró satisfactoria una concentración celular igual o superior a 10^5 UFC/mL.

† Pruebas biológicas

✓ **Colonización en ratón neonato:** Se emplearon ratones Balb/c (1,5 g de peso), los que fueron separados en 2 grupos de 5 animales cada uno. Cada grupo fue inoculado por vía oral con 0,05 mL de una suspensión de 10^5 UFC de las cepas 638 y C7258 (cepa control) respectivamente. A las 24 h fueron sacrificados, los intestinos se extrajeron y homogeneizaron en amortiguador fosfato de sodio (AFS) 0,15 M pH 7,2. Se realizaron diluciones seriadas, las que se sembraron en Agar TCBS para la determinación del índice de colonización (12).

✓ **Inmunogenicidad en conejo adulto:** Se utilizaron conejos Nueva Zelanda (2-2,5 kg. de peso) inoculándose intraduodenalmente con 5 mL de la suspensión bacteriana con 10^9 UFC. Se tomaron muestras de suero a los

0, 7, 14 y 21 días post inoculación para la detección de anticuerpos vibriocidas e IgG anti LPS Ogawa por ELISA. El título de anticuerpos vibriocidas se define como la mayor dilución del suero que causa inhibición completa del crecimiento bacteriano. En el ELISA, las muestras de suero con valores de D.O por encima de 0,4 son consideradas positivas. Un incremento del título en cuatro veces, entre los 14 días y el día de inoculación (tiempo 0) es criterio de seroconversión, en ambos ensayos (13,14).

- ✓ **Determinación de la dosis letal media (DL50):** Se emplearon ratones Balb/c (1,5 g de peso) los que fueron separados en 5 grupos de 6 animales cada uno. Se emplearon suspensiones de 10^4 hasta 10^8 UFC. Cada grupo fue inoculado por vía oral con 0,05 mL de la dilución correspondiente. Se registró el número de animales muertos después de las 72 h (15).

En cada ensayo se evaluaron tres muestras. Se realizaron tres repeticiones de cada ensayo para verificar la repetibilidad de los resultados.

Elaboración del Lote de Siembra de Trabajo: A partir de una ampolleta del Lote de Siembra de Referencia, resuspendida en 1 mL de medio Triptona Peptona (TP), se inoculó un tubo con 15 mL del mismo medio. Este se incubó a 37 °C durante 24 h y subcultivó en Erlenmeyer con 100 mL del mismo medio, incubando a 37 °C y 200 rpm por 4 h en un agitador orbital termostataado.

El cultivo se mezcló con los crioprotectores glicerol al 20% (v/v) y leche descremada 10% (p/v). Se tomaron 0,1 mL de la suspensión para recuento de UFC/mL y el resto se distribuyó en viales para crioconservación. Los viales se rotularon con una etiqueta señalando género y especie, número de la cepa, número del lote y fecha de conservación. Se almacenaron a -70 °C.

Al igual que para el Lote de Referencia, el Lote de Trabajo fue elaborado por personal calificado en ambiente controlado. Es importante señalar que quedaron registrados el origen y el historial de los pases de ambos Lotes de Siembra.

Caracterización del Lote de Siembra de Trabajo

Los ensayos de identidad, pureza, viabilidad en medio TSA (a los 0, 6 y 12 meses después de la congelación) y dosis letal media, así como el número de muestras evaluadas y las repeticiones de los ensayos, se realizaron de manera similar a la descrita para el Lote de Siembra de Referencia.

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

El análisis de la viabilidad se hizo usando el test de la suma de rangos de Wilcoxon. Para el análisis de la cinética de anticuerpos en el ensayo de inmunogenicidad, se usó el test de Kolmogorov Smirnov de una cola, para mostrar diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos. Se calcularon los porcentajes de seroconversión de los títulos medidos por ELISA y vibriocida en el tiempo 14 con respecto al tiempo cero. También se calcularon los títulos medios geométricos para los títulos de anticuerpos medidos por ELISA y vibriocida.

Resultados y Discusión

Documentación: Previo a la elaboración de los Lotes de Siembra de Referencia y de Trabajo, fueron redactados, y aprobados por la Dirección de Calidad, los siguientes documentos necesarios para la elaboración y caracterización del Sistema de Lotes de Siembra:

- † PNO 20-035 "Elaboración y control de un lote de siembra de referencia de *Vibrio cholerae*".
- † PNO 20-036 "Elaboración y control de un lote de siembra de trabajo de *Vibrio cholerae*".
- † ESPE 02-058 "Siembra de referencia de *Vibrio cholerae* 638".
- † ESPE 02-059 "Siembra de trabajo de *Vibrio cholerae* 638".

La documentación apropiada para el procesamiento, preparación y ensayo de los Lotes de Siembra es una etapa esencial del cumplimiento de las Buenas Prácticas de

Fabricación de Productos Biológicos y constituye una exigencia de las autoridades regulatorias nacionales (6, 7) e internacionales (3, 10, 16).

Es necesario aclarar, que estos PNO son aplicables también para otras cepas atenuadas, así como para cepas virulentas. Están diseñados de manera tal que establecen, entre otros aspectos: las operaciones detalladas del proceso, etapa por etapa, respetando los requerimientos de cultivo y conservación del microorganismo en cuestión, garantizando que dichas operaciones se realicen de manera uniforme. Además incluyen los registros de elaboración y ensayo de los lotes, para ser llenados a medida que se realizan las operaciones, lo que demuestra que el procedimiento ha sido realizado y que se ha alcanzado la calidad requerida.

En el caso de las Especificaciones de Calidad, estas constituyen estándares de calidad críticos para asegurar la calidad y consistencia del producto. Fueron escogidas y justificadas por los resultados obtenidos por los investigadores que participaron en este proyecto cubano de obtención de vacunas atenuadas contra el cólera y aprobadas por las autoridades regulatorias nacionales.

Elaboración de los Lotes de Siembra de Referencia y de Trabajo

En el presente trabajo se realizó por primera vez la preparación en condiciones de BPP de los Lotes de Siembra de Referencia y Trabajo de la cepa 638 de *V. cholerae*, para ser empleados en la producción de los lotes de vacuna destinados a los Ensayos Clínicos de la primera vacuna cubana contra el cólera.

La ventaja principal de este Sistema de Lotes de Siembra de la cepa atenuada 638, candidata a vacuna oral contra al cólera, es que las bacterias cultivadas a partir del Lote de Siembra de Trabajo tendrán pocos pases en medio artificial y mantendrán las características del cultivo original (17).

Caracterización de los Lotes de Siembra

1 Ensayos de identidad

Tal como era de esperarse, tanto la observación de características culturales en medio sólido, como las pruebas bioquímicas y serológicas,

confirmaron la presencia de *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa en ambos lotes de siembra.

Al realizar la identificación del marcador vacunal a los Lotes de Siembra, se observó en todas las colonias la expresión de la enzima endogluconasa A, la cual produjo la degradación de la carboximetil celulosa apareciendo un halo transparente alrededor de las mismas. Una ventaja de esta cepa 638 es que posee un marcador con el gen reportero *celA*, que codifica la actividad —(1-4) endogluconasa, la cual no está presente en otras bacterias entéricas y permite su rápida e inequívoca distinción de otros vibrios presentes en el ambiente al realizar estudios de campo, además de facilitar el estudio de determinadas propiedades como son la virulencia y la capacidad de colonización (4, 18).

1 Ensayo de pureza

La observación microscópica del cultivo de ambos lotes demostró la presencia, en cultivo puro, de bacilos gramnegativos cortos, curvos o rectos, lo que coincide con la morfología típica de la cepa *V. cholerae* 638.

Un aspecto crítico en la creación de los lotes de siembra lo constituye la valoración de que estos están biológicamente puros, por lo que deben realizarse ensayos apropiados para la detección de contaminantes (3, 10).

1 Viabilidad (UFC/mL)

Lote de Siembra de Referencia: Existen reportes que mencionan la sensibilidad de *V. cholerae* al proceso de liofilización (19).

La viabilidad antes de la liofilización fue de $1,7 \times 10^9$ UFC/mL, disminuyendo a 4×10^8 UFC/mL después del proceso. Durante el primer año de almacenamiento (Figura 1) la reducción de la viabilidad (10^7 UFC/mL) fue menor que un orden logarítmico y no significativa estadísticamente ($p > 0,05$), coincidiendo con lo reportado por Delgado *et al* (1995) (20).

A pesar de esta disminución, es factible el uso del Lote de Siembra de Referencia en la producción, pues la concentración de células al año de almacenamiento se encuentra por encima del límite establecido en las especificaciones para este ensayo, permitiendo la obtención de biomasa para su uso en la elaboración de Lotes de Siembra de Trabajo.

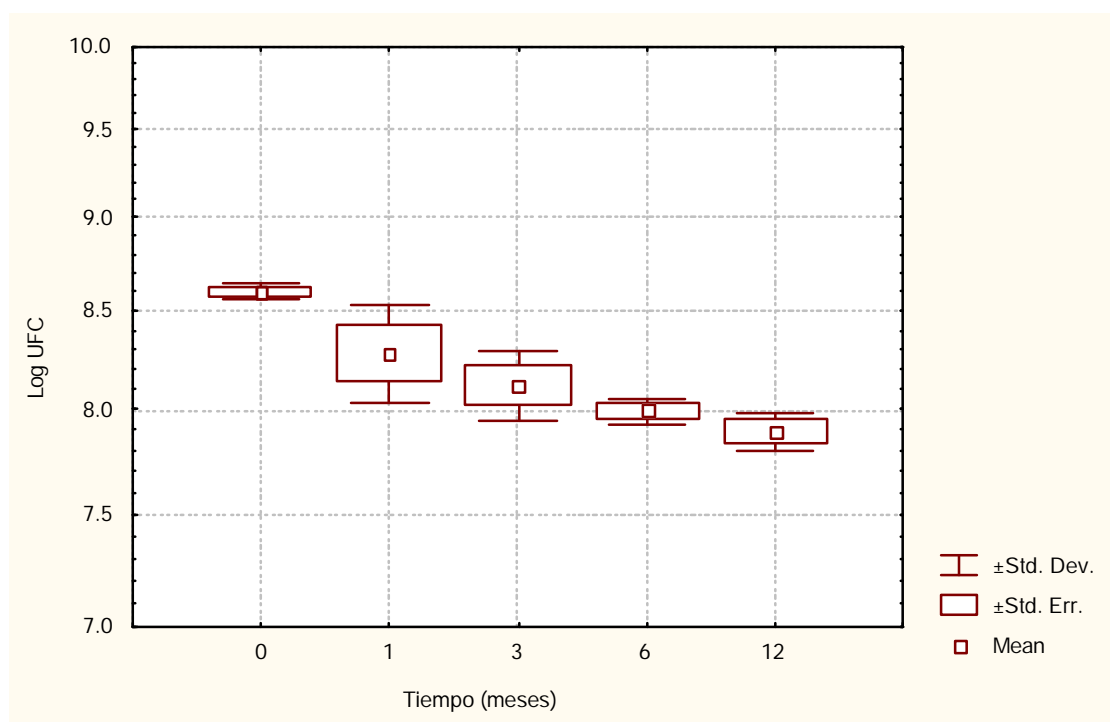


Figura 1. Viabilidad del Lote de Siembra de Referencia durante 1 año de almacenamiento.

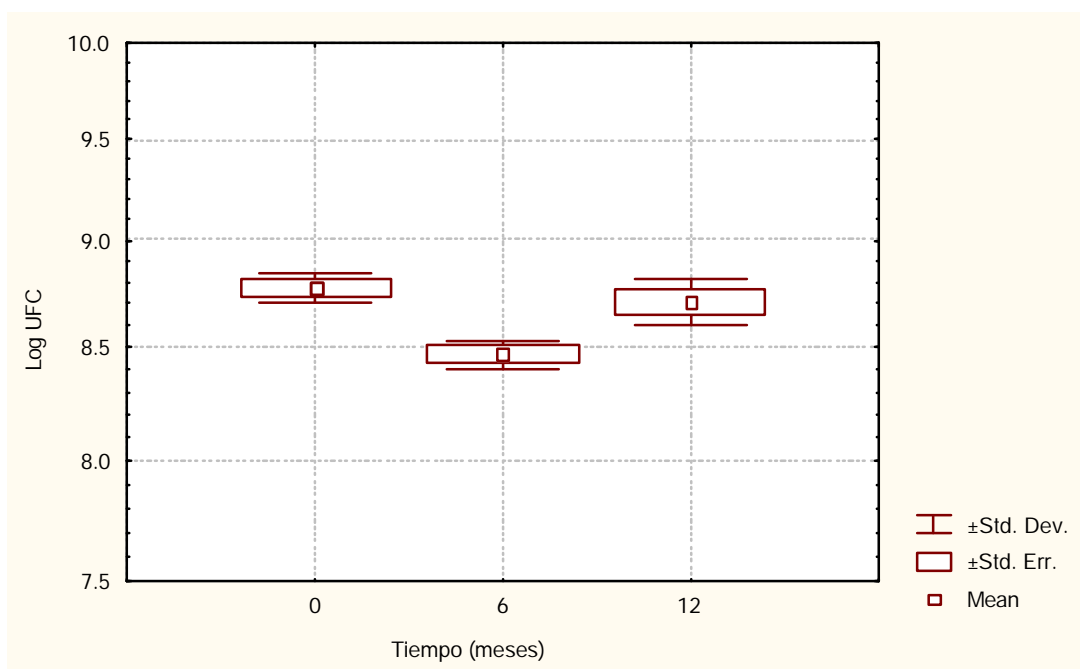


Figura 2. Viabilidad del Lote de Siembra de Trabajo durante 1 año de almacenamiento.

Lote de Siembra de Trabajo: No disminuyó la viabilidad posterior a la congelación, manteniéndose en el orden de 10^8 UFC/mL ($p > 0,05$) durante 1 año de almacenamiento (Figura 2). La aparente disminución que se

observa a los 6 meses, pudiera deberse a la imprecisión inherente al tipo de ensayo, máxime teniendo en cuenta que a los 12 meses se incrementa y que no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tiempos.

La congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ es el método de preservación cercano al ideal y ha demostrado ser adecuado para la preservación de *V. cholerae*, ya que la viabilidad de un lote de siembra de trabajo, conservado con glicerol al 20% como aditivo, se mantuvo constante durante periodos de 2 años y 2 años y medio respectivamente (21, 22). Pitisuttithum *et al* (2002) (23) reportan igual resultado después de 5 años de almacenamiento.

† Pruebas biológicas

✓ Colonización en ratón neonato

La cepa 638 (Lote de Siembra de Referencia) mostró un índice de colonización a las 24 h de 10^7 UFC/g de intestino, comparable al de la cepa parental C7258 usada como control en este ensayo, al obtenerse en ambas un incremento de más de cien veces en el número de células con respecto al inóculo (10^5 UFC).

El hecho de que la cepa parental (C7258) y la atenuada (638) presentan índices de colonización

similares coincide con lo reportado respecto a que en la transformación genética realizada, no se modificaron los genes que regulan la capacidad de adherencia y con ello de colonización en el intestino tanto en el modelo de ratón neonato (4) como en voluntarios humanos (18). Además a esta cepa se le inactivó el gen *hap* (que codifica para la hemaglutinina proteasa, una enzima que desempeña un papel importante en la colonización intestinal) y en su lugar se insertó el gen *celA*, lo que no afectó la capacidad de colonización de la cepa. De hecho la inactivación del gen *hap* incrementa la colonización en ratones lactantes (24).

✓ Inmunogenicidad en conejo adulto

El Lote de Siembra de Referencia mostró una cinética de anticuerpos que coincide con lo obtenido para la cepa 638 antes de la liofilización (Tabla 1).

Tabla 1. Título Medio Geométrico (TMG) de anticuerpos vibriocidas e IgG anti-LPS Ogawa por ELISA en conejos inoculados por vía intraduodenal con muestras del Lote de Siembra de Referencia.

TMG	Días post inoculación			
	0	7	14	21
Vibriocida	16,81	253,98 *	761,09 *	806,34 *
IgG anti-LPS	nd	0,18 *	0,88 *	0,67 *

Cada valor representa el promedio de 12 animales.

TMG: Título Medio Geométrico. * $p < 0,05$ (comparado con tiempo 0).

nd: no detectable.

Se observó un incremento significativo de los anticuerpos vibriocidas a partir de los 7 días de inoculación, con respecto a los niveles pre-inmunización (tiempo 0). Los valores máximos de respuesta se alcanzaron entre los 14 y 21 días tal como reporta la literatura (11, 25) con un 100% de seroconversión entre tiempo 0 y 14 días.

No se detectaron anticuerpos vibriocidas en los animales usados como controles. En las muestras de tiempo 0 de algunos conejos, se detectaron bajas respuestas de anticuerpos, lo que podría deberse a actividad bactericida inespecífica causada por una reacción cruzada con anticuerpos producidos por el contacto con otras enterobacterias.

La respuesta vibriocida sérica que aparece luego de la ingestión de antígenos orales vivos, sean vibrios salvajes o cepas atenuadas, sirve como

marcador para la estimulación de una inmunidad intestinal potente que permanece luego que los anticuerpos vibriocidas han alcanzado los niveles basales. Por esta razón los anticuerpos vibriocidas son evaluados para determinar la respuesta inmune protectora intestinal que sigue a la administración de candidatos a vacunas orales vivas (26).

Aunque no existen reportes en la literatura sobre la inmunogenicidad en animales, se conoce que en voluntarios o enfermos, títulos por encima de 160 protegen contra la colonización y la enfermedad. Hasta el momento, los títulos de anticuerpos vibriocidas se consideran el mejor correlato de protección, ya que se ha visto que individuos con altos títulos de anticuerpos están protegidos (27). Esto ha sido demostrado en los ensayos clínicos con voluntarios vacunados con

la cepa atenuada 638 (18) y retados un mes después con la cepa virulenta 3008 (datos no publicados).

Los anticuerpos IgG anti-LPS Ogawa detectados por ELISA mostraron un pico a los 14 días, con una discreta disminución no significativa ($p > 0,05$) a los 21 días de inmunizados. Se obtuvo seroconversión en todos los animales.

Se ha reportado que la respuesta mayoritaria de tipo antibacteriana es antilipolisacáridica, porque el antígeno protector más importante de *V. cholerae* es el antígeno O del lipopolisacárido (28) lo que pudiera explicar la elevada respuesta de anticuerpos IgG anti-LPS obtenida.

✓ Determinación de la dosis letal media (DL₅₀)

Todos los animales inoculados con los cultivos obtenidos a partir de los Lotes de Siembra de Referencia y de Trabajo, sobrevivieron a la dosis de inóculo más alta aún después de las 72 h de inoculación, por lo que el valor de DL₅₀ es superior a 10⁸ UFC, lo que corrobora la atenuación de la cepa por la eliminación de sus principales determinantes de patogenicidad (toxina del cólera y otras). Estos están ubicados en el genoma del fago filamentosos lisogénico CTX_≡, presente en el cromosoma de cepas toxigénicas de *V. cholerae* (29).

Klose (2000) (30) plantea que las cepas de *V. cholerae* que carecen de estos genes tienen una dosis letal media en ratones lactantes mucho mayor que las cepas virulentas, lo que coincide con nuestros resultados, ya que la cepa parental C7258 tiene una DL₅₀ de 10³ UFC (5).

Todos los ensayos de caracterización realizados a los Lotes de Siembra de Referencia y de Trabajo resultaron "conformes a la especificación", lo que significa que ambos, al ser ensayados de acuerdo con los procedimientos analíticos listados en las Especificaciones de Calidad, cumplieron con el criterio de aceptación (3). Esto evidencia que se mantienen inalterables las características originales de la cepa, su pureza y adecuados niveles de viabilidad. Actualmente, contamos con cantidad suficiente de ambos lotes garantizando el suministro de la cepa, necesario para el proceso productivo, durante un largo periodo de tiempo, asegurando así la calidad del proceso de obtención de inmunógeno, lo que confiere una elevada importancia a este trabajo.

Referencias

1. García L y Benítez J. Hacia el desarrollo de una vacuna eficaz contra el cólera. *VacciMonitor*. 1996; 5(2):2-8.
2. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. Step 4, 16 July 1997.
3. European Communities. Pharmaceutical Legislation. Medicinal Products for Human and Veterinary Use. Good Manufacturing Practices. 1998 (Vol. 4).
4. Robert A, Silva A, Benítez JA, Rodríguez BL, Fando R, Campos J, Sengupta DK, Boesman-Finkelstein M, Finkelstein RA. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin protease gene using a novel reporter enzyme, *Clostridium thermocellum* endogluconase A. *Vaccine*. 1996; 14: 1517-1522.
5. Serie de Informes Técnicos (822). 42º informe. Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos. OMS 1992.
6. Regulación 6/94. Buenas Prácticas de Producción de Biológicos. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. 1994:9-11.
7. Regulación 16-2000. Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. 2000:17-26.
8. Pharmaceutical Inspection Convention. Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products. PH 1/97 (Rev. 3). 2002.
9. Moreira T y Delgado H. Sistema para la caracterización y método para la conservación de formulaciones vacunales. No. de solicitud de patente 1998/0159. Cuba.
10. Food and Drugs Administration. Code of Federal Regulations, Title 21. Part 610. General Biological Products Standards. Section 610.18 Cultures. Rockville, Maryland. 2002.
11. CDC/NCID. OPS. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. Organización Panamericana de la Salud. 1994.
12. Cedré B, García LG, García HM, Fariñas M, Talavera A, Infante JF. Intestinal colonization of the infant mouse model by attenuated and virulent *Vibrio cholerae* strains. *Archives of Medical Research*. 1998;29(3):231-234.
13. Cedré B, García HM, García LG, Talavera A. Estandarización y evaluación del ensayo vibriocida modificado. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 1999; 51(3):156-159.

14. Svennerholm AM, Jonson-Stromberg G, Holgrem J. Purification of *Vibrio cholerae* soluble haemagglutinin and development of enzyme-linked immunosorbent assays for antigen and antibody quantitations. *Infect. Immun.* 1982;41: 237-243.
15. Attridge SR and Rowley D. Prophylactic significance of the non-lipopolysaccharid antigens of *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* 1983;148:931-939.
16. WHO. A WHO Guide to Good manufacturing Practices (GMP) requirements. Part 1: Standard Operating Procedures and master formulae. Geneva, Switzerland. 1997.
17. Food and Drugs Administration. Center for Biologics Evaluation and Research. Lab. of Pertussis. Preparation of freeze-dried cultures of *Bordetella pertussis*. Rockville, Maryland. 1992.
18. Benítez JA, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, Pérez A, Campos J, Rodríguez B, Pérez JL, Valmaseda T, Pérez O, Ramírez M, Ledón T, Díaz M, Lastre M, Bravo L, Sierra G. Preliminary assesment of the safety and immunogenicity of a new CTX-negative, haemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect. Immun.* 1999; 67: 539-545.
19. Simatos D, Blond G, Dauvois P, Sauvageot F. In: La Lyophilisation. Principes et applications. Collection de L´A.N.R.T. Paris, France; 1974:349-358.
20. Delgado H, Moreira T, Luis L, García H, Martino TK, Moreno A. Preservation of *Vibrio cholerae* by freeze-drying. *Cryo-Letters* 1995;16:91-101.
21. Sack DA, Tacket CO, Cohen MB, Sack B, Losonsky GA, Shimko J, Nataro JP, Edelman R, Levine MM, Giannella RA, Schiff G, Lang D. Validation of a volunteer model of cholera with frozen bacteria as the challenge. *Infect. Immun.* 1998;66(5):1968-1972.
22. Cohen MB, Giannella RA, Bean J, Taylor DN, Parker S, Hooper A, Wowk S, Hawkins J, Kochi SK, Schiff G, Killeen KP. Randomized, controlled
23. human challenge study of the safety, immunogenicity and protective efficacy of a single dose of Perú-15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infect. Immun.* 2002; 7(4):1965-1970.
24. Pitisuttithum P, Cohen MB, Phonrat B, Suthisarnsuntorn V, Dussaratid V, Desakorn U, et al. A human volunteer challenge model using frozen bacteria of the new epidemic serotype, *V. cholerae* O139 in Thai volunteers. *Vaccine.* 2002; 20:920-925.
25. Silva AJ, Pham K, Benítez JA. Haemagglutinin/protease expresion and mucin gel penetration in El tor biotype *Vibrio cholerae*. *Microbiology* 2003; 149 (Pt 7):1883-91.
26. Levine MM and Tacket CO. Recombinant live cholera vaccines. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O, eds. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular and global perspectives. Washington DC: American Society for Microbiology;1994:395-414.
27. Holgrem J. Pathogenesis. In: Barua D, Greenough III WB, eds. *Cholera*. New York: Plenum Medical Book Company;1992:199-208.
28. Clemens JD and Holgrem J. Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh: serum vibriocidal and antitoxic antibodies as a markers of the risk of cholera. *J. Infect. Dis.* 1991; 163:1235-1242.
29. Svennerholm AM, Jonson G, Holgrem J. Immunity to *Vibrio cholerae* infection. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O, eds. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular and global perspectives. Washington DC: American Society for Microbiology;1994:257-271.
30. Faruque SM, Rawruzzaman M, Meray IM, Chowdhury N, Nair GB, Sack RB, Colwell R, Sack DA. Pahogenic potential of environmental *Vibrio cholerae* strains carrying genetic variants of the toxin-corregulated pilus pathogenicity island. *Infect. Immun.* 2003;71(2):1020-25.
31. Klose KE. The suckling mouse model of cholera. *Trends Microbiol.* 2000;8(4):189-191.

Seed Lot Systems of the *Vibrio cholerae* 638 vaccinal strain

Abstract

In the production of biologicals, specially those obtained from microorganisms, it is essential to have a provision of stable, well-characterized cells as a production source. The concept of Seed Lot System in two levels, in which the Master Seed Lot is used to obtain the Working Seed Lot, is considered the most practical approach to achieve this purpose. In this study we developed the Reference and Working Seed Lots of the vaccine strain *Vibrio cholerae* 638, first stage in the production of a vaccine against cholera complying with the requirements of Good Manufacturing Practices (GMP) demanded by the national and international regulatory authorities. The characterization of the lots demonstrated that adequate levels of viability were achieved. Identity, purity, lack of virulence, ability to colonize the small intestine of suckling mice and to induce an immune response, remained unchanged as in the original strain.

Keywords: Seed Lot, *Vibrio cholerae*, attenuated strain.