

Antigenicidad e inmunogenicidad de una cepa de *Vibrio cholerae* inactivada

✉ Gemma Año López,¹ Hilda M^a García Sánchez,¹ Tania Valmaseda Pérez, Bárbara Cedré Marrero,¹ Yadira Pino Navarro,¹ Odelsa Ancheta Niebla,² José Luis Pérez Quiñoy,¹ Luis García Imia,¹ Arturo Talavera Coronel¹

¹Instituto Finlay para la Investigación-Producción de Sueros y Vacunas. Ave. 27 No. 19805, La Lisa. AP 16017, CP 11600, La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 208 6075; E-mail: gano@finlay.edu.cu

²Centro Nacional de Investigaciones Científicas.

RESUMEN

La vacunación contra el cólera es todavía la principal vía para la erradicación de la enfermedad. El desarrollo de vacunas orales inactivadas contra el cólera ha retomado vigencia en los últimos 2 años. En este trabajo se llevó a cabo la inactivación por calor de la cepa C7258 de *Vibrio cholerae* y se comprobó en el producto obtenido la presencia de antígenos tales como LPS, MSHA y TCP. Se empleó la técnica de Dot Blot. La cepa inactivada fue inoculada a los 0 y 14 días por vía intraduodenal a 4 conejos Nueva Zelanda blancos. Se tomaron muestras de sangre en el día 0 así como a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días post inoculación, y se determinaron los títulos de anticuerpos vibriocidas, así como de anticuerpos IgG anti-LPS mediante ELISA. Como resultado de este estudio se pudo observar la presencia de los antígenos evaluados en las suspensiones de células inactivadas de *V. cholerae*. Por otra parte se obtuvieron altos títulos vibriocidas y de IgG anti LPS en los sueros de conejos, similares a la respuesta inducida informada para la cepa viva atenuada 638 de *Vibrio cholerae*, candidata a vacuna oral.

Palabras claves: *Vibrio cholerae*, inactivación, antigenicidad, inmunogenicidad

Biotecnología Aplicada 2003:20:9-13

ABSTRACT

Antigenicity and immunogenicity of inactivated *Vibrio cholerae* strain. Vaccination against cholera continues to be the most efficient mean to eradicate the disease, with the development of oral inactivated vaccines recapturing validity in the later years. In this paper, *Vibrio cholerae* strain C7258 was inactivated by heat, and the presence of antigens like LPS, MSHA and TCP was evaluated afterwards by dot-blotting. This preparation was inoculated at days 0 and 14 by intraduodenal route to 4 white New Zealand rabbits. Blood samples were taken at days 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 post inoculation to determine vibriocidal antibody titers, as well as IgG anti LPS antibodies by ELISA. The results confirmed the presence of the evaluated antigens in the suspension of inactivated cells. Also, high vibriocidal and IgG anti LPS titers were obtained, at levels similar to those previously reported for the live *V. cholerae* strain 638, an attenuated oral vaccine candidate.

Keywords: *Vibrio cholerae*, inactivation, antigenicity, immunogenicity

Introducción

Numerosos estudios han demostrado que las vacunas inactivadas contra el cólera son seguras y protectoras en poblaciones de riesgo en países subdesarrollados. Dentro de estos se encuentra el ensayo de campo realizado en Bangladesh con la variante vacunal sueca compuesta por células inactivadas suplementadas opcionalmente con la subunidad B (CTB) de la toxina de cólera (WC-BS). Con esta vacuna se observaron altos niveles de protección, en el orden del 85% durante los primeros 6 meses, los cuales disminuyeron aproximadamente al 60% a los 3 años de la vacunación [1-3]. En otro estudio realizado en militares peruanos donde se utilizó una variante recombinante de WC-BS, denominada WC-rBS, se observaron iguales niveles de protección que los mostrados en Bangladesh a los 6 meses [3, 4]. En 1997 fue publicado un ensayo de campo con una vacuna de células inactivadas producida en Viet Nam, donde se observó un 60% de eficacia y se logró proteger a niños, lo que no permitió la variante sueca. Sin embargo, ninguna variante brinda altos niveles de protección contra el biotipo El Tor, el cual es predominante en la actual

epidemia [1, 3]. La vacuna vietnamita se diferencia de las anteriores, pues no contiene CTB y además se realizó la sustitución de una de las cepas constituyentes por la cepa 569B, debido a que la vacuna sueca probada en Bangladesh y Perú no contiene cantidades detectables del antígeno pili corregulado con la toxina (TCP), el cual es eficientemente expresado por la nueva cepa así como la hemaglutinina sensible a manosa (MSHA) [5, 6]. Recientemente Pérez y colaboradores demostraron en voluntarios vacunados la inducción de anticuerpos anti LPS y TCP, los cuales resultaron protectores en modelos animales [7].

En este trabajo se llevó a cabo la inactivación de la cepa C7258, biotipo El Tor, serotipo Ogawa y la posterior evaluación de su capacidad antigénica e inmunogénica en conejos adultos.

Materiales y Métodos

Cepa bacteriana: El estudio se realizó con la cepa C7258 de *V. cholerae* O1, (biotipo El Tor, serotipo Ogawa), la cual fue aislada de pacientes en Perú [8]. Se partió de conservaciones almacenadas a -70 °C en

1. Holmgren J, Svennerholm AM. Vaccines Against Diarrheal Diseases. In Perlmann P, Wigzell H, editors. Vaccines. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg;1999. p. 290-28.

2. Clemens JD, Sack DA, Harris JR, van Loon F, Chakraborty J, Ahmed F, et al. Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh: results from three-year follow-up. *Lancet* 1990;335:270-3.

3. Ryan ET, Calderwood SB. Cholera Vaccines. *Clinical Infectious Diseases* 2000; 31:561-5

4. Sánchez JL, Vasquez B, Begue RE, Meza R, Castellares G, Cabezas C, et al. Protective efficacy of oral whole- cell/ recombinant B subunit cholera vaccine in Peruvian military recruits. *Lancet* 1994;344:1273-6.

5. Trach DD, Clemens JD, Ke NT, Thuy HT, Son ND, Canh DG, et al. Field trial of a locally produced killed oral cholera vaccine in Vietnam. *Lancet* 1997;349:231-5.

6. Trach DD, Cam PD, Ke NT, Rao MR, Dinh D, Hang PV, et al. Investigations into the safety and immunogenicity of a killed oral cholera vaccine developed in Viet Nam. *Bull World Health Organ* 2002;80:2-8.

Caldo Tripton Soya (TSB) (MERCK, Alemania) con glicerol al 20%.

Cinética de crecimiento

Se realizaron tres réplicas de cultivo de la cepa C7258, las cuales tuvieron una densidad óptica (D.O) de 0,01 y fueron incubados a 37 °C, 200 rpm durante 7 h. Se realizó la medición de la D.O del cultivo cada 1 h, en un espectrofotómetro Pharmacia LKB-Ultrospec III, a una longitud de onda de 600 nm. Se determinaron las unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL) mediante diluciones seriadas y siembra en placas de Agar Tripton Soya (TSA) (MERCK, Alemania) así como la velocidad de crecimiento [9, 10].

Para el procesamiento de los datos y la confección del gráfico, se empleó Microsoft Excel y para la determinación del modelo matemático, se aplicó el programa de cinética de fermentaciones de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana [11].

Obtención de biomasa en zaranda

A partir de una conservación del lote de siembra de trabajo de la cepa C7258, se realizó un precultivo que se incubó a 37 °C de 18-24 h. Posteriormente se realizó un cultivo en zaranda hasta el inicio de la fase exponencial. Este cultivo constituyó el inóculo para un segundo cultivo que fue incubado en iguales condiciones hasta el inicio de la fase estacionaria. Se determinó la pureza del cultivo mediante tinción de Gram. Para la cosecha de la biomasa, los cultivos se centrifugaron a 17 700 x g., a 4 °C, 30 min [10]. El precipitado fue resuspendido en solución salina fosfatada (PBS: ClNa, ClK, PO₄HNa₂, PO₄HK₂ pH 7,4). La determinación de la concentración celular se realizó mediante conteo de las UFC/mL en placas de TSA [9].

Inactivación por calor

Se realizó la inactivación por calor de la biomasa obtenida en zaranda. Se realizaron los controles de inactivación mediante la siembra en Tiosulfato Citrato Sales Biliares Sacarosa (TCBS) (MERCK, Alemania), así como en el medio de enriquecimiento denominado TSA [12].

Microscopía electrónica

Para la demostración de la integridad morfológica de las células de *V. cholerae*, las bacterias fueron teñidas mediante tinción negativa y observadas al microscopio electrónico. Se emplearon rejillas de cobre de 200 mesh con membrana de Formvar. La tinción se realizó con acetato de uranilo acuoso al 5% [13].

Demostración de la presencia de antígenos estructurales de *V. cholerae* antes y después de la inactivación

Se realizó la técnica de Dot Blot [14], para la determinación de la presencia de los antígenos TCP, MSHA y Lipopolisacárido (LPS) de *V. cholerae*, antes y después de la inactivación de la biomasa procedente del cultivo en zaranda. Los controles positivos y anticuerpos empleados se correspondieron con cada antígeno en estudio (Tabla 1). Como sistema de detección para el LPS y la MSHA, se

Tabla. 1. Anticuerpos y controles positivos empleados en el Dot Blot para la determinación de la presencia de MSHA, TCP y LPS.

Antígeno en estudio	Control positivo ^a	Anticuerpo empleado
MSHA	MSHA	Anticuerpo monoclonal anti MSHA 2F12 F1 ^b
TCP	TCP	Anticuerpo policlonal anti TCP ^c
LPS	LPS Ogawa	Anticuerpo monoclonal anti LPS Ogawa ^b

Fuente

a: Departamento de Bacterias Enteropatógenas. Instituto Finlay.

b: Departamento de Anticuerpos Monoclonales. Instituto Finlay.

c: Donado por Ronald K. Taylor. Department of Microbiology, Dartmouth Medical School, Hanover, New Hampshire.

utilizó un conjugado anti IgG de ratón-peroxidasa (HRP) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), diluido 1/500. Para el TCP se empleó un conjugado anti IgG de conejo-HRP diluido 1/2000 de la misma casa comercial citada arriba.

Inmunogenicidad

Se empleó el modelo de inoculación intraduodenal [15], en 4 conejos Nueva Zelanda blancos (1,8-2,5 Kg de peso), suministrados por el Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), con sus correspondientes certificados higiénico sanitarios y de calidad genética. Se emplearon 3 conejos controles. A los animales se le retiró el alimento 12 h antes de la inoculación.

Los conejos fueron anestesiados con pentobarbital (25 mg/Kg de peso). Luego de una previa desinfección de la zona a utilizar, se realizó una laparotomía en la línea media del abdomen. El duodeno fue localizado y expuesto. Se inoculó en el espacio luminal 5 mL de una suspensión bacteriana previamente ajustada, que contenía 10¹⁰ células de la cepa C7258 inactivada y a los conejos controles 5 mL de PBS. Se administraron dos dosis con dos semanas de intervalo entre ellas. Se tomaron muestras de sangre mediante punción de la arteria central de la oreja en el día 0, así como a los 7, 14, 21, 28, 35 y 42 días post inoculación. Los sueros fueron colectados y almacenados a -20 °C, hasta su posterior análisis. Este estudio preclínico cumplió con los principios de bioética de experimentación con animales de laboratorio [16].

ELISA IgG anti LPS

Se emplearon placas de microtitulación de 96 pozos Maxisorp (Nunc, Dinamarca), las cuales fueron recubiertas con LPS Ogawa, a una concentración de 25 µg/mL e incubadas a 4 °C durante toda la noche. Se bloqueó con leche descremada al 2% en PBS. Los sueros fueron diluidos 1/100 en PBS-tween 0,05% e incubados 2h a temperatura ambiente. Se utilizó conjugado anti IgG-HRP diluido 1/3000 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Las placas se revelaron con o-fenilendiamina, también de la casa comercial Sigma Chemical Co. y se leyeron en un lector de placas Titertek Multiskan Plus, a una longitud de onda de 492 nm. El título se definió como el log del inverso de la dilución que dio una lectura de 0,4, obtenida por la interpolación en la recta experimental, de valores inmediatamente por encima y por debajo del valor de corte [17].

7. Pérez JL, García L, Talavera A, Oliva R, Valmaseda T, Año G, et al. Passive protection of serum from volunteers inoculated with attenuated strain 638 of *Vibrio cholerae* O1 in animal models. *Vaccine* 2000;19:376-84

8. Benítez JA, Silva AJ, Rodríguez BL, 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. *Arch of Med Res* 1996;27:275-83.

9. Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Microbial Growth Control*. In: *Biology of Microorganisms*. 7th ed. New Jersey: Prentice Hall Inc;1994. p.397-430

10. Talavera A, Riverón L, Año G, Oramas J, Valmaseda T, García H, et al. Cinética de crecimiento y expresión de Pilina Corregulada con la Toxina (TCP) de cultivos en fermentación de la cepa 638 de *Vibrio cholerae*. *Vaccinmonitor*. Servicio Informativo del Instituto Finlay 1999;8:2-4.

11. Pérez J, Villaverde M, Costa F. Programa de Computación Cinética de Fermentaciones. 1992. Universidad de la Habana.

12. Sood S, Das BK, Kapil A, Rattan A. TCBS for the isolation of *Vibrio cholerae*. *Trop Gastroenterol* 1996;17:177.

13. Richardson K. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect Immun* 1991; 59:2727-36.

14. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. 1999;18. p. 18-47.

15. García L, Oliva R, Cedré B, Valmaseda T, García H, Talavera A, et al. Intraduodenal inoculation of Adults Rabbits for evaluating the immunogenicity of genetically attenuated *Vibrio cholerae* O1 strain. *Laboratory Animal Science* 1998; 48:267-70

16. Capó M, Borregón S, Gutiérrez y MJ. Bioética animal: desarrollo de un concepto privado. *Información Veterinaria* 1999; 4.

17. Svennerholm AM, Johnson G, Holmgren J. Immunity to *Vibrio cholerae* infection. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O, editors. *Vibrio cholerae* and Cholera, molecular to global perspectives. Washington DC.:American Society for Microbiology 1994.p.145-68.

Vibriocida

Los títulos de anticuerpos vibriocidas en los sueros colectados, fueron determinados mediante la técnica vibriocida, publicada por Benenson y colaboradores en 1968 [18] y modificada por el grupo de Cedré en 1999 [19]. Las placas fueron leídas por observación visual, y se definió el título de anticuerpos vibriocidas como la mayor dilución de suero que inhibió el crecimiento bacteriano.

Análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico de los títulos de anticuerpos determinados por ELISA y actividad vibriocida, se utilizó la transformación logarítmica en base 10 del inverso de los títulos. Se verificó la distribución normal e igualdad de varianza. Para la comparación entre grupos se aplicó ANOVA y la prueba de rangos múltiples (LSD), con un nivel de significación de $p < 0,05$. Las pruebas se realizaron utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows 2.1.

Resultados y Discusión

La cepa epidémica circulante de *V. cholerae*, en la mayoría de las regiones del mundo, incluyendo América Latina, pertenece al biotipo El Tor, predominantemente del serotipo Ogawa, lo que sugirió que una vacuna compuesta por una cepa El Tor Ogawa, brindaría una mejor protección contra las cepas circulantes actualmente [20]. Por este motivo este trabajo se desarrolló con la cepa C7258 perteneciente al biotipo y serotipo antes mencionados.

En el análisis de la cinética de crecimiento de la cepa C7258, se observó que en las tres réplicas del cultivo realizadas, se obtuvieron comportamientos similares, con una velocidad de crecimiento (\geq) promedio de $1,30 \text{ h}^{-1}$, una desviación estándar (s^2) de $0,138$ y con cumplimiento del modelo logístico de crecimiento bacteriano, un coeficiente de correlación (r^2) de $0,972$ y un intervalo de confianza de 95% .

En la curva de crecimiento que se muestra en la Figura 1, se puede observar que la fase exponencial se presentó desde las 0 hasta las 4 h sin que se observara fase de adaptación, debido posiblemente a que el inóculo provino de un cultivo realizado en igual medio y en la fase exponencial de crecimiento. A partir de la cuarta hora se observó que el cultivo pasó a la fase estacionaria.

En la sexta hora de cultivo, se obtuvo un valor promedio de $2,87 \times 10^9$ UFC/mL, momento en el cual se detuvo el cultivo para realizar la inactivación.

El proceso de inactivación mediante el tratamiento con calor resultó eficiente, lo que se pudo comprobar por la ausencia de crecimiento en las placas de TSA y TCBS. Mediante esta variante, se evitaron los problemas que se generan cuando se realiza la inactivación con agentes químicos como fenol y formaldehído, debido a que la presencia de moléculas no disociadas de estos compuestos, facilita su penetración en la célula y provoca cambios sustanciales en las estructuras lipídicas de las membranas bacterianas [21], además los residuos de estas sustancias que pudieran quedar en el preparado vacunal conllevarían al aumento de su reactogenicidad.

En la figura 2, correspondiente a la observación al microscopio electrónico, se puede apreciar que tanto

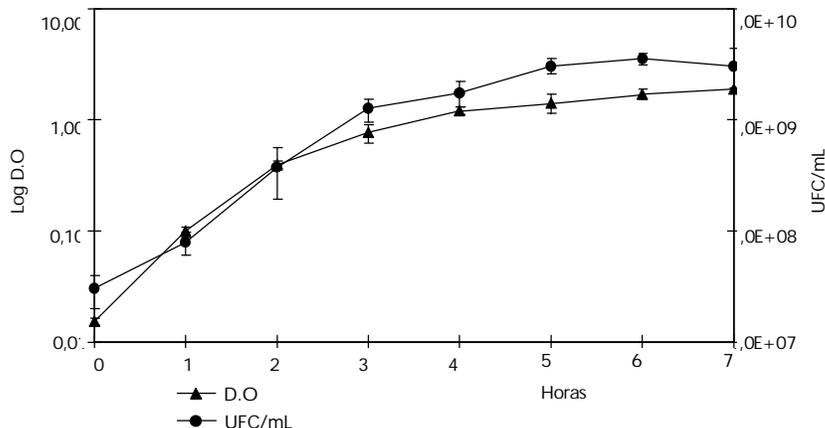


Figura 1. Curva de crecimiento de la cepa C7258 hasta las 7 h de cultivo. Cada valor representa la media de tres determinaciones.

la cepa C7258 viva (A), como la inactivada (B), presentan la morfología típica de *V. cholerae*, con presencia de las estructuras externas de la célula bacteriana, entre ellas el flagelo, lo que permitió afirmar que la biomasa inactivada obtenida, no presentó cambios de importancia en su morfología celular.

En el análisis de la presencia de los factores de virulencia LPS, TCP y MSHA, mediante la técnica de Dot Blot, la muestra correspondiente a los diferentes antígenos empleados como control positivo, las célu-

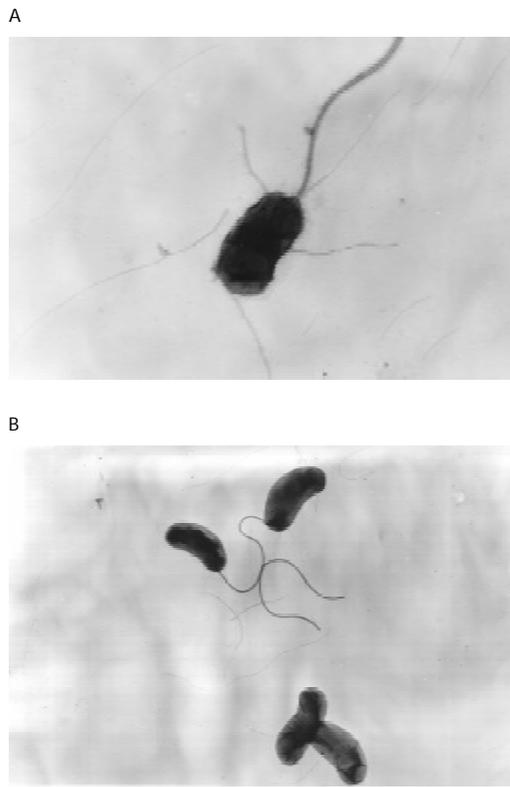


Figura 2. Microfotografía electrónica de la cepa C7258 de *Vibrio cholerae*. A: cepa viva (x 19500), B: cepa inactivada (x 26000).

18. Benenson AS, Saad A, Mosley WH. Serological studies in cholera, serum toxin neutralization - rise in the titre in response to infection with *Vibrio cholerae*, and the level in the "normal" population in East Pakistan. Bull WHO 1968;38:287-95.

19. Cedré B, García H, García L, Talavera A. Estandarización y Evaluación del ensayo vibriocida modificado. Revista Cubana de Medicina Tropical 1999; 51:156-9.

las vivas de la cepa C7258 proveniente de zaranda y la muestra de células inactivadas, brindaron reacciones positivas. En el caso del control negativo, *E. coli*, hubo ausencia de coloración lo que demostró que no existieron reacciones inespecíficas. (figura 3)

Estos resultados demostraron que en la biomasa inactivada se expresaron los antígenos LPS, TCP y MSHA comprobado por el reconocimiento específico antígeno - anticuerpo en la técnica de Dot Blot. Este hecho resultó de gran importancia, pues pudiera permitir que se realice una presentación antigénica al sistema inmune, de la manera más cercana posible a la que ocurre cuando el microorganismo coloniza el intestino delgado humano.

La presencia del LPS de *V. cholerae*, en cualquier formulación vacunal contra la enfermedad es esencial, debido a que el polisacárido O del LPS constituye el principal antígeno protector, responsable de la mayoría de la respuesta antibacteriana que se induce posterior a la infección [22]. En estudios de especificidad antigénica de los sueros de humanos inoculados con la cepa de *V. cholerae* 638, candidata a vacuna oral contra el cólera, se demostró que en la inducción de la inmunidad protectora, el LPS desempeñó el papel principal [7], aunque no el único.

Se ha demostrado que el TCP ha sido poco inmunogénico, en estudios realizados con sueros de humanos después de la infección experimental [23], sin embargo este constituye uno de los factores de virulencia que tiene probada su importancia en el desarrollo de la enfermedad en humanos. Estudios realizados en voluntarios demostraron que la colonización intestinal por *V. cholerae* fue abolida cuando se inactivó el gen que codifica la subunidad del TCP (*tcpA*) [24]. Estos informes pueden sustentar la hipótesis de que el TCP puede ayudar en el contacto bacteria- mucosa y con ello contribuir en la presentación antigénica.

Por otra parte el papel de la MSHA ha sido muy controversial. Algunos autores afirman el papel de esta fimbria como buen inmunógeno para desarrollar respuesta antibacteriana que bloquee la colonización intestinal por *V. cholerae* [25]. Otros investigadores plantean que los anticuerpos anti MSHA no son suficientes para mediar una protección significativa ante un reto con cepas salvajes del biotipo El Tor [26]. Sin embargo, la MSHA presenta afinidad por la D- Manosa. Este compuesto se encuentra en glicocompuestos presentes en el recubrimiento mucoso del intestino lo que pudiera influir debido al aumento del contacto con la mucosa intestinal.

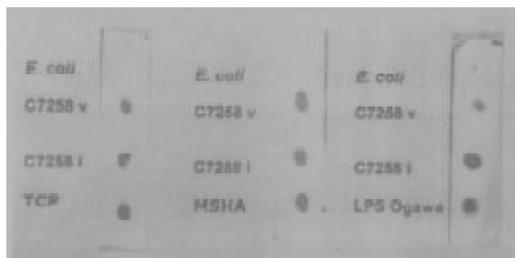


Figura 3. Dot Blot que demuestra la presencia de TCP, MSHA y LPS en la cepa C7258 antes y después de inactivar. Se empleó anticuerpo policlonal anti TCP, monoclonal anti MSHA y monoclonal anti LPS respectivamente. v: viva; i: inactivada.

Aunque se ha publicado que el LPS de *V. cholerae* es el mayor responsable de la respuesta inmune antibacteriana [7, 27], la presencia de antígenos como el TCP y la MSHA en candidatos vacunales, pudiera contribuir a la inmunidad protectora antibacteriana, debido a que la patogénesis de cólera es un proceso complejo en el cual están involucrados varios factores. Por otra parte, debido a que la biomasa evaluada son células inactivadas, las mismas no pueden multiplicarse en el intestino. En este sentido, la conservación de los antígenos de superficie de *V. cholerae*, es un factor importante en el desarrollo de una variante vacunal compuesta por células inactivadas, ya que, bien sea por la afinidad con el receptor o por las características hidrofóbicas, estos pudieran desempeñar un papel importante en la presentación antigénica.

La inmunogenicidad de células inactivadas de *V. cholerae* en animales ha sido evaluada por algunos autores y se han obtenido resultados poco alentadores [28, 29, 30], los cuales pudieran deberse a las condiciones de inactivación empleadas así como la vía de inoculación evaluada, generalmente la parenteral, que no resulta tan efectiva para cólera como lo es la vía intraduodenal, utilizada en este estudio.

Los valores de los títulos de anticuerpos IgG anti LPS obtenidos en esta investigación son mostrados en la figura 4. A los 7 y 14 días posteriores a la inoculación de la primera dosis, se observaron títulos con un valor promedio de 2,56 y 2,78 respectivamente. Después de la segunda dosis hubo un pequeño aumento en los valores los cuales se mantuvieron en el mismo rango hasta los 42 días posteriores a la primera inoculación, momento en que se concluyó el estudio. En los conejos inoculados se observó seroconversión, es decir se cuadruplicó el valor del título en relación con el tiempo cero, mientras que en los conejos controles no se obtuvieron respuestas.

Los títulos alcanzados resultaron similares con los informados en el modelo de inoculación intraduodenal para la cepa viva C7258, los cuales oscilaron entre 1,029 (0,89) a los 7 días y 3,2 (0,98) a los 28 días. Para la cepa viva atenuada 638, los valores oscilaron entre 2,17 a los 14 días y 2,48 a los 28 días [15].

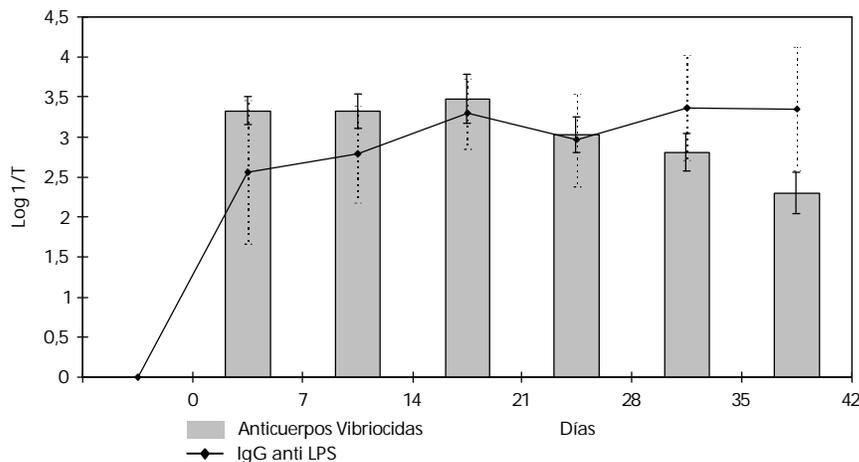


Figura 4. Títulos de anticuerpos vibriocidas y de IgG anti LPS en conejos inoculados intraduodenalmente con la cepa C7258 inactivada con calor. Cada valor representa la media de cuatro animales. En el día 0 se observaron títulos no detectables por ELISA y menores de log 1/10 para Vibriocida.

20. World Health Organization. Cholera Vaccines. Weekly epidemiological record. 2001; 76:117-24.

21. Davis DB, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. Growth and Death of Bacteria. In: Lippincott-Raven Publishers. Microbiology 4th ed 1990. p. 51-63.

22. Holmgren J, Czerkinsky C, Lycke N, Svennerholm AM. Mucosal immunity: Implications for vaccine development. Immunobiology 1992;184:157-79.

23. Hall RH, Losonsky G, Silveira APD, Taylor RK, Mekalanos JJ, Withman ND, et al. Immunogenicity of *Vibrio cholerae* O1 toxin-correlated pili in experimental cholera. Infect Immun 1991;59:2508-12.

24. Kaufman JB, Taylor RK. The Toxin Correlated Pili: Biogenesis and function. In: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O, editors. *Vibrio cholerae* and Cholera, molecular to global perspectives. Washington DC: American Society for Microbiology 1994. p.187-99.

25. Jacek O, Jonson G, Svennerholm AM, Holmgren J. Role of antibodies against biotype-specific *Vibrio cholerae* Pili in protection against experimental classical and El Tor cholera. Infect Immun 1994; 62:2901-7.

26. Attridge SR, Manning PA, Holmgren J, Jonson G. Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-nucleated pili in colonization of infant mice by *V. cholerae* El Tor. Infect Immun 1996;64: 3369-73.

27. Svennerholm AM, Jertborn M, Gothefors L, Karim A, Sack DA, Holmgren J. Current status of an oral B subunit whole cell cholera vaccine. Dev Biol Stand 1983;53:73-9.

28. Cryz SJ Jr, Furer E, Germanier R. Immunogenicity and protective capacity of inactivated "vibrio cholerae" whole cell vaccines. Dev Biol Stand 1983;53:67-72.

29. Kabir S. Immunological responses of rabbits to various somatic and secreted antigens of *Vibrio cholerae* after intraduodenal inoculation. J Med Microbiol 1987; 24:29-40.

Ambas cepas vivas fueron administradas en dosis única a diferencia de la inactivada, en la cual se inocularon dos dosis.

Es probable que esta similitud en los niveles de inducción de anticuerpos IgG anti LPS se deba a la conservación de la estructura del LPS, así como de los epítopes expuestos.

Los valores del Log_{10} del inverso de los títulos de anticuerpos vibriocidas inducidos en los conejos oscilaron entre 3,33 (0,17) y 3,48 (0,3) a los 7 y 21 días respectivamente, posterior a la primera dosis. A partir de los 28 días se observó una disminución, hasta alcanzar el valor de 2,3 (0,26) a los 42 días (figura 4), con diferencia significativa con los títulos anteriores, excepto para los obtenidos a los 35 días. Hubo seroconversión en los conejos inoculados, mientras que en los controles no se detectaron niveles de anticuerpos vibriocidas.

Al igual que los títulos de anticuerpos IgG anti LPS, los valores de anticuerpos vibriocidas, en los conejos inoculados con la cepa C7258 inactivada, fueron similares a los obtenidos luego de la inoculación de la cepa viva C7258 y la candidata a vacuna oral, la cepa 638. Esta última ha sido probada en ensayos en humanos y resultó ser inmunogénica y no reactogénica. Los valores de anticuerpos vibriocidas informados para estas cepas en este modelo [15], oscilaron entre 3,1 (7 días) y 2,57 (28 días) en el caso de la C7258 y 2,95 (7 días) y 2,65 (28 días) para la 638.

Resulta interesante señalar que mientras los títulos por ELISA de anticuerpos IgG anti LPS se mantuvieron hasta los 42 días, los de vibriocidas declinaron, posiblemente por la caída de los títulos de IgM y permaneciendo los anticuerpos IgG que resultaron con actividad bactericida. Resultados previos en humanos también mostraron que la respuesta vibriocida primaria se correlacionó mejor con títulos IgM que con los

de IgG, lo que sugiere una posible explicación a las diferencias ELISA - Vibriocida en animales [31].

La naturaleza no invasiva de *V. cholerae* y su enterotoxina patogénica confina la acción protectora de los anticuerpos a las inmunoglobulinas presentes en el lumen, en la capa mucosa o en la superficie epitelial del intestino [32]. Sin embargo aunque no se considera que los anticuerpos vibriocidas en el suero sean los mediadores reales de la inmunidad protectora, la presencia de tales anticuerpos sirve como un marcador de la presencia de anticuerpos IgA secretores intestinales, teniendo en cuenta la no invasividad de este microorganismo y que por lo tanto la estimulación del sistema inmune ha ocurrido en las Placas de Peyer. Además se ha demostrado que existe una estrecha correlación entre el título de anticuerpos vibriocidas séricos y la protección [19]. De igual manera la presencia de anticuerpos IgA e IgG en suero constituye una medida indirecta de la respuesta inmune intestinal a la bacteria después de una infección natural con cólera, así como luego de la inmunización con la vacuna de células inactivadas (WC-BS) [32].

Los resultados descritos en este trabajo, en cuanto a la antigenicidad de la biomasa obtenida, tanto antes como después de inactivar, así como la inmunogenicidad de la cepa C7258 inactivada, resultaron alentadores pues son similares a los publicados para la cepa viva atenuada 638 que mostró resultados satisfactorios en animales y en estudios con humanos [15, 33]. Por todo ello se espera que la biomasa obtenida y evaluada en este estudio, constituya una materia prima activa promisoriosa para el posterior desarrollo de nuevas vacunas inactivadas contra el cólera.

Agradecimientos

Agradecemos a la División de Modelos Animales del Instituto Finlay, especialmente al técnico Vismark Torres y al Lic. Gustavo Falero del departamento de Anticuerpos Monoclonales.

30. Rijpkema SG, Jansen WH, Gielen H, Guinee PA. Immunoglobulins in bile and serum of the rabbit associated with protection after *Vibrio cholerae* infection and vaccination. *Microb Pathog* 1987; 3: 365-75.

31. Losonsky GA, Yunyongying J, Lim V. Factors influencing vibriocidal immune response relevance to understanding immunity to cholera. *Infect Immun* 1996; 64:10-15.

32. Jertborn M, Svennerholm AM, Holmgren J. Evaluation of different immunization schedules for oral cholera B subunit-whole cell vaccine in Swedish volunteers. *Vaccine* 1993;11:1007-12

33. Benítez JA, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B. Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTXf-negative, haemagglutinin/protease-defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect Immun* 1999;67:539-45.

Recibido en Diciembre de 2001. Aprobado en Enero de 2003.