

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
INSTITUTO FINLAY

SELECCIÓN DE CEPAS ATENUADAS DE *Vibrio cholerae* Y SU UTILIZACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE UN CANDIDATO VACUNAL.

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

Autora:
M. C. Hilda María García Sánchez

Ciudad de la Habana

2004

INSTITUTO FINLAY CENTRO DE INVESTIGACIÓN PRODUCCIÓN DE
VACUNAS Y SUEROS

Título:

**SELECCIÓN DE CEPAS ATENUADAS DE *Vibrio cholerae*
Y SU UTILIZACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE UN
CANDIDATO VACUNAL.**

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

Autora:

M. C. Hilda María García Sánchez

Tutores:

Dr. C. Arturo Talavera Coronel

Dr. C. Luis García Imia

Asesor:

Dr. C. Oliver Pérez Martín

Ciudad de la Habana

2004



DEDICATORIA

A la memoria de mi padre.

ABREVIATURA

A1: Subunidad A1 de la Toxina de cólera.	<i>ctx</i> : Gen que codifica para la Toxina de cólera
A2: Subunidad A2 de la Toxina de cólera.	<i>ctxA</i> : Gen que codifica para la subunidad A de la Toxina de cólera.
ADN: Acido Desoxirribonucleico.	<i>ctxB</i> : Gen que codifica para la subunidad B de la Toxina de cólera.
AMPc: Adenosin Monofosfato cíclico.	CVD: Centro para el Desarrollo de Vacunas.
ARN: Ácido Ribonucleico	dNTP: Trifosfato-desoxi-nucleotidos.
ARNr: Ácido Ribonucleico (ribosomal).	dATP: Trifosfato-desoxi-Adenosina.
APA: Agua Peptona Alcalina.	dGTP: Trifosfato-desoxi-Guanina.
<i>Bgl</i> I: Enzima de Restricción.	dCTP: Trifosfato-desoxi-Citocina.
BHI: Caldo Cerebro Corazón	dTTT: Trifosfato-desoxi-Timina.
BPC: Buenas Prácticas Clínicas.	D.O: Densidad Óptica.
BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio.	EDTA: Ácido Etilen-diamino Tetracético.
BPP: Buenas Prácticas de Producción.	EGCP: Electroforesis de Gel de Campo Pulsado.
C: Citosina.	ELISA: Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas.
CDC: Centro Controlador de Enfermedades.	EAC: Entero toxina Accesoria de Cólera FA: Fluido Acumulado.
<i>ce</i> /A: Gen que codifica para la enzima Endoglucanasa A	G: Guanina
CENPALAB: Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio.	GMi: Monosialogangliósido.
CEP: Core Encoded Pili.	h: Hora.
CPS: Cápsula Polisacáridica.	
CTX(j): Fago filamentoso que codifica la porción del genoma de <i>Vibrio cholerae</i> .	

HaeIII: Enzima de Restricción.

HASM: Hemaglutinina Asociada a Células Sensible a D-Manosa.

HASF: Hemaglutinina Asociada a Células Sensible a L-fucosa.

HARFM: Hemaglutinina Asociada a Células Resistente a D-manosa y a L- fucosa.

HAP: Hemaglutinina Proteasa Soluble.

hap\ Gen de la Hemaglutinina Proteasa Soluble.

HET: Hemolisina El Tor/citolisina

HIV: Virus de Inmunodeficiencia.

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgG: Inmunoglobulina G

IgG-HRP: Conjugado-anti-IgG-eroxidasa.

KIA: Agar Hierro Kliger.

LB: Caldo Luria Bertani.

ALB: Agar Luria Bertani.

LD50: Dosis Letal Media.

LIA: Agar Hierro Lisina.

Log 1/T: Logaritmo del inverso del Título.

LPS: Lipopolisacárido.

ME: Microscopio Electrónico.

MET: Microscopía Electrónica de transmisión.

MG: Media Geométrica.

MO: Microscopio Óptico.

no-O1: Serogrupo no-O1 de *Vibrio cholerae*.

01: Serogrupo 01 de *Vibrio cholerae*.

0139: Serogrupo 0139 de *Vibrio cholerae*.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

orfU: Marco de lectura abierto U.

pb: Pares de Bases

VTC: Centro de Ensayos de Vacunas.

PBS: Solución Tampón Fosfato Salina.

WHO: Organización Mundial de la Salud.

PCT: Pili Corregulado con la Toxina.

zot\ Gen de la Toxina de la Zónula Ocluida.

pctA: Unidad repetitiva del PCT.

pctA\ Gen de la proteína pctA.

PLFR: Polimorfismo de la Longitud de los

Fragmentos de Restricción.

PME: Proteínas de Membranas Externas RCP:

Reacción en Cadena de la Polimerasa.

recA: Gen que codifica para la proteína Rec A.

RITARD: Diarrea en Conejo Adulto con Lazo

Intestinal Separable.

RS: Copias de Secuencias Repetidas.

TC: Toxina de cólera.

TCBS: Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares-

Sacarosa.

thy: Gen de auxotrofía a la Timidina.

TMG: Título Medio Geométrico.

toxR: Gen de la proteína ToxR la cual regula la expresión de los genes de virulencia.

toxT: Gen de la proteína ToxT la cual regula la

expresión de los genes de virulencia.

TP: Medio Triptona Peptona.

TSA: Agar Triptona Soya.

TSB: Caldo Triptona Soya.

TZO: Toxina de la Zónula Ocluida.

VPI(j): Fago filamentoso que codifica el

PCT.

SÍNTESIS

En el presente trabajo se desarrolló una metodología para la selección de cepas modificadas genéticamente de *Vibrio cholerae*, para la obtención de candidatos vacunales atenuados orales contra el cólera. Se crearon los lotes de siembra de trabajo conservados a -70°C , a los que se les realizaron controles de: viabilidad, pureza, identidad, seguridad y pruebas biológicas (dosis letal media, capacidad colonizadora, adherencia en ratones, intestino ligado e inoculación intraduodenal en conejos como pruebas de virulencia y potencia). Las cepas 81, 638, 638T y 1333 fueron sometidas a ensayo clínico para evaluar reactogenicidad e inmunogenicidad. Se propuso un proceso tecnológico a escala de laboratorio con la cepa 638 para la obtención del IFA, en un fermentador modelo CHEMAP de 7 L. Los controles realizados confirmaron la identidad hasta género y especie de los lotes de siembra de trabajo y mostraron su atenuación e inmunogenicidad en modelos animales. Las cepas 638 y 1333 resultaron no reactogénicas e inmunogénicas en voluntarios. Se obtuvieron rendimientos del IFA de 1650 a 2000 dosis por litro de fermentación. Se evaluaron tres mezclas de lioprotectores con el IFA en bulbos multidosis. Una sola de las mezclas de lioprotectores evaluadas mantuvo la viabilidad en el período analizado. Se establecieron las pruebas de control desde el lote de siembra de trabajo hasta el producto final. Este trabajo constituye una etapa fundamental en los procesos de transferencia tecnológica desde la escala investigativa (laboratorio) y analítica, hasta la fase de desarrollo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
II.1 Antecedentes históricos: cólera pandémico	7
11.2 Etiología de <i>Vibrio cholerae</i>	8
11.3 Manifestaciones clínicas del cólera.....	9
11.4 Tratamiento de la infección del cólera	11
11.5 Obtención y transporte de las muestras de pacientes con cólera.....	12
11.6 Aislamiento e identificación de <i>V cholerae</i>	12
11.7 Genoma de <i>V. cholerae</i>	13
11.8 Subtipificación molecular de <i>V cholerae</i>	14
11.9 Factores de virulencia de <i>V. cholerae</i> O1 y 0139.....	16
11.10 Modelos animales más utilizados para reproducir la infección por <i>V. cholerae</i>	24
11.11 Transmisión y prevención del cólera.....	26
11.12 Producción de vacunas bacterianas vivas atenuadas	31
11.13 Ensayos clínicos.....	36
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
111.1 Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	37
111.2 Creación de los lotes de siembra de trabajo de las cepas	

modificadas genéticamente	38-
111.3 Controles microbiológicos a los lotes de siembra de trabajo.....	38
111.4 Selección de cepas atenuadas por pruebas biológicas en modelos animales ...	41
111.4.1 Ensayo para evaluar virulencia	41
111.4.2 Ensayo para evaluar capacidad colonizadora	42
111.4.3 Ensayo para evaluar capacidad de adherencia a la mucosa intestinal.....	43
111.4.4 Ensayo para evaluar toxigenicidad	44
111.4.5 Ensayo para evaluar inmunogenicidad.....	45
111.5 Selección de cepas atenuadas no reactivas e inmunogénicas por ensayos clínicos.....	47
111.5.1 Criterios de selección.....	47
111.5.2 Criterios de exclusión	47
111.5.3 Criterios de salida del estudio.....	49
111.5.4 Distribución de los ensayos clínicos.....	49
111.5.5 Consideraciones éticas y regulatorias	49
111.5.6 Preparación y administración del inóculo	50
111.5.7 Monitoreo de reacciones adversas.....	51
111.5.8 Aislamiento, identificación y estabilidad genética de <i>V. cholerae</i> excretados en heces de voluntarios.....	52
111.5.9 Evaluación de la inmunogenicidad.....	54

III.6 Obtención de altos rendimientos del IFA de un candidato vacunal a escala de laboratorio.....	55
III.7 Evaluación de tres mezclas lioprotectoras.....	57
III.8 Análisis estadísticos.....	57
IV. RESULTADOS.....	60
IV.1 Confección de los lotes de siembra de trabajo de las cepas modificadas genéticamente. Pruebas de control microbiológico.....	60
IV.2 Selección de cepas atenuadas, no reactogénicas e inmunogénicas por pruebas biológicas en modelos animales y ensayos clínicos.....	65
IV.2.1 Modelos animales.....	65
IV.2.2 Ensayos clínicos.....	70
IV.3.3 Obtención de altos rendimientos de IFA de un candidato vacunal a escala de laboratorio.....	77
IV.4 Evaluación de tres mezclas lioprotectoras y establecimiento de las pruebas de control para la formulación liofilizada.....	80
V. DISCUSIÓN.....	87
VI. CONCLUSIONES.....	106
VII. RECOMENDACIONES.....	107
BIBLIOGRAFÍA RELACIONADA CON EL AUTOR	
REFERENCIAS	
ANEXOS	

I. INTRODUCCIÓN

En el inicio del tercer milenio el cólera continua siendo un problema de salud para muchos países del mundo (**Bajaj et al, 2001**). Es una enfermedad que cursa con una infección intestinal aguda caracterizada por la aparición brusca de diarrea acuosa y abundante, vómitos, deshidratación, acidosis, colapso circulatorio y en los enfermos no tratados produce la muerte en las primeras 24 horas de la aparición de los signos clínicos (**CDC/NCID. OPS. 1994**).

Los serogrupos 01 y 0139 de *Vibrio cholerae* son los agentes causales del cólera, los cuales secretan una enterotoxina, la toxina colérica (TC), responsable de los signos y síntomas clínicos de la enfermedad (**Davis y Waldor, 2003**).

Es conocido que la infección clínica o experimental con *V. cholerae* produce una sólida y duradera protección debido a una respuesta inmune local (**Jertborn, 1987**). Esto hace que una de las vías para lograr una vacuna efectiva contra el cólera sea el empleo de cepas atenuadas administradas oralmente (**Levine y Tacket, 1994**). Para ello resulta necesario, no solamente la obtención de la cepa, sino también desarrollar una formulación que conserve la viabilidad y capacidad para colonizar el intestino e inducir la respuesta inmune deseada (**MacKenzie, 1977**).

Según las regulaciones que rigen las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y de Producción (BPP), es necesario un sistema de lote de siembra de trabajo en el proceso tecnológico de la vacuna oral contra el cólera. En el presente trabajo nos propusimos crear los lotes de siembra de trabajo a partir de los lotes de siembra de referencia, de las cepas modificadas genéticamente obtenidas en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), con el objetivo de evitar la posible pérdida de las

propiedades que pueda ocasionarse por cultivos repetidos y poder garantizar que los lotes sucesivos del proceso tecnológico se deriven del mismo lote de siembra de referencia a un nivel dado de pases **(Regulaciones No. 6/94)**.

El lote de siembra de trabajo ha de tener una composición uniforme y las mismas características del lote de siembra de referencia. Se crea, almacena y se usa de forma que reduzca al mínimo el riesgo de contaminación y variación de sus características. Se debe evaluar su viabilidad, pureza, identidad y estabilidad para su utilización sistemática en el proceso de investigación-desarrollo. Estos controles juegan un importante papel en el aseguramiento de la consistencia de la calidad del producto terminado **(Regulaciones No. 6/94)**.

Es de suma importancia comprobar que el sistema de lote de siembra de trabajo de las cepas de *V. cholerae* modificadas genéticamente mantiene las mismas características microbiológicas del lote de siembra de referencia.

La utilización de pruebas biológicas en la fase de investigación básica y en la de proceso tecnológico son indispensables para evaluar la atenuación de la virulencia en modelos animales, la capacidad de colonizar y de adhesión a la mucosa intestinal, así como la inducción de respuesta inmune en las cepas candidatas a vacunas vivas atenuadas contra el cólera **(García y Benítez 1996)**.

Posterior a su evaluación en los modelos animales es necesario realizar ensayos clínicos. El objetivo que se persigue en estos ensayos, es evaluar la reactogenicidad a través de la observación de una serie de reacciones adversas tales como, diarreas, vómitos, fiebre, náuseas, meteorismo, dolor abdominal y malestar general. La diarrea es la principal reacción adversa y decide la condición de reactogenicidad para una cepa atenuada administrada por vía oral. Sin embargo, en estos ensayos, la evaluación de la inmunogenicidad permite

profundizar en diferentes aspectos de la respuesta inmune, entre los que se encuentran, el título de anticuerpos vibriocidas e IgA anti-LPS. La adecuada utilización de estos modelos animales y la evaluación en voluntarios permiten seleccionar cepas atenuadas no reactogénicas e inmunogénicas como candidatos vacunales que permiten iniciar el proceso tecnológico a escala de laboratorio.

El proceso tecnológico incluye, desde la apertura del vial del lote de siembra de trabajo hasta la entrega de la biomasa para formular por el método de liofilización, estableciéndose los parámetros de fermentación, el medio de cultivo para los pases en tubo, zaranda y fermentación. Todo esto permitirá la obtención de rendimiento adecuado en escala de laboratorio para la obtención del IFA.

Las vacunas bacterianas vivas atenuadas, deben preservarse a una concentración conocida por un período prolongado de tiempo. La vía más eficiente para lograr este objetivo es mediante liofilización. Los concentrados bacterianos son relativamente muy lábiles, por lo que deben ser combinados con una solución lioprotectora para lograr resistencia a la inactivación durante la liofilización.

En la formulación de vacunas atenuadas se deben evaluar diferentes soluciones de lioprotección y métodos de liofilización, para lograr resultados satisfactorios de viabilidad y de colonización, que son los factores principales para que este tipo de vacuna, de aplicación oral, logre altos índices de protección (**Moreira et al, 1994**).

En este trabajo se hace una proposición de las especificaciones con sus límites de aceptación, de cada prueba de control realizada para la liberación de los lotes de siembra de trabajo, los procesos fermentativos y el producto final, antes de la transferencia tecnológica a desarrollo. Estas especificaciones son estándares de calidad críticos y estrategias de control para asegurar la calidad y consistencia del producto. Las mismas son escogidas y justificadas por los resultados obtenidos por los investigadores que participaron en este

proyecto cubano de obtención de vacuna atenuada contra cólera y aprobado por las autoridades regulatorias. Teniendo en cuenta estos problemas nos proponemos la siguiente hipótesis y objetivos.

HIPÓTESIS

La aplicación de técnicas microbiológicas, de pruebas biológicas y clínicas, así como biotecnológicas, permitirán la confección de lotes de siembra de trabajo, la selección de cepas atenuadas como candidatos vacunales no reactogénicas e inmunogénicas y el diseño de un proceso de obtención de producto a escala de laboratorio.

OBJETIVOS

1. Crear los lotes de siembra de trabajo de las cepas de *V. cholerae* modificadas genéticamente y establecer sus controles microbiológicos.
2. Seleccionar las cepas atenuadas, no reactogénicas e inmunogénicas según los resultados de las pruebas biológicas en animales y en ensayos clínicos para la obtención de candidatos vacunales a escala de laboratorio.
3. Obtener altos rendimientos del IFA de un candidato vacunal a escala de laboratorio para evaluar tres mezclas lioprotectoras.

NOVEDAD CIENTÍFICA. APLICABILIDAD

La OMS ha reportado un incremento de los casos de cólera en los últimos años, con más de 120 000 muertos anuales, sobre todo en países del tercer mundo y ha planteado la necesidad de implementar

medidas sanitarias urgentes en las zonas más afectadas; sin embargo, ha reconocido la necesidad de obtener una vacuna efectiva contra el cólera, como la vía más segura y barata para combatir la enfermedad a mediano plazo.

Los candidatos vacunales contra el cólera más prometedores en la actualidad son los basados en cepas vivas atenuadas que han sido construidas por delección de los genes que codifican para los principales factores de virulencia.

La novedad científica de esta investigación se sustenta en que es la primera vez que se logra fuera de los Estados Unidos, establecer una metodología para la selección de cepas vivas atenuadas vacunales inmunogénicas y no reactogénicas, corroboradas en ensayos en voluntarios, donde las cepas atenuadas de *V. cholerae* 01 del biotipo El Tor de ambos serotipos Inaba u Ogawa seleccionadas, demostraron ser consistentemente bien toleradas e inmunogénicas. Se diseñó un proceso tecnológico que permitió la obtención de un producto vacunal liofilizado en bulbos con 1 a 10 dosis, con rendimientos de 1650 a 2000 dosis por litro de fermentación.

El resultado de la presente investigación representa un paso que permite el escalado y desarrollo farmacéutico de la vacuna atenuada oral contra cólera en la planta de desarrollo del Instituto Finlay.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 Antecedentes históricos: cólera pandémico

Puede afirmarse que el cólera, en su forma epidémica, se originó en la India y en el valle del Yang-Tse en China. En 1817 se inicia la primera pandemia del cólera, en Jesore en la India. En 1830 comienza la segunda pandemia que afectó a varios países de Europa y América, incluida Cuba. En esta época, entre 1847 y 1854, fue cuando John Snow, médico inglés, planteó la teoría de la transmisión por el agua e infirió también la participación de los alimentos (**Faruque et al, 1998**). Se inicia luego la tercera

pandemia (1852-1859), que fue la más mortífera, la puerta de entrada fue Nueva Orleans. La Guerra de Crimea, con la movilización de tropas inglesas, francesas e italianas, llevó el cólera a Turquía y Grecia. En la cuarta pandemia (1864-1875) se extendió el cólera notoriamente a África. Entre 1883 y 1895 se presentó la quinta pandemia que azotó Asia, África, Europa y América. Durante la quinta pandemia, Robert Koch aisló el microorganismo causal, referido como un “comma bacilo”, de heces de un paciente egipcio en 1883 y en la India en 1884. Fue en la sexta pandemia (1899-1923), diseminada principalmente en Europa, Asia y África, donde se aisló en la estación de cuarentena El Tor, en la península del Sinaí, un vibrión distinto al clásico, al que se denominó con igual nombre (**Faruque et al, 1998**). En 1961 se inicia la séptima pandemia en Indonesia, aún en curso, que se extiende al sudeste asiático y al subcontinente Indio y al Oriente Medio. La séptima pandemia se caracteriza por el predominio casi absoluto de *V. cholerae* O1 toxigénico biotipo El Tor, serotipo Inaba (**Faruque et al, 1998**), aunque en el subcontinente indio, el biotipo Clásico continúa como responsable de la enfermedad (**Mukhopadhyay et al, 1998**). Ha sido la más extensa geográficamente y la de

mayor duración. En 1991, la aparición del cólera en Hancay (Perú), cerca de Lima y la propagación de la enfermedad a otros puntos del país y otras naciones de América del Sur, hizo caer en la posibilidad epidemiológica de la endemidad en el hemisferio (**Pichel et al, 2003**).

En octubre de 1992, ocurrió en Madrás, India, una epidemia de una enfermedad diarreica parecida al cólera. El agente causal fue una cepa de *V. cholerae* 0139 toxigénica del serogrupo no-O1, a la que se le denominó, Bengal; se piensa que pueda ser el agente causal de la Octava Pandemia de cólera (**Ramamurthy et al, 2003**). Vibrios del serogrupo 0139 continúan provocando brotes de cólera en la India, Bangladesh, China y Pakistan junto con Vibrios El Tor (**Agrawal et al, 2003; Faruque et al, 2003a; Qu et al, 2003**).

II.2 Etiología de *Vibrio cholerae*

El cólera es causado por una bacteria que inicialmente fue conocida como "*Vibrio comma*" y actualmente como *Vibrio cholerae*. Su nombre genérico proviene del latín "*Vibrare*" por su característico movimiento visible al microscopio y "*cholerae*" del griego que significa diarrea o flujo bilioso (**Mata, 1992**).

Vibrio cholerae se encuentra ubicado en la División II de Bacterias, Grupo 5 Bacilos gramnegativos y anaerobios facultativos. En este grupo se incluyen tres subgrupos: I. Familia Enterobacteriaceae, II. Familia Vibrionaceae y III. Familia Pasteurellaceae (**Holt et al, 1994**).

En la familia *Vibrionaceae* se encuentra al género *Vibrio* que son bacilos que miden de 0,5- 0,8 (im de diámetro por 1,4-2,6 de largo. No forman endoesporas, ni microquistes, en medio líquido son móviles por flagelos polares, anaerobios facultativos: poseen ambos metabolismos, respiratorio y fermentativo (**Giono et al, 1991**). Pueden crecer sin grandes requerimientos nutricionales y preferiblemente a pH 7 aunque toleran condiciones alcalinas de pH 8 hasta 9.5, pero son extremadamente sensibles a pH ácido y

los iones Na⁺ estimulan su crecimiento (**Holt et al, 1994**).

Dentro del género *Vibrio* existen más de 30 especies, se diferencian por su respuesta ante diferentes pruebas bioquímicas (**West y Colwell, 1984**). La clasificación de *V. cholerae* se realiza sobre la base de sus antígenos somáticos O, en serovares y serogrupos, y al menos se conocen mas de 200 serogrupos.

Los serogrupos más importantes son O1 y O139, que constituyen patógenos intestinales del hombre (**Chartterjee y Chaudhuri et al, 2003**). *Vibrio cholerae* O1 se divide en dos biotipos: Clásico y El Tor, teniendo en cuenta criterios bioquímicos y morfológicos. Éstos, a su vez, se encuentran separados en tres serotipos debido a diferencias antigénicas en su lipopolisacárido superficial: Ogawa, Inaba e Hikojima, que se aíslan con poca frecuencia (**Chartterjee y Chaudhuri et al, 2003**).

Los biotipos Clásico y El Tor no son aplicables a *V cholerae* O139 y tampoco es válido para los restantes 153 serogrupos no-O1 (**Chartterjee y Chaudhuri et al, 2003**).

II.3 Manifestaciones clínicas del Cólera

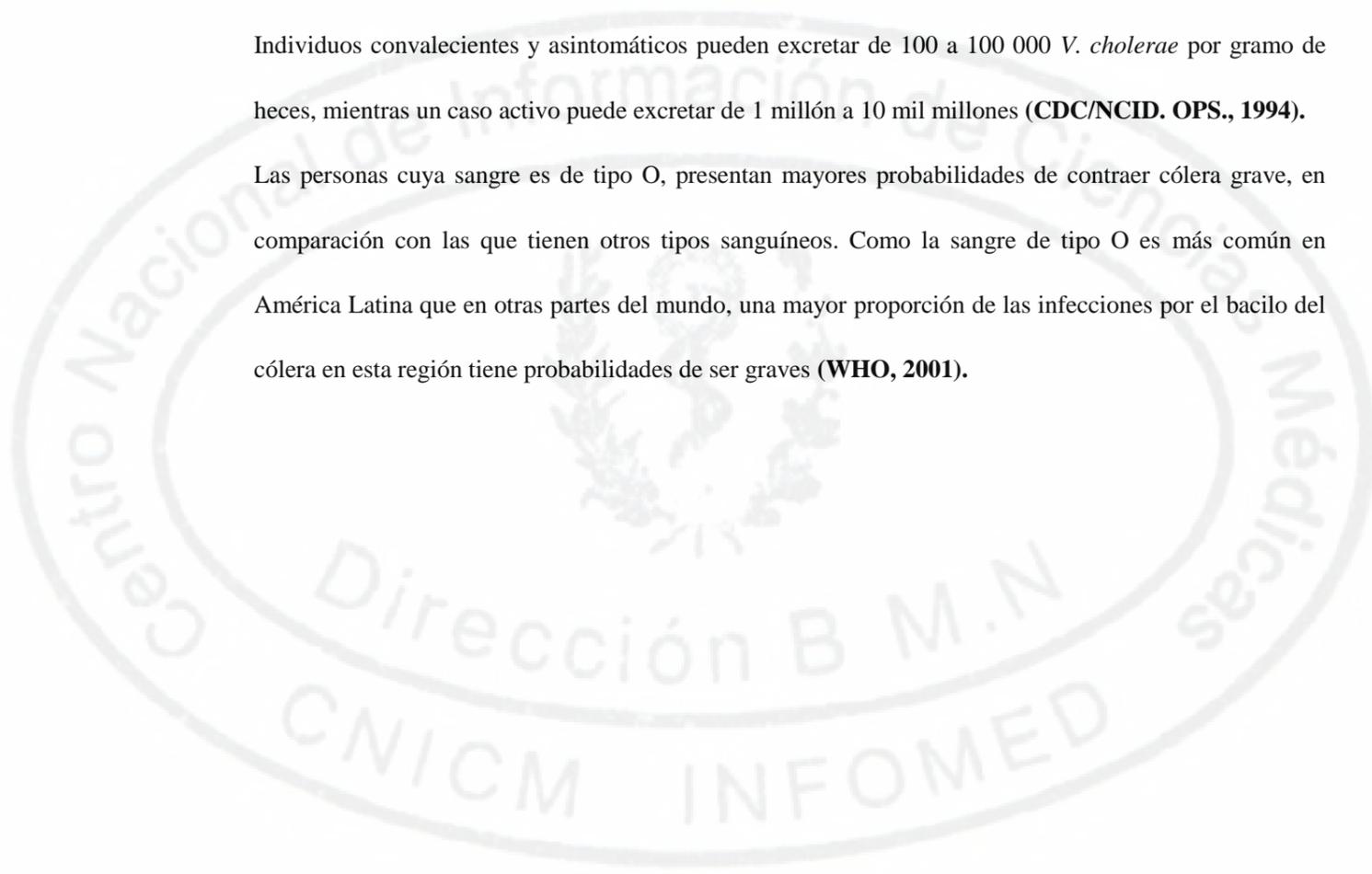
La clínica de esta enfermedad varía según el biotipo involucrado, Clásico o El Tor por las características de los mismos. Para el biotipo Clásico, la dosis infectiva es de 10 a 100 millones de unidades viables; para El Tor la dosis requerida es de 100 000 a 1 millón, la que podría ser menor en individuos con aclorhidria relativa o absoluta, llegando a 1000 bacterias si es ingerida con bicarbonato de sodio. El período de incubación habitualmente es de 2-3 días, con un rango ubicado entre las horas y los 5 días y el de transmisibilidad está relacionado con el período de eliminación fecal de vibrios, que sólo dura pocos días después de la colonización de los vibrios al intestino (**CDC/NCID. OPS., 1994**).

En los casos sintomáticos las manifestaciones constantes del cuadro clínico son los vómitos, el escape de enormes cantidades de líquido y electrólitos hacia la luz del intestino, lo cual produce rápidamente una

diarrea acuosa profusa, disminución del volumen sanguíneo circulante, acidosis metabólica, depleción de potasio, y en último término colapso vascular y muerte. En los casos graves, la copiosísima diarrea puede causar rápidamente la pérdida de 10% o más del peso corporal y acompañarse de choque hipovolémico y muerte (CDC/NCID. OPS., 1994).

Individuos convalecientes y asintomáticos pueden excretar de 100 a 100 000 *V. cholerae* por gramo de heces, mientras un caso activo puede excretar de 1 millón a 10 mil millones (CDC/NCID. OPS., 1994).

Las personas cuya sangre es de tipo O, presentan mayores probabilidades de contraer cólera grave, en comparación con las que tienen otros tipos sanguíneos. Como la sangre de tipo O es más común en América Latina que en otras partes del mundo, una mayor proporción de las infecciones por el bacilo del cólera en esta región tiene probabilidades de ser graves (WHO, 2001).



II.4 Tratamiento de la infección del cólera

El tratamiento del cólera no difiere mucho del que se aplica a la diarrea común. La clave aprobada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la terapia con sales de rehidratación oral (SRO), y recomienda la hidratación por vía endovenosa dependiendo de la severidad del cuadro clínico del paciente. En tal caso es considerada la solución de lactato de Ringer. Un reemplazo rápido de agua y electrolitos perdidos por la diarrea y los vómitos, previenen la muerte (**Bhattacharya, 2003**). Si bien el tratamiento del cólera, no depende exclusivamente de la administración de antibióticos, el uso de los mismos por vía oral reduce el volumen y la duración de la diarrea, acortando, además el período de excreción de vibriones coléricos. Los agentes antimicrobianos recomendados por la OMS para tratar enfermos de cólera son tetraciclina, doxiciclina, furazolidona, trimetoprima- sulfametoxazol, eritromicina, cloranfenicol y las fluoroquinolonas (por ej., ciprofloxacina y norfloxacina) (**Bhattacharya, 2003**). En vista de que la resistencia a los agentes antimicrobianos ha sido un problema en ascenso en ciertas partes del mundo, debe vigilarse periódicamente la susceptibilidad de las cepas de *V. cholerae* 01 y 0139 a los mismos (**Tjaniadi et al, 2003**).

La doxiciclina es el antibacteriano de elección para los adultos (excepto mujeres embarazadas), porque se utiliza en una sola dosis (**Bhattacharya, 2003**), mientras que la azitromicina es recomendado para los niños (**Bhattacharya et al, 2003**). La furazolidona es la principal elección para las mujeres embarazadas. La eritromicina puede emplearse cuando no es posible obtener otros antibacterianos o cuando el microorganismo es resistente a ellos (**Tjaniadi et al, 2003**).

11.5 Obtención y transporte de las muestras de pacientes con cólera

Las muestras fecales deben recogerse en las etapas iniciales de cualquier enfermedad entérica, cuando los agentes patógenos suelen estar presentes en mayor número en las heces y antes de que se inicie la

antibioticoterapia. Para recoger heces líquidas puede usarse una sonda rectal. Las heces o los hisopos se depositan en tubos con medio de transporte de Cary-Blair y se transportan al laboratorio a temperatura ambiente o 4°C (CDC/NCID. OPS., 1994).

Para estudios de anticuerpos, se deben obtener dos muestras de suero, una en la fase aguda y otra en la fase de convalecencia. La primera debe recogerse tan pronto como sea posible una vez que ha comenzado la enfermedad (en condiciones ideales, antes de transcurridos tres días). La de la fase de convalecencia, entre 10 y 21 días después del inicio de la enfermedad. Si el suero se va a conservar por varios días, es mejor congelarlo que refrigerarlo (CDC/NCID. OPS., 1994).

11.6 Aislamiento e identificación de *V. cholerae*

Aunque *V. cholerae* crece en diversos medios, el que se utiliza comúnmente para el aislamiento a partir de muestras fecales es el agua peptona alcalina (APA), como caldo de enriquecimiento. El mismo se puede inocular con heces líquidas, suspensión fecal o hisopado rectal. *Vibrio cholerae* crece muy rápidamente en estos medios de manera que al cabo de 6 a 8 horas a temperatura de 35-37°C, está presente la mayor cantidad de microorganismos. Después de este período de incubación se resiembr en agar TCBS, que se utiliza como un medio diferencial y selectivo. El crecimiento de *V. cholerae* en TCBS es de 18 a 24 horas a una temperatura de 35-37°C, obteniéndose colonias grandes (2 a 4 mm) de color amarillo. A partir de la placa de agar TCBS se seleccionan colonias presuntivas, que se someten a pruebas ulteriores e inocularán en un medio no inhibitorio como agar gelatina, agar infusión de cerebro corazón u otro medio no selectivo. Las colonias sospechosas de *V. cholerae* recién aisladas de un medio de agar no selectivo, se pueden someter a pruebas serológicas en lámina con antisueros polivalentes contra *V. cholerae* 01. Los aislamientos que aglutinan con el antisuero polivalente contra el serogrupo 01

se identifican como presuntivo *V. cholerae* 01, lo que se comprueba posteriormente, mediante aglutinación con antisueros monovalentes, Ogawa e Inaba.

Los aislamientos distintos del serogrupo 01, provenientes de muestras clínicas de pacientes con enfermedad semejante al cólera, deben someterse a la aglutinación con el antisuero 0139. La identificación mínima de *V. cholerae* 01 y 0139 requiere solamente de la confirmación serológica en los aislamientos presuntivos. Sin embargo, a veces es necesaria la caracterización más completa del microorganismo, lo cual puede incluir pruebas de la producción de la toxina, de hemolisinas, así como la determinación de la sensibilidad a los antibacterianos e identificación bioquímica (CDC/NCID. OPS., 1994).

II.7 Genoma de *V. cholerae*

El genoma de *V. cholerae* consiste en 2 cromosomas circulares. El mayor abarca 2,96 megabases y el pequeño aproximadamente 1,07 megabases. Ambos cromosomas tienen la misma cantidad de nucleótidos G+C, que constituye alrededor del 47% del genoma (Heidelberg, *et al*, 2000).

El cromosoma mayor, denominado cromosoma I, contiene mayormente los genes de las funciones esenciales de la célula, tales como replicación del DNA, división celular, los de transcripción, traducción de proteínas y biosíntesis de la pared celular. También contiene la mayoría de los sitios asociados con la virulencia, por ejemplo, el principal determinante de la patogenicidad, la toxina de cólera, que es codificada dentro del genoma de un bacteriófago filamentoso lisogénico, CTX<j) (Waldor y Mekalanos, 1996). El factor esencial para la colonización en el intestino, es el pili corregulado con la toxina (PCT) (Taylor *et al*, 1987), el cual es codificado en este cromosoma, en la isla de patogenicidad, identificadas en cepas de *V. cholerae* que causan pandemias (Karaolis *et al*, 1998). La expresión de los genes de

virulencia es regulada por proteínas tales como ToxR y ToxT (Skorupski y Taylor, 1997; Lee, 1999), ambas codificadas también en el cromosoma I.

El cromosoma pequeño o cromosoma II, contiene algunos genes esenciales incluyendo los que codifican las proteínas ribosomales L20 y L35. Este cromosoma, contiene menos genes que el cromosoma I. Representados prominentemente en el cromosoma II están los genes involucrados en el transporte de azúcares, iones de metales y aniones, componentes de la síntesis de proteínas y de la reparación del ADN (Waldor y Raychaudhuri, 2000).

La decodificación del genoma de *V. cholerae* ayudará al desarrollo de nuevas vacunas y medicamentos contra la enfermedad (Waldor y Raychaudhuri, 2000).

II.8 Subtipificación molecular de *V. cholerae*

Las pruebas moleculares que identifican a los microorganismos patógenos basándose en las secuencias específicas de ADN, tienen muchas aplicaciones en la microbiología diagnóstica. Estas técnicas por lo general son más rápidas y específicas que las técnicas tradicionales, y con frecuencia facilitan la diferenciación entre las cepas (Usera *et al*,

1994) . El uso de sondas de ADN o la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP), evitan las dificultades que se presentan con las cepas de *V. cholerae* que no expresan la TC a concentraciones detectables, pero poseen los genes *ctx* que la codifican (Varela *et al*, 1993). La RCP tiene la ventaja de ser una técnica rápida que no requiere cultivos puros ni microorganismos viables, puede amplificar los segmentos de ADN directamente de las muestras fecales y determinar la presencia del microorganismo en la muestra sin cultivar (Varela *et al*, 1994).

El polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (PLFR), es una técnica que permite

diferenciar cepas en cuanto al tamaño del fragmento o de los fragmentos de restricción de ADN específicos (**Popovic et al, 1993**). Se ha utilizado una variedad de sondas para la tipificación molecular de *V. cholerae* 01 (**Faruque et al, 1994**). Los genes que codifican el ARNr, se encuentran en copias múltiples en el genoma de *V. cholerae*, lo que hace que se obtenga este conjunto de bandas moderadamente complejo cuando se utiliza ARNr como sonda. A veces se logra un alto grado de discriminación de las cepas con esta técnica, denominada en ocasiones “ribotipificación” (**Popovic et al, 1993**). De manera similar, debido a que los genes de la TC pueden estar presentes en una o en muchas copias, los patrones obtenidos del PLFR basados en la localización de dichos genes, suelen ser útiles para diferenciar las cepas (**Qu et al, 2003**).

La electroforesis en gel de campo pulsado (EGCP), separa fragmentos de ADN de peso molecular muy altos, obtenidos por el empleo de enzimas con bajas frecuencias de reconocimiento de sitios de restricción en el ADN. Esta técnica molecular permite identificar patrones con un número relativamente pequeño de fragmentos de restricción del ADN. El PLFR se puede visualizar y analizar con un nivel de resolución alto y estable, sin necesidad de utilizar sondas específicas (**Kam et al, 2003; Kotetishvili et al, 2003**).

II.9 Factores de virulencia de *V. cholerae* 01 y 0139

La toxina de cólera es una enterotoxina lábil al calor que se une a células intestinales y no es más que una proteína oligomérica de 84 kDa compuesta por una subunidad pesada A de 28 kDa con actividad catalítica y cinco subunidades ligeras B de 11,6 kDa, a través de las cuales se fija al receptor gangliósido GMj presente en la membrana celular del epitelio del intestino delgado (**Finkelstein, 1992**). La cantidad de toxina acoplada pudiera aumentar por la acción de la neuraminidasa, una enzima secretada por *V. cholerae* que se plantea actúa a nivel intestinal convirtiendo otros oligosialogangliósidos en GMi (**Kabir**

et al, 1984). Una vez que se ha producido la unión de la toxina a su receptor GMj₅ ocurren cambios conformacionales que permiten la acción de la hemaglutinina proteasa soluble secretada por *V. cholerae* sobre la subunidad A, separándola en A1 y A2. La región A1 queda libre para penetrar al interior de la célula, y A2 queda unida al pentámero de subunidades B (Finkelstein, 1992). La modificación de esta subunidad promueve la activación persistente de la adenil ciclasa y el aumento consecuente de los niveles de AMP_c (Spangler, 1992). Éste, constituye el evento determinante en la diarrea característica de la enfermedad (Finkelstein, 1992). Los genes que codifican para TC, (*ctx A* y *ctx B*) se encuentran ubicados en el genoma del fago CTX<j) (Waldor y Mekalanos, 1996), presente en el cromosoma I, de cepas toxigénicas de *V. cholerae* 01 y 0139 (Heidelberg *et al*, 2000). Este segmento presenta una región núcleo-central de 4,5 Kb flanqueada por una o más copias de secuencias repetitivas (RS) de 2,7 Kb. Se conoce que en esta región existen al menos 6 genes: *ctx AB* (codifica para las subunidades A y B de la TC), *zot* (codifica para la toxina de la zónula ocluida), *cep* (codifica para el core-encoded pilin), *ace* (codifica para la enterotoxina accesoria de cólera) y *orf U* (codifica para un producto de función desconocida) (Waldor y Mekalanos, 1996).

La molécula de lipopolisacárido (LPS) es considerada un antígeno relevante en una infección con *V. cholerae* por ser altamente inmunogénica y, además, responsable de la respuesta antibacteriana que aparece en los humanos, considerado el mecanismo inmune fundamental, incluso más que la respuesta antitóxica (Chatterjee y Chaudhuri, 2003).

En estudios *in vitro* y en modelos animales, los anticuerpos contra el LPS Inaba y Ogawa mostraron prevenir la adherencia de *V. cholerae* a la mucosa intestinal (Brandtzaeg, 2003). El antígeno O ha estado implicado en varios procesos de la patogénesis del cólera. Numerosos estudios han permitido afirmar que el antígeno O constituye el principal antígeno protector (Brandtzaeg, 2003).

El antígeno O del LPS de *V. cholerae* O1 y 0139 difieren entre sí en cuanto a longitud y composición, siendo la causa de que cepas del serogrupo 0139 no aglutinen con antisueros policlonales y monoclonales directas contra el antígeno O1 (**Brandtzaeg et al, 2003**).

El LPS de cepas 0139 contiene 3,6 dideoxihexosa, identificada como colitosa, este azúcar es encontrado por primera vez en miembros de la familia *Vibrionaceae* (**Nesper et al, 2003**).

El conjunto de genes responsables de la biosíntesis del antígeno O en *V. cholerae* O1, ha sido designado *rjb* y se ha demostrado que las cepas de *V. cholerae* 0139 carecen de dicho paquete de genes (**Chatterjee y Chaudhuri, 2003**), estando relacionada su síntesis con una región genética de al menos 11 Kb que no se encuentra presente en *V. cholerae* O1 (**Chatterjee y Chaudhuri, 2003**).

En ambos serogrupos de *V. cholerae* O1 y 0139, la pilina mejor caracterizada es el PCT, otro factor esencial para la colonización. El mismo forma bultos sobre la superficie de la célula, debido probablemente a su naturaleza hidrofóbica y está compuesto por subunidades repetitivas de 20,5 kDa llamadas *pctA* (**Faruque et al, 2003b**).

Anticuerpos monoclonales anti-PCT muestran que existen diferentes epítopes en la pilina producida por cepas del biotipo clásico y El Tor (**Sun et al, 1990; Jonson et al, 1992**). Las cepas El Tor producen menos PCT que la cepa del biotipo clásico, y las condiciones de cultivo para una óptima expresión difieren entre ambos biotipos (**Sun et al, 1990; Jonson et al, 1992; Voss y Attridge, 1993**).

El PCT es expresado por *V. cholerae* 0139 cuando las cepas se cultivan bajo las mismas condiciones que favorecen la expresión de este factor en cepas El Tor (**Hall et al, 1993**), y se ha observado que no existen diferencias en la secuencia del gen *pctA* entre ambas cepas (**Faruque et al, 2003b**). Estudios realizados con cepas El Tor y 0139, mutadas en el gen que codifica para el PCT (*pctA*), han revelado un decrecimiento en la colonización, lo que demuestra el papel de este pili en este proceso. Así, se llegó a la

conclusión de que el PCT puede ser expresado como una estructura funcional durante la infección con cepas El Tor y

0139, como ha sido previamente determinado para cepas del biotipo Clásico (**Sasmal et al, 1995**).

El PCT está codificado en un nuevo fago filamentoso nombrado VPI<> (**Karaolis et al, 1999; 2001**).

Estudios realizados han demostrado que el PCT es usado como receptor por el bacteriófago filamentoso CTX<|) que contiene al elemento genético CTX (**Waldor y Mekalanos, 1996; Karaolis et al, 2001**), siendo por tanto el elemento genético inicial, requerido para el origen de cepas epidémicas. Se ha demostrado que CTX< (> y VPI(j) fueron transferidos horizontalmente entre cepas de *V. cholerae* y *V. mimicus*, pudiendo representar este último, un reservorio ambiental importante para ambos bacteriófagos.

Este hecho puede desempeñar un papel importante en la emergencia de nuevos aislamientos toxigénicos de *V. cholerae* (**Boyd et al, 2000**). Dicho pili, al igual que la TC se encuentran regulado a nivel transcripcional por el mismo gen regulatorio *toxR*, el cual codifica para *ToxR*, una proteína de membrana de 32 kDa (**Bina et al, 2003**). Anticuerpos dirigidos contra el PCT protegen a ratones lactantes, contra la enfermedad (**Faruque et al, 2003**). Una sólida y duradera inmunidad puede ser generada en humanos en ausencia de una respuesta inmune detectable anti-PCT

Cepas aisladas del ambiente presentan variantes de los genes que codifican para el PCT, pero las secuencias de algunos de estos genes difieren de la secuencia que previamente se ha reportado. Los genes de las cepas ambientales son funcionales y capaces de producir PCT, tales cepas son patógenos potenciales, aunque en menor grado que las cepas epidémicas. Esto podría explicar el origen y evolución de los genes de virulencia de *V. cholerae* (**Faruque et al, 2003**).

El flagelo polar, el cual facilita la movilidad, es expresado por todas las cepas de *V. cholerae* 01 y 0139

(Albert, 1994). La movilidad es un evento importante en la patogénesis, sugiriendo algunos estudios que la movilidad y particularmente el flagelo están involucrados en la colonización (Richardson, 1991). Se ha comprobado que anticuerpos anti-flagelo no han sido capaces de prevenir la infección, lo que puede ser explicado por el hecho de que el flagelo está normalmente cubierto por un forro exterior de membrana externa, que al parecer puede contrarrestar la acción de dichos anticuerpos (Richardson, 1991). Por el contrario, con el uso de anticuerpos dirigidos directamente contra el LPS, que cubre la vaina del flagelo, sí se ha logrado efecto protector, el cual se ha manifestado con un decrecimiento de la movilidad de los vibrios. Por esta razón es que se considera la movilidad como realmente patogénica y no la estructura que la facilita (Krukoniš y DiRita, 2003), siendo reportado que los vibrios mótils son mucho más virulentos que los no mótils (Krukoniš y DiRita, 2003).

Al igual que la mayoría de las cepas de *V. cholerae* no O1, y a diferencia de las O1, *V. cholerae* 0139 posee cápsula y se ha visto que las mismas son capaces de variar entre formas encapsuladas, pobremente encapsuladas y no encapsuladas (Weintraub *et al*, 1994; Johnson *et al*, 1994). La presencia de la CPS, le permite a este nuevo serogrupo producir bacteremia, además de conferirle resistencia a la acción del complemento (Albert, 1994). Esta resistencia dificulta el desarrollo de ensayos vibriocidas convencionales optimizados para *V. cholerae* O1 (Losonsky *et al*, 1997).

Análisis preliminares de la capa capsular sugieren que la misma es diferente al LPS, aunque pueden tener epitopes comunes y que dicha capa está compuesta al menos parcialmente de cadenas laterales de polisacáridos O que no están ligados con el LPS del núcleo (Adeyeye *et al*, 2003). Por otro lado, se ha visto que vibrios 0139 encapsulados colonizan mejor que los no capsulados, implicando que el LPS de 0139 y el antígeno O de la cápsula son determinantes de la virulencia. Ambas estructuras, el LPS y el CPS son inmunogénicos (Nesper *et al*, 2003). Poco se conoce de los genes que codifican para la cápsula

en *V. cholerae* 0139 aunque existen hipótesis que plantean que estos fueron adquiridos por cepas de *V. cholerae* 01 durante la evolución para convertirse en una cepa 0139 (Albert, 1994). La hemaglutinina sensible a mañosa (HASM) es expresada mayormente por cepas del biotipo El Tor; es un pili flexible compuesto por subunidades con un peso molecular de

17,4 kDa (Jonson *et al*, 1991; Jonson *et al*, 1994). Su acción se manifiesta sobre eritrocitos de pollo y humanos (A, B y O) y puede ser inhibida por D-Manosa y D-Fructuosa (Jonson *et al*, 1991). Estudios realizados con cepas del biotipo El Tor, a las cuales se les realizaron una delección en el gen *hasm*, que codifica para HASM, no mostraron una significativa atenuación o pérdida en la capacidad de colonización en el modelo de ratón lactante, ni tampoco cuando se les administró a voluntarios (Tacket *et al*, 1998). Anticuerpos contra la subunidad de este pili no fueron suficientes para mediar la protección contra el reto de cepas salvajes del biotipo El Tor (Attridge *et al*, 1996).

La HASM en cepas de *V. cholerae* 0139, cumple la función de receptor del bacteriófago CTX_{ij} al igual que lo hace el TCP en cepas 01 (Jouravleva *et al*, 1998).

V. cholerae 01 y 0139 poseen otra proteína con actividad hemaglutinante, pero que su acción primaria es ser una proteasa (Finkelstein *et al*, 1983; Naka *et al*, 1995). La hemaglutinina soluble proteasa (HAP) es una metaloenzima Zn dependiente que, además, puede tener como sustratos fibronectina, mucina y lactoferrina (Silva *et al*, 2003). Otra función de HAP es el corte y activación de la subunidad A de la toxina del cólera en los péptidos A1 y A2 (Booth *et al*, 1984). Se plantea que HAP está relacionada con la liberación de los vibrios de las células intestinales luego de haber colonizado y que sea la responsable de la aparición del microorganismo vivo en las heces fecales propagándose así la enfermedad (Finkelstein *et al*, 1992). Esta hemaglutinina puede desempeñar un papel importante en la colonización intestinal y es también un factor reactogénico potencial de cepas vacunales atenuadas genéticamente (Benítez *et al*,

1999; Silva et al, 2003).

La hemolisina El Tor/citolisina (HET), es una toxina elaborada por la mayoría de los aislamientos de *V. cholerae* 01 biotipo El Tor (**Honda y Finkelstein, 1979**) y *V. cholerae* no 01 (**Ramamurthy et al, 1993; Dalsgaard et al, 1995**). Las hemolisinas de ambos serogrupos son biológica, fisicoquímica e inmunológicamente indistinguibles (**Yamamoto y Yokota, 1986**). Esta toxina proteica es secretada como una protoxina de **80** kDa, que es cortada proteolíticamente, para rendir una toxina activa con un peso molecular de 65 kDa (**Chattopadhyay y Banerjee, 2003**). La HET es codificada por el gen *hlyA*. Los genes que codifican HET y la hemolisina de *V. cholerae* no O1 tienen un alto grado de homología demostrado por la técnica de southern blot. Estas hemolisinas causan la lisis de los eritrocitos de varios vertebrados y células mamarias, además, provocan enterotoxicidad en el modelo de diarrea experimental (**Olso y Govaux, 2003**). La HET contribuye a la patogénesis de la gastroenteritis causada por cepas de *V. cholerae*, especialmente las cepas que no producen TC (**Olso y Govaux, 2003**)

Los vibrios del serogrupo 01 y 0139, también producen otras toxinas como la toxina de la zona ocluida (TZO) y la enterotoxina accesoria de cólera (EAC). En 1991, fue reportado que TZO incrementa la permeabilidad de la mucosa del intestino delgado, afectando la estructura de las uniones intercelulares o zónulas ocluidas. Estas uniones restringen o previenen la difusión de moléculas solubles en agua a través del espacio intercelular hacia el lumen. Debido a que TZO disminuye la resistencia de los tejidos, incrementando la permeabilidad, el agua y los electrolitos pueden pasar al lumen bajo la fuerza de una presión hidrostática, produciendo la diarrea (**Baudry et al, 1992**). El peso molecular de dicha toxina es de aproximadamente 44,8 kDa y por determinaciones de su secuencia aminoacídica, se ha visto que no existe homología con ninguna toxina bacteriana que pueda alterar zónulas ocluidas (**Kaper et al, 1994**).

Además, esta toxina participa en la formación estructural del fago CTX(j) (**Waldor y Mekalanos, 1996**). Por otra parte, EAC, un péptido

de 11,3 kDa, al igual que TC, pero a diferencia de TZO, incrementa la diferencia de potencial más que la conductividad del tejido (**Kaper et al, 1994**). Esta proteína provoca acumulación de fluido en asas ileales de conejo. Se piensa que su acción puede estar relacionada con una región anfípática que presenta en el extremo C-terminal, la cual puede insertarse en la membrana de la célula eucariota formando un canal iónico (**Trucksis et al, 1993**). EAC participa, además, en la formación del fago CTX₂, mediante la unión de partículas viriónicas (**Waldor y Mekalanos, 1996; Faruque et al, 1998**).

Varias proteínas de membrana externa de vibrios (PME) actúan como factores de virulencia e importantes antígenos protectores. Se plantea que cambios en las condiciones de crecimiento y la accesibilidad a los nutrientes puede influir en la expresión de OMP *in vitro* (Taylor, 1989).

Estas proteínas de membrana externa incluyen un grupo de 6-7 proteínas con PM entre 25- 64 kDa. Se ha visto que anticuerpos dirigidos contra componentes no lipopolisacáridicos de la membrana externa de la bacteria, bloquean la adherencia de los vibrios a las superficies mucosas y protegen contra retos con vibrios de ambos biotipos (**Attridge et al, 1993; Jacob et al, 1993**). Muchas de estas PME también pueden ser expresadas en el intestino, las que pueden inducir respuesta de anticuerpos contra infecciones de cólera (**Simonet et al, 2003**).

11.10 Modelos animales más utilizados para reproducir la infección por *V. cholerae*

Para estudiar cólera se han desarrollado diversos modelos animales, algunos de los cuales han proporcionado información relevante de la enfermedad humana, a pesar de la limitación fundamental dada por el hecho que la infección natural con *V. cholerae* no ocurre en animales y hasta el momento no se ha descrito ningún modelo animal que reproduzca completamente los signos y síntomas de la enfermedad, pues la mayoría de los animales adultos son resistentes a la colonización intestinal por este

microorganismo (**Cray et al, 1983**).

El uso del modelo de ratones neonatos y el modelo de conejo infante de Dutta (**Dutta et al, 1959**) están limitados a un corto tiempo después del nacimiento de estos animales (de 6-8 días), pues sólo en estos momentos es que son susceptibles a la infección. *V. cholerae* coloniza e infecta adecuadamente sólo animales recién nacidos. Sin embargo, debido a que sus intestinos son fisiológica e inmunológicamente inmaduros, el uso de estos animales está restringido a estudios de patogénesis de inmunidad pasiva, a experimentos de colonización de corto tiempo y en la determinación de la Dosis Letal Media (DL50) (**Baselski et al, 1977**),

Los animales adultos utilizados para el estudio de *V cholerae*, son los conejos, realizando modificaciones quirúrgicas de su tracto intestinal (**Richardson, 1994**). El modelo de inoculación intraduodenal permite una exitosa colonización intestinal de la cepa administrada y una correcta presentación antigénica que permite evaluar la respuesta inmune frente a células completas o antígenos purificados.

Un modelo muy utilizado para estudiar la virulencia de las cepas de *V. cholerae*, así como el efecto que producen las diferentes toxinas excretadas por vibrios, es el modelo de intestino ligado de conejo adulto o “Ileal Loop” (**De y Chatterjee, 1953**). En este modelo el potencial toxigénico de las cepas de *V. cholerae*, se evalúa a través de la acumulación de fluido que se produce como consecuencia de la excreción de toxinas en los segmentos de íleon inoculados.

Otro modelo ampliamente utilizado es el de la Diarrea en Conejo Adulto con Lazo Intraintestinal Removible (RITARD) (**Spira et al, 1981; Spira y Sack, 1982**). Este modelo permite que ocurra diarrea masiva y frecuentemente fatal en los 5 días posteriores a la inoculación. El modelo RITARD, es muy usado después de la inmunización oral, con el objetivo de evaluar la respuesta protectora inducida por cepas de *V cholerae*, al ser retados los conejos con vibrios vivos (**Lycke et al, 1986; Jansen et al, 1988**).

La diarrea acuosa letal también puede ser inducida en un modelo de perro adulto, pero este modelo es muy poco utilizado por su elevado costo (**Sack y Carpenter, 1969**).

El uso de animales para pruebas biológicas y ensayos preclínicos hace necesario que se cumplan un conjunto de normas éticas, que regulan el comportamiento del hombre en relación con los animales (**Capó, 1999; Morton, 1998**).

La bioética animal surge como consecuencia del reconocimiento de los derechos de los animales, debido a la sensibilización de los grupos de defensa y de los científicos que realizan experimentación con animales, así como los productores, para lograr el bienestar y la disminución o eliminación del sufrimiento animal como objetivos primordiales (**Peralta, 1998; Capó, 1999**).

11.11 Transmisión y prevención del cólera

Cuando el cólera en la forma epidémica se presenta por vez primera en una población anteriormente no expuesta a este microorganismo, puede afectar a todos los grupos de edades (**Peterson, 1995**). Por el contrario, en zonas con tasas elevadas de la forma endémica de la enfermedad, como Bangladesh, la mayoría de los adultos han adquirido cierto grado de inmunidad natural como resultado de las infecciones repetidas, sean o no sintomáticas. En estas circunstancias, la enfermedad se presenta sólo en niños pequeños que se exponen al bacilo por vez primera, y en los ancianos, cuya producción de ácido gástrico es menor y cuya inmunidad está disminuyendo (**Bajaj et al, 2001**). *Vibrio cholerae* 0139 Bengal, ha causado la enfermedad primariamente entre adultos, sugiriendo que la inmunidad preexistente para *V. cholerae* 01 no ofrece protección cruzada contra el nuevo serogrupo epidémico (**Jabeen y Hasan, 2003**).

Las epidemias se producen de manera característica a finales del verano y otoño. Las personas que no

tienen acceso al agua potable y dependen de fuentes mal reglamentadas para obtener sus alimentos y bebidas, corren el riesgo más elevado de ser infectadas por *V. cholerae* de ambos serogupos 01 y 0139 (Sack *et al*, 2003).

El reservorio natural de *V. cholerae* es el hombre, siguiendo la enfermedad un ciclo de transmisión hombre-medio ambiente-hombre. Para lograr una eficiente prevención y control del cólera, es necesario trabajar sobre la base de la destrucción del agente causal, la interrupción de la transmisión (digestiva), y la protección de los huéspedes susceptibles y personas sanas. Para dar cumplimiento a este objetivo se debe proceder a la educación sanitaria de la población, la vigilancia de los focos y el empleo de vacunas (Peterson, 2002). Sin embargo, una vacuna eficaz podría ser una medida de control útil, si se empleara en conjunto con las otras actividades antes descritas.

Ninguna de las vacunas existentes tiene todas las características de una vacuna ideal por lo que alcanzar este objetivo, sigue siendo la meta más ambiciosa en la lucha por erradicar esta enfermedad.

Las vacunas parenterales de bacterias inactivadas de *V. cholerae*, han dejado de ser utilizadas porque confieren protección limitada (de corta duración de 3 a 6 meses) en zonas endémicas. En regiones no endémicas la protección es aún menos duradera, además de que son vacunas muy reactogénicas y por su escasa eficacia no son recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2001).

Teniendo en cuenta que *V. cholerae* es un microorganismo no invasivo, que genera una respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal, la cual desempeña un papel importante en la protección contra el cólera y que la propia enfermedad confiere una protección duradera, un preparado vacunal contra el cólera debe ser oral, preferiblemente una bacteria viva, o que en el proceso de producción conserve en lo posible la estructura nativa, de manera que estimule de forma efectiva el sistema inmune a este nivel. La inmunización oral estimula una memoria duradera que permite al sistema inmune una vez preparado, la

rápida respuesta a una posterior exposición al antígeno (**Levine y Pierce, 1992**).

Con el desarrollo de la biotecnología y la comprensión de la necesidad de estimular el sistema inmune en la mucosa del intestino se ha ampliado el desarrollo de vacunas orales. Los dos tipos de vacunas orales licenciadas contra el cólera, han mostrado ser seguras e inmunogénicas. Una, está compuesta por células de *V cholerae* inactivadas, administradas sola o en combinación con la subunidad B de la TC y la otra consiste en una cepa atenuada de *V cholerae* (CVD 103-HgR) (**WHO, 1995**).

La vacuna oral de células enteras muertas de *V. cholerae*, contiene 10^{11} células de ambos serotipos (Ogawa e Inba) y de ambos biotipos (Clásico y El Tor), inactivadas por formol y calor, combinada con 1mg de la subunidad B de la enterotoxina (**Holmgren y Svennerholm, 1999**). Se administran dos dosis de vacuna separadas por un intervalo de una semana y una dosis de refuerzo dos años después. Debe administrarse una tercera dosis a los 6 meses en caso de viaje a zonas de alto riesgo. En cuanto a la inmunogenicidad y eficacia se observa una respuesta de anticuerpos séricos antibacterianos en el 50-80% de los vacunados, y de anticuerpos antitóxicos en el 60-80%. Se alcanzan títulos máximos de anticuerpos a las dos semanas de la administración de la vacuna. La protección proporcionada por la vacuna es entre un 85-90% durante los primeros 6 meses después de la segunda inmunización y alrededor del 50% luego de 3 años. La intensidad y duración de esta respuesta es menor en niños de 2-5 años (**WHO, 2001**). Es bien tolerada en pacientes HIV positivos. Se indica para prevenir el cólera en niños mayores de 2 años y adultos pertenecientes a grupos de riesgo, así como en pacientes con grupo sanguíneo O (en los que se ha demostrado una mayor susceptibilidad) que presenten riesgo de contraer la enfermedad. Como efectos secundarios, sólo se ha descrito la aparición de molestias gastrointestinales y diarreas. Las contraindicaciones son las generales de las vacunas inactivadas. No se han estudiado los resultados tras la administración simultánea con otras vacunas o inmunoglobulinas, así como su seguridad en embarazadas

e inmunodeprimidos (WHO, 2001).

La vacuna oral de células vivas, CVD-103 HgR, se deriva de la cepa 569 B de *V. cholerae*

OI biotipo Clásico, serotipo Inaba, la cual fue manipulada genéticamente para suprimir el gen que codifica la subunidad A de la enterotoxina colérica, a la vez que mantiene la subunidad B. Tiene, además, la inserción de un marcador de resistencia al mercurio (Levine *et al*, 1988). Se administra una dosis única por vía oral. Su inmunogenicidad oscila en cuanto al porcentaje de seroconversión, entre el 72 y el 97% en el caso de anticuerpos antibacterianos, y entre el 71 y 76% en el caso de los antitóxicos (Kotloff *et al*, 1992). Los efectos secundarios que se han descrito son excepcionalmente diarrea autolimitada en los vacunados y las contraindicaciones generales de las vacunas de gérmenes vivos atenuados (Levine *et al*, 1988). La cepa CVD 103-HgR, confirió buena protección (60-80 %) en voluntarios adultos en Estados Unidos, retados 3 meses después de la vacunación y fue inmunogénica y bien tolerada en niños de 3 meses de edad (WHO, 2001).

La eficacia de esta vacuna fue realizada en un ensayo de campo en Indonesia desde 1993 hasta 1997, con 67508 personas entre 2 a 41 años de edad, que ingirieron una dosis de vacuna o placebo y fueron seguidos por cuatro años. El estudio de reactogenicidad (538 vacunados y 535 placebos) no reveló efectos adversos. El estudio de inmunogenicidad (N = 657) demostró entre un 64-70% de serorespuesta vibriocida en los vacunados contra 1-2% de los controles. La incidencia de cólera fue menor que lo esperado. Fueron detectados 103 casos de diarrea por *V. cholerae* OI El Tor. De los 93 casos evaluados para la eficacia de la vacuna (43 vacunados, 50 placebos), la eficacia fue 60% a los 6 meses, 24% al año y 14% a los 4 años. En algunas personas con grupo sanguíneo O se observó protección (p = 0.12). Solamente en siete casos ocurrió con seis meses de vacunados, al evaluar la eficacia en un corto tiempo. En Jakarta una dosis única de la vacuna CVD 103-HgR no confirió protección por largo tiempo. Sin

embargo, fue observada una protección duradera después de dos dosis. (Richie *et al*, 2000).

La vacuna CVD 103-HgR, no debe administrarse en el curso de una enfermedad febril aguda o de infección intestinal aguda. No se han estudiado los resultados tras la administración simultánea con otras vacunas. No se conoce el efecto de su administración en mujeres embarazadas, por lo que se recomienda no vacunar salvo que exista un riesgo muy elevado. La vacunación durante la lactancia no tiene efectos negativos sobre el niño. Es segura e inmunogénica en pacientes HIV positivos. No confiere protección contra vibrios 0139 al igual que la vacuna de células enteras muertas (WHO, 2001).

La otra cepa candidata a una vacuna viva atenuada (no licenciada) es la Perú-15, cepa no mótil derivada de la cepa C6709 de *V. cholerae* 01 El Tor Inaba, a la cual se le realizaron una serie de deleciones y modificaciones, incluyendo la deleción de los genes que codifican la TC entera, y le fueron insertados los genes que codifican para la subunidad B de TC en el sitio *recA* (Kenner *et al*, 1995). Una sola dosis oral liofilizada de 2 x 10 UFC de este candidato vacunal, fue segura e inmunogénica en un número limitado de voluntarios norteamericanos con una eficacia de 100% en un estudio de reto con la cepa NI6961 de *V. cholerae* 01 El Tor Inaba (Cohén *et al*, 2002).

11.12 Producción de vacunas bacterianas vivas atenuadas

Hay tres vacunas licenciadas para uso humano basada en el uso de bacterias vivas atenuadas: bacilo Calmette-Guérin (BCG) para la prevención de la tuberculosis, *Salmonella typhi* Ty21a contra la fiebre tifoidea (Levine, 1987) y *Vibrio cholerae* CVD 103-HgR para la prevención del cólera (Levine, 1988).

La producción de la vacuna *S. typhi* Ty21a, por su considerable experiencia de más de 15 años, es un sistema modelo para la producción de vacunas bacterianas vivas atenuadas administrada oralmente (Cryz y Glück, 1997).

En la producción de las vacunas vivas atenuadas Ty21a y CVD 103-HgR, la fermentación, cosecha, mezcla y toda transferencia entre estos pasos se desarrolla en un sistema cerrado esterilizable, para facilitar el proceso y reducir los riesgos de contaminación. Todas las manipulaciones siguientes con la suspensión celular, como liofilización, encapsulación y recubrimiento entérico, son realizadas en otras áreas estériles o locales limpios. Todo el proceso de fabricación es controlado por computadoras para asegurar la uniformidad entre lotes **(Cryz y Glück, 1997)**.

La mayor prioridad en la producción de las vacunas vivas atenuadas, debe ser la formulación del medio de cultivo que asegure la expresión de los antígenos protectores esenciales (LPS de un determinado fenotipo, cápsula, flagelo, etc.). El medio debe ser bien definido, preferentemente compuesto de componentes comerciales en polvo, libre de antígenos de grupos sanguíneos. El crecimiento de la bacteria deberá ser exuberante y los rendimientos celulares estables para facilitar los pasos siguientes de fabricación (centrifugación, liofilización y otros) **(Cryz y Glück, 1997)**.

La expresión de los antígenos de superficie de las células bacterianas puede variar considerablemente, dependiendo de las condiciones de cultivo tales como pH, oxígeno disuelto, agitación y duración del crecimiento. Por ejemplo, si los antígenos de la superficie de la célula tales como pili o flagelo son esenciales para la eficacia de la vacuna, la agitación puede ser mantenida a un mínimo. La fase de crecimiento en la cual las bacterias son cosechadas, es conocido que desempeña un papel importante en la sobrevivencia después de la liofilización. La fase estacionaria de varios géneros gramnegativos se ha comprobado que sobrevive mejor a la liofilización que la fase logarítmica **(Cryz y Glück, 1997)**.

La vía más común por la cual las células bacterianas son recolectadas es mediante centrifugación de flujo continuo. Esta forma de recolección es rápida y provee buenos recobrados y rendimiento de una mezcla de bacterias concentrada para los procesos siguientes. Este sistema puede eliminar estructuras de

superficie de la bacteria tales como flagelo o pili. Métodos alternativos de cosecha, como el sistema de filtración por membrana son también capaces de concentrar rápidamente la suspensión bacteriana sin daños, manteniendo las estructuras de superficie. El mérito de cada sistema debe ser adecuado contra la necesidad de mantener los antígenos de superficie relevantes. Por ejemplo, la cosecha de la cepa Ty21a por centrifugación permite obtener una vacuna eficaz, mientras que la cepa CVD 103-HgR debe ser recolectada por filtración de flujo tangencial para preservar las estructuras celulares de superficie para la inducción de respuesta inmune protectora **(Cryz y Glück, 1997)**.

Las vacunas bacterianas vivas atenuadas, deben preservarse a una concentración conocida por un período prolongado de tiempo. La vía más eficiente para lograr este objetivo es mediante la liofilización. Los concentrados bacterianos son relativamente muy lábiles y pueden ser combinados con una mezcla de soluciones lioprotectoras, para lograr resistencia a la inactivación durante la liofilización. Los lioprotectores o aditivos, son usualmente hiperosmóticos para prevenir la muerte celular por lisis y rompimiento del ADN. Varios azúcares y aminoácidos son factibles para humanos y excelentes lioprotectores **(MacKenzie, 1977; WHO, 1984)**. Para obtener rangos máximos de sobrevivencia, es necesario formular en un medio protector específico para cada cepa bacteriana. El aditivo ideal no debería solamente proveer buenos rangos de sobrevivencia inmediatamente después de la liofilización, sino también un producto estable en un almacenaje prolongado (18 meses o más). La solución lioprotectora debe ser designada para ser compatible con las condiciones de liofilización seleccionadas, tales como el rango de secado y la humedad residual presente como agua no cristalina requerida en el producto final **(WHO, 1984; De Valdés, 1985)**. Este último factor es crítico para la estabilidad de la cepa en la vacuna Ty21a.

Para provocar una respuesta inmune protectora, la cepa vacunal debe primero atravesar la barrera de la acidez estomacal antes de la colonización en el íleon (**Hajishengallis et al, 1992**). La mayoría de las bacterias gramnegativas son altamente sensibles a pH bajo, por ejemplo, el 99.9 % de células viables de *S. typhi* Ty21a fueron inactivadas después de exponerse 15 min. a jugo gástrico sintético (pH cercano a 2). Dos métodos existen para evitar este problema. El primero involucra administrar una solución tamponada inmediatamente antes o junto con la cepa vacunal. Históricamente, el bicarbonato de sodio ha sido extensivamente usado (**Cryz et al, 1996**). Una solución amortiguada, a base de bicarbonato de sodio, mezclado con ácido ascórbico, ha sido utilizado para prevenir las alteraciones gástricas frecuentemente notadas después de la ingestión de bicarbonato de sodio (**Cryz et al, 1996**). El segundo es que alternativamente la cepa vacunal puede ser incluida en una cápsula de recubrimiento entérico que es impermeable a pH ácido, pero se descubre al pH alcalino del íleon. De este modo se liberan las bacterias en el sitio apropiado (**Cryz et al, 1996**).

Resultados de algunos ensayos de campo con la vacuna *S. typhi* Ty21a, han demostrado que la eficacia de la vacuna es muy dependiente de la formulación final utilizada (**Levine et al, 1987; Wahdan, 1982**).

El control de vacunas orales vivas es esencial para verificar la seguridad y eficacia de la vacuna. El lote de siembra de trabajo de la cepa vacunal debe ser analizado para confirmar fenotipo y genotipo. Las pruebas “*in vitro*” desempeñan un papel crítico porque no hay un modelo animal relevante para patógenos humanos entéricos, que puedan predecir la seguridad y potencia de la vacuna. Hay diferentes controles que son realizados antes de liberarse la vacuna (**Cryz y Glück, 1997**).

El control de calidad de CVD 103-HgR es más simple, que para Ty21a, ya que la cepa fue construida utilizando tecnología de ADN recombinante (**Kaper et al, 1984**). En este caso no son conocidas las manipulaciones genéticas realizadas y las pruebas apropiadas que pueden ser seleccionadas para

identificar los resultados fenotípicos y genotípicos **(Cryz y Glück, 1997)**.

Los lotes de producción de la vacuna CVD 103-HgR son controlados por los siguientes parámetros: (1) conteo de viables de la cepa CVD 103-HgR por dosis; (2) ensayos de células adrenales Y1, para confirmar que no existe la TC; (3) producción de la subunidad B de la TC, determinada por Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) con gangliósido GMi. (4) la habilidad para crecer en la presencia de iones Hg²⁺ y (5) identidad por serología y pruebas de seguridad **(Cryz y Glück, 1997)**.

Desde el punto de vista de la salud pública, es importante contar con una vacuna contra el cólera, capaz de inducir protección continua contra la enfermedad grave y contra la infección asintomática. Las investigaciones para evaluar y desarrollar una vacuna eficaz deben acelerarse en la mayor medida posible. Deben emprenderse esfuerzos para mejorar las vacunas candidatas existentes. Esto incluye el incremento de su capacidad inmunógena, el desarrollo de formulaciones prácticas y la reducción de los costos de producción **(WHO, 2001)**.

11.13 Ensayos clínicos

Los estudios clínicos o ensayos clínicos son investigaciones en sujetos humanos dirigidas a descubrir o verificar los efectos clínicos, farmacológicos u otros efectos farmacodinámicos, identificar cualquier reacción adversa y estudiar la absorción, distribución, metabolismo y excreción de un producto en investigación, con el objetivo de determinar su seguridad y/o eficacia **(ICH, 1996)**.

Los ensayos clínicos deben ser realizados de acuerdo con los principios éticos que tienen su origen en la Declaración de Helsinki, los cuales son consistentes con las Buenas Prácticas Clínicas (BPC) y los requisitos reguladores vigentes **(ICH, 1996)**.

Las BPC son un conjunto de medidas sistemáticas con una norma internacional de calidad científica y ética dirigidas al diseño, realización, registro y redacción de informes de ensayos que implican la

participación de sujetos humanos (ICH, 1996). Su cumplimiento asegura públicamente la protección de los derechos, la seguridad y bienestar de los que participan en el ensayo (ICH, 1996).

La investigación biomédica en humanos debe concordar con los principios científicos generalmente aceptados y debe basarse en experimentos de laboratorio y en animales, bien realizados, así como en un conocimiento profundo de la literatura científica pertinente (Moreno, 1997).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo

Todas las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo y sus referencias se detallan en la Tabla 1.

Se utilizaron un total de 15 cepas de *V. cholerae*, 10 correspondientes al serotipos Inaba y Ogawa, 5 al serogrupo 0139 y 1 *Escherichia coli*

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas.

Características de las cepas parentales		Referencias
C7258	O1, El Tor Ogawa, epidémica, Perú 1991	Häse <i>et al.</i> , 1994
C6706	O1, El Tor Inaba, epidémica, Perú 1991	Häse <i>et al.</i> , 1994
SG251	O139, epidémica, India 1993	Ramamurthy <i>et al.</i> , 1993
Características de las cepas modificadas de 1 ^{ra} generación		Referencias
81	C7258 [Δ ctxAB, zot, ace, cep, orfU], mshA ⁻	Benítez <i>et al.</i> , 1996
413	C6706 [Δ ctxAB, zot, ace, cep, orfU]	Benítez <i>et al.</i> , 1996
251a	SG251 [Δ ctxAB, zot, ace, cep, orfU], me	Año <i>et al.</i> , 1998
Características de las cepas modificadas de 2 ^{da} generación		Referencias
638	81, hap::celA ⁻	Robert <i>et al.</i> , 1996
1333	413, hap::celA ⁻	García y Benítez, 1996
L911	251a [hap::celA ⁻], no motil	Ledon <i>et al.</i> , 2003
Característica de la cepa modificada de 3 ^{ra} generación		Referencias
638T	638, thyA	Valle <i>et al.</i> , 2000
Características de las cepas controles		Referencias
569B	O1, Clásico Inaba, epidémica, India, 1945	Finkelstein <i>et al.</i> , 1969
VC12	O1, Clásico Ogawa, referencia	Cedré <i>et al.</i> , 1999
VC13	O1, Clásico Inaba, referencia	Cedré <i>et al.</i> , 1999
MDO12	O139, epidémica, India, 1993	Sengupta <i>et al.</i> , 1996
MO45	O139, epidémica, India, 1993	Shimada <i>et al.</i> , 1994
K12	<i>Escherichia coli</i> , referencia	Migasena <i>et al.</i> , 1989

Nomenclatura de los genes que codifican para: *ctxA*, subunidad de la toxina A de la toxina colérica, *ctxB*, subunidad B de la toxina colérica; *zot*, toxina de la zona ocluida; *ace*, enterotoxina colérica accesoria; *cep*, *core encoded pilus*; *orfU*, marco de lectura abierto U; *mshA*, hemaglutinina sensible a mañosa, *thy*, auxotrofia la timidina; *Itap*, hemaglutinina/proteasa; *ce/A*, endogluconasa A y *me*, mutante espontáneo. Los genes comprendidos en el cassette de virulencia están entre corchetes.

111.2 Creación de los lotes de siembra de trabajo de las cepas modificadas genéticamente

Se partió de cultivos liofilizados de los lotes de siembra de referencia del laboratorio de Crioconservación y Liofilización del Centro Nacional Investigaciones Científicas (CNIC), controlados por los laboratorios de Enfermedades Diarreicas Agudas y de Biología Molecular del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK). Se cultivaron en caldo triptona peptona (TP) [peptona de caseína obtenida por digestión pancreática, peptona de carne obtenida por digestión pancreática, NaCl y K₂HPO₄] a 37°C a 200 rpm por 4 h. Se controló la pureza de cada cultivo por coloración de Gram. Se mezclaron 0,3 mL de cada cultivo con 0,3 mL de leche descremada al 10% y glicerol al 20% (todos los reactivos y medios de cultivos de MERCK), y distribuyeron en tubos de crioconservación de 1,5 mL y almacenándose a -70°C hasta su uso, según la metodología establecida en el PNO 20-036, (Anexo 1).

111.3 Controles microbiológicos a los lotes de siembra de trabajo

La identificación fisiológica y bioquímica de los lotes de siembra de trabajo se realizó siguiendo la metodología recomendada en el manual de la Organización Panamericana y Mundial de la Salud (CDC/NCID. OPS, 1994).

Se utilizó la técnica de gota pendiente (fresco) para examinar bacterias móviles de los serogrupos O1 y O139 al microscopio óptico (MO) (Baker, 1970). Además, la motilidad fue demostrada a través de la siembra por punción en agar semisólido triptona-cloruro de sodio, de colonias aisladas crecidas en agar

triptona soya (ATS) (**Gardel y Mekalanos, 1996**).

Para observar la presencia del flagelo se realizó una coloración negativa y las células fueron observadas al microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL- JEM 100 S. Las bacterias se fijaron en rejillas de cobre de 200 mesh previamente recubiertas con una fina membrana Formvar, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se realizó la coloración con acetato de uranilo acuoso al 5% (**Richardson, 1991**).

La presencia de cápsula en las cepas atenuadas 251a y L911 del serogrupo 0139, se analizó a través de MET, utilizando como control positivo la cepa 0139 virulenta, MD012 y como control negativo la cepa del serogrupo 01, VC12. Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 5% en solución amortiguadora de cacodilato de sodio 0,1 M, antes de la coloración con ferritina policatiónica (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), posteriormente se fijaron en tetraóxido de osmio al 2% en la misma solución amortiguadora, se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol etílico y se incluyeron en resina Spurr (**Spurr, 1969**). Se realizaron cortes ultrafinos que fueron contrastados con acetato de uranilo y citrato de plomo (**Reynolds, 1963**) y observados al MET. Se tomaron fotografías sobre las cuales se realizaron mediciones.

Luego de comprobar que las pruebas bioquímicas de las cepas en estudio coincidían con las de *Vibrio cholerae*, se procedió al análisis serológico a través del método de aglutinación en lámina (**CDC/NCID. OPS, 1994**), empleando antisuero polivalente 01, monovalentes Ogawa e Inaba (Murex Biotech Ltd) y antisueros 0139 obtenidos en el Laboratorio de Bacterias Enteropatógenas del Instituto Finlay según **Sakazaki y Donovan, 1994**.

El ensayo que identifica a las cepas cubanas candidatas a vacuna contra cólera es el que detecta la

expresión de un marcador cromosómico, el gen *celA* que codifica para la enzima endogluconasa A del *Clostridium thermocellum* (Robert *et al*, 1996). Se utilizó como control positivo la cepa 638 *V cholerae* 01 El Tor Ogawa y como control negativo la cepa C7258 del mismo biotipo y serotipo.

Cada cepa se cultivó en placas de agar Luria Bertani (ALB), las cuales se sembraron, a partir de diferentes diluciones. Las placas se incubaron a 37°C, de 18 a 24 h y se recubrieron con 7 mL de agar suave (agarosa al 0,7% y carboximetilcelulosa soluble 0,5%) y se incubaron 2 h a 60°C. Posteriormente, se cubrieron las placas con una solución de rojo congo al 1% durante 20 min., la cual fue eliminada con NaCl 1 M mediante lavados, hasta observar la formación de un halo traslúcido alrededor de las colonias. Las colonias de las cepas de *V cholerae* que expresan el gen *cel A*, se observan como colonias rojas rodeadas de un halo transparente.

Como prueba de seguridad se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP), para detectar el gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la TC, siguiendo la metodología del manual de la OPS (CDC/NCID. OPS, 1994). El ADN amplificado de *ctx A* se detecta como una banda de 564 pares de bases (pb) en un gel de agarosa.

El ADN de cada cepa para la amplificación se obtuvo a partir de un cultivo en caldo LB, incubado a 37°C por 24 h. La biomasa del cultivo obtenida por centrifugación fue resuspendida en 500 μ L de agua destilada estéril y posteriormente calentada a 100°C durante 20 min. Las cepas recién procesadas se colocaron rápidamente en hielo o se conservaron a -20°C hasta su uso.

La amplificación se realizó según Fields *et al*, 1992. La mezcla de la reacción se preparó a un volumen de 50 μ L que contenía 38,75 μ L de agua estéril, 5 μ L de amortiguador de RCP IOx [Promega] (Tris-HCl 100 mM, KCl 500 mM, MgCl 15 mM, gelatina al 0,1% [p/v]),

2 μ L de la mezcla de dNTPs 10 mM [Promega] (2,5 mM cada uno, dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,6 μ L

de cada cebador 100 ng/pL (CTX 2686: 5' CGG GCA GAT TCT AGA CCT CCT G3'; de la posición 73 a 94) y (CTX 2687: 5' GCA TGA TCT TGG AGC ATT CCC AC 3', de la posición 611 a 636), sintetizados en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), 1 pL de la enzima Taq ADN polimerasa [Promega] y 5 pL de la muestra procesada. Como control negativo se utilizó una mezcla de reacción con todos los ingredientes menos la muestra y la cepa 569 B como control positivo. Se programó el termociclador PTC-100, con un paso de preincubación a 95°C por 5 min., 25 ciclos de 95°C por min., 1 min. a 72°C, y una incubación final a 72°C por 10 min. A los productos de la amplificación se les realizó electroforesis submarina en geles de agarosa al 1%, los cuales se tiñeron previamente con bromuro de etidio [0,5 pg/mL] (Sambrook *et al*, 1989). Se utilizó como marcador de peso molecular el bacteriófago (j) 174 [Promega]. La corrida electroforética se realizó a 120 V con tampón Tris-Borato EDTA, pH 8 (Fields *et al*, 1992).

III.4 Selección de cepas atenuadas por pruebas biológicas en modelos animales

III.4.1 Ensayo para evaluar virulencia

Para comprobar la atenuación y virulencia de cada cepa se determinó la dosis letal media (DL₅₀), según el método descrito por Ujille *et al*, 1968.

Se utilizaron ratones lactantes Balb/c de 2-4 días de nacidos con peso promedio de 1-5 g, suministrado por el Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Se hicieron 5 grupos de 10 animales por dilución. A cada grupo de animales se le administró por vía oral a través de una cánula, 50 pL de las diluciones seriadas desde 10⁻⁵ hasta 10⁻¹ del cultivo de cada una de las cepas en PBS-azul de evans al 0,01%. El grupo control recibió sólo PBS-azul de evans al 0,01%. Seis horas después se colocaron las madres y se registró el número de muertos en cada dilución a las 72 h de inoculados. El

experimento se realizó por triplicado con cada cepa. Los cálculos de la DL50 se realizaron según el método descrito por **Reed y Muench, 1938**. Para considerar que las cepas modificadas genéticamente estaban atenuadas y eran no virulentas se tomó como criterio de aceptación que deben cumplir con que el valor de la DL₅₀ fuera $> 10^6$.

III.4.2 Ensayo para evaluar capacidad colonizadora

El ensayo de colonización en el modelo del ratón neonato es una de las pruebas que determina la potencia de cepas de *V. cholerae* modificadas genéticamente (**Pearson et al, 1993**).

Se utilizaron ratones lactantes Balb/c de 2-4 días de nacidos suministrados por el CENPALAB con peso promedio de 1-5 g. A cada grupo de 10 ratones se le administraron por vía oral a través de una cánula, 50 μ L de una suspensión celular que se ajustó a una concentración de 10^8 UFC/mL en PBS azul de evans al 0,01% y se sacrificaron 24 h después de la inoculación. Se extrajeron los intestinos, se pesaron en forma de mezcla (10 intestinos por cada mezcla), se lavaron, con el objetivo de eliminar las células que no se encontraban adheridas al epitelio intestinal y por último se homogeneizaron en un ULTRA- TURRAX T-25 (Janke & Kunkel, IKA) a 13 500 r.p.m. durante 15 segundos en PBS. Los homogenatos se sembraron en placas de TCBS y se incubaron 18 h a 37°C. Los resultados se expresaron como UFC/g intestino. El experimento se realizó por triplicado para cada

cepa. El criterio de aceptación que deben cumplir las cepas modificadas en esta prueba es que incrementen su concentración entre 10-10 UFC/gr con respecto al inóculo inicial (10^5 UFC/mL).

III.4.3 Ensayo para evaluar capacidad de adherencia a la mucosa intestinal

Para evaluar la capacidad de las cepas modificadas de adherirse a la mucosa intestinal se utilizaron, ratones neonatos Balb/c de 2-4 días de nacidos, procedentes del CENPALAB con peso promedio de 1-5 g al inicio del experimento. La metodología se realizó de igual manera que la de la prueba de colonización, realizándose las tomas de muestras de intestino para estudios de identificación microbiológica de *V. cholerae* y para el estudio anatomopatológico por la técnica Hematoxilina-Eosina, así como para el análisis inmunohistoquímico mediante la técnica de inmunoperoxidasa indirecta (Vacca, 1985). Se hizo una dilución 1/10 del anticuerpo policlonal anti-células enteras de los serogrupos OI y 0139 obtenidos en conejos en el laboratorio. Se empleó un conjugado anti IgG-peroxidasa de conejo (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), a una dilución 1/250. Esta prueba es de caracterización y no constituirá una prueba de rutina para el control del sistema de lotes de siembra de la vacuna atenuada contra cólera.

III.4.4 Ensayo para evaluar toxigenicidad

El modelo del intestino ligado en conejo adulto se utilizó como prueba de caracterización para evaluar la toxigenicidad de las cepas modificadas genéticamente y comprobar su atenuación. Se siguió el método reportado por De y Chatterjee, 1953, con conejos blancos de Nueva Zelanda de 2-2,5 Kg de peso, suministrados por el CENPALAB.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (25 mg/Kg de peso, por vía intravenosa), seguidamente se les realizó una laparatomía de 3 cm en la línea media del abdomen próximo al cartílago sifoides. El intestino delgado fue localizado y dividido por ligaduras en 9 o 10 segmentos de 5-6 cm, próximos al apéndice. Fueron inoculados con 0,5 ml de la suspensión bacteriana de 10 UFC en PBS estéril. Se retomó el órgano a su cavidad abdominal y se suturó la herida.

A las 18 h posteriores a la inoculación, los animales se sacrificaron con una sobredosis de 50 mg/Kg de

peso de pentobarbital sódico, se localizaron los segmentos inoculados y se midió el largo en cm de los mismos, así como el volumen de fluido acumulado en su interior. Los resultados se expresaron como volumen de fluido acumulado (FA) en mL por cm de segmentointestinal (**Ichinose et al, 1987**).

En cada animal se evaluaron dos cepas, con tres segmentos de intestino para cada una de las cepas. En otros dos segmentos se inocularon sólo con PBS estéril. En cada experimento se trabajó con tres animales.

III.4.5 Ensayo para evaluar inmunogenicidad

El modelo de inoculación intraduodenal se utilizó como prueba de potencia para evaluar la inmunogenicidad. Se utilizaron conejos blancos de Nueva Zelanda de 2-2,5 Kg de peso suministrados por el CENPALAB.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (25 mg/kg de peso), por vía intravenosa. Seguidamente se les realizó una laparatomía de 3 cm en la línea media del abdomen próximo al cartílago sifoides. Se visualizó el duodeno y se inyectó en el lumen intestinal 5 mL de la suspensión bacteriana que contenía 10⁹ UFC de cada cepa. Se retomó el órgano a su cavidad y se reconstruyó la herida. Una hora más tarde, se les administró atropina intramuscularmente (0,1 mg/Kg). Los conejos controles recibieron PBS estéril en lugar de la suspensión de bacterias viables.

La sangre de los animales inoculados, se colectó por punción en la vena central de la oreja los días 0 y 14.

Los sueros fueron colectados y almacenados a -20 °C, hasta su análisis para la determinación de anticuerpos bactericidas mediante el ensayo vibriocida y de anticuerpos IgG anti-LPS Ogawa a través de la técnica de ELISA.

Se determinó el título de anticuerpos vibriocidas por el método reportado por **Benenson et al, 1968**, con modificaciones según **Cedré et al, 1999**, en cuanto a la metodología para la determinación del punto final

en la titulación.

En una placa de microtitulación de 96 pocillos (COSTAR) se hicieron diluciones dobles de los sueros desde 1/10 hasta 1/20480. Se empleó una suspensión bacteriana de las cepas VC12 (clásico Ogawa), VC13 (clásico Inaba) o la cepa M045 (0139) (**Losonsky et al,**

1997) , en dependencia del serotipo y/o serogrupo inoculado con una concentración de 10^7

UFC/mL, las cuales fueron mezcladas en una proporción 1:1 con complemento humano diluido 1/5 en PBS. Las placas se incubaron 1 h a 37 °C. Se añadió 150 pL de medio Caldo Cerebro Corazón (BHI) al que se le adicionó glucosa y púrpura de bromocresol, ambos en solución para una concentración final en el medio del 2%. Las placas se incubaron nuevamente durante 3 h a la misma temperatura.

El título vibriocida se definió como el inverso de la mayor dilución del suero que causó inhibición completa del crecimiento bacteriano, determinado por la invariabilidad de color del medio al realizarse el examen visual (**Cedré et al. 1999**).

Los anticuerpos IgG anti-LPS se midieron por ELISA, usando placas de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano (Nunc Maxisorp), recubiertas insistentemente con LPS Ogawa, Inaba y 0139 según la cepa inoculada como antígenos a una concentración de 25pg/mL en PBS, incubándose a una temperatura de 4 °C, durante toda la noche. Las muestras de suero de los conejos, diluidas en PBS-Tween, se incubaron 2 h a temperatura ambiente. Se empleó el conjugado anti IgG-HRP (Sigma) de conejo, diluido 1/2000 en leche descremada (MERCK) al 1% en PBS-Tween y las placas se mantuvieron 1 h a la misma temperatura. La reacción fue revelada con 0,4 mg/mL de ortofenilén diamina (Sigma) en solución amortiguadora de Citrato de Sodio 0,1 M, pH=5 y H₂O₂ al 0,4%. Se detuvo la reacción adicionando una solución de H₂SO₄ 2.5N. Las placas fueron leídas en un lector de placas de ELISA 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 densidad óptica de 0,4 por encima del blanco de la placa. Este valor se calcula mediante la interpolación en la

ecuación de la recta de valores de DO por encima y por debajo de 0,4 (Svennerholm *et al*, 1982).

Los criterios de aceptación para ambas pruebas, empleadas para evaluar la capacidad inmunogénica de cepas atenuadas en el modelo intraduodenal, fueron que los títulos de anticuerpos bactericidas deberían ser > 1:160 y los títulos de IgG anti LPS entre 1,24-2,72

III.5 Selección de cepas atenuadas no reactogénicas e inmunogénicas por ensayos clínicos

El diseño del estudio se realizó con voluntarios sanos, con régimen hospitalario en el Instituto Pedro Kouri (IPK). Participaron 97 voluntarios distribuidos por ciclos de 18.

Para determinar la población en los ensayos se especificaron los criterios de selección, exclusión y de salida del estudio.

111.5.1 Criterios de selección:

- Voluntariedad expresa mediante consentimiento informado escrito.
- Hombres de 18-40 años de edad.
- Buen estado de salud física y mental, establecido por criterio médico mediante examen físico, de laboratorio y prueba psicométrica antes de comenzar el estudio.

111.5.2 Criterios de exclusión:

- Antecedentes de inmunodeficiencias.
- Enfermedad cardiovascular, respiratoria, renal, hematológica, hepática, gastrointestinal, neurológica,

desorden endocrino, psiquiátrico o del sistema retículo endotelial referidos por el voluntario durante el examen clínico o detectados en los exámenes de laboratorio.

- Alergia a las tetraciclinas (antibiótico de elección para el tratamiento del cólera).
- Historia previa de vacunación o reto con *V. cholerae*.
- Historia de terapia con otros antimicrobianos o gammaglobulinas durante los 30 días anteriores a la inoculación.
- Ensayo para anticuerpos HIV-1 o HIV-2 positivos.
- Positivo al antígeno de superficie de la Hepatitis B o anticuerpos contra Hepatitis A o C.
- Antecedentes de coprocultivo positivo para patógenos entéricos.
- Estar bajo tratamiento inmunosupresivo (más de 14 días) u otro tipo de medicamento que modifique el estado inmunológico, excluyendo los esteroides tópicos o por inhalación.
- Administración de una vacuna no prevista en el protocolo aprobado para este estudio, 30 días antes o después de la aplicación del producto en estudio.
- Presencia de enfermedad aguda severa o moderada (con o sin fiebre) en el momento de su incorporación al estudio.
- No aprobar el examen escrito de comprobación de conocimientos sobre el tema de la investigación que va a participar.

111.5.3 Criterios de salida del estudio:

- Presencia de una enfermedad aguda durante el desarrollo del estudio.
- Administración por más de 14 días de inmunosupresores o de otras drogas que modifiquen el sistema inmune durante el período de estudio. Se excluyen los esteroides tópicos o por inhalación.
- Administración de una vacuna no prevista en el protocolo aprobado para este estudio, 30 días antes o

después de la aplicación del producto en estudio.

- Administración de inmunoglobulinas y/o hemoderivados durante el período de estudio.

111.5.4 Distribución de los ensayos clínicos

Después de la selección de la población, las distribuciones de los ensayos clínicos fueron por ciclos, motivados por las características hospitalarias (Tabla 2).

111.5.5 Consideraciones éticas y regulatorias

Los ensayos clínicos para la selección de cepas no reactogénicas e inmunogénicas candidatas a vacuna oral contra el cólera se ajustaron estrictamente a todos los principios de la ética médica y científica, cumplieron con las reglas internacionales en este sentido y se realizaron de acuerdo con los principios de Buenas Prácticas Clínicas y la Declaración de Helsinki (**WHO, 2001**). Se presentó y se aprobó el protocolo de ensayos de reactogenicidad e inmunogenicidad por las autoridades reguladoras cubanas: Centro Estatal para el Control de Medicamentos (CECMED) y el Centro Nacional de Seguridad Biológica (CNSB). El protocolo se sometió a la consideración y aprobación del Comité de Ética del IPK y del Instituto Finlay. La participación voluntaria en los ensayos quedó conformada por escrito en la carta de consentimiento informado elaborada para este fin, según lo descrito en la última edición de la Declaración de Helsinki (**WHO, 2001**).

Tabla 2. Distribución de los ensayos clínicos de reactogenicidad e inmunogenicidad de cepas atenuadas de *V cholerae*.

Dosis /cepas	No. de Voluntarios inoculados/cepa	No. Voluntarios Placebos
10 ⁷ UFC/638	7	4
10 ⁷ UFC/1333	5	4
10 ⁸ UFC/638	6	4
10 ⁸ UFC/1333	5	4
10 ⁹ UFC/81	12	4
10 ⁹ UFC/638	38	23
10 ⁹ UFC/638T	9	4

III.5.6 Preparación y administración del inóculo

Se realizó la preparación y administración del inóculo según el PNO 12-176 (Anexo 2). Los voluntarios ingirieron primeramente 120 mL de bicarbonato de sodio al 1,33% y pasados 30 min., cada voluntario ingirió una dosis única del inóculo o el placebo, en 30 mL de la misma solución según correspondió.

Los voluntarios del grupo placebo recibieron bicarbonato de sodio que resultó indistinguible en apariencia del preparado vacunal. Para asegurar que la prueba transcurriera a doble ciegos, frascos idénticos que contenían el inóculo bacteriano o el placebo, fueron codificados por un monitor externo.

El investigador

clínico asignó una letra a cada voluntario y los códigos y las letras se hicieron coincidir aleatoriamente.

Los códigos fueron guardados por el monitor hasta el final de cada ensayo y de los estudios de laboratorio.

III.5.7 Monitoreo de reacciones adversas

Luego de administrarse el inóculo y durante los cinco días posteriores se observaron las reacciones

adversas tales como, diarreas, vómitos, fiebre, náuseas, meteorismo, dolor abdominal y malestar general.

Estas reacciones nos permitieron evaluar la seguridad y reactividad de las cepas administradas. Al quinto día de la inoculación se administró 300 mg de doxiciclina en dosis única.

Desde el momento de la inoculación y hasta el quinto día se colectaron cada una de las deposiciones de los voluntarios en recipientes plásticos las cuales fueron pesadas y evaluadas su consistencia, este último según una escala de 5 grados: grado 1: firme, grado 2: suave, grado 3: prácticamente líquida, grado 4: acuosa de color opaco, grado 5: agua de arroz (**Tacket et al, 1998**).

Los grados 1 y 2 son considerados variaciones normales de las heces, mientras los grados 3-5 son considerados patológicos. Se tomó una muestra de cada deposición en un recipiente estéril para el correspondiente estudio bacteriológico. El resto de las heces se descontaminaron con hipoclorito de sodio al 2% (20 g/L) durante 15 min. para que actuara la solución y posteriormente se autoclavearon.

Definición de diarrea reactiva: deposiciones de consistencia grado 3-5, que totalicen 200 g o más en 48 h o una de ellas de al menos 300 g (**Tacket et al, 1998**). Estas se clasifican en:

Ausente: 0

Ligera: < de 3 Kg

Moderada: 3-5 Kg

Severa: > 5 Kg

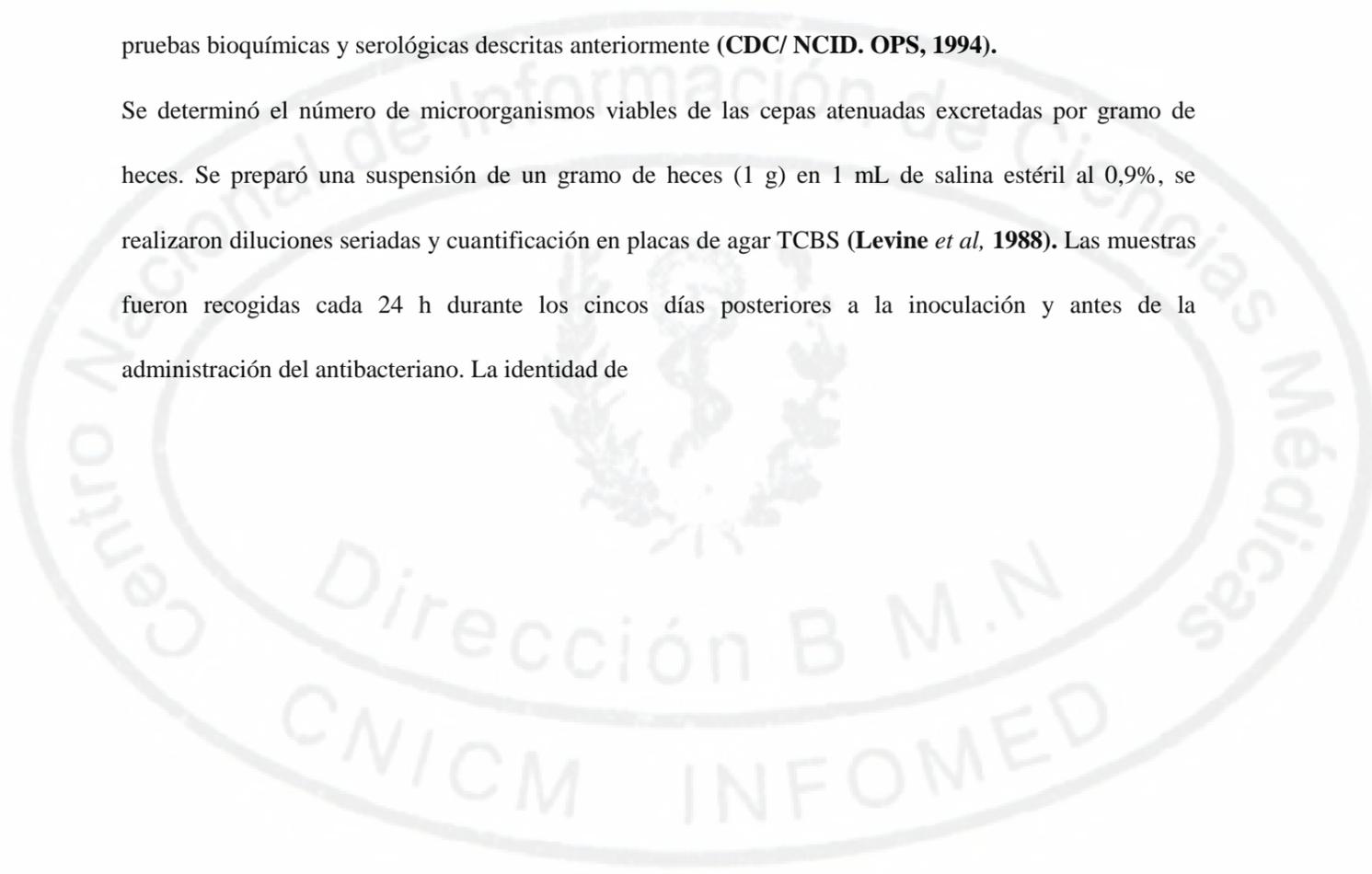
III.5.8 Aislamiento, identificación y estabilidad genética de *V cholerae* excretados en heces de voluntarios

Se realizó un coprocultivo por voluntario, el que se repitió cada 24 h después de la inoculación por 5 días

y tres días después de la administración del antibacteriano.

Para el aislamiento e identificación de las cepas atenuadas, se sembraron directamente las muestras de las heces en TCBS y APA, con incubación a 37°C por 24 h y 6-8 h, respectivamente. EL APA se resembró en agar TCBS. Las colonias con apariencia de *V. cholerae* en TCBS fueron sometidas a las mismas pruebas bioquímicas y serológicas descritas anteriormente (CDC/ NCID. OPS, 1994).

Se determinó el número de microorganismos viables de las cepas atenuadas excretadas por gramo de heces. Se preparó una suspensión de un gramo de heces (1 g) en 1 mL de salina estéril al 0,9%, se realizaron diluciones seriadas y cuantificación en placas de agar TCBS (Levine *et al*, 1988). Las muestras fueron recogidas cada 24 h durante los cinco días posteriores a la inoculación y antes de la administración del antibacteriano. La identidad de



las colonias se determinaron por aglutinación con antisuero polivalente 01, monovalentes Ogawa o Inaba (Murex Biotech Ltd) y expresión del gen reportero *celA* en placas ALB.

Para estudiar la estabilidad genética de las cepas atenuadas administradas a los voluntarios después de su paso por el tracto gastrointestinal, se utilizaron las pruebas de RCP y el Polimorfismo de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (PLFR). Para la RCP se siguió la metodología anteriormente descrita (CDC/NCID. OPS. 1994).

Para la prueba del PLFR, el ADN cromosomal de cada uno de los aislamientos fue purificado según Popovic *et al*, 1993. Se digirió el ADN con la enzima *Bgl*I (10U/mL) [Promega]. El análisis de restricción se llevó a cabo por electroforesis submarina en gel de agarosa (Promega) al 0,8% previamente teñido con bromuro de etilidionio (0,5 µL/mL). La corrida se mantuvo a bajo voltaje (25 V) durante toda la noche. Previamente a la transferencia a la membrana de nylon (Hybond N+), el gel se puso en contacto con luz ultravioleta durante 5 min., con solución de depurinación (HC1 0,25 M) durante 10 min. y con solución desnaturalizadora (NaOH 0,4 M) por 20 min. en agitación.

El contenido del gel se transfirió a la membrana de nylon por Southern Blot y se dejó toda la noche en solución amortiguadora de transferencia (NaOH 0,4 M). El ADN transferido a la membrana se fijó a 80°C, 2 h. Se conservó a 4°C hasta su uso.

Se utilizó como sonda para la hibridación una secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S del ARN ribosomal. El mareaje de la sonda se realizó según lo descrito en el estuche comercial del sistema de detección y mareaje directo de ácidos nucleicos ECL (Amersham).

Para la hibridación se colocó la membrana en el interior de un tubo que contenía la solución de prehibridación ECL (Amersham), se mantuvo en agitación media hora a 42°C en el homo de hibridación.

Luego se añadió la sonda marcada a la solución de prehibridación y se dejó hibridando con agitación toda

la noche a 42°C.

La detección se realizó en un cuarto con luz adecuada, utilizando mezcla de los dos reveladores del sistema ECL durante 1 min. a temperatura ambiente. La membrana se colocó en un cassette para film de rayos X (ECL), en el que estuvo expuesta alrededor de 30 min. y posteriormente se procedió al revelado del film.

II.5.9 Evaluación de la inmunogenicidad

Las muestras de sangre total se tomaron los días 0 y 14, posteriores a la inoculación por punción venosa. Diez mL de sangre se centrifugaron a 1700 x g a 4°C durante 10 min. para la obtención del suero. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta su uso para la determinación de anticuerpos vibriocidas y de anticuerpos IgA anti-LPS Ogawa o Inaba por ELISA.

En ambas técnicas se siguió la misma metodología descrita anteriormente en el ensayo de inoculación intraduodenal, con la diferencia de que para el ELISA de anticuerpos IgA anti- LPS Ogawa o Inaba se empleó el conjugado anti-IgA humano (Sigma) (**Black et al, 1987; Kabir et al, 1987**).

Los criterios de seroconversión se definieron como un incremento de la respuesta inmune de anticuerpos vibriocidas, de cuatro veces el título inicial a los 14 días de inmunizado y de dos veces en el valor del título de anticuerpos IgA anti-LPS Ogawa o Inaba **en el ELISA (Tacket et al, 1998)**.

III.6 Obtención de altos rendimientos del IFA de un candidato vacunal a escala de laboratorio

De los estudios anteriores se seleccionaron las cepas atenuadas 638 y 1333 como candidatas más promisorias para la producción de una vacuna viva oral contra el cólera del biotipo El Tor, serotipos Ogawa e Inaba respectivamente.

Se diseñó el proceso tecnológico para la obtención de IFA a partir de la cepa 638 porque es el candidato vacunal del biotipo y serotipo predominante desde el punto de vista epidemiológico (**Bajaj et al, 2001**).

La obtención de biomasa en zaranda y fermentador se realizó como sigue: a partir de un vial del lote de siembra de trabajo de la cepa atenuada 638, se inocularon los primeros cultivos (precultivos) en tubos con 15 mL de medio TP, los que se incubaron a 37°C de 18 a 24 h. Posteriormente, se inocularon 3 mL del precultivo en erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio y se incubaron en zaranda (Orbital INFORS) a igual temperatura por 4 h a 200 r.p.m. Con este cultivo de 4 h se inoculó el fermentador de 7 L (Chemap A.G. CF3000), con 5 L de volumen de medio.

El volumen de inóculo adicionado al fermentador fue del 4 al 6% del volumen total (5L), para alcanzar una absorbancia inicial aproximadamente de 0,04 a una longitud de onda (λ) de 600 nm. Se fijaron los siguientes parámetros: temperatura a 37°C, agitación 400 rpm, pH 7,4; aireación 0,3 vvm, 100% de oxígeno disuelto inicial, tiempo de cultivo de 5 h. Se realizaron 12 procesos con adición de glucosa a una concentración de 7,5 g/L a las 0 y 3 h. La cosecha del IFA de fermentación se realizó por centrifugación, fijando los parámetros de centrifugación en 30 min. a 17 700 g a 4 °C.

La caracterización del proceso tecnológico a escala de laboratorio se realizó como se indica en el diseño de proceso en el ciclo investigación-desarrollo-productivo según **Talavera y Pérez 2003**, así como el sistema de análisis descrito y documentación. La información fue tomada a partir de los registros del laboratorio de diez procesos de obtención de IFA a escala fermentativa.

Al final del tiempo de incubación de los precultivos, se tomaron muestras para la prueba de pureza por coloración de Gram. En los cultivos en zaranda y fermentador se tomaron las muestras cada una hora desde el tiempo 0 (inoculación), hasta las 5 h de cultivo y se les determinó la absorbancia con λ de 600 nm en un espectrofotómetro (Pharmacia LKB- Ultrospec III), se realizó conteo por dilución y coloración

de Gram. En el cultivo en fermentador se determinaron, además, con igual frecuencia los azúcares reductores solubles por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico de Summer y Somer (1944) y modificado por Weller (1959), así como los demás parámetros que caracterizan el proceso fermentativo como la velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación (**Villaverde y Martínez, 1989**).

111.7 Evaluación de tres mezclas lioprotectoras

La biomasa procedente de la centrifugación fue resuspendida con las soluciones lioprotectoras A, B y C (A: mezcla de proteínas, aminoácidos y polioles; **B**: mezcla de polipéptidos, azúcares, aminoácidos y polioles y C: mezcla de azúcares, polioles y aminoácidos), para el posterior llenado de bulbos multidosis. Se liofilizaron los bulbos en un equipo USIFROID SMH-15, Francia. Una vez concluido el proceso, los bulbos se sellaron al vacío, almacenándose a 8°C.

A cada lote liofilizado se le realizaron las siguientes pruebas de control del producto final: pureza por coloración de Gram, conteo de viables, estudiándose la estabilidad en el tiempo, colonización en el modelo de ratón neonato e inmunogenicidad en el modelo de inoculación intraduodenal en conejos adultos, identidad de producto por pruebas bioquímicas, serológicas e identificación del marcador vacunal *cel A* y seguridad por RCP como se describió anteriormente.

Se establecieron las especificaciones con los límites de aceptación de las pruebas de control consideradas en este trabajo, para asegurar la calidad y consistencia del proceso productivo en fase de desarrollo de la vacuna oral contra el cólera (Anexo 3).

111.8 Análisis estadístico

El 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 estadísticas del 0,05 para

todas las comparaciones.

La caracterización microbiológica y la susceptibilidad bacteriana se describieron usando gráficos y tablas estadísticas. Para el análisis de la estabilidad de la cepa 638 conservada a -70°C se usó la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon, para mostrar diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos.

El análisis de la DL_{50} , el índice de fluido acumulado y de colonización intestinal se usó la prueba de la suma de rangos de Wilcoxon, para mostrar diferencias estadísticamente significativas entre las 10 cepas.

Para el análisis de la respuesta inmunológica se calcularon los títulos medios geométricos. Se usó ANOVA simple para comparar la media de los logaritmos de los títulos obtenidos tanto por ELISA como por el ensayo vibriocida.

Similares análisis se realizaron para los datos de los ensayos clínicos (aquí se hicieron comparaciones entre cepas usando la misma dosis). Se tabularon las reacciones adversas encontradas y se hicieron comparaciones entre cepas usando la prueba exacta de Fisher siempre que los datos lo permitieron.

Cuando se analizó la seroconversión en la respuesta inmunológica tanto por ELISA como por el ensayo vibriocida, se definió como un incremento de al menos cuatro veces del título final comparado con el título inicial. Se estimaron los porcentajes de seroconversión en cada grupo y se realizaron comparaciones de los porcentajes de cada cepa en una misma dosis. Para estas comparaciones se usó la prueba X Cuadrado o la de Fisher según lo permitieron los datos.

Los resultados de los cultivos en fermentación se expresaron con los estadígrafos descriptivos (promedios y error del promedio) calculado con el paquete estadístico

Microsoft Excel y para la determinación del modelo matemático, se aplicó el programa de Cinética de las fermentaciones de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana (**Pérez *et al*, 1992**)

IV. RESULTADOS

IV.1 Confección de los lotes de siembra de trabajo de las cepas modificadas genéticamente. Pruebas de control microbiológico

Cumpliendo con los principios básicos de las BPL y BPP, en el presente trabajo se elaboraron los lotes de siembra de trabajo de las cepas candidatas a vacuna oral contra el cólera modificadas genéticamente de *V. cholerae* del serogrupo 01 biotipo El Tor, serotipos Inaba u Ogawa (81, 638, 638T, 413 y 1333) y del serogrupo 0139 (251a y L911), (tabla 1).

Los lotes de siembra de trabajo se prepararon a partir de los lotes de siembra de referencia liofilizados, se realizó el segundo pase de estas cepas después de obtenidas por técnicas de ingeniería genética en el laboratorio de Biología Molecular del CNIC, considerándose los requisitos referidos al personal, la instalación, la identificación y el almacenamiento de los viales, según la metodología establecida en el PNO 20-036, (Anexo 1).

Al observar las células de las cepas atenuadas al microscopio óptico utilizando la técnica de coloración de Gram, se observaron bacilos Gram-negativos con morfología de coma bacilo en la mayoría de las cepas, la morfología bacilar de las cepas 63 8T y L911 cambió con respecto a la de sus cepas parentales, observándose como bacilos rectos alargados.

En la Tabla 3 se observa que independientemente de la manipulación genética realizada, todas las cepas atenuadas fueron indistinguibles en pruebas bioquímicas a sus cepas parentales.

Tabla 3. Características bioquímicas de las cepas modificadas genéticamente de *Vibrio cholerae*.

Prueba	% de cepas positivas
KIA	100 (K/A, sin gas, sin H ₂ S)
LIA	100 (K/K, sin gas, sin H ₂ S)
Hilo mucoide	100
Oxidasa	100
Lisina	100
Arginina	0
Omitina	100
Voges-Proskauer	100
Crecimiento en 0 % de Na ₂ CO ₃	100
Crecimiento en 1 % de Na ₂ CO ₃	100

Nota: KIA: Agar Hierro Kligler y LIA: Agar Hierro Lisina K/A= alcalinidad/acidez; K/K= alcalinidad/alcalinidad

Al examinar las cepas estudiadas al microscopio óptico por la técnica de fresco se observaron bacterias móviles, con excepción de la cepa L911 del serogrupo 0139 que es no mótil a diferencia de su cepa parental 251 a.

A través de la siembra en agar semisólido se pudo corroborar la movilidad de las cepas del serogrupo 01 estudiadas, lo que se evidenció por un crecimiento radial alrededor del sitio de inoculación, excepto para la cepa atenuada L911.

El flagelo polar se presenció a través de ME en todas las cepas atenuadas de ambos serogrupos (Figura 1).

Al observar los cortes ultrafinos por microscopía electrónica de transmisión, de la superficie de las cepas atenuadas del serogrupo 0139, se visualizó una cápsula electrodensa gruesa, marcada con ferritina, asociada a la pared celular de la cepa virulenta MD012 (control positivo), con un grosor de la zona externa al límite citoplasmático de alrededor de 35 a 40 nm, a diferencia de la cepa VC12 (control negativo) del serogrupo 01 cuyo grosor de la superficie celular

midió 20 nm, con ausencia del mareaje con ferritina. En las cepas candidatas vacunales 251a y L911 se apreció una capa electrodensa fina asociada a la pared celular de las bacterias, teñidas con ferritina, rodeando completamente las células (Figura 2).

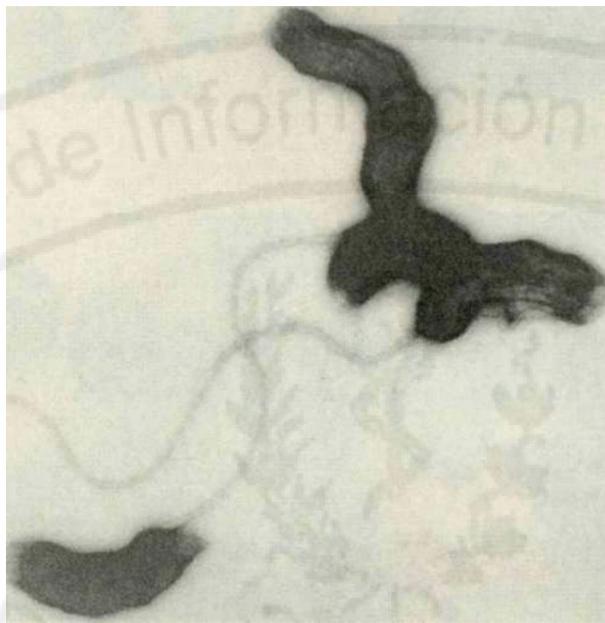


Figura 1. Micro fotografía Electrónica de Transmisión del flagelo polar de la cepa modificada genéticamente 638 de *Vibrio cholerae* 01, procesada mediante tinción negativa con acetato de uranilo acuoso al 5 %. Barra 1µm

El uso de antisueros es uno de los métodos más rápidos y específicos para la identificación de *V. cholerae* 01 y 0139. Todas las cepas atenuadas estudiadas reaccionaron de forma intensa y rápida con los antisueros correspondiente a sus cepas parentales.

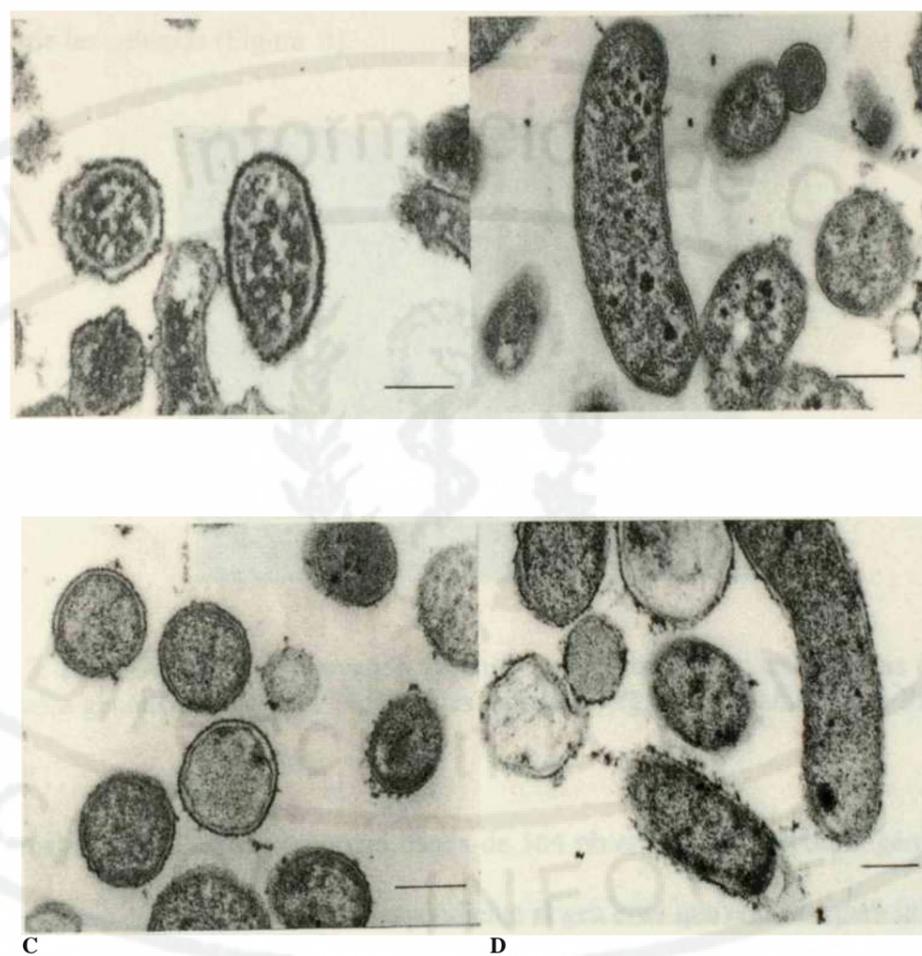


Figura 2. Microfotografías Electrónicas de Transmisión de las cápsulas de cepas modificadas genéticamente de *Vibrio cholerae* del serogruppo 0139, teñidas con ferritina policationica. (A. MD012, B. VC12, C. 251a y D. L911). Barra, 500nm.

Las cepas modificadas 638, 638T, 1333 y L911 de segunda y tercera generación, a las cuales se le insertó a nivel cromosómico el gen *celA* del *C. thermocellum* como marcador vacunal, expresaron la enzima endoglucanasa A, la cual produjo la degradación de la carboximetil celulosa, visualizándose a través de la aparición de un halo traslúcido alrededor de las colonias (Figura 3).

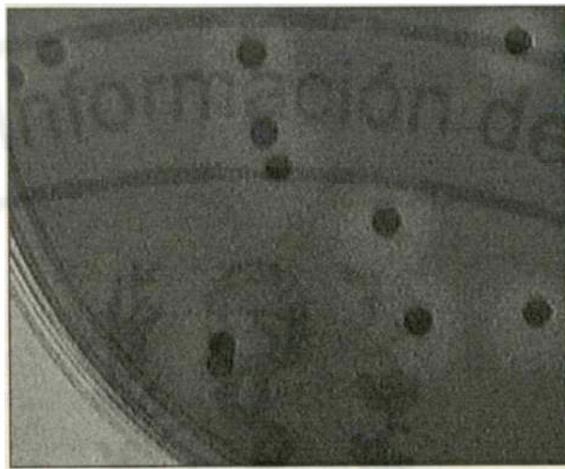


Figura 3. Identificación del marcador vacunal, endoglucanasa A en colonias de *Vibrios* modificadas genéticamente *celA*⁺, cultivadas en medio Agar LB y teñidas con Rojo Congo al 1 %.

En la prueba de RCP se observó una banda de 564 pb en la cepa hipertoxigénica 569 B, utilizada como control positivo, correspondiente al gen *ctxA* que codifica para la subunidad A de la toxina colérica. Esta banda no se observó en el producto amplificado del ADN cromosómico de las cepas modificadas genéticamente, a las cuales se les eliminó el profago CTX(j), que incluye los genes que codifican para la toxina de cólera (Figura 4).

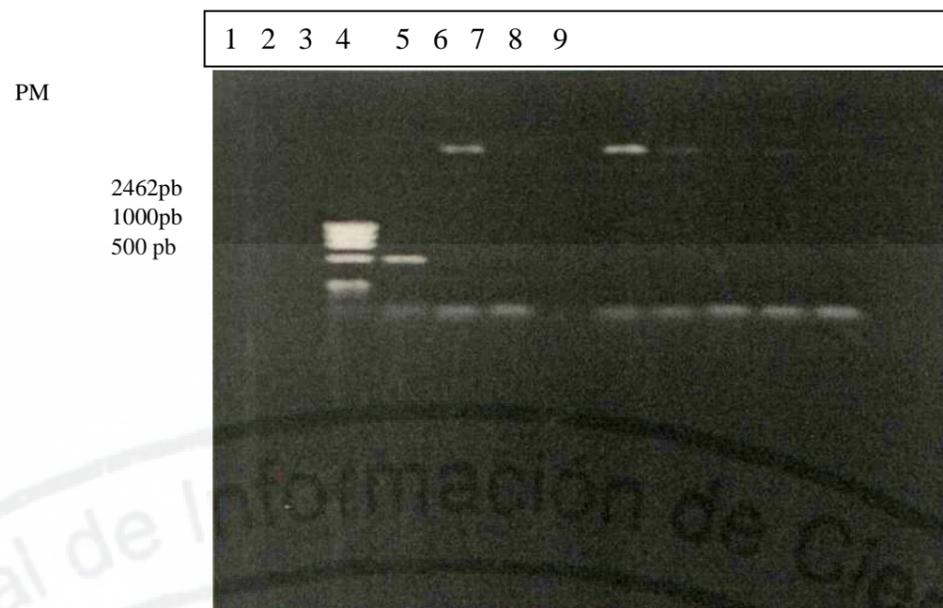


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación por RCP de la subunidad A de la toxina colérica. Cepas modificadas genéticamente de los serogrupos O1 y O139. Líneas: 1 (marcador de peso molecular fago (λ) X174 digerido con *Hae* III); 2 (Control positivo: cepa 569B); 3 al 8 (corresponden a las cepas: 81, 638, 638T, 1333, 251a y L911); 9 (Control de reactivos: agua estéril)

IV.2 Selección de cepas atenuadas, no reactogénicas e inmunogénicas por pruebas biológicas en modelos animales y ensayos clínicos IV.2.1 Modelos animales

Los resultados del cálculo de la DL_{50} en la evaluación de la virulencia de las cepas modificadas genéticamente de primera, segunda y tercera generación difirieron significativamente con respecto a sus cepas parentales ($p < 0,05$), alcanzando las cepas modificadas, valores de dos a tres órdenes superiores (Figura 5). Estas cepas cumplieron con los criterios de aceptación para esta prueba de control, ya que los valores de DL_{50} fueron mayores de 10^6 UFC, lo que permite considerarlas como cepas atenuadas.

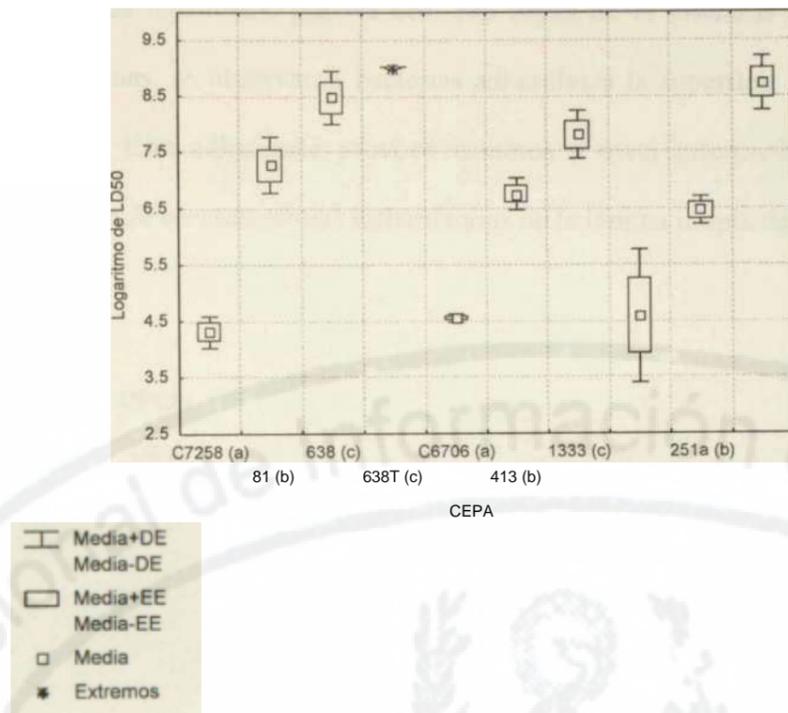


Figura 5. Dosis Letal 50 (DL_{50}) de cepas de *V. cholerae* candidatas a vacuna oral contra cólera y sus cepas parentales en el modelo del ratón neonato. Cada valor representa la media de tres determinaciones con cada cepa. Las letras significan: a. primera, b. segunda y c. tercera generación de cepas modificadas genéticamente.

Independientemente de la modificación genética realizada a las cepas de *V. cholerae* de ambos serogrupos 01 y 0139, no se afectó la capacidad de colonizar el intestino de ratones neonatos. No existieron diferencias significativas entre las cepas parentales y las modificadas genéticamente ($p > 0,05$). La cepa L911 y la cepa auxotrófica 638T (01), en las que se produjo un cambio de su morfología de coma-bacilo a bacilo más alargado y recto, colonizaron el intestino delgado de ratones neonatos, de igual forma que sus parentales 251a y 638, respectivamente (Figura 6). Todas las cepas modificadas cumplieron con los criterios de aceptación para esta prueba, debido a que su concentración se incrementó entre 10^2 - 10^3 UFC con respecto al inóculo inicial.

Al observar al microscopio óptico los cortes histológicos, realizados a la mucosa intestinal de ratones inoculados por vía oral con cepas de *V. cholerae* virulentas y genéticamente modificadas, se observaron bacterias adheridas a la superficie de las células del intestino delgado. Esta adherencia provocó cambios a nivel intestinal, edema en las criptas y presencia de escasas células inflamatorias de la lámina propia de la mucosa.

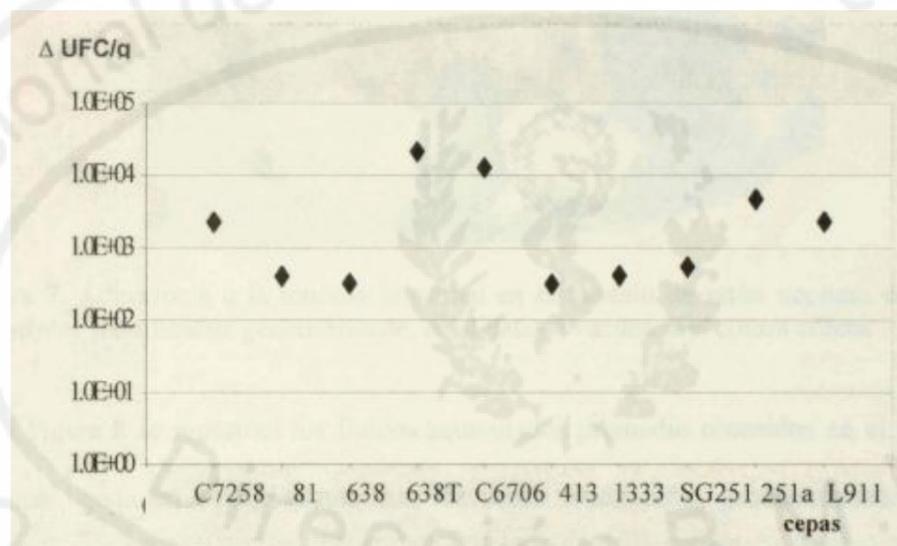


Figura 6. Capacidad colonizadora de cepas de *V. cholerae* 01 y 0139 modificadas genéticamente y sus cepas parentales en el modelo del ratón neonato, expresada como el incremento de las UFC del inóculo administrado, con respecto a las UFC recobradas por gramo de intestino. Cada valor representa la media de las tres determinaciones con cada cepa.

Mediante la técnica de inmunoperoxidasa, utilizando anticuerpos policlonales anti-células enteras de los serogrupos 01 y 0139, se evidenció en muestras de intestinos una reacción positiva frente a los anticuerpos específicos de ambos serogrupos. Se apreciaron reacciones

positivas en la luz del órgano y encima de la capa superficial del epitelio intestinal, con la presencia de abundantes bacterias (Figura 7). Esto se corroboró con los aislamientos microbiológicos obtenidos en los cultivos realizados, en los que se identificó por bioquímica y serología la presencia de *V. cholerae* de los serogrupos O1 y O139.



Figura 7. Adherencia a la mucosa intestinal en el modelo de ratón neonato de cepas de *V. cholerae* modificadas genéticamente, candidatas a vacuna oral contra cólera

En la Figura 8 se muestran los fluidos acumulados promedio obtenidos en el modelo de intestino ligado en conejo adulto con las cepas modificadas genéticamente, las cepas epidémicas y el control negativo (cepa de *E. coli* K-12). Se observaron diferencias estadísticas entre las cepas modificadas de primera, segunda y tercera generación y las cepas parentales epidémicas ($p < 0,05$). No se observaron diferencias entre las cepas modificadas y la cepa de *E. coli* K-12 ($p > 0,05$), con valores inferiores a 1 mL/cm. Esta prueba en unión a la de RCP fueron controles de seguridad, que nos dieron información acerca de la

toxigenicidad y atenuación de las cepas modificadas genéticamente.

Los resultados del modelo de conejo adulto inoculado por vía intraduodenal, para medir la capacidad inmunogénica de las cepas modificadas genéticamente nos reportaron los TMG de anticuerpos vibrioideas e IgG anti LPS que se muestran en la Tabla 3. Los títulos corresponden a los 14 días después de la inoculación, que es el día de máxima respuesta serológica.

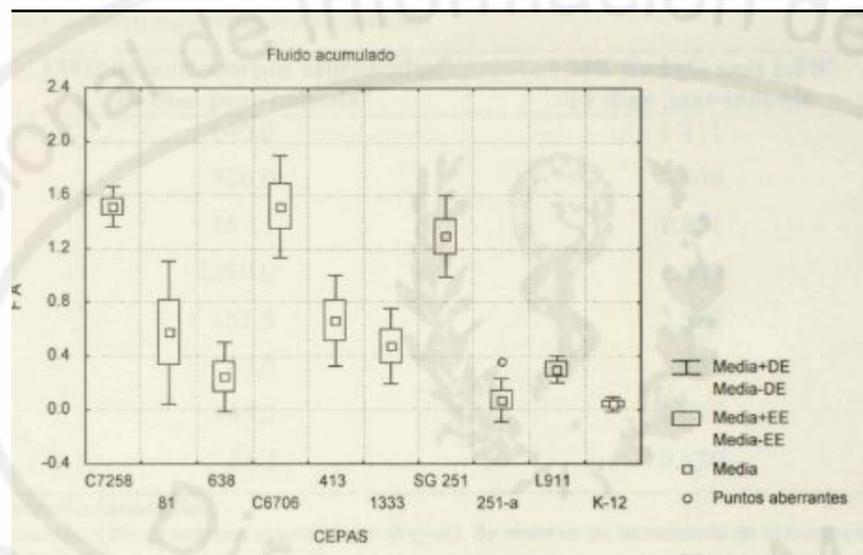


Figura 8. Cuantificación del Fluido Acumulado (FA) mL/cm en el modelo de intestino ligado (ileal loop) en

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de anticuerpos vibrioideas inducidos por las cepas parentales y las atenuadas ($p > 0,05$), excepto las cepas 413 y L911 donde los títulos de anticuerpos vibrioideas inducidos fueron más bajos que el resto. Resultados similares se obtuvieron en los títulos de anticuerpos IgG anti LPS, donde tampoco se encontraron diferencias en la inducción de anticuerpos por las cepas parentales y atenuadas ($p > 0,05$). La cepa L911 no cumplió con el criterio de aceptación para esta prueba debido a la baja cantidad de anticuerpos evocados.

Tabla 3. Título Medio Geométrico (TMG) de anticuerpos vibriocidas e IgG anti LPS en conejos inoculados por vía intraduodenal con cepas de *V. cholerae* modificadas genéticamente y sus correspondientes parentales.

Cepas	TMG de anticuerpos vibriocidas ³ 14 días post-inóculo ^b	TMG de IgG anti LPS ^a 14 días post-inóculo
C7258	640.0	1.811
81	320.0	2.400
638	557.1	1.801
63 8T	1280.0	1.600
C6706	452.5	2.522
413	40.0	1.622
1333	445.2	1.017
L911	56.5	0.630

a: TMG: Título Medio Geométrico.

b: 14 días post-inóculo, (día de máxima respuesta serológica). Se observa un incremento de al menos cuatro veces el título inicial.

c: Cada valor representa el promedio de tres animales.

Los TMG de anticuerpos vibriocidas del día 0 fueron < 20 y de IgG anti-LPS < 0.4

IV.2.2 Ensayos clínicos

Todas las cepas modificadas genéticamente resultaron atenuadas e inmunogénicas en las pruebas biológicas en modelos animales a excepción de la cepa L911, que fue no inmunogénica en el modelo de inoculación intraduodenal. Por este criterio todas las cepas fueron elegibles para ser evaluadas en ensayos clínicos y corroborar su seguridad, inmunogenicidad y capacidad de protectora.

En la Tabla 4, aparece la ocurrencia de diarrea reactógena según la dosis administrada de las cepas atenuadas.

Tabla 4. Respuesta clínica y bacteriológica de los voluntarios inmunizados con las cepas atenuadas a diferentes dosis.

Dosis	Cepa	No. de Voluntarios con diarrea ² > 200 g/no. total (%)	Episodio por voluntarios con diarrea	Grado	Media del peso promedio (g)	No. de voluntarios con MG ³ de los cultivos positivos en las heces/no. total positivos	MG ³ de las UFC/g cultivos positivos
10 ⁷	638	0/7 (0)	0	-	-	3/7	7,10X10
	1333	0/5 (0)	0	-	-	5/5	7,63X10
10 ⁸	638	1/6(16)	1	III	680	6/6	3,63X10 ⁴
	1333	0/5 (0)	0	-	-	5/5	2,88X10
10 ⁹	81	6/12 (50)	(8,11,2, 1,2, 5)	III	200	12/12	1,26X10 ⁵
	638	2/38 (5.2)	(1,2)	III	275	29/38	1,90x10 ²
	638T	0/9 (0)	0	-	-	3/9	1,63X10

1. Dosis administradas expresadas en UFC

2. Diarrea reactiva: deposiciones de consistencia grado 3-5, que totalicen 200 g o más en 48 h o una de ellas de al menos 300 g.

3. MG. Media Geométrica

Ninguno de los placebos con la dosis 10⁷ y 10⁸ presentó signos y síntomas adversos encontrados en los voluntarios inoculados.

Un placebo del ensayo clínico donde se inoculó la dosis 10⁹ presentó una diarrea grado III, 180 g pero no se detectó cultivo positivo en las heces.

Ningún voluntario que ingirió placebo excretó *V cholerae* en las heces. No hay diferencias significativas en la Media Geométrica (MG) de las UFC de los cultivos positivos entre 638 y 1333 ($p > 0,05$).

Los síntomas tales como dolor abdominal, meteorismo, acidez, dolor de cabeza, vómitos y fiebre fueron de corta duración y de carácter leve con ambas cepas. No se detectaron

diferencias significativas con respecto a los síntomas ($p > 0,05$) entre los que ingirieron las cepas atenuadas y los que recibieron placebo (Datos no mostrados).

Cuando se aumentó la concentración del inóculo a 10⁸ UFC se presentó un caso con diarrea reactiva grado III, con un sólo episodio y un peso promedio mayor de 300 g entre los que ingirieron la cepa 638, no así con la 1333. No hubo diferencia significativa entre la MG de las UFC de los cultivos positivos de ambas

cepas excretadas por los voluntarios ($p > 0,05$). No hubo diferencia ($p > 0,05$) con respecto a los otros síntomas clínicos analizados entre los voluntarios que ingirieron la cepa y los que ingirieron placebo. Con una dosis de 10^9 UFC, se evaluaron tres cepas atenuadas de primera, segunda y tercera generación, todas del mismo serogrupo. Con la cepa 81 (parental de la 638) se presentaron 6 casos con diarrea reactogénica de los 12 que la ingirieron, que, aunque el peso promedio de la diarrea fue menor de 300 g, con un rango de 1-11 episodios de diarreas por voluntario antes de las 48 horas. En los voluntarios que ingirieron la cepa 638 (parental de la 638T), 2 de 38 presentaron diarrea reactogénica. Cuando se administró la cepa auxotrófica 63 8T de tercera generación ningún voluntario tuvo diarrea.

Hay diferencias significativas entre las cepas 81 y 638 con respecto a la diarrea reactogénica ($p = 0,08$) y 81 y 638T ($p = 0,07$). No hubo diferencias significativas en cuanto a la ocurrencia de la diarrea, entre los inoculados con las cepas 638, 638T y los placebos ($p > 0,05$).

Todos los voluntarios inoculados con la cepa 81 excretaron cultivos positivos de la cepa. La cepa 638 fue aislada de 29 de los 38 voluntarios y con la 63 8T, 3 de 9 tuvieron cultivos positivos en sus heces. La MG de los cultivos positivos de la 81 fue superior a los de las cepas 638 y 638T, detectándose diferencias significativas entre 81 y las dos cepas restantes ($p < 0,01$). Ninguno de los placebos excretaron cultivos positivos de *V. cholerae*.

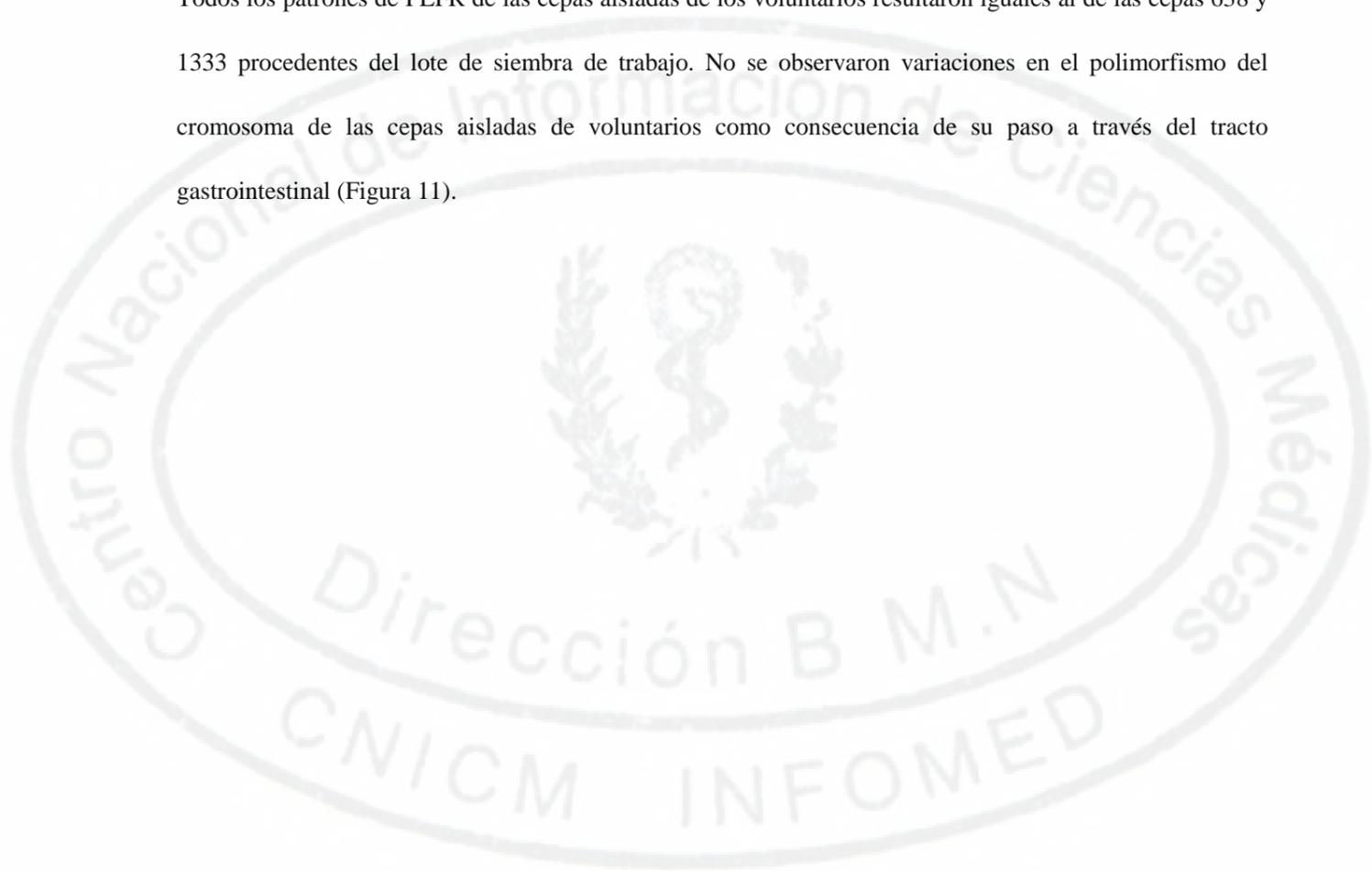
El resto de las reacciones adversas fueron de corta duración y de carácter leve cuando se administró la dosis de 10^9 y no se detectaron diferencias significativas entre los grupos inoculados con las cepas ni entre los voluntarios inoculados y los placebos ($p > 0,05$).

Los cultivos positivos en las heces se identificaron por pruebas bioquímicas y serológicas como *V. cholerae* O1 de los serogrupos Ogawa o Inaba y las cepas de segunda y tercera generación se identificaron, además, por la presencia del marcador. Las cepas evaluadas no se aislaron en las heces de los voluntarios que

recibieron placebo ni tampoco después de la administración de la doxiciclina.

Con la prueba de RCP se corroboró que las cepas atenuadas después de pasar por el tracto gastrointestinal de los voluntarios, no adquirieron los genes de la toxina colérica ya que no se identificó el gen de la subunidad A de la toxina colérica en ninguna de las cepas aisladas de heces (Figura 9 y 10).

Todos los patrones de PLFR de las cepas aisladas de los voluntarios resultaron iguales al de las cepas 638 y 1333 procedentes del lote de siembra de trabajo. No se observaron variaciones en el polimorfismo del cromosoma de las cepas aisladas de voluntarios como consecuencia de su paso a través del tracto gastrointestinal (Figura 11).



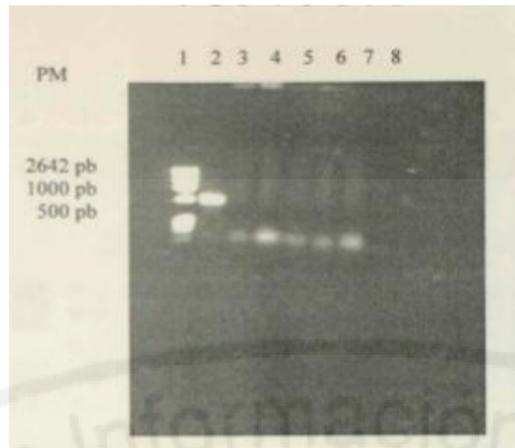


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de la amplificación por RCP de la subunidad A de la toxina colérica de la cepa 638 excretada por voluntarios. Líneas: 1 (marcador de peso molecular fago (λ X174 digerido con *Hae* III); 2 (Control positivo: cepa 569B); 3-7 (cepa 638 excretada por diferentes voluntarios) y 8 (Control de reactivos: agua estéril).

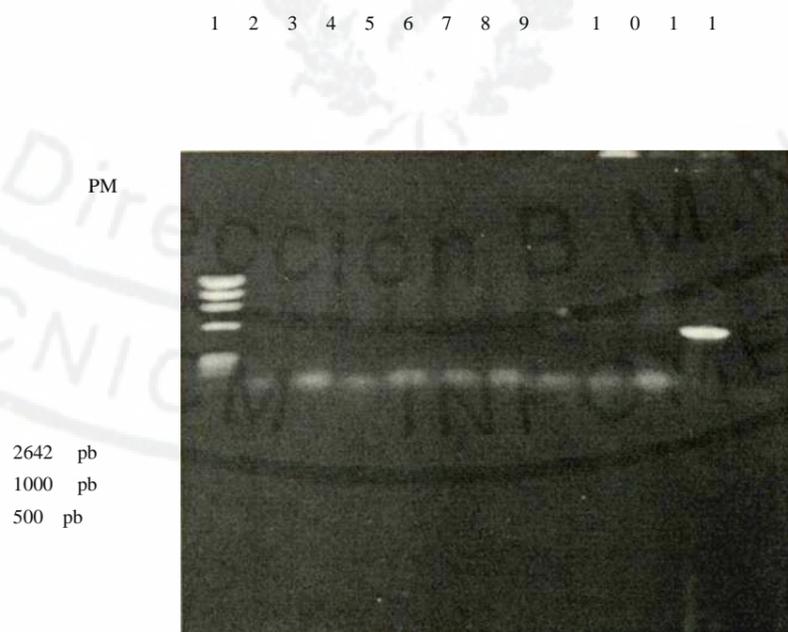


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de la amplificación por RCP de la subunidad A de la toxina colérica de la cepa 1333 excretada por voluntarios. Líneas: 1 (marcador de peso molecular fago (λ X174 digerido con *Hae* III); 2-9 (cepa 1333 excretada por diferentes voluntarios); 10 (Control de reactivos: agua estéril) y 11 (Control positivo: cepa 569B).

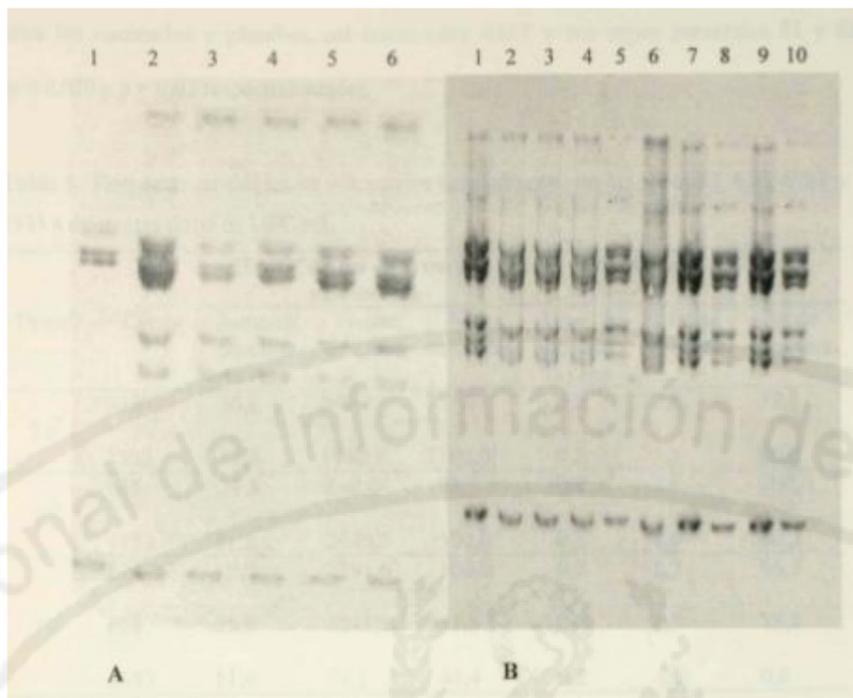


Figura II. Patrones de PLFR de las cepas aisladas de voluntarios inmunizados con las cepas 638 (A) y 1333 (B). Líneas de la Fig. A: 1 cepa 638 del lote de siembra de trabajo, 2- 6 cepas excretadas por voluntarios inmunizados con la cepa 638. Líneas de la Fig. B: 1 cepa 1333 del lote de siembra de trabajo, 2-11 cepas excretadas por voluntarios inmunizados con la cepa 1333.

En la tabla 5 se muestran los resultados de inmunogenicidad en voluntarios después de 14 días de inmunizados, con dosis diferentes de las cepas atenuadas 81, 638, 638T y 1333.

En cuanto a los valores de TMG de anticuerpos vibriocidas e IgA anti-LPS por ELISA, no se encontraron diferencias significativas entre las cepas atenuadas 81, 638 y 1333, independientemente de la dosis administrada. Sí se encontraron diferencias significativas

entre los vacunados y placebos, así como entre 63 8T y sus cepas parentales 81 y 638 ($p = 0,020$ y $p = 0,03$ respectivamente).

Tabla 5. Respuesta serológica de voluntarios inmunizados con las cepas 81, 638, 638T y 1333 a diferentes dosis de UFC/mL

Dosis ¹	Cepas	TMG ²	de los anticuerpos vibriocidas			TMG de IgA anti-LPS				
			Antes de inocular cepa	de la	14 días después	% de seroconv.	Antes de inocular cepa	de la	14 días después	% de seroconv.
10 ⁷	638	36,2			390,1	57,1	0,3		2,8	57,1
	1333	17,4			1940,1	100,0	0,2		1,5	80,0
10 ⁸	638	31,8			640,0	83,3	0,2		2,6	100,0
	1333	11,5			2940,7	100,0	0,2		1,6	80,0
10 ⁹	81	15,0			2281,0	100,0	0,2		1,2	66,7
	638	28,8			1211,8	81,6	0,2		1,5	73,7
	638T	11,6			74,1	44,4	0,2		0,3	0,0

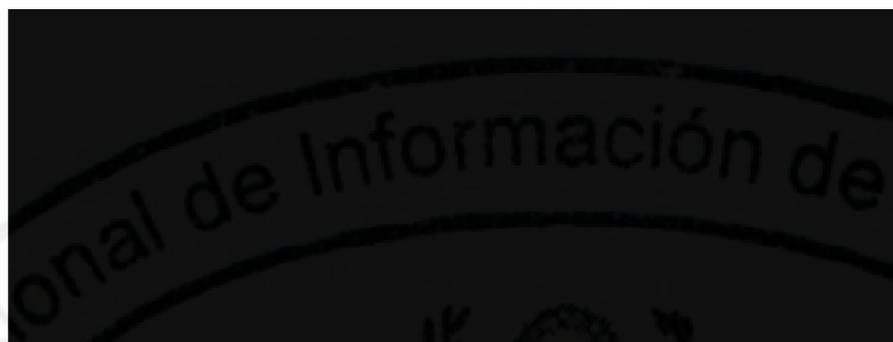
1. Dosis expresada en UFC

2. TMG. Título Medio Geométrico Ninguno de los placebos seroconvirtieron

Los voluntarios que satisficieron el criterio de seroconversion alcanzaron relativamente altos títulos de anticuerpos vibriocidas (> 640), excepto para la cepa 638 en la dosis más baja (10⁷) y la cepa 638T (10⁹) cuyos valores alcanzados fueron 390,1 y 74,1 respectivamente y porciento de seroconversion de 57,1 y 44,4, respectivamente.

IV. 3 Obtención de altos rendimientos de IFA de un candidato vacunal a escala de laboratorio

Se obtuvo un rendimiento en biomasa promedio del orden de 10^{10} UFC/mL, aproximadamente, en las diez fermentaciones realizadas. El medio de cultivo empleado permitió que la cepa 638 se preparara fisiológicamente y se activara metabólicamente en los diferentes pases desde precultivo hasta inoculo,



fermentativo (Figura

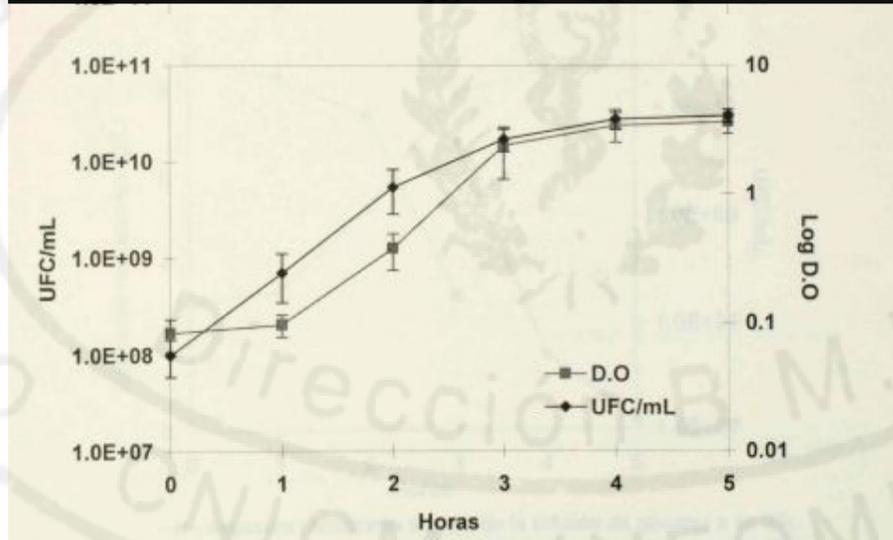


Figura 12. Curva de crecimiento promedio $n=10$ de las cepas 638 en medio TP, en fermentador de 7 L según los valores de D.O y de UFC/mL.

En la Figura 13 se demuestra el comportamiento típico de consumo de sustrato por el microorganismo, cuando se adicionan las dos dosis de glucosa, apreciándose que a medida que aumenta el crecimiento en el tiempo, los niveles de azúcares reductores disminuyen, fundamentalmente en la fase exponencial, donde se alcanzaron concentraciones bacterianas del orden de $10^{10} \pm 6,5 \times 10^9$ UFC/mL y valores de azúcares reductores de $3,10 \pm 0,28$ g/L con respecto al valor promedio inicial de $8,7 \pm 0,39$ (Figura 13) antes de la segunda dosificación, con consumo total de la glucosa a las 4,5 h de cultivo.

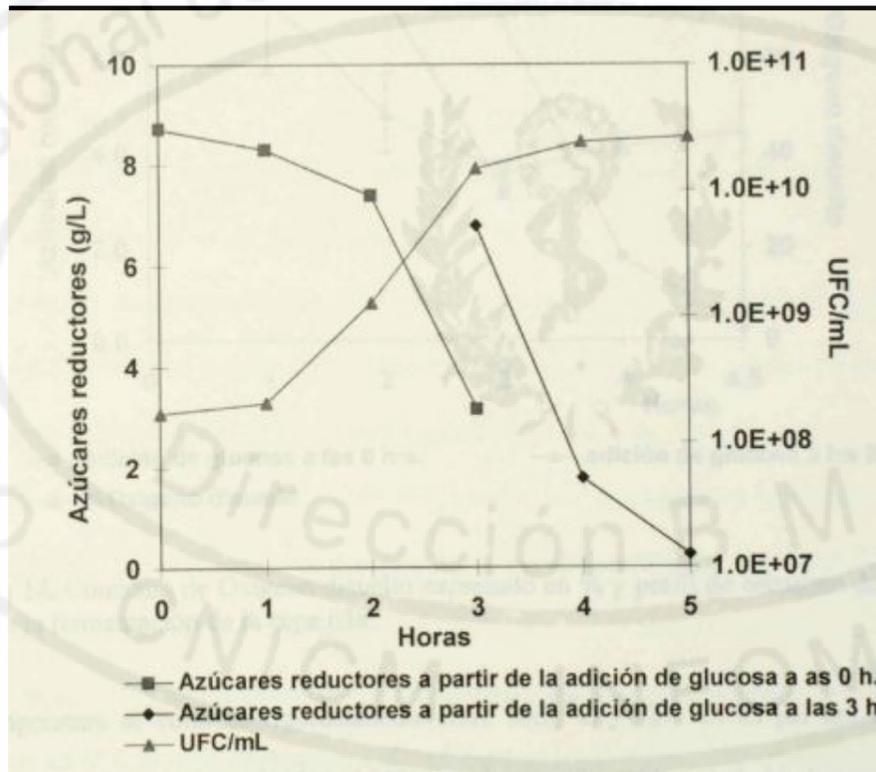


Figura 13. Concentraciones bacterianas según el número de UFC/ml y valores de azúcares reductores totales solubles promedio durante 4,5 horas de fermentación de la cepa 638 en medio TP con adición de glucosa a las 0 y 3 horas.

En la figura 14 se aprecia que los procesos fermentativos se iniciaron con un 100% de oxígeno disuelto y en las dos primeras horas hubo una drástica disminución del mismo en el medio, manteniéndose la aireación superficial en un valor constante de 0,3 vvm en todo el proceso, observándose crecimiento de la cepa.

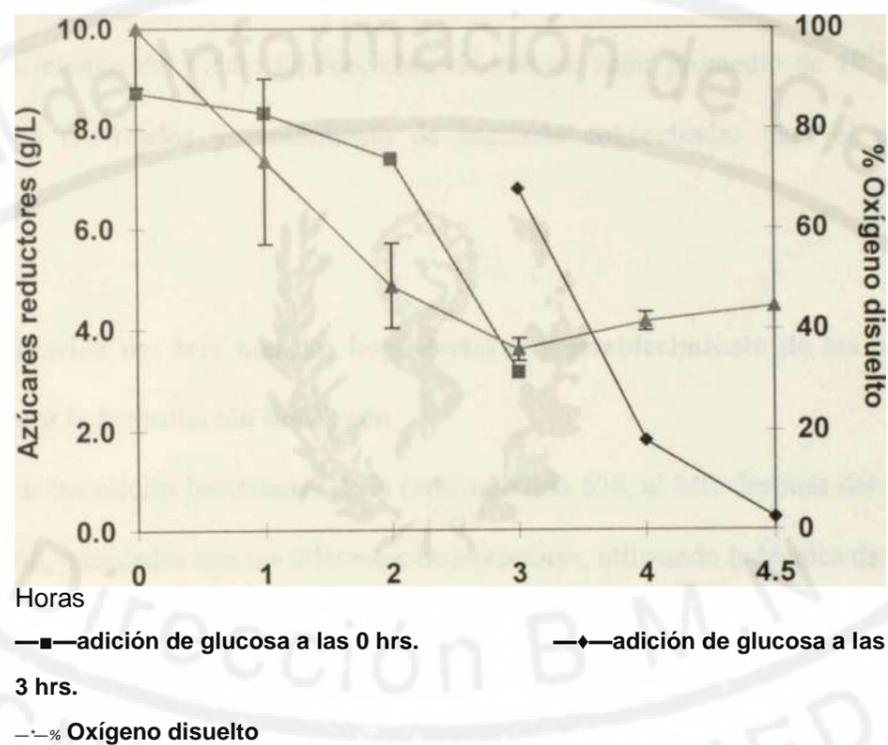


Figura 14. Consumo de Oxígeno disuelto expresado en % y perfil de consumo de glucosa durante la fermentación de la cepa 638.

La temperatura se controló rigurosamente entre 36,6 °C y 37 °C. El pH del medio se mantuvo entre 7,2 y 7,4 con NaOH al 20% debido a que la oxidación de la glucosa por este microorganismo conlleva a la formación de ácidos, pudiendo provocar la inhibición del crecimiento.

El tipo de impelente y los deflectores no permitieron la formación de vórtice, lo que garantiza un mezclado más eficiente y por tanto un mejor aprovechamiento de los nutrientes por el microorganismo.

En todos los pasos del proceso se comprobó la pureza microbiológica al microscopio óptico.

La cosecha de la biomasa en las condiciones establecidas permitió la separación de las células bacterianas del medio líquido, obteniéndose un valor promedio de 10^{11} UFC/mL, con buenos recobrados y rendimiento de bacterias concentradas para el proceso de liofilización.

IV. 4 Evaluación de tres mezclas lioprotectoras y establecimiento de las pruebas de control para la formulación liofilizada

Al observar las células bacterianas de la cepa atenuada 638, al MO después del proceso de liofilización, mezcladas con los diferentes lioprotectores, utilizando la técnica de coloración de Gram, se evidenció la morfología en forma de coma, típica de *V. cholerae*.

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, son mostrados en la tabla 6. Se pudo observar que las características bioquímicas de la cepa 638 en las tres mezclas A, B y C, se correspondieron con las de *V. cholerae*.

La identificación por aglutinación en lámina con antisueros específicos corroboró la identidad del IFA, el cual aglutinó con el antisuero polivalente 01 y monovalente Ogawa, no así con los antisueros Inaba y 0139, ni con el control de PBS, correspondiendo el IFA al serogrupo 01, serotipo Ogawa.

En nuestro estudio pudimos observar que en las cepas aisladas de las tres mezclas liofilizadas se mantuvo la expresión de la enzima endogluconasa A, en condiciones “*in vitro*”, la cual no está presente en otras bacterias entéricas, facilitando la rápida e inequívoca identificación de las cepas candidatas a vacuna de otros aislamientos de *V. cholerae*.

Tabla 6. Identificación bioquímica del IFA de cada mezcla lioprotectora: A (mezcla de proteínas, aminoácidos y polioles), B (mezcla de polipéptidos, aminoácidos, polioles y azúcares) y C (mezcla de aminoácidos, polioles y azúcares).

IFA de cada Mezclas	KIA fondo/cuña	LIA fondo/cuña	Oxidasa	Cuerda	Catalasa
A	A/K	K/K	+	+	+
B	A/K	K/K	+	+	+
C	A/K	K/K	+	+	+

A/K: acidez/alcalinidad

K/K: alcalinidad/alcalinidad.

En la figura 15 se muestra la viabilidad en las mezclas A, B y C hasta tres meses después de liofilizadas. Cuando se compararon los valores de UFC/mL de las tres mezclas cuyo IFA se correspondió con la cepa 638, después de resuspendida con bicarbonato de sodio estéril al 1,33%, se observó que presentaron diferente viabilidad ($p < 0,05$) en el período estudiado. La mezcla A después de liofilizada mantuvo una viabilidad del orden de 10^9 UFC/mL, manteniéndose estable durante 3 meses sin diferencias significativas ($p > 0,05$).

En la mezcla B después de la liofilización su viabilidad fue de 10^9 UFC/mL, pero a partir del primer mes de almacenada su concentración disminuyó significativamente hasta el

orden de 10^7 UFC/mL, manteniéndose en esa concentración hasta el tercer mes sin diferencias significativas entre estos tiempos ($p > 0,05$).

La mezcla C disminuyó su viabilidad desde tiempo 0 a una concentración de 10^8 UFC/mL y después disminuyó hasta 10^7 UFC/mL manteniéndose sin diferencia durante los tres meses de estudio ($p > 0,05$).

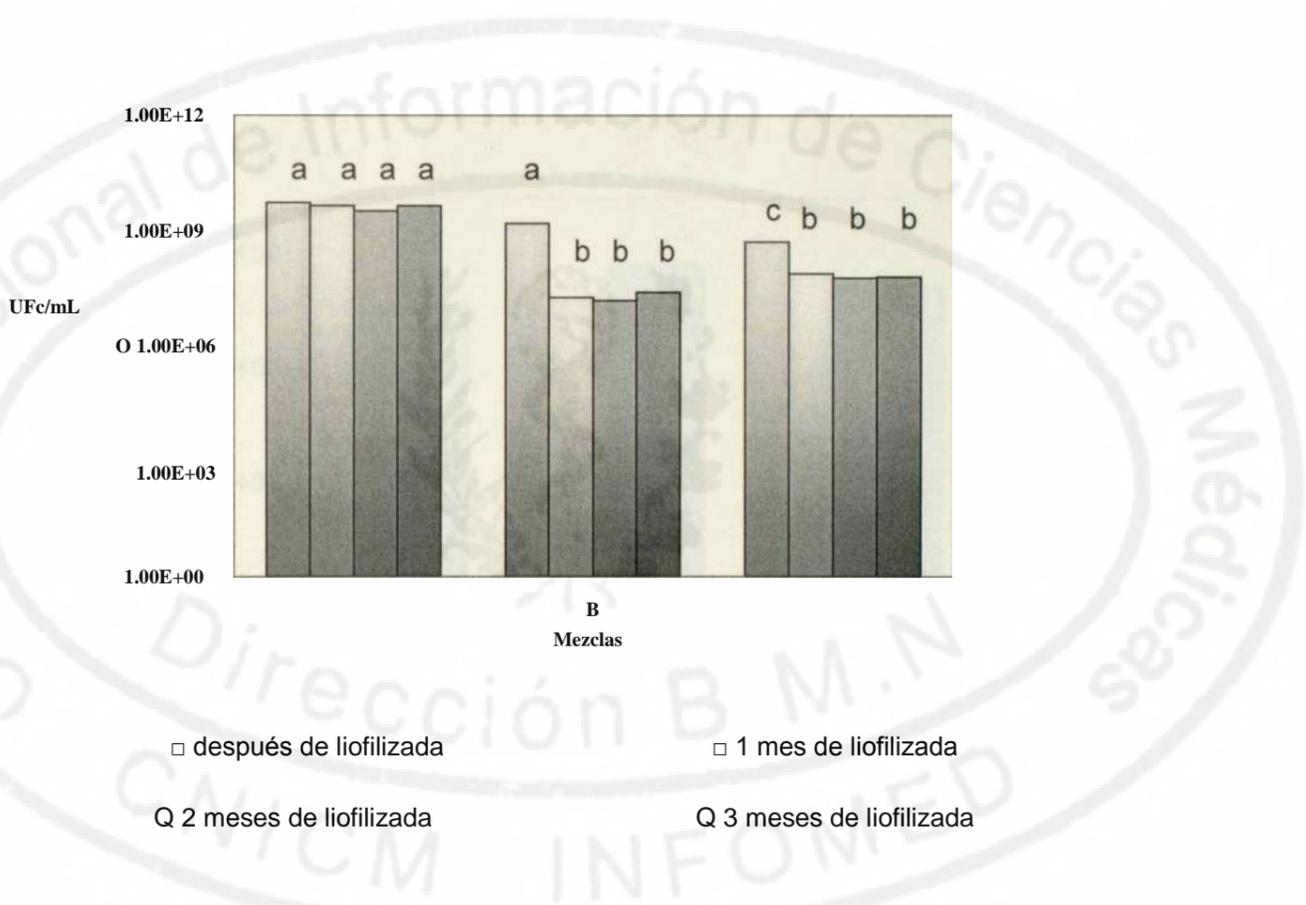


Figura 15. Viabilidad en UFC/mL de la cepa atenuada 638 de *Vibrio cholerae* 01 liofilizada con tres mezclas de lioprotectores, durante 3 meses: A (mezcla de proteínas, aminoácidos y polioles), B (mezcla de polipéptidos, aminoácidos, polioles y azúcares) y C (mezcla de aminoácidos, polioles y azúcares) resuspendidas en solución de hidrógeno carbonato de sodio al 1.33%. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos en los estudios de colonización, en los que se normalizaron los inóculos según el número de viables, indican que las tres mezclas liofilizadas no muestran diferencias significativas entre ellos en cuanto al índice de colonización ($p > 0,05$) (Figura 16), y no difieren de los obtenidos con la cepa 638 antes de liofilizar, lo que indica que si bien este método de liofilización disminuyó la viabilidad bacteriana en las mezclas B y C, no afectó la capacidad de colonización de las células viables en el modelo utilizado.

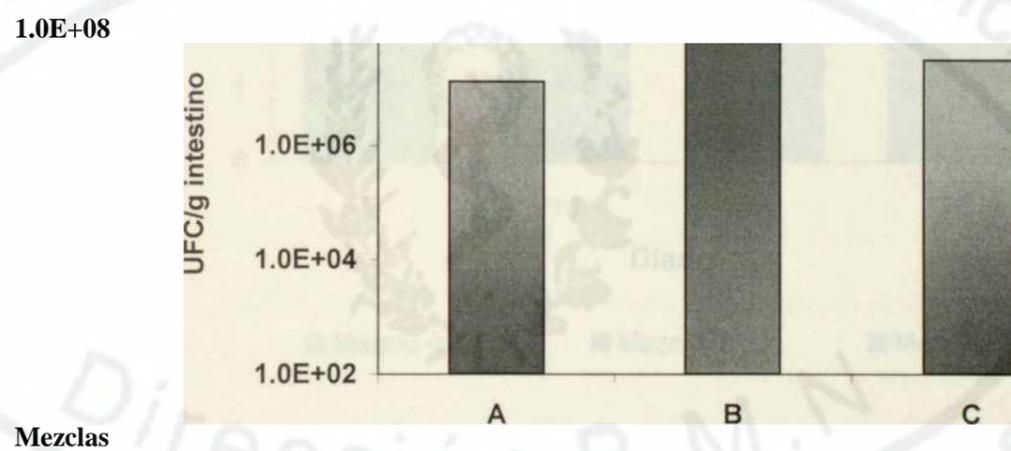


Figura 16. Colonización en ratones neonatos de la cepa atenuada 638 de *Vibrio cholerae* 0 liofilizada con tres mezclas de lioprotectores. A (mezcla de proteínas, aminoácidos y polioles), B (mezcla de polipéptidos, aminoácidos, polioles y azúcares) y C (mezcla de aminoácidos, polioles y azúcares), resuspendidas en solución de hidrógeno carbonato de sodio al 1.33% y normalizados según el número de viable.

Los títulos de anticuerpos vibriocidas evocados por el IFA proveniente de las tres mezclas, en el modelo de inoculación intraduodenal, se muestran en la Figura 17.

Para la mezcla A, los títulos vibriocidas fueron de 3,46 y 4,01 en los días 7 y 21, respectivamente, y a los 28 días de 3,56, no detectándose diferencias ($p > 0,05$).

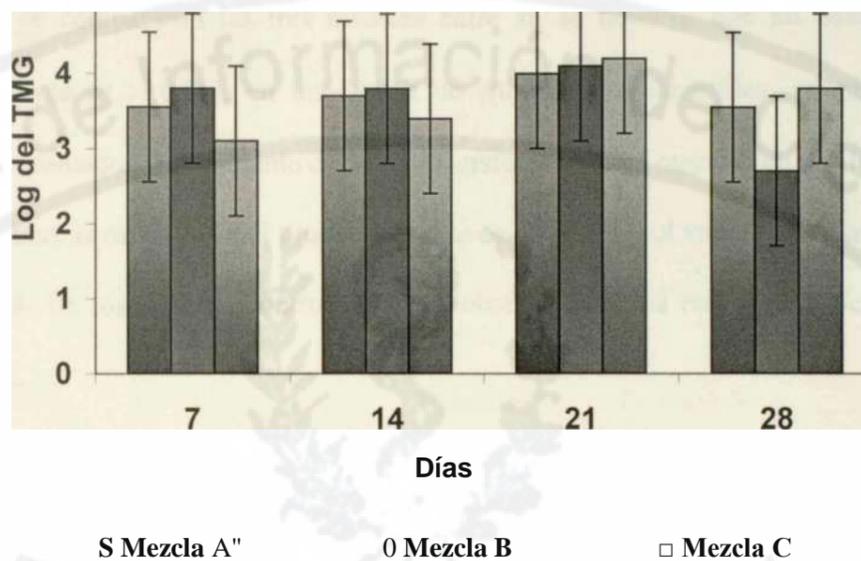


Figura 17. Títulos de anticuerpos Vibriocidas después de la inoculación intraduodenal con la cepa atenuada 638 de *Vibrio cholerae*: **A** (mezcla de proteínas, aminoácidos y polioles), **B** (mezcla de polipéptidos, aminoácidos, polioles y azúcares) y **C** (mezcla de aminoácidos, polioles y azúcares), resuspendidas en solución de hidrógeno carbonato de sodio al 1.33% y normalizadas según el número de viables. Cada valor representa la media de tres animales para cada mezcla. En el día 0 se observaron valores del Log del TMG menores de 1.

En el caso de la mezcla **B** tampoco se detectaron diferencias en los títulos entre los tiempos

evaluados ($p > 0,05$). Los mismos fueron el día 7 de 3,81, el 21 de 4,11 y el 28 de 2,71.

Por otra parte con la mezcla **C**, sí se observaron diferencias entre los títulos obtenidos en el día 7 (3,11) y

los mostrados el día 21 (4,21) y 28 (3,81), siendo estos últimos mayores

($p < 0,05$).

Para las tres variantes se observaron diferencias significativas entre el día 0 y el resto de los tiempos evaluados ($p < 0,05$).

Cuando se compararon las tres mezclas entre sí, se observó que no había diferencias significativas ($p > 0,05$), en los títulos de anticuerpos vibriocidas, en ninguno de los tiempos evaluados. El porcentaje de seroconversión con cada mezcla fue del 100%, o lo que es lo mismo, la razón entre el título alcanzado en el día 21 y el valor en el día 0, es mayor o igual a 4. En los conejos controles no se observó ninguna respuesta específica para *V. cholerae*.

Los títulos de anticuerpos IgG anti LPS de los conejos inoculados por vía intraduodenal con la cepa 638, con tres mezclas de lioprotectores, se muestran en la figura 18. No se encontró diferencia significativa en los niveles de anticuerpos específicos entre las tres mezclas ($p > 0,05$), mostrando diferentes patrones de cinética de anticuerpos con títulos detectables 14 días después de la inoculación.

En los tres casos se alcanzaron los criterios de seroconversión para esta técnica. No se detectaron títulos de anticuerpos IgG anti LPS en los conejos controles.

Se corroboró con la técnica de RCP, como prueba de seguridad, que en ninguna de las cepas aisladas de las mezclas (A, B y C) se observó la banda de 564 pb del gen que codifica para la subunidad A de la TC.