

Viabilidad *in vitro* y colonización en ratones neonatos de una formulación vacunal de la cepa 638 de *Vibrio cholerae*

Arturo Talavera Coronel, Tomás Moreira Hernández,* Gemma Año López, Bárbara Cedré Marrero, Herminia Delgado Rodríguez,* Hilda María García Sánchez y Luis García Imias.

Departamento de Bacterias Enteropatógenas, Vicepresidencia de Investigaciones, Instituto Finlay, Avenida 27 No. 19805, La Lisa. Apartado Postal 1601 Código Postal 11600, Ciudad de La Habana, Cuba. *Laboratorio de Criobiología y Liofilización, Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

Recibido: 4 de octubre de 1998. Aceptado: 8 de junio de 1999.

Palabras clave: cólera, vacuna atenuada, formulación, colonización, viabilidad, ratón neonato.
Key words: *Vibrio cholerae*, attenuated vaccine, formulation, colonisation, viability and neonatal mouse model.

RESUMEN. Para evaluar la viabilidad y la capacidad de colonización de una formulación vacunal liofilizada de la cepa 638 de *Vibrio cholerae*, El Tor Ogawa [ctxF, ce/A⁺] derivada originalmente de la cepa C7258, se obtuvieron a escala de laboratorio dos lotes (00 y 01) y un sub lote del 00 que se conservó a 45 °C durante 7 d. El producto obtenido fue resuspendido en disolución reguladora de fosfato (DRF) o en disolución de hidrógenocarbonato de sodio (1,3 %). También fueron preparadas suspensiones de la cepa 638 a partir de cultivos frescos de placas de agar triptonsoya sin glucosa como controles positivos. La viabilidad se evaluó por determinación de unidades formadoras de colonia (UFC)/mL, por el método de diluciones y siembra en superficie a los 0, 10, 20, 40 y 60 min después de resuspendido. La capacidad de colonización se evaluó inmediatamente después de resuspendido el producto, empleando el modelo de ratones neonatos con inoculación oral de 50 µL con una carga bacteriana de 10⁶ UFC por ratón. Se emplearon 10 ratones por ensayo y se determinó la colonización a partir de homogeneizados de intestino, los cuales fueron diluidos de forma seriada (1:10) y cultivados sobre la superficie de placas de ABTCS para el conteo de colonias. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para cada tiempo o condición. Para la comparación estadística de los resultados, se aplicó ANOVA y Prueba "t". Los resultados demostraron que no hubo diferencias en la viabilidad ni en la colonización de las variantes resuspendidas, tanto en DRF como en disolución de hidrógenocarbonato de sodio; ni entre los tiempos estudiados. La conservación a 45 °C por 7 d afectó significativamente la viabilidad, pero las viables mantuvieron la capacidad de colonización. Tampoco hubo diferencias significativas con los valores de colonización obtenidos al preparar los inóculos con cultivos frescos. Estos resultados permiten señalar que los preparados evaluados, al ser resuspendidos en disolución de hidrógenocarbonato de sodio presentan un comportamiento satisfactorio, según los criterios de viabilidad y de colonización en el modelo de ratones neonatos.

ABSTRACT. The viability and the colonization capacity of the lyophilized vaccinal formulation of 638 strain *Vibrio cholerae* biotype El Tor Ogawa [ctxF, ce/A⁺] from C7258 strain resuspended with sodium bicarbonate solution were evaluated. Two batches (00 and 01) were obtained and a sub-batch preserved for 7 d at 45 °C. The lyophilized were resuspended in phosphate buffer solution (PBS) or in sodium bicarbonate solution (1.3 %). Positive control suspensions of 638 strain were prepared also, from fresh plate culture (triptone soy agar without glucose). The viability was evaluated by colony forming units (CFU)/mL determination at 0, 10, 20, 40 and 60 min of resuspended. The colonization capacity was evaluated at the moment of resuspension of product in neonatal mouse model, by oral inoculation of 50 µL with 10⁶ CFU/mouse. Ten mice per group were used. Number of bacteria recoverable from mice was determined by homogenization of intestine from mice. Suitable serial dilution (1:10) of the homogenates were plated on thiosulphate-citrate-bile salt-sucrose agar for viable counting. The experiments were repeated three times. Analysis of variance and t-Student were ap-

plied for statistical comparison of results. No significant differences of viability or colonization when vaccinal formulation was resuspended with PBS or sodium bicarbonate solution, in all studied moments was found. The sub-batch conserved 7 d at 45 °C showed a significant difference in viability, but not in colonization capacity. Nor it showed any difference with colonization values obtained in mice inoculated with fresh cultures. These results allow to say that the evaluated product resuspended in sodium bicarbonate have a satisfactory response, in viability and colonization in neonatal mouse model.

INTRODUCCION

Una de las vías de lograr una vacuna efectiva contra el cólera es la que emplea cepas atenuadas de aplicación oral.¹ Para ello, resulta necesario no solamente la obtención de la cepa, sino también, desarrollar una formulación y una forma de administración que conserve su viabilidad y capacidad para colonizar el intestino e inducir la respuesta inmune deseada.^{2,3} En tal sentido, se han realizado diferentes esfuerzos para la aplicación oral de estos preparados vacunales,⁴ siendo las disoluciones de hidrógenocarbonato de sodio las más empleadas para minimizar la barrera ácida del estómago.

Con respecto al estudio de la capacidad de colonización de *Vibrio cholerae* en el intestino humano, se aceptan los resultados que ofrece el biomodelo de ratón neonato.⁵⁻⁷ A par-

tir de estos elementos, este trabajo se realizó con el propósito de evaluar la viabilidad y la capacidad de colonización del intestino de un preparado vacunal liofilizado de la cepa atenuada 638 de *Vibrio cholerae*,⁸ en su posible forma de aplicación, resuspendida en una disolución de hidrógenocarbonato de sodio.

MATERIALES Y METODOS

Cepa

Vibrio cholerae 638 El Tor Ogawa [ctxF, ce/A⁺] derivada originalmente de la cepa C7258.⁸ Obtenida en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas, La Habana, Cuba.

Preparación del producto vacunal

La cepa 638 procedente del banco de trabajo fue crecida en tubos a 37 °C por 16 a 18 h.

Se expandió en dos subcultivos sucesivos incubados a 37 °C a 200 r/min. La biomasa se colectó por centrifugación y fue convenientemente resuspendida para su liofilización en bulbos.

Determinación de unidades formadoras de colonia por mililitros (UFC/mL)

Se empleó el método de diluciones seriadas y siembra en superficie. Se realizaron diluciones seriadas 1:10 en disolución reguladora de fosfato (DRF); se cultivaron tres alícuotas de 10 µL de las diluciones adecuadas en la superficie de placas de agar triptona soya sin glucosa (ATS) o en agar sales biliares tiosulfato citrato y sacarosa (ABTCS) para los conteos a partir de muestras de homogeneizados de intestino. Las placas se incubaron a 37 °C por 12 a 16 h.

Colonización en ratones neonatos⁹

Los ratones Balb/C de 2 a 4 d de nacidos se separaron de las madres 6 h antes de la inoculación. El inóculo consistió en 50 µL con una carga bacteriana de 10⁸ UFC y se administró con una sonda por vía oral. A las 18 h de la inoculación, se aislaron los intestinos de los ratones y se lavaron cuatro veces en DRF; luego se homogeneizaron (2 mL de DRF por intestino) en un Ultra-Turrax T-25 a 13 500 r/min por 15 s. Al homogeneizado se le determinaron las UFC/mL. Se utilizaron 10 ratones por determinación, uniéndose sus intestinos antes de la homogeneización.

Marcha de los experimentos

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado para cada tiempo o condición. Para la comparación estadística de los resultados se aplicó ANOVA y Prueba "t".

En los estudios de viabilidad y colonización en ratones, se emplearon dos lotes (00 y 01) del producto vacunal conservado entre 4 y 8 °C y un sub lote del 00 conservado a 45 °C por 7 d (00a). Los productos liofilizados fueron resuspendidos en DRF (control positivo) o en disolución de hidrógenocarbonato de sodio (1,3%), manteniendo el mismo factor de dilución. Para la viabilidad se determinaron las UFC/mL a los 0, 10, 20, 40 y 60 min de resuspendidas a temperatura ambiente, entre 25 y 28 °C. En los estudios de colonización se empleó como control la cepa 638 cultivada en CTS (6 h de incubación a 37 °C con 200 r/min) como se describe para la preparación de los inóculos en ensayos de reatogenicidad e inmunogenicidad en voluntarios.¹⁰ Todas las muestras, incluido el control positivo, se resuspendieron inmediatamente antes del uso, de manera tal que los inóculos (50 µL) tuvieran cargas de 10⁸ UFC por ratón.

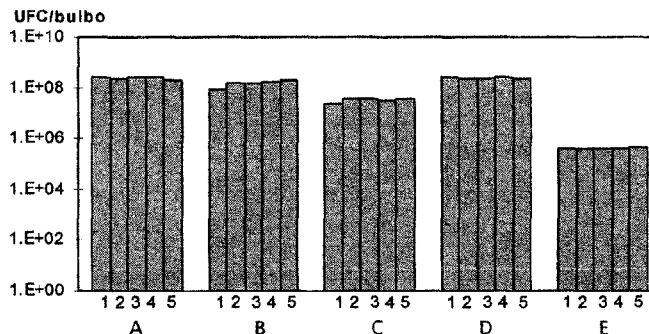
RESULTADOS Y DISCUSION

El producto vacunal obtenido con la cepa 638 después de resuspendido y mantenido a temperatura ambiente, presentó igual viabilidad ($p < 0,05$) a los diferentes tiempos (0 a 60 min) estudiados y las disoluciones empleadas (DRF e hidrógenocar-

bonato de sodio) (Fig. 1). Incluso en el sub lote 00a conservado a 45 °C por 7 d donde hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) de la viabilidad con respecto al conservado entre 4 y 8 °C, se mantuvo ésta entre las diferentes disoluciones y tiempos de resuspendidos.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Cryz y col.¹¹ con distintas disoluciones de restitución, así como con los obtenidos por los autores en inóculos preparados a partir de cultivos frescos resuspendidos en estas disoluciones y conservados a temperatura ambiente por 30 min, inóculos estos que resultaron colonizadores e inmunogénicos en ensayos en voluntarios sanos.¹⁰ El tiempo aquí reportado de 60 min durante el cual se mantiene la viabilidad tanto en DRF como en hidrógenocarbonato de sodio, permitiría su empleo, tanto en modelos animales como en ensayos en voluntarios sanos.

Los resultados obtenidos en los estudios de colonización (Fig. 2) indican que ambos lotes, tanto resuspendidos en DRF como en hidrógenocarbonato de sodio muestran iguales índices de colonización entre sí y con respecto a los cultivos controles de la cepa 638. Además, tampoco fueron diferentes respecto al sub lote 00a, lo que indica que si bien esta condición de conservación extrema disminuyó la viabilidad, no afectó la capacidad de colonización de las células viables en el modelo utilizado.



A Lote 00 en hidrógenocarbonato de sodio.
 B Lote 01 en hidrógenocarbonato de sodio.
 C Lote 00 en DRF
 D Lote 01 en DRF.
 E Sublote 00a en hidrógenocarbonato de sodio.
 UFC/mL determinadas:

- 1 en el momento de ser resuspendidas.
- 2 a los 10 min de ser resuspendidas.
- 3 a los 20 min de ser resuspendidas.
- 4 a los 40 min de ser resuspendidas.
- 5 a los 60 min de ser resuspendidas.

Fig. 1. Viabilidad de una formulación vacunal de la cepa 638 resuspendida en DRF o en disolución de bicarbonato de sodio (0 a 60 min).

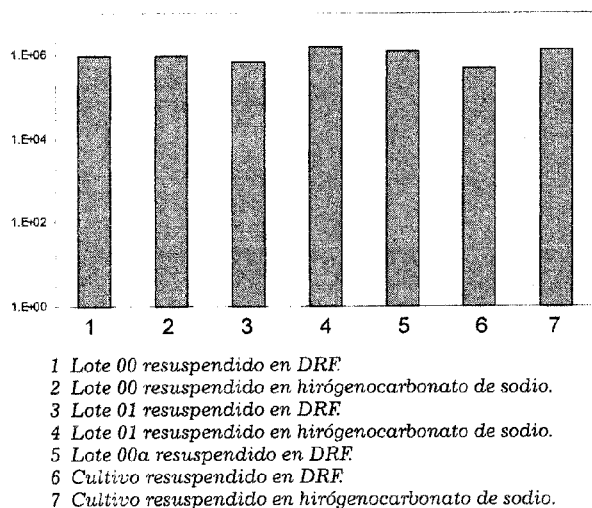


Fig. 2. Colonización en ratones neonatos de una formulación vacunal de la cepa 638 liofilizada y de cultivos frescos de placas de ATS, resuspendidas en disoluciones de hidrógenocarbonato de sodio o de DRF.

La conservación de la capacidad de colonización de la cepa después del proceso de obtención resulta importante, toda vez que ella es uno de los principales factores para que una vacuna atenuada de *Vibrio cholerae* logre elevados índices de protección; así como que con este producto vacunal se logran resultados coincidentes en cuanto a viabilidad y colonización en ratones neonatos con los obtenidos a partir de cultivos frescos de la cepa 638, empleando los mismos métodos y disoluciones de preparación de los inóculos que se emplearon en los ensayos en voluntarios con resultados de colonización e inmunogenicidad muy satisfactorios.¹⁰

Estos resultados permiten señalar que los preparados evaluados, al ser resuspendidos en disolución de hidrógenocarbonato de sodio, presentan un comportamiento satisfactorio, según los criterios de viabili-

dad y de colonización en el modelo de ratones neonatos.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Benítez por facilitar la cepa 638 de *Vibrio cholerae*, así como a Reinaldo Oliva y Mildrey Fariñas por la asistencia técnica brindada.

BIBLIOGRAFIA

- Levine M.M. and Tacket C.O. Recombinant live cholera vaccines in *Vibrio cholerae* and cholera. Molecular to global perspectives. Ed. I. Kaye Washmuth, Paul A. Blake u Orjan Olsvic. Am. Soc. Microbiol. Washington, 395-414, 1994.
- Neoh S.H. and Rowley D. The antigens of *Vibrio cholerae* involved in the vibriocidal action of antibody and complement. *J. Infect. Dis.*, **121**, 503, 1970.
- Jonson G., Holmgren J. and Svennerholm A-M. Analysis of expression of toxin-coregulated pili in Classical and El Tor *Vibrio cholerae* O1 *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.*, **60**, 4278, 1992.

- Sack D.A., Shimko J., Sack R.B., Gómez J.G., McLeod K., O'Sullivan D. and Spriggs D. Comparison of alternative buffer for use with a new live oral cholera vaccine Perú 15 in outpatient volunteers. *Infection and Immunity*, **65**, 2107, 1997.
- Dutta N.K. and Habbu M.K. Experimental cholera in infants rabbits: a method for hemotherapeutic investigation. *Br. J. Pharmacol.*, **10**, 153, 1955.
- Ujjiye A., Nakatomi M., Utsunomiya A., Mitsui K., Sogame S., Iwanaga M., and Kobari K. Experimental cholera in mice. I. First report on the oral infection. *Trop. Med.*, **10**, 65, 1968.
- Baselski V., Briggs R. and Parker C. Intestinal fluid accumulation induced by oral challenge with *Vibrio cholerae* or cholera toxin in infant mice. *Infect. Immun.*, **15**, 704, 1977.
- Robert A., Silva A., Benítez J.A., Rodríguez B.L., Fando R., Campos J., Sengupta D.K., Finkelstein M.B. and Finkelstein R.A. 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*, **14**, 1517, 1996.
- Cedré B., García L., García H.M., Fariñas M., Talavera A. e Infante J.F. Intestine colonization of the infant mouse model by attenuated and virulent *Vibrio cholerae* strain. *Arch. Med. Res.*, **29**, 231, 1998.
- Benítez J.A., García L., Silva A., García H., Fando R., Cedré B., Pérez A., Campos J., Rodríguez B.L., Pérez J.L., Valmaseda T., Pérez O., Sierra A.P., Ramírez M., Ledón T., Jidy M.D., Lastre M., Sierra G. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new ctxf-negative, hemagglutinin/protease-defective El Tor candidate cholera vaccine strain. *Infect. and Immunity*, **67**, 539, 1999.
- Cryz S.J., Parters O., Varallyay S.J. and Furer E. Factors influencing the stability of live oral attenuated bacterial vaccines. Ed. Brawn, F. New Approches to stabilisation of vaccines potency. *Dev. Biol. Stand Basel, Karger*, **87**, 277, 1996.