

Figura 18. Títulos de anticuerpos IgG anti LPS determinados por ELISA después de la inoculación intraduodenal con tres mezclas liofilizadas de la cepa atenuada 638 de *Vibrio cholerae* O1: 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 viables. Cada valor representa la media de tres animales.

V. DISCUSIÓN

Nuestro país cuenta con una batería de cepas de *V. cholerae* del serogrupo 01 de ambos serotipos, Inaba y Ogawa del biotipo El Tor y del serogrupo 0139, candidatas a vacunas orales contra cólera.

Estas cepas han sido manipuladas genéticamente, mediante el empleo de vectores suicidas y técnicas de intercambio alélico, que ha conllevando la construcción de cepas CTX (-) negativas a partir de aislamientos clínicos, de las epidemias del Perú en

1991 y la India en 1993. A partir de los primeros mutantes se obtuvieron una segunda y tercera generación de cepas a los cuales se les inactivo el gen *hapA* que codifica para la hemaglutinina proteasa de *V. cholerae*, obteniéndose así cepas hemaglutinina proteasa negativas (Benítez *et al*, 1996). En este sitio se realizó una integración estable del gen *celA*, el cual codifica para la enzima endogluconasa A del *Clostridium thermocellum* (Robert *et al*, 1996), que sirve como marcador genético de las cepas candidatas a vacuna, pues este gen no está presente en cepas del género *Vibrio*.

Se elaboraron los lotes de siembra de trabajo de las cepas modificadas genéticamente de *V. cholerae* candidatas a vacuna y el número de pases realizados a partir del lote de referencia no fue superior al utilizado para preparar el inoculo de los ensayos clínicos que ha demostrado ser eficaz y seguro, quedando registrados el origen y el historial de los pases de los lotes de siembra de referencia y de trabajo.

El sistema de lotes de siembra es una etapa esencial del cumplimiento de las BPP de productos biológicos y constituyen una exigencia de las autoridades regulatorias nacionales (Regulación 6/94; Regulación 16/2000) e internacionales (WHO, 1997; Good Manufacturing Practice; European Communities, 1998; FDA, 2002).

La ventaja principal del sistema de lotes de siembra de las cepas atenuadas candidatas vacunales

contra cólera, está dado por el hecho de que las bacterias cultivadas a partir del lote de siembra de trabajo tendrán pocos pasajes en medio artificial y mantendrán las características del cultivo original.

La congelación a -70°C es el método de preservación cercano al ideal y ha demostrado ser adecuado para *V. cholerae*. Este método tiene entre sus ventajas que permite mantener por largos períodos la pureza, estabilidad y viabilidad de los cultivos, además de no ser muy laborioso. No obstante, es indispensable la estabilidad de la temperatura de congelación (Snell, 1991). Esta desventaja pudiera hacernos pensar que no deberíamos emplear la congelación para conservar un material tan valioso como los lotes de siembra de trabajo. Sin embargo, al cumplir con lo establecido por las BPP acerca de mantener una supervisión constante sobre los congeladores y contar en nuestro Instituto con un plan de emergencia para la inmediata evacuación del material ante cualquier eventualidad, hacen prácticamente nula la posibilidad de perder los cultivos.

Una vez elaborados los lotes de siembra de trabajo, se controlaron por métodos específicos que permiten evaluar su calidad de acuerdo a las especificaciones establecidas.

Los lotes de siembra de trabajo fueron evaluados microbiológicamente en medio altamente selectivo (TCBS) para *V. cholerae*, en medios no selectivos (Agar Sangre y Agar Cerebro Corazón) y por pruebas bioquímicas de selección (ej. KIA, LIA y otras) que forman parte de la identificación común de *V. cholerae*, corroborándose sus características morfológicas y bioquímicas.

Las pruebas utilizadas en este trabajo fueron suficientes y adecuadas para confirmar la identidad hasta género y especie de los lotes de siembra de trabajo y por lo tanto no fue necesario realizar una caracterización más completa del microorganismo con pruebas bioquímicas adicionales, así como la utilización de otras recomendadas para la identificación de este microorganismo, siendo las primeras

suficientes como pruebas de control de identidad para el sistema de lotes de siembra.

En los sistemas de lotes de siembra de cepas vacunales es imprescindible asegurar que los mismos estén biológicamente puros, libres de agentes microbianos y contaminantes celulares (**ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1997**).

Para controlar la pureza de los lotes de siembra de trabajo de los candidatos vacunales contra el cólera se realizaron observaciones al microscopio óptico, donde se apreciaron bacilos Gram-negativos curvos en todos los campos examinados, excepto en las cepas L911 y 63 8T que cambiaron morfológicamente de forma estable después de la segunda y tercera manipulación genética, realizadas a sus cepas parentales 251a y 638 respectivamente. En todos los campos se observaron cultivos puros sin contaminantes.

El diseño y realización de ensayos específicos para detectar contaminaciones en los lotes de siembra deben tener en cuenta las características de los mismos, los contaminantes más probables basados en la literatura científica, la fuente, métodos y materiales usados para el cultivo, así como otros microorganismos presentes en el laboratorio. Se sugiere realizar el examen visual de las características culturales de colonias bien aisladas del microorganismo de interés, usando varios medios de cultivo, de los cuales algunos favorezcan su crecimiento y otros lo inhiban (**ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1997**).

Al microscopio electrónico de transmisión se observó que todas las cepas atenuadas presentan flagelo polar característico de cepas de *V. cholerae*. Aunque esta prueba no constituirá un control de identidad de rutina, sirvió para caracterizar los lotes de siembra de trabajo que se destinaron a los ensayos clínicos, porque la estructura flagelar de la bacteria combinada con una respuesta

quimiotáctica puede aumentar la probabilidad de interacciones con regiones específicas de la mucosa intestinal y puede ayudar a la resistencia de eliminación de la bacteria por la peristalsis, además de que la estructura flagelar contiene sitios involucrados en la adherencia (**Krukoniš y DiRita 2003**).

A pesar de observarse el flagelo en todas las cepas, no todas fueron móviles. La cepa del serogrupo 0139 (L911) resultó no móvil por pruebas microbiológicas. Es de esperar que esta cepa no móvil, que resultó colonizadora de la mucosa intestinal en el modelo del ratón neonato, pudiera ser aún inmunogénica en voluntarios.

No todos los patógenos entéricos requieren de la motilidad para manifestar su virulencia, como es el caso de especies de *Shigella* que son microorganismos no móviles. Otro ejemplo es la cepa atenuada El Tor Inaba, no móvil, Perú-15, la cual ha sido reportada como una cepa bien tolerada e inmunogénica en voluntarios (**Kenner et al, 1995**).

Además de la observación del flagelo por microscopía electrónica de transmisión se utilizó esta metodología para la observación de la cápsula polisacáridica de la cepa del serogrupo 0139 (251a y L911). Al igual que la prueba anterior, esta no constituirá una prueba de rutina, pero sirvió como prueba de caracterización de estas cepas, porque similar al serogrupo no-01, pero a diferencia del 01, las cepas 0139 poseen una cápsula polisacáridica. Se ha comprobado que las cepas 0139 capsuladas colonizan mejor. El polisacárido de la cápsula, al igual que el LPS son estructuras inmunogénicas (**Nesper et al, 2002**).

En nuestro trabajo se corroboró la identidad serológica de cada cepa con respecto a su cepa parental, pues las mismas aglutinaron con sus antiseros específicos. La identificación con antiseros polivalentes y monovalentes Ogawa e Inaba y con el antisuero 0139, es una de las pruebas más

importante para la identificación de este microorganismo desde el sistema de lotes de siembra, haciendo una contribución importante en la caracterización serológica de las cepas como *V cholerae* 01 u 0139.

La prueba de identificación del gen reportero *celA* como marcador vacunal permitió identificar a las cepas atenuadas de segunda y tercera generación. Este gen reportero el cual codifica la actividad 13 (1-4) endogluconasa, que no está presente en otras bacterias entéricas, se puede detectar fácilmente en agar LB con carboximetilcelulosa teñido con rojo congo (**Robert et al. 1996**) en una prueba rápida, útil, simple y sensible. Al igual que la cepa atenuada, vacunal licenciada, CVD 103 Hg-R, que tiene como marcador vacunal el gen de resistencia al mercurio, nuestros candidatos vacunales de segunda y tercera generación tienen a nivel cromosómico un marcador que permite diferenciarlos de otros vibrios y otras cepas entéricas (**Robert et al, 1996**).

La prueba de RCP fue apropiada para corroborar la seguridad genética de cepas atenuadas candidatas a vacuna. Esta prueba tiene el potencial de ser no solamente más rápida, sino también más específica y sensible que las establecidas para el diagnóstico de la TC, por lo que resulta conveniente utilizarla para el control de los lotes de siembra de trabajo de las vacunas atenuadas contra el cólera y para el producto final, antes de ser administrada en ensayos clínicos.

Los ensayos de identidad deben realizarse apropiadamente para comprobar que el lote es aquel que representa ser y pueden emplearse caracteres fenotípicos o genotípicos. **Los** ensayos de identidad son generalmente realizados al lote de referencia, aunque algunos pueden realizarse al lote de trabajo (**ICH Harmonised Tripartite Guideline, 1997**).

Para estudiar la infección de *V. cholerae* se han desarrollado diversos modelos animales, algunos de

los cuales han proporcionado información relevante de la enfermedad humana, a pesar de las limitaciones existentes, dadas porque la infección natural con *V. cholerae* no ocurre en animales y que hasta el momento no se ha descrito ningún modelo animal que reproduzca los signos y síntomas de la enfermedad (**Cray et al, 1983**).

En nuestro trabajo utilizamos dos modelos animales que nos permitieron evaluar la virulencia, la capacidad de colonización, la toxigenicidad y la inducción de respuesta inmune de cepas modificadas genéticamente para poder seleccionar candidatos vacunales atenuados contra el cólera antes de su evaluación clínica.

El cálculo de la DL_{50} nos permitió comprobar que las cepas atenuadas resultaron no virulentas porque al comparar los valores de DL_{50} , las concentraciones celulares que provocan la muerte del 50% de la población de animales fueron significativamente altos con respecto a las concentraciones que necesitan sus correspondientes cepas parentales virulentas. Con esta prueba se confirmó la atenuación de los candidatos vacunales, por lo que se recomienda su empleo como prueba de control en el sistema de lotes de siembra referencia y de trabajo.

La colonización del intestino delgado por *V. cholerae* es uno de los eventos más relevantes dentro de la patogenia de la enfermedad (**Kirn et al, 2003**). Es por eso que para el diseño de vacunas atenuadas contra el cólera se le atribuye gran importancia a la determinación del índice de colonización, porque al ser este microorganismo un patógeno no invasivo, la adherencia y colonización son factores determinantes en su inmunogenicidad (**Dietrich et al, 2003**).

Los valores de colonización obtenidos con el modelo del ratón neonato indican la no existencia de diferencias significativas entre las cepas parentales y las modificadas genéticamente. El hecho de que

las cepas modificadas 81, 638 y 63 8T no expresaran *in vitro* las dos principales adhesinas HASM y PCT, no afectó la capacidad de colonización de estas cepas. A pesar que **Taylor et al, 1987** demostraron que ambas proteínas son requeridas para la colonización en el modelo del ratón neonato y en estudios con voluntarios han establecido el requerimiento del PCT para la colonización de *V. cholerae* en el intestino humano (**Herrington et al, 1988**), otros autores han comprobado (**Angelichio et al, 1999**) y se confirma en el presente trabajo, que el PCT no es requerido para la colonización y sugieren que *V. cholerae* posee otros factores de colonización adicionales que favorecen la colonización en el modelo del ratón neonato como pueden ser: factores de colonización accesorios, hemaglutinina resistente a mañosa y fucosa, factores metabólicos tales como el hierro y magnesio, proteínas transportadoras, arginina y purina y enzimas de la biosíntesis de la biotina (**Merrell et al, 2002**).

El modelo del ratón neonato puede ser empleado como prueba de control de potencia para medir la capacidad de colonización de los lotes de siembra de referencia y del producto final, porque esta prueba sirve como una correlación entre la respuesta esperada y los atributos del producto el cual está unido a las propiedades biológicas relevantes.

La adherencia al igual que la colonización es un factor crítico en la patogénesis del cólera. La capacidad de adherencia a la mucosa intestinal de las cepas modificadas genéticamente, fue evaluada para la caracterización de los lotes de siembra antes que se destinaran a los ensayos clínicos de selección de candidatos vacunales.

V. cholerae se adhiere a las vellosidades de las membranas de las células absortivas en el modelo del ratón neonato. En este trabajo, tanto las cepas atenuadas como sus correspondientes parentales se

adhirieron a la mucosa intestinal con igual intensidad. Nuestros resultados, con este modelo animal que es el más utilizado para correlacionar la capacidad de colonización de cepas de *V. cholerae* en humanos, no muestran diferencias entre las cepas virulentas parentales y las modificadas genéticamente que no expresan PCT, hemaglutinina y son no motiles.

Aunque se ha investigado mucho del mecanismo de colonización de *V. cholerae*, todavía se conoce poco acerca de cuáles son los atributos que facilitan la colonización y la adherencia de este microorganismo, aunque hay consenso en que es un proceso multifactorial, en el que intervienen varios compuestos y que están favorecidos por determinadas características ambientales (**Chiavelli et al, 2001**).

El otro modelo ampliamente utilizado para evaluar cepas de *V. cholerae* es el modelo del conejo adulto, realizando modificaciones quirúrgicas de sus tractos intestinales.

Con el modelo de intestino ligado de conejo o "Ileal Loop" pudimos evaluar a través de la medición del fluido acumulado en un segmento de intestino ligado, la toxigenicidad de las cepas modificadas genéticamente, que resultaron no tóxicas por los bajos valores de fluido acumulado por cm de intestino comparado con sus correspondientes parentales que mostraron niveles significativamente mayores.

Este modelo puede ser recomendado como prueba de caracterización de nuevas variantes de cepas atenuadas a las cuales se les elimina el profago CTX(j) o se les someta a cualquier otra manipulación genética en busca de su atenuación.

Al estudiar la capacidad inmunogénica de las cepas modificadas en el modelo de inoculación intraduodenal, se apreciaron en el suero de los animales inoculados, niveles altos de anticuerpos

vibriocida, con valores de seroconversión superiores al 80%, excepto con las cepas 413 y L911. Aunque los anticuerpos vibriocidas no son los responsables de la protección a nivel de mucosa, se ha demostrado que existe una estrecha correlación entre los títulos de anticuerpos vibriocidas y la protección contra la colonización y la enfermedad (**Liang et al, 2003**).

La respuesta de anticuerpos IgG anti LPS Ogawa, Inaba y 0139 detectados por ELISA, fue elevada al igual que los anticuerpos vibriocidas, con excepción de la cepa L911. Estos resultados concuerdan con lo reportado por la literatura en que la respuesta antibacteriana es fundamentalmente dirigida contra el LPS, que constituye el antígeno protector más importante en este microorganismo (**Chatterjee y Chaudhuri, 2003**).

Este modelo de inoculación intraduodenal fue útil para evaluar la inmunogenicidad de cepas de *V. cholerae*, como prueba de potencia en el lote de siembra de referencia y en el producto final, porque este modelo permite una exitosa colonización intestinal de las cepas administradas y una correcta presentación antigénica.

Las pruebas biológicas nos permitieron esclarecer, que los lotes de siembra de trabajo de las cepas modificadas genéticamente de *V. cholerae* cumplían con los criterios de atenuación, seguridad e inmunogenicidad (excepto las cepas 413 y L911) para ser probados en voluntarios, y constituyen técnicas de gran importancia en los controles del sistema de lote de siembra y del producto final.

De los resultados anteriores se seleccionaron las cepas de segunda generación 638 y 1333, y la de tercera generación 63 8T como candidatos para ensayos clínicos, porque además de cumplir todos los criterios de prototipos vacunales al igual que el resto de las cepas, se diferencian de las de primera generación por poseer un marcador vacunal que las distingue de cualquier vibrio o bacteria entérica.

Los ensayos clínicos relacionados con el cólera, han evaluado fundamentalmente la reactogenicidad e inmunogenicidad de cepas atenuadas (**Levine**, 1980; **Morris et al**, 1995), así como la protección de voluntarios vacunados frente a un reto con cepas virulentas (**Tacket et al**, 1995_a; 1995_b; 1997). Incluso, se han realizado estudios de infección experimental en voluntarios (**Losonsky et al**, 1997; **Sack et al**, 1998) con cepas virulentas, que mostraron que un episodio inicial de cólera conduce a una inmunidad que provoca altos niveles de protección frente a un segundo ataque por ambos serotipos dentro de un mismo biotipo. Más de 10 años de experiencia han demostrado la seguridad de estos ensayos, sin que se hayan reportado nunca complicaciones severas que hayan puesto en peligro la vida de los participantes.

Existen pocas instalaciones para llevar a cabo estudios de reactogenicidad, inmunogenicidad y eficacia protectora de candidatos vacunales contra el cólera en humanos. El Centro para el Desarrollo de Vacunas (CVD) adjunto a la Escuela de medicina de la Universidad de Maryland y el Centro de Ensayos de Vacunas (VTC) en la Facultad de Medicina Tropical, Universidad Mahidol, Bangkok, Tailandia, constituyen dos ejemplos de estas instalaciones.

En Cuba se dispone de una instalación para evaluar candidatos vacunales, el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, que, a tono con nuestro sistema de salud, internacionalmente reconocido, sirve como sitio para la evaluación de preparados vacunales. En este centro, cumpliendo con las BPC y normas internacionales de ética para la investigación con seres humanos, y aplicando los últimos adelantos de la ciencia, se ha acumulado la experiencia necesaria para realizar estudios con voluntarios prácticamente sin riesgos importantes.

La cepa 81 de primera generación modificada genéticamente, que resultó marcadamente atenuada en

modelos animales, no se seleccionó como candidato vacunal por no tener el marcador vacunal, pero sí se evaluó en voluntarios para compararla con las cepas de segunda y tercera generación obtenidas a partir de ella. Esta cepa no provocó diarrea severa cuando se evaluó en voluntarios sanos, sin embargo, mantuvo una reactividad residual en cuanto al número de episodios de diarrea, y al peso promedio de las deposiciones. Tres voluntarios padecieron diarrea reactiva grado III con más de 5 deposiciones.

Las cepas 638 y 1333, cuando se evaluaron en ensayos clínicos, fueron consideradas no reactivas y mantuvieron la inmunogenicidad mostrada en animales en las diferentes dosis evaluadas, con excepción de la cepa 638 a la dosis de 10 en la que el porcentaje de seroconversión fue significativamente más bajo.

La cepa 81 se consideró inaceptable como candidata vacunal por su reactividad, aunque provocó una potente respuesta vibriocida a diferencia de la cepa 638 que resultó no reactiva e inmunogénica en voluntarios, a pesar de que la única diferencia entre estas cepas radica en la inserción del gen *celA* en el sitio del gen *hap*. Una hipótesis que justifique la reactividad de cepas atenuadas CTX(j)' de *V. cholerae* ha sido la síntesis de otros factores de virulencia no completamente identificados (Mell *et al*, 2000). Es posible que HAP sea uno de estos que contribuya a la reactividad de cepas que carecen de otros factores de virulencia, como la 81.

No es posible evaluar completamente el papel de HAP en la reactividad con los resultados aquí presentados. La inactivación de HAP incrementa la duración de la adherencia de *V cholerae* a células

del epitelio intestinal en cultivo (**Finkelstein et al, 1992**) y aumenta la adherencia y multiplicación de vibrios en células intestinales humanas recubiertas de mucus (**Benítez et al, 1997; Silva et al, 2003**).

Las cepas 638 y 1333 fueron recuperadas de voluntarios inoculados, indicando que estas cepas colonizan apropiadamente el intestino delgado humano. Además, no adquirieron los genes de la subunidad A de la TC y sus cromosomas se mantuvieron estables al pasar por el tracto gastrointestinal como se demostró con las pruebas de RCP y PLFR, así como se mantuvo estable el gen reportero *cel A* durante este proceso.

La utilización de cepas vacunales vivas atenuadas por técnicas de ingeniería genética mantiene latente la posibilidad de readquisición de los genes de la TC provenientes de cepas salvajes presentes en el intestino o el ambiente (**Faruque et al, 1999; 2000**) y de reactivar su virulencia.

Esto ha llevado a seleccionar cepas atenuadas, que su bioseguridad quede demostrada en los ensayos clínicos antes de su producción como preparados vacunales.

Ambas cepas 638 y 1333 contienen el gen *rstR* (**Campos et al, 1998**), el producto de este gen confiere inmunidad a la reinfección por CTX(j) El Tor. Además, estudios recientes con AcM anti TcpA (proteína estructural del TCP) demostraron que la cepa 638 no expresa TcpA en condiciones *in vitro*, lo que favorece la bioseguridad de estas cepas, al no poder adquirir nuevamente los genes de la TC, ya que esta proteína precisamente constituye el receptor del bacteriófago CTX(j), lo que hace que el primer paso de transmisión horizontal no pueda ocurrir.

Se ha continuado en la investigación de la obtención de cepas atenuadas que se inactiven en el medio ambiente. Este es el caso de la cepa de tercera generación 63 8T que se derivó a partir de la cepa 638, que incluye dentro de sus modificaciones una auxotrofia dependiente a la timidina (**Valle et al, 2000**).

Esta cepa, a pesar de que colonizó adecuadamente en el modelo del ratón neonato y fue inmunogénica en conejos, fue pobremente excretada por humanos y muy poco inmunogénica, lo que la hizo no aceptable como candidato vacunal.

En este trabajo se demostró que la ingestión de un inóculo fresco de las cepas 638 y 1333, preparado directamente de un cultivo en placa de agar **BHI** y administrado con bicarbonato de sodio a voluntarios sanos a diferentes dosis, fue bien tolerado en todas las dosis probadas, sin embargo, cuando se administró la cepa 638 a una dosis de 10^7 UFC mostró valores bajos de inmunogenicidad y seroconversión de respuesta vibriocida sérica. No así, con las dosis de 10^8 y 10^9 UFC. Esta respuesta sérica es un marcador de la estimulación inmune a nivel de la mucosa intestinal, que permanece aún luego que los anticuerpos vibriocidas hayan alcanzado sus niveles basales (**Brandtzaeg, 2003**).

Actualmente, se dispone solamente de una cepa atenuada licenciada como vacuna oral contra el cólera, denominada CVD 103 HgR (*V. cholerae* del biotipo clásico), muy atractiva por ser bien tolerada y por conferir una protección en estudios de reto en humanos de un 60% con cepas del biotipo El Tor y 100% contra el clásico (**Richie et al, 2000**). Sin embargo, se carece de una cepa con estas características pertenecientes al biotipo El Tor, que es el predominante a nivel mundial (**Peterson, 2002**).

En nuestro trabajo se demostró la atenuación y estabilidad genética de dos cepas candidatas vacunales del biotipo El Tor 638 y 1333 por toda una serie de técnicas *in vitro* e *in vivo* mediante el uso de modelos animales internacionalmente utilizados en este campo. Como resultado de estos ensayos y de las pruebas clínicas realizadas se han podido catalogar como seguras e inmunogénicas y promisorios candidatos vacunales contra el cólera El Tor. A partir de los resultados anteriores obtenidos con las

cepas 638 y 1333, se decidió obtener a partir de la cepa 638, altos rendimientos del IFA a escala de laboratorio porque es el serotipo predominante epidemiológicamente (**Bajaj *et al*, 2001**).

En el diseño se tuvo en cuenta la formulación del medio de cultivo, escogiéndose el medio TP, porque sus ingredientes aportan materiales asimilables y energía necesaria y sus requerimientos están en función de la composición química de la célula. Estos componentes favorecen la expresión de antígenos esenciales, el crecimiento bacteriano es exuberante y sus rendimientos fueron estables en los pasos posteriores del proceso. Es un medio definido a partir de componentes comerciales en polvo, libre de antígenos de grupos sanguíneos y con los certificados de la casa comercial, que minimizan el posible riesgo de transmisión de la encefalitis espongiforme (conocida como la enfermedad de las vacas locas).

En la metodología para la obtención de biomasa de la cepa 638, con el medio TP en fermentador, se adicionó la glucosa como fuente de carbono a una concentración de 10 g/L dosificada a las 0 y 3 h de cultivo, debido a que en estudios previos, con una sola adición de glucosa al inicio del cultivo, la concentración bacteriana alcanzó niveles similares a los obtenidos en zaranda (10^4 UFC/mL), con poca estabilidad en la viabilidad (datos no mostrados) y los azúcares reductores alcanzaron valores mínimos a las 3 h de cultivo.

En nuestro diseño tuvimos en cuenta las condiciones de cultivo para la expresión de antígenos celulares y biomasa que puede variar considerablemente dependiendo de las condiciones tales como la temperatura óptima de crecimiento para evitar la inactivación de las enzimas que podría afectar el metabolismo celular y provocar variaciones irreversibles en los componentes del medio de cultivo. El pH del medio, se mantuvo entre 7,2 y 7,4, porque uno de los componentes del medio de cultivo es la

glucosa y este microorganismo la acidifica disminuyendo el pH del medio y provocando bajos rendimientos de biomasa. Otro requerimiento que se tuvo en cuenta es el del oxígeno disuelto que, al estar en defecto, microorganismos facultativos como *V. cholerae*, pueden pasar a desarrollar un metabolismo fermentativo durante el proceso, lo que conducirá a bajos rendimientos en biomasa (Aiba, 1970). Se ha demostrado que, en condiciones aeróbicas, *in vitro*, se alcanzan altos niveles de expresión de los principales factores de virulencia y en condiciones anaeróbicas el crecimiento es estresante para este microorganismo (Xu *et al*, 2003).

En los procesos realizados, el oxígeno disuelto disminuyó producto a un metabolismo muy rápido, en el cual la cepa bacteriana, al consumir aceleradamente la fuente de carbono, agota en muy poco tiempo el oxígeno del medio (De Mare *et al*, 2003). Esto se solucionó adicionando la glucosa de forma dosificada a las 0 y 3 horas de cultivo y se observó que los niveles de glucosa adicionados a la 0 hora fueron consumidos, en las primeras 3 horas.

En este momento los niveles de sustratos fueron restituidos a las mismas concentraciones iniciales, lo que conllevó al aumento de las UFC/mL en el proceso. Esto indica que se ha establecido un equilibrio dinámico entre el oxígeno requerido por el microorganismo y el oxígeno que se suministró, porque los requerimientos de oxígeno celular están estrechamente relacionados con la fuente de carbono presente en el medio de cultivo.

En los procesos realizados se describe una típica curva de crecimiento bacteriano donde la fase exponencial de crecimiento se alcanza desde el inicio de la fermentación hasta la cuarta hora de cultivo aproximadamente. La velocidad de crecimiento (μ) promedio de la fermentación fue de 1,89 h^{-1} , con una desviación estándar (CT2) de 0,112 con un coeficiente de correlación (R^2) de 0,993,

disminuyendo la p a las 4,5 horas de la fermentación hasta

0, 04 h⁻¹, momento en que se decide detener el cultivo, debido a que el producto de interés lo constituye la biomasa celular, y es precisamente en este momento donde observamos los mayores valores de concentración el cual se encontraba en el orden de 10¹⁰ UFC/mL. Este comportamiento cumple con el modelo logístico de crecimiento bacteriano con un intervalo de confianza de 95% según el programa de Cinética de Fermentaciones de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana.

Las fermentaciones fueron realizadas con aireación superficial constante de 0,3 vvm, para evitar la formación de espuma, pues no es recomendado el uso de antiespumantes en procesos fermentativos dentro de la producción de vacunas.

La biomasa se recolectó por centrifugación en un proceso que permitió una separación eficiente de las células microbianas, aunque existen otros métodos alternativos como la centrifugación con flujo continuo y la filtración tangencial, que garantizan concentrar rápidamente la suspensión bacteriana sin daños, manteniendo las estructuras de superficie (**Cryz y Glück, 1997**).

Las vacunas bacterianas vivas atenuadas, deben preservarse a una concentración conocida por un período de tiempo. La vía más eficiente para lograr este objetivo es mediante la liofilización (**Mackenzie, 1977**). Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la biomasa de la cepa 638 obtenida en el proceso tecnológico se combinó con tres mezclas lioprotectoras (A, B y C), para seleccionar aquella que lograra una mayor resistencia a la inactivación durante la liofilización y además permitiera obtener rangos máximos de sobrevivencia como producto vacunal estable en un almacenaje prolongado. La cepa atenuada 638 en su posible forma de aplicación oral, deberá ser un

producto liofilizado que se restituya justo antes de su administración.

El método de liofilización realizado para las tres mezclas fue el utilizado para la confección del lote de siembra de referencia de cepas atenuadas de *V. cholerae*, en el cual los lioprotectores mezclados fueron los mismos que se utilizaron en la mezcla A, pero no así en las mezclas B y C.

El método de liofilización utilizado no permitió una deshidratación eficiente del producto en las formulaciones B y C, debido a que las condiciones operacionales no garantizaron que la sublimación se realizara por debajo de la temperatura crítica (inferiores a -40°C) de trabajo. Por consiguiente, la viabilidad del microorganismo y el aspecto físico en las pastillas liofilizadas de estas formulaciones se vio afectada.

Las soluciones lioprotectoras deben ser diseñadas para ser compatibles 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 (De Valdez, 1985). Este último factor es crítico para la estabilidad de las cepas vacunales.

El control de un producto biotecnológico suele implicar técnicas de análisis biológicos que tienen una mayor variabilidad que las determinaciones físico-químicas. Por ello, los controles de proceso asumen una gran importancia en la producción, debido a que algunas deficiencias pueden no ser detectadas mediante el ensayo final del producto. (Regulación No. 6/94).

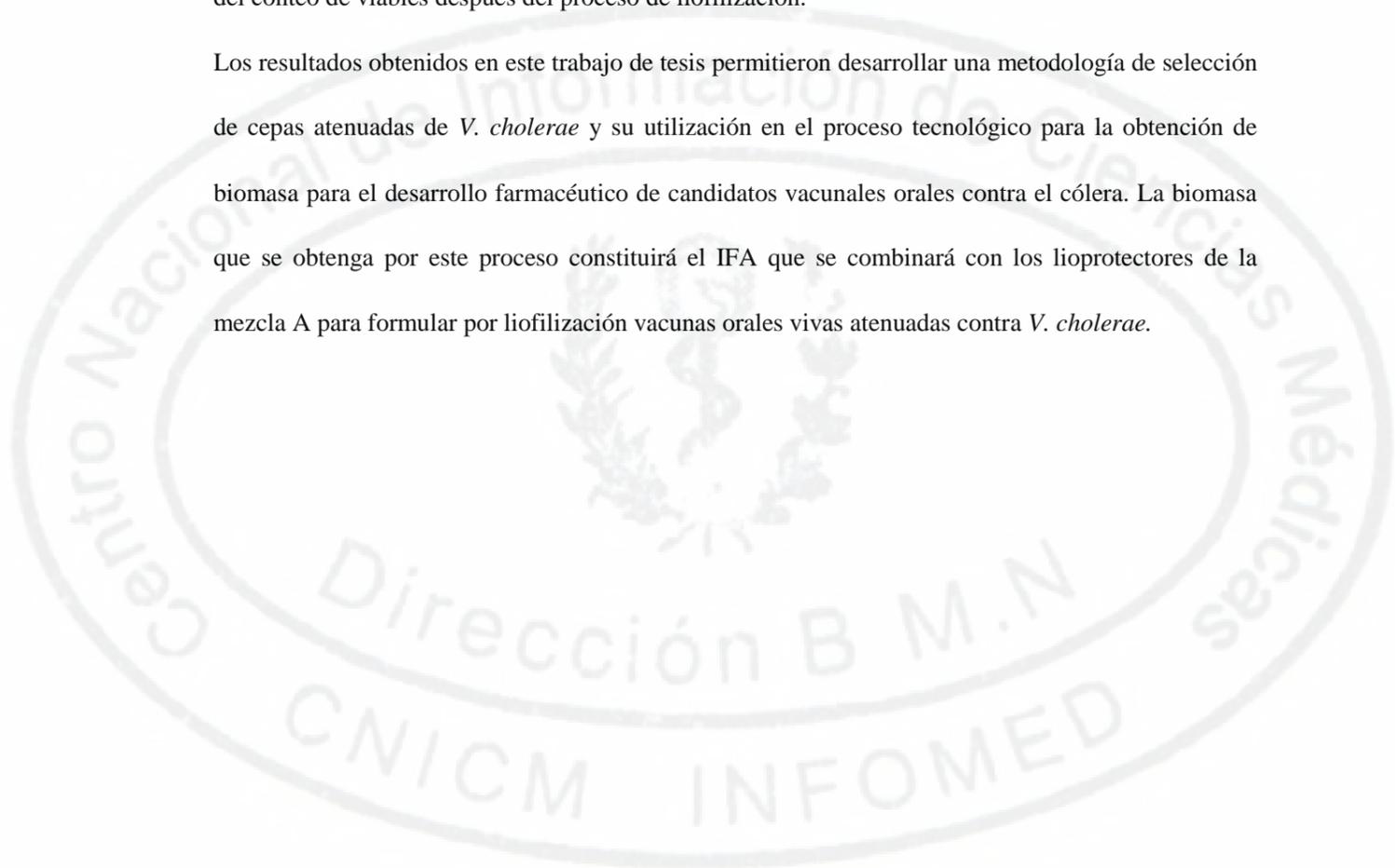
Las pruebas de control de las vacunas orales vivas son esenciales para la seguridad y la eficacia de estas vacunas (Cryz y Glück, 1997). Se seleccionaron los siguientes controles para evaluar las tres mezclas: identificación fenotípica, serológica y del marcador vacunal como pruebas de identidad, conteo de viables en UFC, colonización en el modelo del ratón neonato e inmunogenicidad en el

modelo del conejo adulto, como pruebas de potencia y la prueba de RCP como prueba de seguridad.

Estas pruebas podrían a su vez constituir los controles del producto final.

Las tres mezclas lioprotectoras que se evaluaron cumplieron con todos los criterios de aceptación para las pruebas descritas anteriormente, excepto las mezclas B y C que no cumplieron con el criterio del conteo de viables después del proceso de liofilización.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permitieron desarrollar una metodología de selección de cepas atenuadas de *V. cholerae* y su utilización en el proceso tecnológico para la obtención de biomasa para el desarrollo farmacéutico de candidatos vacunales orales contra el cólera. La biomasa que se obtenga por este proceso constituirá el IFA que se combinará con los lioprotectores de la mezcla A para formular por liofilización vacunas orales vivas atenuadas contra *V. cholerae*.

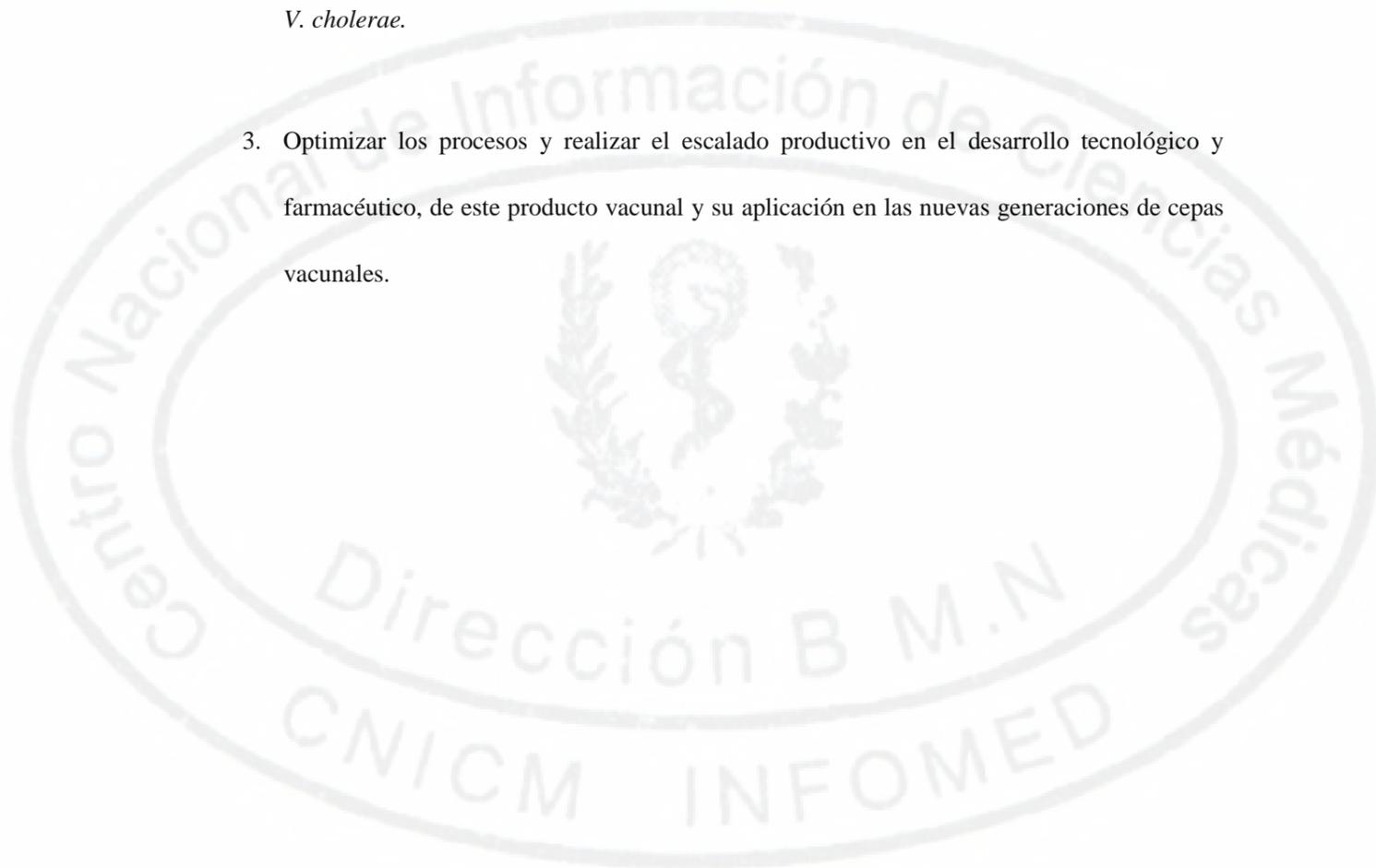


VI. CONCLUSIONES

1. Los lotes de siembra de trabajo de las cepas de *V. cholerae* candidatas a vacuna oral contra cólera confeccionados, cumplieron con los criterios de aceptación según las regulaciones vigentes.
2. Las cepas 638 y 1333 de los serogrupos Ogawa e Inaba respectivamente, resultaron inmunogénicas y no reactogénicas en las pruebas biológicas en animales y en voluntarios humanos.
3. Con la cepa 638 se logró obtener un candidato vacunal a escala de laboratorio, con rendimientos de IFA de 1650-2000 dosis por litro de fermentación y conservar su capacidad de colonización e inmunogenicidad así como, la viabilidad en la formulación liofilizada con la mezcla lioprotectora A.

VII. RECOMENDACIONES

1. Aplicar la metodología desarrollada para los Lotes de Siembra de Trabajo y de selección de cepas, en las nuevas generaciones de cepas candidatas para la vacuna atenuada oral de *V. cholerae*.
2. Desarrollar estudios de protección en voluntarios con las cepas seleccionadas 638 y 1333 de *V. cholerae*.
3. Optimizar los procesos y realizar el escalado productivo en el desarrollo tecnológico y farmacéutico, de este producto vacunal y su aplicación en las nuevas generaciones de cepas vacunales.



BIBLIOGRAFÍA RELACIONADA CON EL AUTOR

TESIS TUTOREADAS O ASESORADAS RELACIONADAS CON ESTA TEMÁTICA

1. Identificación de Microorganismos pertenecientes al Género *Vibrio*. 1989. IPK. Tesis Técnico Medio en Procesos Biológicos. Autora: Tamara Pimentel. Tutor: Lic. Hilda María García Sánchez.
2. Purificación de Neuraminidasa de *Vibrio cholerae* 01. 1995. Instituto Finlay. Tesis Licenciado en Bioquímica. Autora: Mayret Pérez. Tutores: Lic. Hilda María García Sánchez y Lic. José Luis Pérez Quiñoy.
3. Utilización de Pruebas Hemolíticas para el Biotipaje de *Vibrio cholerae* 01. 1995. Instituto Finlay. Tesis Técnico Medio en Procesos Biológicos. Autora: Beatriz Heredia. Tutor: Lic. Hilda María García Sánchez.
4. Caracterización de cepas de *Vibrio cholerae* 0139. 1997. Instituto Finlay. Tesis Licenciada en Microbiología. Autora: Gemma Año. Tutor: Lic. Hilda María García Sánchez. Asesor: Dr. C. Arturo Talavera Coronel.
5. Programa de Aseguramiento de la calidad en el proceso de obtención del inóculo de la cepa 638 candidata a una vacuna oral contra cólera. 1998. Instituto Finlay. Tesis Maestría en Bacteriología-Micología. Autora: Irma Gonzáles. Tutores: Dr. C. Gustavo Sierra y Dr. C. Arturo Talavera Coronel. Asesor: M. C. Hilda María García Sánchez.
6. Ensayos preclínicos de virulencia e inmunogenicidad de cepas de *Vibrio cholerae* candidatas a vacuna oral. 1999. Instituto Finlay. Tesis Maestría Microbiología, Mención Clínica. Autora: Bárbara Cedré Marrero. Tutores: Dr. C. Arturo Talavera Coronel y M. C. Hilda María García Sánchez. Asesores: Lic. Luis García Imia y Dra. C. Nidia Rojas Hernández.

7. Cultivo e inactivación de células de *Vibrio cholerae* 01. 2000. Instituto Finlay. Tesis Maestría Microbiología, Mención Fermentación. Autora: Caridad Torres Suárez. Tutor: M. C. Hilda María García Sánchez.
8. Estudios preclínicos de la capacidad protectora de la cepa atenuada 638 El Tor Ogawa, frente a un reto con la cepa virulenta 3008. 2000. Instituto Finlay. Tesis de Licenciada en Biología. Autora: Evelyn Amat Navarrete. Tutores: M. C. Hilda María García Sánchez y Viviana Pérez Amat. Asesores: Dr. C. Arturo Talavera Coronel y Dr. C. Juan Francisco Infante Bourzac.
9. Respuesta diferencial de IL-8 de la línea celular de epitelio intestinal HT29-18N2 a cepas vacunales reactogénicas y no reactogénica de *Vibrio cholerae*. 2000. Instituto Finlay. Tesis de Licenciado en Microbiología. Autor: William Toledo. Tutores: Lic. Boris Luis Rodríguez y M. C. Hilda María García Sánchez.
10. Antigenicidad e inmunogenicidad de una cepa de *Vibrio cholerae* inactivada, obtenida a nivel de laboratorio. 2002. Instituto Finlay. Tesis de Maestría en Microbiología, Mención Fermentación. Autora: Gemma Año López. Tutores: Dr. C. Arturo Talavera Coronel y M. C. Hilda María García Sánchez.
11. Formulaciones vacunales liofilizadas de la cepa atenuada 638, candidata a vacuna viva, oral contra cólera. 2002. Instituto Finlay. Tesis de Licenciado en Microbiología. Autor: José Antonio Ruiz Despaigne. Tutor: M.C. Hilda María García Sánchez y Lic. Herminia Delgado Rodríguez.
12. Sistema de Lotes de Siembra de la cepa vacunal *Vibrio cholerae* 638. 2003. Instituto Finlay. Tesis de Maestría en Microbiología, Mención Microbiología Clínica. Autora: Lic. Carmen Alina del Puerto Sardiñas. Tutores: M. C. Hilda María García Sánchez y Dr. C. Arturo Talavera Coronel.

Asesores: M. C. Bárbara Cedré Marrero y Dr. Franklin Sotolongo Padrón.

PUBLICACIONES REALCIONADAS CON ESTA TEMÁTICA

1. M. González, H. García, C. Hermida, R. Marcet y R. Monté. 1992. Caracterización de anticuerpos monoclonales que reconocen la toxina termolábil de *Vibrio cholerae*. Revista Cubana de Medicina Tropical. 44(3): 185-187.
2. H. Delgado, T. Moreira, L. Luis, H. García, T. K. Martino, and A. Moreno. 1995. Preservation of *Vibrio cholerae* by freeze-drying. Cryo - Letters. 16:91-101.
3. J. Benítez, A. Silva, B. Rodríguez, R. Fando, J. Campos, A. Robert, H. García, L. García, and J.L. Pérez. 1996. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: Construction of Live Attenuated El Tor candidate vaccine strains. Archives of Medical Research. 27(3):275-283.
4. M. Pérez, H. García, J. L. Pérez, L. García y B. Cedré. 1997. Purificación de neuraminidasa de *Vibrio cholerae*. Revista Biotecnología Aplicada. 14(4):256-261.
5. T. Moreira, V. Zamora, A. Moreno y H. García. 1997. Comportamiento de diferentes cepas de *Vibrio cholerae* ante la liofilización. Publicación clasificada del CNIC.
6. H. García, L. García, R. Oliva, J. L. Pérez, B. Cedré, R. Domínguez y J. Benítez. 1998. Estudio del patrón de excreción y la capacidad protectora en conejos inmunizados de forma orai con cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* 01 biotipo El Tor. Revista Cubana de Medicina Tropical 50(2): 115-9.
7. H. García, R. Domínguez, V. Torres, L. García, R. Oliva, B. Cedré y A. Talavera. 1998. Obtención de antisueros somático de *Vibrio cholerae* 01 y 0139. VacciMonitor 7(6):2
8. G. Año, H. García, A. Talavera, T. Valmaseda, R. Fando, B. Cedré, O. Ancheta, G. Roura, L. García. 1998. Caracterización microbiológica de cepas de *Vibrio cholerae* 0139. VacciMonitor

7(8):2-6.

9. B. Cedré, H. García, M. Fariñas, A. Talavera y J.F. Infante. 1998. Intestinal colonization of the infant mouse model by attenuated and *Vibrio cholerae* strain. Archives of Medical Research 29(3):231-234.
10. L. García, R. Oliva, B. Cedré, T. Valmaseda, H. Garcia, A. Talavera, J. L. Pérez, and G. Sierra. 1998. Intraduodenal inoculation of adult rabbit for evaluating the immunogenicity of genetically attenuated *Vibrio cholerae* strains. Laboratory Animal Science 48(6):538-541.
11. J. Benitez, L. Garcia, A. Silva, H. García, R. Fando, B. Cedré, A. Pérez, J. Campo, B. L. Rodriguez, J. L. Pérez, T. Valmaseda, O. Pérez, A. Pérez, M. Ramírez, T. Ledon, M. Diaz Jidy, M. Lastre, L. Bravo, and G. Sierra. 1999. Preliminary Assessment of the safety and immunogenicity of a New CTX⁻ (-)negative, Hemagglutinin/Protease-Defective El Tor Strain as a cholera vaccine candidate. Infection and Immunity 67(2):539-545.
12. A. Talavera, L. Riverón, G. Año, J. Oramas, T. Valmaseda, H. García y L. Garcia. 1999. Cinética de crecimiento y expresión de pilina corregulada (PCT) de cultivos en fermentación con la cepa 638 de *Vibrio cholerae*. VaccinMonitor 8(7).
13. B. Cedré, H. García, L. García y A. Talavera. 1999. Estandarización y evaluación del ensayo vibriocida. Revista Cubana de Medicina Tropical 51(3): 156-159.
14. A. Talavera, T. Moreira, G. Año, B. Cedré, H. Delgado, H. García y L. García. 2000. Viabilidad *in vitro* y colonización en ratones neonatos de una formulación vacunal de la cepa 638 de *Vibrio cholerae*. Revista CENIC 31 (2): 110-112.
15. A. Aguila La O, A. G. Herrera, W. Toledo, A. Rodríguez, H. García, J. Hernández, A. Cádiz, G.

- Sierra, and J. Hung. 2000. Isolation and Structure-funtional characterization of human calostrual lactoferrin. *Biotecnología Aplicada* 17:177-182.
16. J.L. Pérez, Y. Pino, T. Valmaseda, G. Año, B. Cedré, H. García, A. Talavera, L. García. 2002. Inhibición del efecto anticolonizante del suero positivo de humanos inoculados con la cepa atenuada 638, *Vibrio cholerae* OI. *Biotecnología Aplicada* 19:19-24.
17. L. García, B. Cedré, A. González, H. García, T. Valmaseda, G. Año, J. L. Pérez, A. Talavera. 2002. Virulencia, inmunogenicidad y capacidad de colonización de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* administradas de forma simultáneas en modelos animales. *Biotecnología Aplicada* 19:133-137.
18. T. Ledon, E. Valle, T. Valmaseda, B. Cedré, J. Campo, B. Rodríguez, K. Marrero, H. García, L. García, R. Fando. 2003. Construction and characterization of 0139 cholera vaccine candidate. *Vaccine* 21(11-12): 1282-91.
19. B. Cedré, Y. Viel, T. Rodríguez, G Año, Y. Pino, H. García, T. Valmaseda, I. González, I. Delgado, A. Talavera, J.L. Pérez, L. García. 2003. Validación del ensayo Vibriocida colorimétrico para determinar anticuerpos séricos contra cepas candidatas vacunales de *Vibrio cholerae*. *VacciMonitor* 23, Año 12 No. 1.
20. Y. Pino, T. Valmaseda, Y. Medina, B. Cedré, G. Año, H. García, J.L. Pérez, A. Talavera, I. González I. Delgado, L. García. 2003. Validación de un ensayo de ELISA para la determinación de anticuerpos anti-LPS de *Vibrio cholerae*. *VacciMonitor* 10 Año 12 No.1.

PREMIOS DEL FORUM NACIONAL DE CIENCIA TÉCNICA RELACIONADOS CON ESTA TEMÁTICA.

1. Obtención de cepas atenuadas y antígenos puros de *Vibrio cholerae* y completamiento de la batería

analítica necesaria para la evaluación de una vacuna anti-cólera. J. Benítez, L. García, A. Silva, B. L. Rodríguez, R. Fando, H. García, J. Campos, J. L. Pérez, A. Robert, R. Oliva, B. Cedré, M. Alfonso, C. Torres, T. Valmaseda, J. F. Infante, P. Pérez. Ponencia DESTACADA IX FORUM Nacional de Ciencia y Técnica. 1994.

2. Estudio genético, bioquímico e inmunológico integral de la virulencia e inmunogenicidad de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae*. J. Benítez, L. García, A. Silva, B. L. Rodríguez, H. García, R. Fando, J. Campos, A. Robert, J. L. Pérez, R. Oliva, B. Cedré, M. Alfonso, C. Torres, T. Valmaseda. Ponencia RELEVANTE X FORUM Nacional de Ciencia y Técnica. 1995.

**RESULTADOS RELEVANTES DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA
RELACIONADOS CON ESTA TEMÁTICA**

1. Estudio genético, bioquímico e inmunológico integral de la virulencia e inmunogenicidad de cepas atenuadas de *Vibrio cholerae*. 1996. J. Benítez, L. García, A. Silva, B. L. Rodríguez, H. García, R. Fando, J. Campos, A. Robert, J. L. Pérez, R. Oliva, B. Cedré, M. Alfonso, C. Torres, T. Valmaseda.
2. Desarrollo de biomodelos eficaces en la evaluación de preparados vacunales contra leptospira y cólera. 1997. R. Oliva, J. F. Infante, M. González, L. García, P. Pérez, Y. Bebelagua, J. L. Pérez, M. Fariñas, H. García, L. Estévez, B. Cedré, M. Naranjo, Y. Rodríguez, V. Pérez, E. Muñoz, G. Sierra, C. Campa.
3. *Vibrio cholerae* 638, primera cepa atenuada cubana, candidato vacunal anti-cólera en completar su fase de caracterización y evaluación investigativa. 1999. L. García, R. Fando, A. Pérez, G. Sierra, H. García, B. Cedré, T. Valmaseda, A. Talavera, G. Año, B. L. Rodríguez, J. L. Pérez, J. Campos, M.

Ramírez, L. Bravo, O. Pérez, A. Pérez Sierra, T. Ledón, J. Menéndez, M. D. Jidy, I. González, T. Serrano, A. Moreno.

4. Estudio de la respuesta inmune en humanos a *Vibrio cholerae* 638. Identificación de antígenos de interés vacunal. Base para el desarrollo de una vacuna por subunidades. 2002. J. L. Pérez, Y. Pino, G. Año, T. Valmaseda, A. Talavera, L. García, H. García, B. Cedré.

REFERENCIAS

Adeyeye J, Azurmendi HF, Stroop CJ, Sozhamannan S, Williams AL, Adetumbi AM, et al. Conformation of the hexasaccharide repeating subunit from the *Vibrio cholerae* 0139 capsular polysaccharide. *Biochemistry* 2003;42(13):3979-88.

Agrawal G, Jalgaonkar SV, Jagtap PM, Kamlakar UP, Deagade NG. Emergence and re-emergence of *Vibrio cholerae* 0139: an epidemiological study during 1993-2002 at Nagpur, Central India. *Indian J Med Sci.* 2003;57(4): 155-7.

Albert MJ. *Vibrio cholerae* 0139 Bengal. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:2345-49.

Aiba S, Humphrey AE, Millis NF. Scale-UP. En: *Bioquímica y Ingeniería. Ciencia y Técnica*, ed. La Habana; 1970. p. 163-185

Angelichio MJ, Spector J, Waldor MK, Camilli A. *Vibrio cholerae* intestinal population dynamics in the suckling mouse model of infection. *Infect Immun.* 1999;67(8):3733-39.

Año G, García H, Talavera A, Valmaseda T, Fando R, Cedré B, et al. Caracterización microbiológica de cepas de *Vibrio cholerae* 0139. *VacciMonitor* 1998;7(8):2-6.

Attridge SR, Rowley D. The role of the flagellum in adherence of *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis.*

1993; 147:864-72.

Attridge SR, Manning Pa, Holmgren J, Jonson G. Relative significance of manosa- sensitive hemagglutinin and toxin-nucleogulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor. Infect Immun. 1996;64(8):3369-73.

Bajaj JK, Baradker VP, Joshi SG, Damle AS, Kayararte RP, Deshmukh AB.

Epidemiology of cholera-a five year study. J Commun Dis. 2001;33(4):282-5

Baker FJ. Tinción de microorganismos. En: Olivares L, editor. Manual de técnicas bacteriológicas. 2a. ed. Zaragoza, España; 1970. p. 26.

Baselski V, Briggs R, Parker C. Intestinal fluid accumulation induced by oral challenge with *Vibrio cholerae* or cholera toxin in infant mice. Infect Immun. 1977; 15:704-12.

Baudry B, Fasano A, Ketley J, Kaper JB. Cloning of a gene (*zot*) encoding a new toxin produced by *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 1992; 60:428-34.

Benenson AS, Saad A, Mosley K. The vibriocidal antibody response of cholera patients determined by a microtechnique. Bull W.H.O. 1968; 38:277-85.

Benitez JA, Silva A, Rodríguez B, Fando R, Campos J, Robert A, et al. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. Archives of Medical Research 1996; 27:275-83.

Benitez JA, Spelbrink RG, Silva A, Phillips TE, Stanley CM, Boesman-Finkelslein M,

et al. Adherence of *Vibrio cholerae* to cultured differentiated human intestinal cells: **an in vitro** colonization model. Infect Immun. 1997. 65:3474-77.

Benitez JA, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, et al. Preliminary assesment of the safety and immunogenicity of a new CTX-negative, haemagglutinin/protease-defective El Tor strain

as a cholera vaccine candidate. *Infect Immun.* 1999; 67:539-45.

Bhattacharya SK. An evaluation of current cholera treatment. *Expert Opin Pharmacother.*

Bina J, Zhu J, Dziejman M, Faruque S, Calderwood S, Mekalanos J. ToxR regulon of *Vibrio cholerae* and its expression in vibrios shed by cholera patients. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(5):2801 -6.

Black RE, Levine MM, Clements LM, Young CR, Svennerhol AM, Holmgren, J.

Protective efficacy in humans of Killed whole vibrio oral cholera vaccine with and without the B subunit of cholera toxin. *Infect Immun.* 1987;55(5):1116-20.

Booth BA, Boesman-Finkelstein M, Finlstein RA. *Vibrio cholerae* hemagglutinin-protease nick cholerae enterotoxin. *Infect Immun.* 1984; 45:558-60.

Boyd EF, Moyer KE, Shi L, Waldor MK. Infectious CTX(j) and the Vibrio Pathogenicity Island Prophage in *Vibrio mimicus*: Evidence for recent horizontal transfer between *V mimicus* and *V. cholerae*. *Infect Immun.* 2000; 68:1503-13.

Brandtzaeng P. Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol.* 2003;293(1):3-15.

Campos J, Fando R, Silva A, Rodriguez BL, Benitez JA. Replicating function of the RSI element associated with *Vibrio cholerae* CTX phi prophage. *FEMS Microbiol Lett.* 1998;164(1): 141-7.

Capó M. Bioética animal: desarrollo de un concepto privado. *Animales de Experimentación.* 1999;4(5).

CDC/NCID.OPS. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*. En. Programa especial de publicaciones. 1994.

- Cedré B, García HM, García LG, Talavera A.** Estandarización y evaluación del ensayo vibriocida modificado. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 1999;51(3): 156-9
- Cohen MB, Giannella RA, Bean J, Taylor DN, Parker S, Hooper A, et al.** Randomized, controlled human challenge study of the safety, immunogenicity and protective efficacy of a single dose of Perú-15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infect Immun.* 2002;7(4): 1965-70.
- Cray WC, Tokunaga E, Pierce NF.** Successful colonization and immunization of adult rabbits by oral inoculation with *Vibrio cholerae* 01. *Infect Immun.* 1983;41:735-41.
- Cryz SJ, Glück R.** Large-scale production of live attenuated bacterial and viral vaccines. En: Levine MM, Wodrow GC, Kaper JB, Cobun GS, editores. *New generation vaccines*. 2a. ed. New York. 1997. p. 1153-62.
- Cryz SJ, Pasteris O, Varallyay SJ, Furer E.** Factors influencing the stability of live oral attenuated bacterial vaccines. *Dev Biol Stand.* 1996;87:277-81.
- Chatterjee SN, Chaudhuri K.** Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim Biophys Acta.* 2003; 1639(2):65-79.
- Chattopadhyay K, Banerjee KK.** Unfolding of *Vibrio cholerae* hemolysin induces oligomerization of the toxin monomer. *J Biol Chem.* 2003;278(40):38470-5.
- Chiavelli DA, Marsh JW, Taylor RK.** The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to Zooplankton. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(7):3220- 25.
- Dalsgaard A, Albert MJ, Taylor DN, Shimada T, Meza R, Serinchantarlergs O, Hechavarria P.** Characterizations of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from a outbreak of diarrhea in Lima, Perú. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2715-32.

Davis BM, Waldor MK. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(1):35-42.

De SN, Chatterjee DN. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J Pathol Bacteriol.* 1953;66:559-63.

De Mare L, Andersson L, Hagander P. Probing control of glucose feeding in *Vibrio cholerae* cultivations. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2003;25(4):221-8.

De Valdez GF, Giori GS, Ruiz Holgado AP, Oliver G. Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49:413-15.

Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Lang AB, Viret JF. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine* 2003;21(7):678-83.

Dutta NK, Panse MW, Kulkarni DR. Role of cholera toxin in experimental cholera. *J Bacteriol.* 1959;78:594-95.

Faruque SM, Abdul Alim AR, Roy SK, Khan F, Nair GB, Sack RB, et al. Molecular analysis of rRNA and cholera toxin genes carried by the new epidemic strain of toxigenic *Vibrio cholerae* 0139 synonym Bengal. *J Clin Microbiol.* 1994;32(4): 1050-53.

Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(4): 1301-14.

Faruque SM, Rahman M, Asadulghani M, Islam MN, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion of environmental *Vibrio mimicus* strains by CTX. *Infect Immun.* 1999;67: 5723-29.

Faruque SM, Asadulghani M, Rahman M, Waldor MK, Sack DA. Sunlight-induced propagation of the lysogenic phage encoding cholera toxin. *Infect Immun.* 2000;68:4795- 4801.

- Faruque SM, Chowdhury N, Kamruzzaman M, Ahmad QS, Faruque AS, Salam MA, et al.** Reemergence of epidemic *Vibrio cholerae* 0139, Bangladesh. *Emerg Infect Dis.* 2003a;9(9):1116-22.
- Faruque SM, Zhu J, Asadulghani, Kamruzzaman M, Mekalanos JJ.** Examination of diverse toxin-corregulated pilus-positive *Vibrio cholerae* strains fails to demonstrate evidence for *Vibrio* pathogenicity island phage. *Infect Immun.* 2003b;71(6):2993-9.
- Faruque SM, Kamruzzaman M, Meraj IM, Choudhury N, Nair BG, Sack RB, et al.** Pathogenic potential of environmental *Vibrio cholerae* strains carrying genetic variants of the toxin-corregulated pilus pathogenicity island. *Infect Immun.* 2003c;71(2): 1020-25.
- FDA.** General Biological Products Standards. Code of Federal Regulations. Section 610.18 Cultures 2002; Title 21. Part 610.
- Fields PI, Popovic K, Wachsmuth K, Olsvik O.** Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol.* 1992;30:2118-21.
- Finkestein RA, LoSpalluto JJ.** Pathogenesis of experimental cholera: preparation and isolation of cholera toxin and cholera toxinogen. *J Exp Med.* 1969; 130:185.
- Finkestein RA, Boesman-Finkelstein M, Holt, P.** *Vibrio cholerae* hemagglutinin/lectin/protease hydrolyzes fibronectin and ovomucin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983;80:1092-95.

///

Finkelstein RA. Cholera enterotoxin (eholeragen): a historical perspective. En: Barua **D**, Greenough III WB, editores. Cholera, ed. New York: Plenum Medical Book Company; 1992.

Finkelstein RA, Boesman-Finkelstein M, Hase CC. *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease, colonial variation, virulence and detachment. Infect Immun. 1992;60:472-78.

García L, Benítez J. Hacia el desarrollo de una vacuna eficaz contra el cólera. VaciMonitor 1996;5(2).2-6.

Gardel CL, Mekalano JJ. Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. Infect Immun. 1996;64:2246-55.

Giono S, Gutiérrez LE, Hinojosa AM. Manual de Procedimiento para el aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* 01. En: Publicación Técnica 17, editores. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica ed. México D.F, 1991. p. 10.

Good Manufacturing Practices. European Communities. Pharmaceutical legislation. Medicinal Products for Human and Veterinary Use. 1998;4.

Hall RH, Khambaty FM, Kothary M, Keasler SP. Non 01 *Vibrio cholerae*. Lancet 1993;342:430.

Hajishengallis G, Nikolova E, Russell MW. Inhibition *Streptococcus mutans* adherence to saliva-coated hydroxyapatite by human secretory immunoglobulin A antibodies to the cell surface protein antigen I/II: Reversal by IgA 1 protease cleavage. Infect Immun. 1992;60:5057-64.

//

Hase CC, Thai M, Boesman-Finkelstein M, Mar VL, Burnette WN, Kaslow HR, et al.

Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains producing inactive cholera toxin analog. Infect Immun. 1994; 62:3051-55.

Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwin ML, Dodson RJ, et al. DNA

sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 2000;406: 477-83.

Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, Mekalanos JJ, Taylor RK, Levine MM. Toxin, toxin co-regulated pili and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *J Exp Med*. 1988;168:1487-92.

Holmgren J, Svennerholm AM. Vaccines Against Diarrheal Diseases. En: Perlmann P, Wigzell H. editores. *Vaccines*, ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. 1999. p. 290-328

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. En: Williams and Wilkins, editores. A Waverly Company. Ninth edition. Baltimore-Philadelphia-Hong Kong-London-Munich-Sidney-Tokio; 1994. p. 192-94.

Honda T, Finkelstein RA. Purification and characterization of hemolysin produced by *Vibrio cholerae* biotype El Tor: another toxic substance produce cholera vibrios. *Infect Immun*. 1979;26:1020-27.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human. The ICH Steering Committee 1996.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products. International Conference on Harmonisation of Technical requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. The ICH Steering Committee 1997.

Ichinose Y, Yamamoto K, Nakanose N, Tanabe NJ, Takeda T, Miwanati TK et al. Enterotoxicity of the El Tor-like hemolysin of non-O1 *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*. 1987;55:1090-95.

Jabeen K, Hasan R. Re-emergence of *Vibrio cholerae* 0139 in Pakistan: report from a tertiary care hospital. *J Pak Med Assoc*. 2003;53(8):335-8.

Jacob A, Sinha VB, Sahib MK, Srivasta R, Kaper JB, Srivasta BS. Identification of a 33 KDa antigen associated with an adhesive and colonizing strain of *Vibrio cholerae* El Tor and its role in

protection. *Vaccine* 1993;11:376-382.

Jansen WH, Gielsen SG, Rijpkema SGT, Guinee PAM. Priming and boosting of the rabbit intestinal immune system with live and killed, smooth and rough *Vibrio cholerae* cells. *Microbiol Pathog.* 1988;4:21-26.

Jertborn M. Immune response in human after oral cholera vaccination. *Res Microbiol.* 1987;140:456-63.

Johnson JA, Salles CA, Panagrahi P, Albert MJ, Wright AC, Johnson RJ, et al. *Vibrio cholerae* 0139 synonym Bengal is closely related to *Vibrio cholerae* El Tor but has important differences. *Infect Immun.* 1994;62: 2108-10.

Jonson G, Holmgren J, Svennerholm AM. Identification of a mannose-binding pilus on *Vibrio cholerae* El Tor. *Microb Pathog.* 1991 ;11:433-41.

Jonson G, Holmgren J, Svennerholm AM. Analysis of expression of toxin nucleogulated pili in classical and El Tor *Vibrio cholerae* 01 *in vitro* and *in vivo*. *Infect Immun.* 1992;60:4278-84.

Jonson G, Lebens M, Holmgren J. Cloning and sequencing of *Vibrio cholerae* mannose- sensitive haemagglutinin pilin gene: localization of *mshA* within a cluster of type 4 pilin genes. *Mol Microbiol.* 1994;13:109-18.

Jouravleva EA, McDonald GA, Garon CF, Boesman-Finkelstein M, Finkelstein RA.

Characterization and possible functions of a new filamentous bacteriophage from *Vibrio cholerae* 0139. *Microbiology* 1998;144:315-24.

Kabir S, Ahmad N, AH S. Neuraminidase production by *Vibrio cholerae* 01 another diarrheagenic bacteria. *Infect Immun.* 1984;44:747-749.

Kabir S. Preparation and immunogenicity of a bivalent cell-surface protein-polysaccharide conjugate of *Vibrio cholerae*. *J Med Microbiol.* 1987;23:9-11.

Kam KM, Luey CK, Tsang YM, Law CP, Chu MY, Cheung TL, et al. Molecular subtyping of *Vibrio cholerae* 01 and 0139 by Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Hong Kong: correlation with epidemiological events from 1994 to 2002. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4502-11.

Kaper JB, Lockman H, Baldini MM, Levine MM. A recombinant live oral vaccine. *Bio/Technology* 1984;2:345-49.

Kaper JB, Fasano A, Trucksis M. Toxins of *Vibrio cholerae*. En: Wachsmuth I, Blake PA, Olsvik O, editores. *Vibrio cholerae* and Cholera, Molecular to Global Perspectives American Society for Microbiology, ed. Washington DC; 1994. p. 145-168.

Karaolis DK, Johnson JA, Bailey CC, Boedeker EC, Kaper JB, Reeves PR. A *Vibrio cholerae* pathogenicity associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:3134-39.

Karaolis DK, Somara S, Maneval DR., Johnson JAJr, Kaper JB. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature* 1999;399:375-79.

Karaolis DK, Lan R, Kaper JB, Reeves PR. Comparison of *Vibrio cholerae* pathogenicity islands in sixth and seventh pandemic strains. *Infect Immun.*

2001 ;69(3): 1947-52

Kenner JR, Coster TS, Taylor DN, Trofa AF, Barrera Oro M, Hyman T, et al. Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* 01. *J Infect Dis.* 1995;172:1126-29.

Kirn TJ, Bose N, Taylor RK. Secretion of a soluble colonization factor by the TCP type 4 pilus biogenesis pathway in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol.* 2003;49(1):81 -92. **Kotetishvilli M, Stine OC,**

Chen Y, Kreger A, Sulakvelidze A, Sozhamannan S, et al. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides

a measure of phylogenetic relatedness. *J Clin Microbiol.* 2003;41(5):2191-6.

Kotloff KL, Wasserman SS, O'Donnel S. Safety and Immunogenicity in North Americans of a single dose of live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. Results of a Randomized, Placebo-controlled double-blind crossover trial. *Infect Immun.* 1992;60:4430-32.

Krukonis ES, DiRita VJ. From motility to virulence: Sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(2): 186-90.

Ledon T, Valle E, Valmaseda T, Cedre B, Campos J, Rodriguez B, et al. Construction and characterization of 0139 cholera vaccine candidate. *Vaccine* 2003;21 (11-12): 1282-91 **Lee SH, Hava**

DL, Waldor MK, Camille A. Regulation and temporal expression patterns of *Vibrio cholerae* virulence genes during infection. *Cell.* 1999;99(6):625-34.

Levine MM. Immunity to cholera as evaluated in volunteer. En: Ouchterlony O, Holmgren J, editores. Cholera and related diarrheas, ed. Washington DC; 1980. p. 195.

Levine MM, Black RE, Ferreccio C, Black RE, Germanier R. Large-scale field trial of Ty21a live oral typhoid vaccine in enteric-coated capsule formulation. *Lancet.* 1987; 1(8541): 1049-52.

Levine MM, Kaper JB, Herrington D, Ketley J, Losonsky G, Tacket CO, et al. Safety, immunogenicity and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD103 and CVD103HgR. *Lancet* 1988;2:2467-70.

Levine MM, Pierce NF. Immunity and vaccine development. En: Barua D, Greenough III WB, editores. Cholera. New York: Plenum Medical Book Company; 1992:285-327.

Levine MM, Tacket CO. Recombinant live cholera vaccines. En: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O, editores. *Vibrio cholerae* and cholera: molecular and global perspectives. Washington DC: American Society for Microbiology; 1994. p. 395-414.

Liang W, Wang S, Yu F, Zhang L, Qi G, Liu Y, Gao S, Kan B. Construction and evaluation of a

safe, live, oral *Vibrio cholerae* vaccine candidate, IE M108. Infect Immun. 2003;71(10):5498-504.

/

Losonsky G, Lim Y, Motamedi P, Comstock LE, Johnson JA, Morris G Jr, et al.

Vibriocidal antibody response in North American Volunteers exposed to wild-type or vaccine *Vibrio cholerae* 0139: Specificity and relevance to immunity. Clin Diag Lab Immun. 1997;4:264-9.

Lycke N, Svennerholm AM, Holmgren J. Strong biotype and serotype cross-protective antibacterial and antitoxic immunity in rabbits after cholera infection. Microbiol Pathog. 1986;1:361-71.

Mackenzie AP. Comparative studies on the freeze-drying survival of various bacteria: Gram type, suspending medium and freezing rate. Dev Biol Stand. 1977;36:263.

Mata L. El cólera: historia, prevención y control. Editorial Universidad de Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 1992;3:42-93.

Mell SF, Fullner KJ, Wimer-Macking S, Lencer WI, Mekalanos JJ. Association of protease activity in *Vibrio cholerae* strains with decreased in transcellular epithelial resistance of polarized T84 intestinal epithelial cells. Infect. Immun. 2000;68(11):6487- 6492.

Merrell DS, Hava DL, Camilli A. Identification of novel involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. Mol Microbiol. 2002;43(6): 1471 -91.

Migasena S, Pitisuttitham P, Prayurahong P, Suntharasamai P, Supanaranond W, Dasakorn V, et al. Preliminary assessment for safety and immunogenicity of live oral cholera vaccine strain CVD 103 HgR in healthy Thai adults. Infect Immun. 1989;57:3261- 64.

Moreira T, Gutiérrez A, Delgado H. Aspectos físicos relacionados con los aditivos en el proceso de liofilización. Papel relevante de los carbohidratos. Biotecnología aplicada. 1994; 11(2).

Moreno L. Desarrollo de un proyecto de investigación. Rev Mex de Pediatría **1997;64(4)- 171-4.**

Morris JG, Losonsky GE, Johnson JA, Tacket CO, Nataro JP, Panigrahi P, et al.

Clinical and immunological characteristics of *Vibrio cholerae* 0139 Bengal infection in North American volunteers. J Infect Dis. 1995; 171:903-8.

Morton D. Terminación anticipada del experimento por consideración humanitaria. Animales de Experimentación. 1998;4(2).

Mukhopadhyay AK, Basu A, Garg P, Bag PK, Ghosh A, Bhattacharya SK, et al.

Molecular Epidemiology of reemergent *Vibrio cholerae* 0139 Bengal in India. J Clin Microbiol 1998;36:2149-52.

Naka A, Yamamoto K, Albert JM, Honda T. *Vibrio cholerae* 0139 produce a protease that is indistinguishable from the hemagglutinin/protease of *Vibrio cholerae* 01 and non-01. FEMS Immunol Med Microbiol. 1995;11:87-90.

Nesper J, Schild S, Lauriano CM, Kraiss A, Klose KE, Redil J. Role of *Vibrio cholerae* 0139 surface polysaccharides in intestinal colonization. Infect Immun. 2002;70(11):5990-96.

Olso R, Gouaux E. *Vibrio cholerae* cytolysin is composed of an alpha-hemolysin-like core. Protein Sei. 2003; 12(2):379-83.

Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos 822. 42º informe. Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos 1992

Pearson GD, Woods A, Chiang SL, Mekalanos JJ. CTX genetic element encodes site- specific recombination system and an intestinal colonization factor. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:3750-54.

Peralta JM. Comités Éticos de Experimentación Animal en los Estados Unidos. Animales de Laboratorio. 1998; No. 2.

Pérez J, Villaverde M, Costa F. Programa de computación: Cinética de Fermentaciones. Universidad de la Habana. 1992. Ver. 1.1.

Peterson KM. Expression of *Vibrio cholerae* virulence genes in response to environmental signals. Curr

Issue Intest Microbiol. 2002;3(2):29-38.

Pichel M, Rivas M, Chinen I, Martin F, Ibarra C, Binsztein N. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* 01 in Argentina and Emergence of a new variant. J Clin Microbiol. 2003 ;41 (1): 124-134.

Popovic T, Bopp CH, Olsvik O, Wachsmuth K. Epidemiologic application of standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* 01. J Clin Microbiol. 1993 ;31 (9):2472- 82.

Qu M, Kan B, Qi G, Liu Y, Gao S. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* 0139 in China: Polymorphism of ribotypes and CTX element. J Clin Microbiol. 2003 Jun;41(6):2306-10.

Ramamurthy T, Garg S, Sharma R, Bhattacharya SK, Nair GB, Shimada T, et al.

Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India.

Lancet 1993;341:703-4.

Ramamurthy T, Yamasaki S, Takeda Y, Nair GB. *Vibrio cholerae* 0139 Bengal: Odyssey of a fortuitous variant. Microbes Infect. 2003;5(4):329-44.

Reed LJ, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg.

1938;27:493-97.

Regulación 6/94. Buenas Prácticas de Producción de Biológicos. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. 1994.

Regulación 16/2000. Directrices sobre Buenas Prácticas de Fabricación de Productos Farmacéuticos.

Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. 2000. **Reynolds ES.** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol. 1963; 17:208.

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

Richardson SH. Animal models in cholera research. En: Wachsmuth IK, Blake PA, Olsvik O, editores.

Vibrio cholerae and cholera: molecular and global perspectives, ed. Washington DC; 1994. p. 203-26.

Richie EE, Punjabi NH, Sidharta YY. Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR, in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. *Vaccine* 2000;18:2399-2410.

Robert A, Silva A, Benitez JA, Rodriguez BL, Fando R, Campos J, et al. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin protease gene using a novel reporter enzyme, *Clostridium thermocellum* endoglucanase A. *Vaccine* 1996;14:1517-22.

Sack RB, Carpenter CCJ. Experimental canine cholera. **I.** Development of the model. **J Infect Dis.** 1969;119:138-149.

Sack DA, Tacket CO, Cohen MB, Sack B, Losonsky GA, Shimko J, et al. Validation of a volunteer model of cholera with frozen bacteria as the challenge. *Infect Immun.* 1998;66(5): 1968-72.

Sack RB, Siddique AK, Longini 1M Jr, Nizam A, Yunus M, Islam MS, et al. A 4-year study of the epidemiology of *Vibrio cholerae* in four rural areas of Bangladesh. *J Infect Dis.* 2003; 187(1):96-101.

Sakazaki R, Donovan TI. Serology and epidemiology of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Methods Microbiol* 1994;16:271-289.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* En: Cold Spring Harbor, editores. 2^a. ed., New York, 1989. p. 6.9.

Sasmal D, Guhathakurta B, Ghosh AN, Pal CR, Datta A. Studies on adhesion, haemagglutination and other biological properties of *Vibrio cholerae* 0139. *FEMS Immunology Medical and Microbiology* 1995;10:199-206.

Segupta DK, Finkelstein MB, Finkelstein RA. Antibody against the capsule of *Vibrio cholerae* 0139 protects against experimental challenge. *Infect Immun.* 1996;64:343-45.

Shimada T, Arakawa E, Itoh K, Okitsu T, Matsushima A, Asai Y, et al. Extended serotyping scheme for *Vibrio cholerae*. *Current Microbiology* 1994;28:175-8.

Silva AJ, Pham K, Benitez JA. Haemagglutinating/porin expression and mucin gel penetration in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *Microbiology* 2003; 149(7): 1883-91.

Simonet VC, Basle A, Klose KE, Delcour AH. The *Vibrio cholerae* porins Omp U and Omp T have distinct channel properties. *J Biol Chem.* 2003;278(19): 17539-45.

Skorupski K, Taylor RK. Control of the ToxR virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. *Mol Microbiol.* 1997;25:1003-9.

Snell JJS. General introduction to maintenance methods. En: Kirsop BE, Doyle A, editores. *Maintenance of microorganisms and cultured cells.* 2a. ed. Academic Press, London: 1991. p. 21-30.

Spangler BD. Structure and function of the cholera toxin and other related enterotoxins. *Microbiol Rev.* 1992;56(4).

Spira WM, Sack RB, Froehlich JL. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Infect Immun.* 1981;32:739-747.

Spira WW, Sack RB. Kinetics of early cholera infection in the removable intestinal tie- adult rabbit diarrhea model. *Infect Immun.* 1982;35:952-957.

Spurr ER. A low-viscosity epoxyresin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct Res.* 1969;26:31.

Sun DX, Mekalanos JJ, Taylor RK. Antibodies directed against the toxin-nucleoagulated pilus isolated from *Vibrio cholerae* provide protection in the infant mouse experimental cholera model. *J Infect Dis.* 1990;161:1231-36.

Svennerholm AM, Sack DA, Holmgren J, Bardhan PK. Intestinal antibody response after immunization with cholera B subunit. *Lancet* 1982;62:305-8.

Packet CO, Lososky G, Natarro JP, Wasserman SS, Cryz SJ, Edelma R et al.

Extension of the volunteer challenge model to study South American cholera in population of volunteers with predominantly blood group antigen O. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995a; 89:75-7.

Tacket CO, Lososky G, Natarro JP, Comstock L, Michalski J, Edelma R, et al.

Initial clinical studies of CVD 112 *Vibrio cholerae* 0139 live oral vaccine: safety and efficacy against experimental challenge. *J Infect Dis.* 1995b; 172:883-6.

Tacket CO, Lososky G, Natarro JP, Comstock L, Michalski J, Edelma R, et al. Volunteer studies investigating the safety and efficacy of live oral El Tor *Vibrio cholerae* 01 vaccine strain CVD 111. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56:533-37.

Tacket CO, Lososky G, Natarro JP, Cryz SJ, Edelman R, Fasano A, et al. Safety and Immunogenicity of live oral Cholerae Vaccine candidate CVD 110, a ActxA, Azot Aace derivative of El Tor Ogawa *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis.* 1998;168:1536-40.

Talavera A, Pérez EM. Methodology for process characterisation in R&D to facilitate technology transfer in biopharmaceuticals. *Inf J Biotechnology* 2003;5 (1): 10-13.

Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Mekalanos JJ. Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;25:2833-37.

Taylor RK. Genetic studies of enterotoxin and other potential virulence factor of *Vibrio cholerae*. En: Hopwood DA, Chapter KF, editores. Genetics of bacteria diversity, ed. London, Academic; 1989. p. 309-29.

Tjaniadi P, Lesmana M, Subekti D, Machupud N, Komalarini S, Santoso W, et al.

Antimicrobial resistance of bacterial pathogens associated with diarrheal patients in Indonesia. Am J Trop Med Hyg. 2003;68(6):666-70.

Trucksis M, Galen E, Michalski, J, Fasano A, Kaper JS. Accesory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of *Vibrio cholerae* virulence cassette. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:5267-71.

Ujiye A, Nakatomi M, Utsunomiya A, Mitsui K. Experimental cholera mice. First report on the oral infection. Trop Med. 1968;10:65-71.

Usera MA, Echeita A, Olsvik O, Evins GM, Cameron DN, Popovic T. Molecular subtyping of *Vibrio cholerae* O1 strains recently isolated from patient, food and environmental samples in Spain. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1994; 13(4):299-303. **Vacca LL.** Laboratory Manual of histochemistry. En: Raven Press Books, editores. ed. New York, 1985. p. 27-32, 118-119, 541-549.

Valle E, Ledon T, Cedre B, Campos J, Valmaseda T, Rodriguez B, et al. Construction and characterization of a non proliferative El Tor Ogawa vaccine candidate derived from strain 638. Infect Immun. 2000;68:6411-18.

Varela P, Rivas M, Binsztein N, Cremona ML, Herrmann P, Burrone O, et al.

Identification of toxigenic *Vibrio cholerae* from the Argentine outbreak by PCR for *ctx* a1 and *ctx* A2-B. FEBS Lett. 1993;315:74-6.

Varela P, Pollevick GD, Rivas M, Chinen I, Binsztein N, Frasc ACC et al. Direct

detection of *Vibrio cholerae* in stool samples. J Clin Microbiol. 1994;32(5): 1246-48. **Villaverde M.,**

Martínez J. Determinación de glucosa: mediante el método del dinitrosalicílico de Summer y Somer (1944) modificado por Weller (1959). En: Manual de Prácticas de Laboratorio de Ingeniería Bioquímica, ed. Pueblo y Educación; 1989. p. 31-32. **Voss E, Attridge SR.** In vitro production of toxin-correlated pili by *Vibrio cholerae* El Tor. Microbiol Pathog. 1993;15:255-68.

Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science 1996;272:1910-14.

Waldor MK, Raychaudhuri D. Bacterial genomics: Treasure trove for cholera research. Nature 2000; 406(3):469-70

Wahdan MH Serie C, Cerisier Y. A controlled field trial of live *Salmonella typhi* oral vaccine against typhoid: Three-year results. J Infect Dis. 1982;145:292-95.

Weintraub A, Widmalm G, Jasson M, Hultenby K, Albert JM. *Vibrio cholerae* 0139 Bengal possesses a capsular polysaccharide which may confer increased virulence. Microbiol Pathog. 1994;16:235-41.

West PA, Colwell RR. Identification and classification of Vibrionaceae. An overview. En: Colwell R, editor. Vibrios in the environment, ed. A Willey-Interscience Publication. 1984. **World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization.**

Requirements for typhoid vaccine (live, attenuated, Ty21a, oral). Thirty-four report, Technical Report Series 700, Geneva. Switzerland; 1984. p. 48

World Health Organization. Meeting on the potential role of new cholera vaccine in the prevention and control of cholera outbreaks during acute emergencies. Document CDR/GPV/95.1. World Health Organization, Geneva, Switzerland; 1995.

World Health Organization. A WHO Guide to Good manufacturing Practices (GMP) requirements. Part 1: Standard Operating Procedures and master formulae. Geneva; 1997. **World Health Organization.** Weekly epidemiological record. 2001 ;76(16): 117-124.

World Health Organization. Ethical principles for medical research involving human subjects. En: Bulletin of the World Health Organization 2001. p. 373-374.

Xu Q, Dziejman M, Mekalano JJ. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during growth and midexponential phase in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100(3): 1286-91

Yamamoto T, Yokota T. Electron microscopy study of *Vibrio cholerae* 01 adherence to the mucus coat and villus surface in the human small intestine. Infect Immun. **1986;56:2753-59.**

ANEXO 1
PNO 20-036



INSTITUTO
FINLAY

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
Ejemplar No.	Versión 1	Pág. 1/16

Título: Elaboración y Control de un lote de Siembra de trabajo de *VIBRIO CHOLERAE*

1. Objetivo y Alcance

Establecer la metodología a seguir para obtener y controlar un lote de siembra de trabajo de *Vibrio cholerae*, a partir de un lote de siembra de referencia.

Este procedimiento es aplicable en el Laboratorio de Liofilización y Conservación de Cepas (DACTA) y en el Departamento de Bacterias Enteropatógenas de la Vicepresidencia de Investigaciones, del Instituto Finlay.

2. Responsabilidades

Los especialistas en microbiología y técnicos medios, estarán previamente entrenados en Buenas Prácticas de Laboratorio y dominarán los conocimientos de Bioseguridad, tendrán pleno conocimiento de este PNO y estarán calificados para realizar el mismo.

El Jefe del laboratorio supervisará y controlará el cumplimiento de los pasos establecidos en este PNO.

3. Frecuencia

La elaboración de un nuevo lote de siembra de trabajo de *Vibrio cholerae* se realizará cuando se necesite, teniendo en cuenta la estabilidad de las características de interés de las cepas y los consumos por parte del área de producción.

El control se realizará inmediatamente después de elaborado el lote y posteriormente con una frecuencia anual, excepto la viabilidad que se determinará cada 6 meses.

4. Referencias/Documentos aplicables

CDC/NCID. OPS. 1994. Métodos de laboratorio para el diagnóstico de *Vibrio cholerae*

PNO 10-008 "Almacenamiento y distribución de los lotes de siembra de referencia elaborados en DACTA"

PNO 12-048 "Tinción de Gram"

PNO 12-127 "Ensayos bioquímicos de control de cepas bacterianas utilizadas en la producción y control de vacunas"

PNO 12-160 "Determinación de la viabilidad por el método de micocuento"

PNO 12-176 "Preparación del inóculo para los ensayos de reactogenicidad e inmunogenicidad en humanos de cepas de *Vibrio cholerae*"

PNO 12-241 "Determinación de la dosis letal 50 de cepas de *Vibrio cholerae*"

PNO 17-027 "Preparación de los medios de cultivos y soluciones en el Laboratorio de Microbiología"

PNO 17-059 "Preparación de soluciones"

PNO 17-118 "Elaboración del medio Luria Bertani (LB)"

PNO 17-120 "Elaboración del medio Caldo Triptona - Peptona (TP)"

PNO 18-018 "Esterilización de material limpio y sucio"

PNO 27-001 "Manipulación y organización de las operaciones en el gabinete de seguridad biológica clase II"

PNO 27-002 "Descontaminación gaseosa del gabinete de seguridad biológica"

PNO 27-003 "Limpieza del gabinete de seguridad biológica clase II"

PE- 4 "Procedimiento de emergencia para casos de derrame de material infeccioso dentro del gabinete de seguridad biológica" PE- 5 "Procedimiento de emergencia para casos de ingestión de material infeccioso"

PE- 7 "Procedimiento de emergencia para casos de derrame de material infeccioso durante la centrifugación"

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No.	Versión 1	Pág. 2/16

5. **Consideraciones de seguridad**

- Riesgos a los que se expone el personal:

Riesgo biológico: Infección con *Vibrio cholerae*. La vía de transmisión es oral, pero no existe el riesgo de contaminación por aerosoles
Riesgo físico: - Quemaduras por exposición a temperaturas extremas
- Cortaduras en caso de rotura de la cristalería

- Medidas de seguridad:

El laboratorio debe cumplir los requisitos del nivel de bioseguridad 2
Realice las operaciones en el gabinete de seguridad biológica clase II
Durante la exposición a temperatura extremas frías y calientes utilice guantes protectores
Tenga en cuenta lo establecido en los PE- 4, 5 y 7
Cumpla con lo establecido en el Reglamento de Seguridad Biológica del área

6. **Operaciones preliminares**

Esterilice los materiales que requieran esta condición según el PNO 18-018.

Coloque las placas con agar invertidas en la incubadora a $(36.5 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, y (70-80) % de humedad, 1 hora antes de comenzar a trabajar.

Manipule y organice las operaciones en el GSB según los PNOs. 27-001, 27-002 y 27-003.

6.1 **Materiales**

Portaobjetos

Cubreobjetos

Asa microbiológica

Aguja microbiológica

Torundas de gasa estéril

Segueta

Pipeta automática variable de (10,100, 1000 y 5000) (iL Gradillas Papel de filtro Agitador de vidrio Viales Eppendorf Viales para
crioconservación Puntas azules Puntas amarillas Pomos de centrifuga de 250 mL Probeta de 100 mL

Tubos de (25 x 150) mm con tapa de rosca Tubos de (13 x 100) mm con tapa de rosca

Erlenmeyer de 250 y 100 mL Espátula de Drigalsky Placas Petri Pastilla refrigerada

6.2 **Equipos e instrumentos de medición**

Incubadora a 37 °C Incubadora a 60 °C

Gabinete de seguridad biológica. Clase II

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No.	Versión 1	Pág. 3/16

Microscopio óptico de campo claro Microscopio estereoscópico Freezer de -70 °C
Aparato de dosificación automático Zaranda orbital termostataada Fotocolorímetro

6.3 Materias primas

Ampolla del lote de siembra de referencia de *Vibrio cholerae*

6.4 Reactivos

Juego de reactivos para tinción de Gram Aceite de inmersión Acetona, p.a. C₃H₅OH
Alcohol clase A C₂H₅OH Oxalato de tetrametil parafenilendiamina Desoxicolato de sodio.
Cloruro de sodio, p.a. NaCl
Carboximetilcelulosa soluble
Colorante Rojo Congo
Acido cítrico, p.a C₆H₈O₇.HaO
Hidrógeno fosfato de potasio, p.a K₂HP0₄
Peróxido de hidrógeno H₂O₂
Glicerol, p.a. C₃H₈O₃

6.5 Soluciones preparadas según el PNO 17-059

Solución de alcohol al 70 %

Conserve a temperatura ambiente por un período no mayor de 3 meses Solución de Oxalato de

tetrametil parafenilendiamina al 1 %

Conserve entre (2-8) °C, en frasco ámbar por un período no mayor de 14 días.

Solución de cloruro de sodio 1 M

Conserve a temperatura ambiente por un período no mayor de 1 mes.

Solución de desoxicolato de sodio al 0.5 %

Conserve a 4 °C por un período no mayor de 1 mes.

Solución de Rojo Congo al 1 %

Conserve en frasco ámbar, a temperatura ambiente por período no mayor de 1 mes.

Solución buffer fosfato citrato, elaborado según el PNO 12-176 Conserve a temperatura

ambiente por período no mayor de 1 mes.

Glicerol al 20 %

Esterilice por 5 minutos a 121 °C.

6.6 Medios de cultivo y materiales biológicos

Los siguientes medios de cultivo se preparan según el PNO 17-027.

Agar tiosulfato - citrato - sales biliares - sacarosa (TCBS)

Agar sangre de camero (5-10) % (AS)

Agar infusión cerebro corazón (BHI)

Agar Hierro Kligler (KIA)

Agar Hierro Lisina (LIA)

Agar Triptona Soya (TSA)

Leche descremada al 10%

Agar suave:

Agarosa----- 0.7 %

Carboximetilcelulosa soluble — 0.5 %

Preparado en buffer fosfato citrato.

Sueros de aglutinación de referencia de *Vibrio cholerae*

- Polivalente 01
- Monovalentes Ogawa e Inaba
- Serogrupo 0139

Medio de cultivo Caldo Triptona - Peptona (TP), elaborado según el PNO 17-120 Medio de cultivo Luria Bertani (LB), elaborado según el PNO 17-118

6.7 Recipientes para el traslado de los viales

Contenedor secundario: recipiente a prueba de escape, con cierre hermético, que asegure el aislamiento térmico del material. Contenedor exterior: recipiente resistente a golpes, a prueba de escape, con cierre hermético. Debe tener suficiente capacidad para guardar el contenedor secundario.

7. Procedimiento

7.1 Precultivo

7.1.1 Apertura y siembra de la ampolla

Extraiga de la cámara fría, la ampolla del lote de siembra de referencia y trasládela al GSB.

Utilizando una gasa estéril embebida en alcohol al 70 %, limpie cuidadosamente el exterior de la ampolla.

Marque con la segueta el cuello de la ampolla, envuélvala con una gasa estéril y separe ambas partes con la mano. Resuspenda la pastilla liofilizada con 1 mL de medio TP.

Vierta la suspensión en un tubo de precultivo, de (25 x 150) mm con tapa de rosca conteniendo 15 mL del mismo medio. Incube a 37 °C por (18-24) horas, con la tapa poco apretada.

7.1.2 Realice tinción de Gram del precultivo, según el PNO 12-048

Observe al microscopio óptico las características morfológicas típicas de *Vibrio cholerae*: se observan como bacilos Gram negativos en forma de coma.



INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No. /.	Versión 1	Pág. 5/16

7-1.3 Chequeo de motilidad del precultivo, según el PNO 12-176

Criterios de aceptación

Motilidad (+): Bacilos cortos incoloros en constante movimiento.
 Motilidad (-): No se observa movimiento.

7.2 Cultivo

7.2.1 Tome 1 mL del pre - cultivo y viértalo en un tubo de ensayo. Agregue 4 mL de medio fresco (dilución 1/5).

Determine la absorbancia a 600 nm.

Calcule el volumen de inóculo, empleando la fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$, para lograr una Abs inicial de 0.01 en 50 mL de cultivo. Donde:
 C₁ - es la absorbancia del pre - cultivo V₁ - es el volumen a inocular C₂ - es la absorbancia inicial del cultivo (0.01)
 V₂ - es el volumen final del cultivo (50 mL)

7.2.2 Inóculen en erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio TP, con el volumen de inóculo definido en el paso anterior, el zaranda orbital termostata a 37 °C, 200 rpm por 4 horas.

Realice tinción de Gram según el PNO 12-048, los resultados tienen que ser similares a los obtenidos en el Apdo. 7.1.2. Realice observación en fresco para ver motilidad. Los resultados tienen que ser similares al Apdo. 7.1.3.

Realice recuento de UFC/mL del cultivo según el PNO 12-160, empleando como medios de cultivo TSA y TP. Incube de (18- 24) horas a 37 °C.

7.3 Preparación del cultivo para criopreservación

- Mezcle en un erlenmeyer de 250 mL estéril, 50 mL del cultivo, 50 mL de leche descremada al 10 % y 20 mL de glicerol. Homogenice la mezcla agitando con la mano con movimientos circulares.
 Distribuya en los viales para criopreservación, a razón de 1 mL por vial.
 Rotule cada vial con el nombre de la cepa, la fecha de conservación y un número consecutivo según el orden de llenado.
 Congele los viales en un freezer a -70 °C, hasta su uso.

7.4 Distribución del lote.

Siempre que sea solicitada la cepa para su uso en producción, o se extraigan muestras para ensayo, actualice el R-20-013 que se establece en el PNO 10-008.

Llene 2 copias del R-14-042 que se establece en el PNO 10-008. Archive una copia en el laboratorio y adjunte la otra al material que se entrega.

Extraiga los viales del freezer y colóquelos en el contenedor secundario junto con la pastilla refrigerada. Introdúzcalo en el contenedor exterior y cierre herméticamente.

Traslade rápidamente los viales a su destino.

Ejemplar No.

8. Ensayos de control

8.1 Seleccione tres viales del lote.

Colóquelos en el GSB a temperatura ambiente y espere hasta total descongelación.

8.2 Determinación de la viabilidad (UFC/mL).

Tome 100 µL de la suspensión obtenida en el paso anterior.

Realice recuento de UFC/mL, según el PNO 12-160, empleando como medios de cultivo TSA y TP. Incube entre (18-24) horas a 37 °C.

8.3 Identificación microbiológica y bioquímica:

8.3.1 Identificación microbiológica:

De la suspensión obtenida en el inciso 8.1, siembre 50 pL por agotamiento en los siguientes medios:

- 2 placas de TCBS.
- 2 placas de AS.
- 2 placas de agar BHI.

Incube a 37 °C entre (18 - 24) horas Crecimiento característico

AS: colonias de (2-4) mm de diámetro, lisas, de color grisáceo. Si la cepa es del biotipo El Tor formará beta hemolisis, mientras que las cepas del biotipo Clásico son no hemolíticas.

TCBS: colonias de (2-4) mm de diámetro, lisas, brillantes, ligeramente aplanadas y de color amarillo, con el centro opaco y la periferia translúcida.

BHI: colonias de (2-4) mm de diámetro, lisas, translúcidas y de color crema.

A partir del crecimiento en las placas de BHI realice tinción de Gram según el PNO 12-048. Los resultados tienen que ser similares al Apdo 7.1.2.

8.3.2 Identificación bioquímica.

Seleccione 10 colonias con crecimiento característico en TCBS e inocule por punción y estría, en KIA y LIA (sin flamear la aguja entre ambos para que sea la misma colonia). Incube con la tapa semiabierta, a 37 °C durante 18 horas.

Criterio de aceptación

KIA: K/A (significa: reacción alcalina en la superficie inclinada, **color rojo/reacción ácida en la columna vertical, color amarillo**), no producción de sulfídrico, no producción de gas.

- LLA: K/K (significa: reacción alcalina tanto en la superficie inclinada como en la columna vertical, color violeta intenso), no producción de sulfídrico, no producción de gas.

De los tubos con imagen típica de *Vibrio cholerae* en KIA y LIA, inocule en 2 tubos de agar BHI en plano inclinado, a partir del KIA. Incube a 37 °C, entre (18-24) horas con la tapa semiabierta.



INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No. /J	Versión 1	Pág. 7/16

Del cultivo de agar BHI en plano inclinado realice:

Prueba de citocromo oxidasa, según el PNO 12-127.

Criterio de aceptación: oxidasa positiva, aparece una coloración púrpura intensa entre (5-10) segundos.

Prueba de catalasa, según el PNO 12-127.

Criterio de aceptación: catalasa positiva, reacción efervescente por la liberación de O₂ puro en forma de burbujas.

Prueba de la cuerda o del hilo mucoide:

- Resuspenda una asada del cultivo, en una gota de solución acuosa de desoxicolato de sodio al 0.5 %.
- Mezcle suavemente por unos segundos.

Criterio de aceptación: al retirar lentamente el asa de la suspensión, se forma un "hilo" mucoide. Esto ocurre, porque las células bacterianas se lisan por efecto del desoxicolato con lo cual la suspensión perderá turbidez y el DNA liberado de las células ocasiona que la mezcla se haga viscosa.

8.3.3 Identificación serológica.

Del cultivo de agar BHI en plano inclinado realice el ensayo de aglutinación rápida en lámina (ARL), según el PNO 12-176.

Criterio de aceptación

- Aglutinación positiva: en un lapso de 30 segundos a un minuto aparece una aglutinación en forma de grumos, con el antisuero correspondiente al serogrupo o serotipo.
- Aglutinación negativa: no hay formación de grumos.

Detección de la actividad de la endoglucanasa A.

Utilizando las diluciones obtenidas en el paso 8.3, realice la detección de la actividad de endoglucanasa A, según el PNO 12-176.

8.4 Curva de crecimiento en medio TP.

/f. N

- Seleccione tres viales del lote.
- Colóquelos en el GSB a temperatura ambiente y espere hasta total descongelación.
- Inocule en tubos de (25 x 150) mm, con 15 mL de medio TP (precultivo).
- Incube a 37 °C entre (18-24) horas, con la tapa semiabierta.
- Realice tinción de Gram, según el PNO 12-148. Los resultados tienen que ser similares a los obtenidos en el Apdo. 7.1.2.
- Realice observación de motilidad, similar a lo descrito en el Apdo. 7.1.3.
- Calcule el volumen de inóculo como se describe en el Apdo. 7.2.1.
- Inocule en erlenmeyer de 500 mL, con 100 mL del mismo medio con el volumen definido en el paso anterior.
- Incube en zaranda orbital termostata a 37 °C, 200 rpm.
- Determine la absorbancia a $X = 600$ nm, cada 2 horas, hasta el final del cultivo (5-6 horas). El valor obtenido debe ser entre 1.0 y 1.5, en caso de que no se haya alcanzado el mismo el cultivo se considera inhibido.
- Determine las UFC/mL a tiempo 0, 2, 4 y 6 horas, según el PNO 12-160 empleando como medios de cultivo: TSA y TP.

8.5 Realice la dosis letal 50 (DL₅₀) en ratón neonato, según PNO 12-241.

8.6 Entregue tres viales del lote al Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", quien actúa como controlador externo, para la realización del ensayo:

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No. /J>	Versión 1	Pág. 8/16

9. Registro de Datos

Registre las incidencias de la elaboración del lote en el R- 20-031 “Registro de elaboración del lote de siembra de trabajo de *Vibrio cholerae*”, que se establece en el Anexo 1.

Registre las incidencias de los ensayos en el R- 12-257 “Registro de ensayo del lote de siembra de trabajo de *Vibrio cholerae*”, que se establece en el Anexo 2



Elaborado: Lic. Carmen A. del Puerto Sardiñas Cargo: Esp. “A” Tecn. Farmacéutica Firma: _____ Fecha: 8/1/02.

Revisado: MC. Hilda M. García Cargo: J’ Dpto. Bacterias Enterop. Firma: _____ Fecha: 10/1/02

Aprobado: Dr. Franklin Sotolongo Padrón Cargo: Director PACTA Firma: _____ Fecha: 14/01/02

Aprobado: Dr. Luis García Imías Cargo: Director de Investigación I Firma: _____ Fecha: 21/01/02

Aprobado: Lic. Lilia Alfalla Valdés Cargo: Directora de la Calidad Firma: _____ Fecha: 21/02/02

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No. >3	Versión 1	Pág. 9/16

ANEXO 1

INSTITUTO FINLAY	REGISTRO DE ELABORACIÓN DEL LOTE DE SIEMBRA DE TRABAJO DE <i>Vibrio cholerae</i> (PNO 20-036)	R- 20-031	
		Versión 1	Pág. 1/3
Cepa:		Lote:	
Elaborado a partir de:			
Lote de medio Caldo Triptona - Peptona:			
Adjunte el registro de elaboración.			
1. Precultivo			
Cantidad de tubos inoculados:		Código. GSB:	
Incubación: Código. Incubadora:		Temperatura:	
Hora inicio:		Hora final:	
Realizado por:		Fecha: //	
Control de pureza (Gram). Resultados:			
Lote del juego de reactivos:		Código. Microscopio:	
Observación en fresco. Resultados:			
Código. Microscopio:		Fecha: //	
Realizado por:		Fecha: //	
Revisado por:		Fecha: //	
2. Cultivo			
Absorbancia del precultivo (600 nm):		Código. Espectrofotómetro:	
Cálculo del volumen de inóculo:			
$c, v, = c_2 v_2$ mL.			
$V, = 0.01 \times 50 \text{ mL}$			
c,			
Resultado:			
Cantidad de erlenmeyer inoculados:		Código. GSB:	
Incubación. Código. Zaranda:		Temperatura:	
Agitación orbital: rpm		Hora inicio: Hora final:	
Realizado por:		Fecha: //	
Control de pureza (Gram). Resultados: Lote del juego de reactivos:			
Código. Microscopio:		Fecha: //	
Observación en fresco. Resultados:			
Código. Microscopio:		Fecha: //	
Realizado por:		Fecha: //	
Revisado por:		Fecha: //	

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No.	Versión 1	Pág. 10/16

INSTITUTO
FINLAY

REGISTRO DE ELABORACIÓN DEL LOTE DE SIEMBRA DE TRABAJO DE
Vibrio cholerae

R- 20-031

(PNO 20-036)

Versión 1

Pág. 2/3

3. Determinación de la viabilidad del cultivo Agar triptona

soya (TSA)

Fabricante: _____ Lote: _____ Cantidad (g): _____
 Esterilización Código. Autoclave: _ Temperatura: _____
 Presión: _____ Hora inicio: _ Hora final: _____ Cantidad de placas: _____
 Elaborado por: _____ Fecha: _ //

Se tomaron _____ (íL del cultivo. Se realizaron _____ diluciones

Código. GSB: _____

Incubación: Código.
 Hora de inicio: _____ Incubadora: _ Hora
 final: _____

Resultado:

Dilución	Cantidad de colonias		
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3

colonias en la dilución:

Promedio de la lectura:

Desarrollo de la ecuación:

UFC/mL = No. de colonias x factor de dilución x 10 =

Resultado: _____ _UFC/mL

Í-- 1 Realizado

por: Revisado por:

_____ Fecha: _/_/_
 _____ Fecha: //

-

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No.	Versión 1	Pág. 11/16

INSTITUTO FINLAY	REGISTRO DE ELABORACIÓN DEL LOTE DE SIEMBRA DE TRABAJO DE <i>Vibrio cholerae</i> (PNO 20-036)	R- 20-031	
		Versión 1	Pág. 3/3

4. Preparación de la crioconservación

Leche descremada al 10 %: Lote: _____ Fabricante: _____

Cantidad (g): _____ Volumen preparado: mL _____

Esterilización: _____ Código. Autoclave: _____ Temperatura: _____

Tiempo: _____ Hora inicio: _____ Hora final: _____

Realizado por: _____ Fecha: / /

Glicerol al 20 %: Lote: _____ Fabricante: _____

Volumen preparado: mL _____

Esterilización: _____ Código. Autoclave: _____ Temperatura: _____

Tiempo: _____ Hora inicio: _____ Hora final: _____

Realizado por: _____ Fecha: / /

Se mezclaron _____ mL de cultivo, _____ mL de leche descremada y _____ mL de glicerol.

Cantidad de viales preparados: _____ Código. GSB: _____

Almacenamiento: _____ Código. Freezer: _____

Realizado por: _____ Fecha: / /

Observaciones: _____

*

Revisado: _____ Cargo: _____ Firma: _____ Fecha: // .

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No. <i>f3</i> >	Versión 1	Pág. 12/16

ANEXO 2

INSTITUTO FINLAY	REGISTRO DE ENSAYO DEL LOTE DE SIEMBRA DE TRABAJO DE <i>Vibrio cholerae</i> (PNO 20-036)	R- 12-257	
		Versión 1	Pág. 1/5

Lote:

Motivo del ensayo:

Lote de medio Caldo Triptona - Peptona:

Adjuntar registro de elaboración.

Agar triptona soya (TSA)

Fabricante:

Lote:

Cantidad (g):

Esterilización: Código. Autoclave:

Presión: _____ Hora inicio:

Hora final:

Elaborado por: _____

Temperatura: _____

diluciones.

_____ Cantidad de placas:

Fecha: //

1. Determinación de viabilidad (UFC/mL)

Se realizaron _ Código. GSB:

Incubación: Código. Incubadora: _ Hora de inicio:

Temperatura:

_____ Hora final:

Resultado:

Dilución	Cantidad de colonias		
	Réplica 1	Réplica 2 .	Réplica 3

colonias en la dilución:

Promedio de la lectura:

Desarrollo de la ecuación:

UFC/mL = No. de colonias x factor de dilución x 10² =

Resultado: _____ UFC/mL

Realizado por:

Fecha: / /

Revisado por: _

Fecha: / /

INSTITUTO	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION	PNO 20-036
FINLAY	Ejemplar No. ZJ	Versión 1
		Pág. 13/16

INSTITUTO FINLAY	REGISTRO DE ENSAYO DEL LOTE DE SIEMBRA DE TRABAJO DE <i>Vibrio cholerae</i> (PNO 20-036)	R- 12-257
		Versión 1 Pág. 2/5
2. Identificación microbiológica		
Medios	Lote	Resultados
Agar TCBS		
Agar sangre		
Agar BHI		
Código. GSB:		
Incubación: Código. Incubadora:		Temperatura:
Hora de inicio: Hora final:		
Control de pureza (Gram). Resultados:		
Lote del juego de reactivos:		Código. Microscopio:
Realizado por:		Fecha: //
Revisado por:		Fecha: //
3. Identificación bioquímica		
Ensayo	Criterio de aceptación	
Agar Hierro Kligler (KIA)		
Agar Hierro Lisina (LIA)		
Código. GSB:		
Incubación: Código. Incubadora:		Temperatura:
Hora de inicio: Hora final:		
Observaciones: *		
Realizado por:		Fecha: //
Revisado por:		Fecha: //
- Pase a agar BHI en plano inclinado:		
Código. GSB:		
Incubación: Código. Incubadora:		Temperatura:
Hora de inicio: Hora final:		/
Realizado por:		Fecha: //
Revisado por:		Fecha: //

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No. <i>Q</i>	Versión 1	Pág. 14/16

INSTITUTO FINLAY	REGISTRO DE ENSAYO DEL LOTE DE SIEMBRA DE		R- 12-257	
	TRABAJO DE <i>Vibrio cholerae</i> (PNO 20-036)		Versión 1	Pág. 3/5
Ensayo		Resultado	Control de calidad	
Oxidasa				
Catalasa				
Cuerda				
Código. GSB:				
Observaciones:				
Realizado por:		Fecha: //		
Revisado por:		Fecha: //		
4. Identificación serológica				
Antisuero		Resultados		
Polivalente				
Ogawa				
Inaba				
0139				
Código. GSB:				
Observaciones:				
Realizado por:		Fecha: //		
Revisado por:		Fecha: //		
5. Detección de la actividad de endoglucanasa A				
Lote de medio Luria Bertani (LB):				
Se sembraron las diluciones: _____ y'• _____				
Código. GSB:				
Incubación: Código. Incubadora:		Temperatura:		VIGENTE .
Hora de inicio:	Hora fmal:	Fecha: //		
Realizado por:				
Resultado:				
Dilución		Cantidad de colonias	Cantidad de colonias positivas	
«				

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No. 3	Versión 1	Pág. 15/16

INSTITUTO
FINLAY

REGISTRO DE ENSAYO DEL LOTE DE SIEMBRA DE TRABAJO DE

R- 12-257

Vibrio cholerae

(PNO 20-036)

Versión 1

Pág. 4/5

Observaciones:

Realizado por:

Fecha:

Revisado por:

Fecha:

6. Curva de crecimiento en Caldo TP

Inoculación del precultivo. Cantidad de tubos

Código. GSB:

Temperatura:

~~Incubación~~ Código. Incubadora: _

Hora de inicio: _____ Hora final: _____

Realizado por: _____

Fecha: //

Chequeo del precultivo:

Parámetros

Resultados

Absorbancia

Pureza

Motilidad

Código. Fotocolorímetro:

Código. Microscopio: _____

Realizado por: _____

Revisado por: _____

Cálculo del volumen de inóculo:

Lote del juego de reactivos:

Fecha: //

Fecha: //

$C_1V_1 = C_2V_2$

$V_i = 0.01 \times 100 \text{ mL } C_1$

Resultado: _____ mL.

Cantidad de erlenmeyer inoculados: _____

Incubación. Código. Zaranda: _____

Código. GSB:

- cc

Agitación orbital: _____ rpm

Temperatura:

Realizado por: _____

Hora final:

Fecha:

Lectura: Tiempo (horas): 2: _

4: _

6: _

Abs final.

Realizado por:

Fecha:

Revisado por:

Fecha: // - / -

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 20-036
	Ejemplar No.	Versión 1	Pág. 16/16

INSTITUTO
FINLAY

REGISTRO DE ENSAYO DEL LOTE DE SIEMBRA DE TRABAJO DE

R- 12-257

Vibrio cholerae

(PNO 20-036)

Versión 1

Pág. 5/5

6.1 Determinación de la viabilidad (UFC/mL) Código.

GSB: _____

Incubación: Código. Incubadora: Resultado:

Temperatura:

Tiempo:

Tiempo (horas)	Cantidad de diluciones	Dilución donde se contaron las colonias	Cantidad de colonias			Promedio del número de colonias	Resultado UFC/mL	Realizado por
			Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3			
0								

Revisado por:

Fecha: //

Observaciones:

Revisado:

Cargo:

Firma:

Fecha: //

ANEXO 2
PNO 12-176



INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No.	Versión 2	Pág. 1/15

Título: Preparación del inóculo para los ensayos de reactividad e inmunogenicidad en humanos de cepas DE *Vibrio cholerae*

1. Objetivo y Alcance

Establecer la metodología de trabajo para la preparación del inóculo y su normalización para los ensayos de reactividad e inmunogenicidad y protección en humanos de cepas de *Vibrio cholerae*, así como la toma de muestras para realizar los mismos.

Es aplicable al Laboratorio de Microbiología designado para trabajar con cepas de *Vibrio cholerae* y llevar a cabo el procedimiento de preparación del inóculo a utilizar en los estudios antes mencionados.

2. Responsabilidades

El ensayo será realizado por un profesional especializado en Microbiología y por un técnico especializado en Pruebas Biológicas, con pleno conocimiento de este PNO y debidamente entrenado en BPL.

La ejecución de este procedimiento lo supervisará y controlará el Inspector designado del Dpto. de Aseguramiento de la Calidad.

3. Frecuencia

Este procedimiento se realizará cada vez que se decida la ejecución de un ensayo de reactividad e inmunogenicidad o un ensayo de reto en humanos.

4. Referencias/Documentos aplicables

Levine, M.M., et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD 103 and CVD 103- HgR. Lancet 2:467-470. 1993

Protocolo para la investigación clínica preliminar con cepas atenuadas de *Vibrio cholerae* para determinar reactividad e inmunogenicidad. Gustavo Sierra, Luis García. Instituto Finlay. 1996

Robert, A., Benítez J. A. y cois. Tagging a *Vibrio cholerae* El Tor candidate vaccine strain by disruption of its hemagglutinin protease gene using a novel reporter enzyme, *Clostridium thermocellum* endoglucanasa A. Vaccine 14, 1517-1522. 1996 Victoria Pazos, Alvarez Rivera. Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología. Facultad de Biología. Ciudad Habana, 1986

Manual of methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology. Washington D.C. Segunda Edición. 1981. Capítulo II. Pág. 185-187 PNO 12-020 "Prueba de Esterilidad"

PNO 12-027 "Preparación de medios de cultivo y soluciones en el Laboratorio de Microbiología"

PNO 12-048 "Tinción de Gram"

PNO 12-160 "Determinación de la viabilidad por el método de minicuento"

PNO 17-059 "Preparación de soluciones"

5. Fundamentación

La preparación del inóculo consiste en la obtención de una suspensión ajustada a la concentración deseada de la cepa *Vibrio cholerae* en estudio. Para ello, el microorganismo se propaga en medio de infusión cerebro corazón (Brain Infusión Agar, BHIA).



de
Heart

6. Consideraciones de seguridad

El laboratorio debe cumplir con los requisitos de nivel de bioseguridad 2.

Los riesgos a que se expone el personal son los concernientes al trabajo con microorganismos clasificados como Riesgo 2, cuya vía de transmisión es la oral, pero no existe peligro de contaminación por aerosoles.

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No. 4 ^	Versión 2	Pág. 2/15

• Medidas de seguridad:

Realice las operaciones en el gabinete de seguridad biológica clase II Utilice guantes quirúrgicos al manipular los microorganismos Verifique que los controles microbiológicos del GSB sean satisfactorios Cumpla con lo establecido en el Reglamento de Seguridad Biológica del área

7. Operaciones preliminares

7.1 Materiales Placas Petri

Puntas amarillas, azules y blancas (para pipetas automáticas)
 Cubetas espectrofotométricas de vidrio
 Tubos de vidrio, de tapa rosca de (25 x 150) mm
 Asas y agujas bacteriológicas
 Hisopos estériles
 Algodón
 Gasa quirúrgica
 Láminas portaobjetos
 Contador de colonias
 Tubo falcon de 50 mL
 Contenedor de bioseguridad
 Viales de microcentrifuga de 1,5 mL
 Varilla de vidrio
 Espátula de Drigalsky
 Erlenmeyer de 100 mL
 Pipetas automáticas de (10, 100, 1000 y 5000) pL
 Papel de filtro
 Gradillas
 Portaobjetos excavados Cubreobjetos

7.2 Equipos e instrumentos de medición

Gabinete de seguridad biológica clase II (GSB)
 Incubadora de 37 °C
 Microscopio óptico binocular de campo claro
 Espectrofotómetro Agitador de tubos (vortex)
 Reloj de intervalo Mechero de gas Incubadora 60°

7.3 Reactivos

Alcohol etílico técnico grado A C_2H_5OI
 Cloruro de sodio, p.a. NaCl
 Bicarbonato de sodio, p.a. $NaHCO_3$ Juego de reactivos de GraCarboximetilcelulosa soluble Colorante Rojo Congo
 Acido cítrico, p.a.
 Hidrógeno fosfato de potasio, p.a.
 Aceite de inmersión para microscopía



INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No. <i>j'j'</i>	Versión 2	Pág. 3/15

^^ Medios de cultivo y materiales biológicos preparados según el PNO 12-027

- Agar sangre de carnero (5-10 %) (AS)
- Agar infusión cerebro - corazón (ABHI)
- Agar tiosulfato - citrato - sales biliares (TCBS)
- Agarosa Triptona
- Extracto de levadura Agar bacteriológico 1 %

Agar Luria Beltani (ALB):

Triptona10 g/L
NaCl 10 g/L
Extracto de levadura----- 5 g/L
Agar al 1 %
Ajuste el pH entre 7.4-7.6

Agar suave - Carboximetilcelulosa

Agarosa..... 0.7 %
Carboximetilcelulosa soluble 0.5 %
Preparado en Buffer fosfato citrato

Microorganismos:

- Cepas de *Vibrio cholerae* atenuadas genéticamente
- Cepa de *Vibrio cholerae* 638 El Tor Ogawa, control positivo
- Cepa de *Vibrio cholerae* virulenta, de referencia, del serotipo en estudio, control negativo
- Cepa de *Vibrio cholerae* virulenta de ambos biotipos y serotipos

Sueros de aglutinación de referencia:

- Polivalente OI de *Vibrio cholerae*
- Monovalentes Ogawa e Inaba
- Serogrupo 0139 de *Vibrio cholerae*

7.5 Soluciones preparadas según el PNO 17-059

Solución salina 0.9 % m/v, estéril suministrada por el Laboratorio "Adalberto Pesant"

Bicarbonato de sodio 1.33 % m/v, estéril suministrada por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Microbiología del IPK
Rojo Congo al 1 %

Conserve a temperatura ambiente por un período no mayor de 1 mes

- NaCl 1 M

Conserve a temperatura ambiente por un período no mayor de 1 mes



INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No. <i>G^oj</i>	Versión 2	Pág. 4/15

Solución de Buffer fosfato citrato

50mM K₂HP0₄ 0.4 g/L
 12 mM ácido cítrico —..... 2.52 g/L
 Ajuste el pH a 6.3

Conserve a temperatura ambiente por un período no mayor de 1 mes Solución de alcohol al 70 %

Conserve a temperatura ambiente por un período no mayor de 3 meses

7.6 Cepas a evaluar

Las cepas a evaluar proceden del lote de siembra de trabajo conservado a -70 °C, en la Dirección de Asistencia Científico-Técnica Aplicada (DACTA) del Instituto Finlay.

8. Procedimiento

8.1 Comprobación del estado de las cepas

La cepa de trabajo se siembra por estrías a partir de la conservación, 29 horas antes de comenzar el ensayo, en tres planos de las placas (Método de siembra por agotamiento) en:

- 2 placas de agar sangre de carnero (5-10) % (AS)
- 2 placas de agar tiosulfato-citrato-sales biliares (TCBS)
- 2 placas de agar infusión cerebro-corazón (ABHI)

Incuba a 37 °C en aerobiosis durante 24 horas.

Chequee visualmente las características culturales y bioquímicos en las placas para la determinación de posibles contaminantes. Crecimiento característico:

AS: colonias de (2-4) mm de diámetro, lisas, de color grisáceo y formando beta hemolisis TCBS: colonias de (2-4) mm de diámetro, lisas, brillantes, ligeramente aplanadas y de color BHI: colonias de (2-4) mm de diámetro, lisas, translúcidas y de color crema

8.2 Identidad

8.2.1 Ensayo para detectar la actividad de la endoelucanasa A

Tome 100 uL del vial conservado y agréguelos a 900 μ L de solución salina al 0.9 % para un volumen final de 1 mL.

Realice diluciones hasta 10⁶.

Siembre 100 μ L de las 3 últimas diluciones en 2 placas de medio LB y disemine con espátula de Drigalski.

Incuba durante 2 horas a 60 °C.

Escoja las placas donde exista crecimiento entre 50 y 100 colonias.

Añada de 3 a 4 mL de agar suave previamente fundido y deje 5 minutos a temperatura ambiente.

Incuba durante 2 horas a 60 °C.

Cubra la placa con una solución de rojo congo al 1 %. Deje teñir durante 20 minutos.

Destiña enjuagando con NaCl 1 M. Elimine el rojo congo y realice los lavados necesarios hasta observar la formación del halo transparente alrededor de las colonias.

Use como control positivo la cepa 638 *Vibrio cholerae* El Tor Ogawa y como control negativo cualquier cepa de referencia virulenta del serotipo correspondiente; éstas últimas aparecen como colonias rojas sin halo transparente.



INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No. ¿'S	Versión 2	Pág. 5/15

8—2 Ensayo de aglutinación rápida en lámina (ARL)

Seleccione colonias aisladas típicas en las placas con medio ABHI. A tres de estas colonias seleccionadas por placas realícele aglutinación rápida en lámina (ARL), con antisueros específicos para *Vibrio cholerae* O1 y O139, según se establece a continuación:

- Limpie un portaobjetos y un cubreobjetos con papel de filtro
- Coloque una colonia procedente de la superficie de un cultivo crecido en ABHI
- Emulsione en una gota pequeña de solución de NaCl al 0.9 %
Mezcle muy bien, mediante movimientos de balance de la lámina hacia atrás y hacia delante, durante 30 segundos
- Compruebe que la suspensión sea uniforme y no tenga grumos producidos por la autoaglutinación
Si la suspensión es lechosa y homogénea agregue una gota de antisuero. Por lo general se mezclan volúmenes iguales del antisuero y de la suspensión. Se pueden utilizar volúmenes tan pequeños de antisueros como de 10 uL.
- Mezcle la suspensión bacteriana con el suero polivalente O1.
- Si es positiva, repita con antisueros monovalentes Ogawa e Inaba
- Si es negativa la reacción con el antisuero polivalente O1, realice aglutinación con el antisuero O139.

Si la ARL resulta negativa, repita el proceso a partir de las placas sembradas en 8.1.

8.3 Propagación del cultivo

Si resulta positiva la reacción, tome de 2 a 3 colonias aisladas de cualesquiera de las placas de ABHI sembradas y subcultívelas en 4 placas de ABHI, realizando estrías muy unidas que cubran toda la superficie de la placa (siempre en forma de césped). Se puede realizar la siembra con hisopos estériles o asas bacterianas (si utiliza asas, no esterilice a la llama entre un plano y otro de la placa).

Incube las placas en posición invertida a 37 °C durante 5 horas.

Realice inspección visual de las características culturales del crecimiento sobre las placas de ABHI. Elimine aquellas que no tengan crecimiento abundante o estén contaminadas.

Seleccione las placas de agar ABHI y coseche el cultivo con 5 mL de solución salina 0.9 % estéril por placa, auxiliándose de un aplicador o espátula de Drigalski estéril.

Transfiera con una pipeta volumétrica estéril o con una pipeta automática con punta estéril, 5 mL de la suspensión anterior, de la superficie de la placa a un erlenmeyer estéril de 100 mL (suspensión madre).

Tome una alícuota de 1 mL de la suspensión madre y realice diluciones en igual solución a la utilizada para la cosecha, hasta lograr en el espectrofotómetro una absorbancia de 0.60 a 0.64, registrando los puntos de dilución realizadas.

8.4 Comprobación microbiológica de la suspensión madre

Tome una muestra de la suspensión madre en solución salina para la ARL y proceda según el Apdo. 8.2.2 teniendo en cuenta que la muestra ya está en forma de suspensión.

Chequee la pureza por tinción de Gram según lo establecido en el PNO 12-048.

Chequee la motilidad de la siguiente forma:

- Limpie un portaobjetos y un cubreobjetos con papel de filtro
- Coloque una pequeña gota de la suspensión en el centro del portaobjetos
- Coloque un cubreobjetos sobre la muestra para protegerla
- Vierta una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos
 - Observe al microscopio óptico con lente de inmersión 100X



Criterios de aceptación

Motilidad (+): Bacilos cortos incoloros en constante movimiento Motilidad

(-): No se observa ningún movimiento

Nota: Desde la observación de las placas hasta este paso, no debe transcurrir más de 30 minutos.

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No. <i>ú'o'</i>	Versión 2	Pág. 6/15

■5 Preparación y control del inóculo

La preparación, muestreo y control del inóculo se realizará con la presencia del inspector de Aseguramiento de la Calidad, quien verificará el cumplimiento del presente PNO y registrará la conformidad o las desviaciones al procedimiento, en la parte correspondiente del R- 12-128 del Anexo.

Teniendo en cuenta la absorbancia lograda en 8.3, la cual se corresponde a una concentración de $5.5 \times 10^8 \pm 6 \times 10^7$ UFC/mL, el operador calcula la concentración de la suspensión madre mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de la suspensión madre (Conc. S.M)} = 5.5 \times 10^8 \times \text{Factor de dilución}$$

Determinada la concentración de la solución madre el operador calcula el volumen que debe tomar de la solución madre (V.S.M) para preparar los 30 mL de inóculo de cada voluntario mediante la fórmula:

$$V.S.M = 1.3 \times 10^8 \times 30 / \text{Conc. S.M}$$

Mezcle el volumen determinado anteriormente y prepare los frascos con 30 mL de solución de bicarbonato de sodio al 1.33 % los que representan los inóculos. Los placebos se preparan sin V.S.M y con 30 mL de bicarbonato de sodio al 1.33 % solamente.

De los frascos anteriores seleccione tres aleatoriamente y tome una muestra de 100 μ L de cada uno para comprobar el número de UFC/mL en el GSB clase II.

Realice el conteo en placa según PNO 12-160.

Realice el ensayo para detectar la actividad de la endoglucanasa A, según el Apdo. 8.2.1.

Prepare el sistema de diluciones seriadas con factor 10, desde 10^1 hasta 10^7 y siembre 10 μ L por triplicado de las tres últimas diluciones en placas de ABHI Incube a 37 °C entre (18-24) horas.

Terminada la incubación, tome todas las placas y seleccione entre ellas la dilución adecuada que contenga aproximadamente de 2 a 15 colonias por cuadrante.

Realice el conteo visual y anote los resultados en el R- 12-128.

Cálculo

No. de UFC/mL = No. de colonias x dil. de conteo (con exponente positivo) x 100 (factor de conversión a 1 mL)

Observación:

Este valor de No. de UFC/mL se obtiene considerando como cantidad de muestra sembrada 0.01 mL. Cuando se varíe dicha cantidad, utilice otro factor de conversión.

De las colonias crecidas, chequee la identidad a 5 de ellas por ARL, según se describe en el Apdo. 8.2.2.

9. Registro de Datos

El técnico recogerá las incidencias del ensayo en el R- 12-128 "Registro de la preparación del inóculo para el ensayo de reactividad e inmunogenicidad en humanos de cepas de *Vibrio cholerae*", que se establece en el Anexo.

Revisado: DrC. Luis García Imías Cargo: Director de Vacunas Bacterianas F

Revisado: In» Roselvn Martínez Rivera Cargo: J' Aseguramiento de la Calidad Firma:

Aprobado: MC Francisco Dmguez Alvarez Cargo: Vicepresidente Pesar. de Productos Fi Aprobado: i ir Ramón Barberà

Morales Cargo: Director de la Calidad----- F

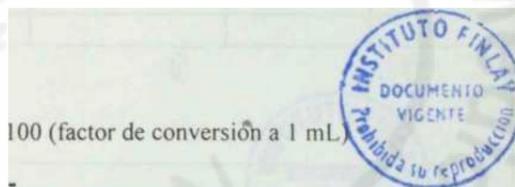
Fecha: <WS- >3

Fecha: H/ 5~ / 03

Fecha: //^/ ^ / 0^

Fecha: ú¿_ / ° 3

Fecha: ~f/ Of~%



INSTITUTO
FINLAY

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION

PNO 12-176

Ejemplar No. z y

ANEXO

Versión 2

Pág. 7/15

INSTITUTO
FINLAY

REGISTRO DE LA PREPARACION DEL INOCULO PARA EL ENSAYO DE
REACTOGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD EN HUMANOS DE CEPAS DE
Vibrio cholerae (PNO 12-176)

R- 12-128

Versión 2

Pág. 19

Transferencia de la cepa
Cepa (Código)

Fecha

Hora

Entregado por

Recibida por

Certificado de la cepa Observaciones:

Revisado por: _____

Comprobación del estado de la cepa

Parámetro	Medios	Lote	Fecha/Hora	Operador	Resultados	Fecha/Hora	Operador
Pureza	Agar sangre						
	Agar TCBS						
	Agar BHI						

Incubadora. Código: _____

Observaciones: _____

Identidad por aglutinación rápida en lámina

Antisuero		Cont. +	Cont. -	Fecha/Hora	Operador
Tipo	Referencia				

Resultados de la ARL:

Antisuero

Resultados

Fecha/Hora

Operador

Inspector de calidad: _____ Firma: _____ Fecha: ____/____/____

Revisado por: _____



INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No. 01)	Versión 2	Pág. 8/15

INSTITUTO FINLAY REGISTRO DE LA PREPARACION DEL INOCULO PARA EL ENSAYO DE REACTOGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD EN HUMANOS DE CF.PAS DE *Vibrio cholerae* (PNO 12-176) R- 12-128

Versión 2 Pág. 2/9

Determinación de la actividad de la endoglucanasa A de la cepa

Nombre del microorganismo: _____ Ensayo: _____

Diluciones:

Medio sólido: _____
 Volumen de inóculo (siembra): _____
 Cantidad de réplicas: _____
 Temperatura de Incubación: _____
 Tiempo de incubación: _____

Lecturas de las colonias Cel A positivas y negativas Dilución

Colonias -

No. colonias +

Dilución.

Resultados:

Conformidad/Desviaciones:

Inspector de calidad:

Revisado por: _____

Firma:

Fecha: //

**OCUMINTO
VIGENTE**

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No. ¿)	Versión 2	Pág. 9/15

INSTITUTO
FINLAY

REGISTRO DE LA PREPARACION DEL INOCULO PARA EL ENSAYO DE
REACTOGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD EN HUMANOS DE CEPAS DE
Vibrio cholerae (PNO 12-176)

R- 12-128

Versión 2 Pág. 3/9

Determinación de las UFC/mL de la cepa

Ensayo:

Nombre del microorganismo: _____

Medio sólido: _____

Diluciones:

Volumen de inculo (siembra): _____

Cantidad de réplicas: _____

Temperatura de Incubación:

Tiempo de incubación:

Lecturas de las réplicas por dilución:

Promedio de réplicas:

No. de UFC/mL: _____

Resultados: _____ UFC/mL

Conformidad/Desviaciones: _____



Inspector de Calidad:

Revisado por: _____

Firma:

Fecha: //

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No. 6)	Versión 2	Pag. 10/15

INSTITUTO FINLAY	REGISTRO DE LA PREPARACION DEL INOCULO PARA EL ENSAYO DE REACTOGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD EN HUMANOS DE CEPAS DE <i>Vibrio cholerae</i> (PNO 12-176)		R- 12-128		
			Versión 2	Pág. 4/9	
Propagación del cultivo					
Medios de cultivo: _____					
No. de placas	Temperatura de incubación	Resultados	Selección		Operador
			Sí	No	
1					
2					
3					
4					
GSB. Código: _____ Incubadora. Código: _____					
Observaciones: _____					
Cosecha del cultivo					
No. de placas	Volumen de solución	Lote solución salina	Resultados	Operador	
1					
2					
3					
4					
GSB. Código: _____					
- Prepare la solución madre a partir de la mezcla de los volúmenes añadidos a cada una de las placas.					
Observaciones: _____					

Revisado por: _____					



INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No. <i>1</i>	Versión 2	Pág. 11/15

INSTITUTO
FINLAY

REGISTRO DE LA PREPARACION DEL INOCULO PARA EL ENSAYO DE
REACTOGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD EN HUMANOS DE CEPAS DE
Vibrio cholerae (PNO 12-176)

R- 12-128

Versión 2

Pag. 5/9

Determinación de la actividad de endoglucanasa de la suspensión madre

Nombre del microorganismo: _____ Ensayo:

Medio sólido: ____ _

Volumen de inóculo (siembra):

Cantidad de réplicas:

Temperatura de Incubación:

Tiempo de incubación:

Diluciones:

Lecturas de las colonias Cel A positivas y negativas Dil.

No. colonias +

Dil.

Colonias

Resultados:

Conformidad/Desviaciones:

Inspector de calidad:

Revisado por: _____

Firma:

Fecha: //



Determinación de las UFC/mL de la suspensión madre

Ensayo:

Nombre del microorganismo: _____

Diluciones:

Medio sólido:

Volumen de inóculo (siembra): _____

Cantidad de réplicas: _____

Temperatura de Incubación: _____

Tiempo de incubación: _____

Lecturas de las réplicas por dilución:

Promedio de réplicas:

No. de UFC/mL:

Resultados: _____ UFC/mL

Conformidad/Desviaciones: _____



Inspector de Calidad:

Firma:

Fecha: //

Revisado por:

INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No.	Versión 2	Pág. 13/15

INSTITUTO
FINLAY

REGISTRO DE LA PREPARACION DEL INOCULO PARA EL ENSAYO DE
REACTOGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD EN HUMANOS DE CEPAS DE
Vibrio cholerae (PNO 12-176)

R- 12-128

Versión 2

Pág. 7/9

Preparación y control del inculo

Cálculo de la concentración de la suspensión madre

Conc. S.M = 5.5×10^8 x Factor de dilución

= 5.5×10^8 x _____

UFC

Cálculo del Volumen de la S.M V.S.M = Conc. S.M x

30

= _____ mL

Cantidad de frascos de inculo: Cantidad de placebo:

Ensayo:

Nombre del microorganismo: Observaciones:

Revisado por:

Entregado a:



INSTITUTO FINLAY	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
	Ejemplar No.	Versión 2	Pág. 14/15

INSTITUTO
FINLAY

REGISTRO DE LA PREPARACION DEL INOCULO PARA EL ENSAYO DE
REACTOGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD EN HUMANOS DE CEPAS DE
Vibrio cholerae (PNO 12-176)

R- 12-128

Versión 2 Pág. 8/9

Determinación de la actividad de endoglucanasa del inocular

Nombre del microorganismo: _____ Ensayo:

Medio sólido: _____

Volumen de inocular (siembra): _____

____ Cantidad de réplicas: _____

____ Temperatura de Incubación: _____

____ Tiempo de incubación: _____

Diluciones:

Lecturas de las colonias Cel A positivas y negativas Dil. No. colonias + Dil.

Colonias -

Resultados: _____

Conformidad/Desviaciones:

Inspector de calidad:

Revisado por: _____

Fecha: //

Firma:



INSTITUTO
FINLAY

PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE OPERACION		PNO 12-176
Ejemplar No. ζ ÍS <i>jr</i>	Versión 2	Pág. 15/15

INSTITUTO
FINLAY

REGISTRO DE LA PREPARACION DEL INOCULO PARA EL ENSAYO DE
REACTOGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD EN HUMANOS DE CEPAS DE
Vibrio cholerae (PNO 12-176)

R- 12-128

Versión 2

Pág. 9/9

Determinación de la actividad de endoglucanasa del inoculo

Nombre del microorganismo: _____ Ensayo:

Diluciones:

Medio sólido: _____

Volumen de inoculo (siembra): _____

Cantidad de réplicas: _____

Temperatura de Incubación: _____

Tiempo de incubación: _____

Lecturas de las colonias Cel A positivas y negativas Dil.

No. colonias

Colonias -

+

Dil.

Resultados:

Conformidad/Desviaciones:

Inspector de calidad:

Realizado:

____ Cargo:

Firma:

____ Firma:

Fecha: ____ / ____ / ____

Fecha: //

Revisado:

____ Cargo: _

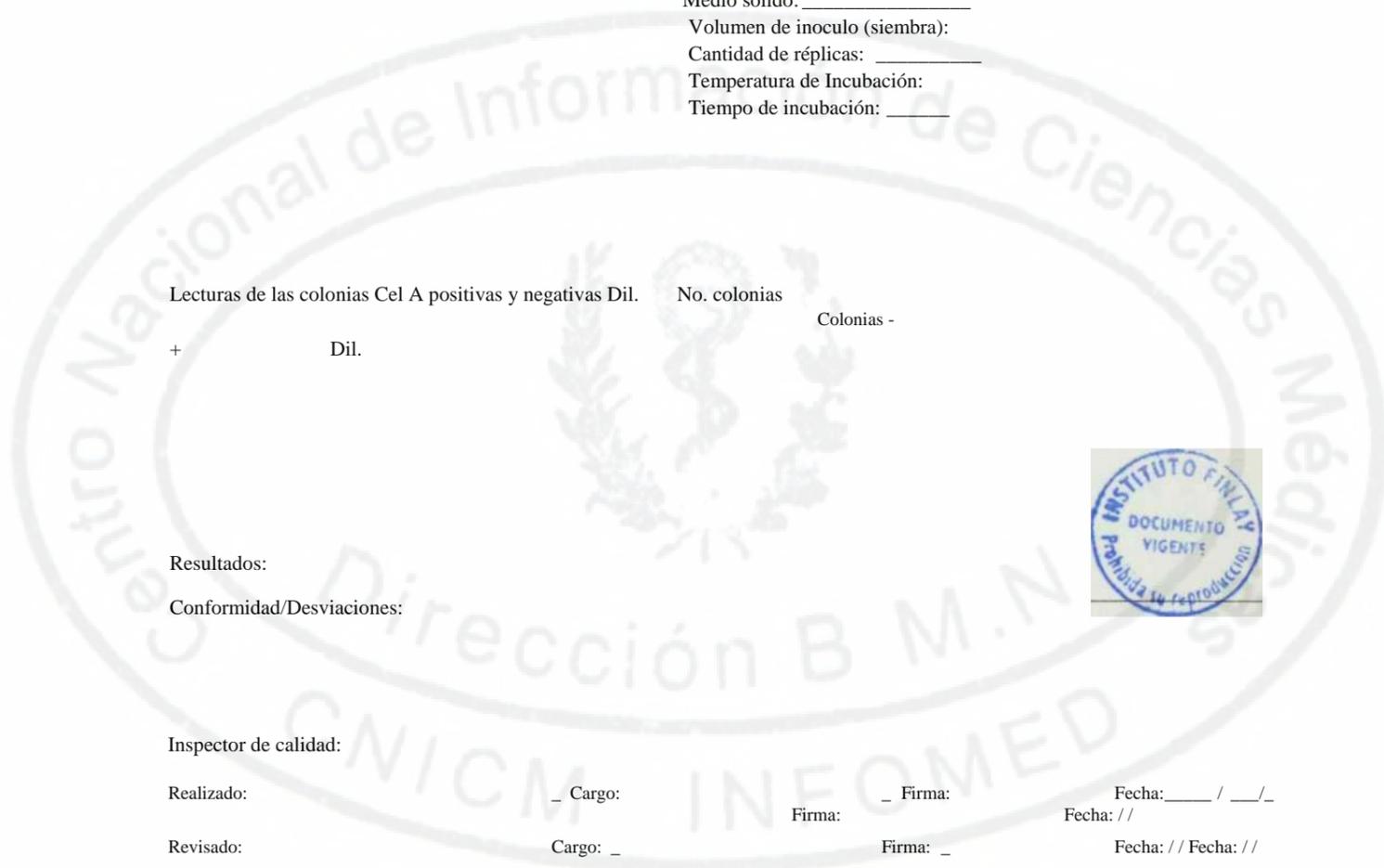
Firma: _

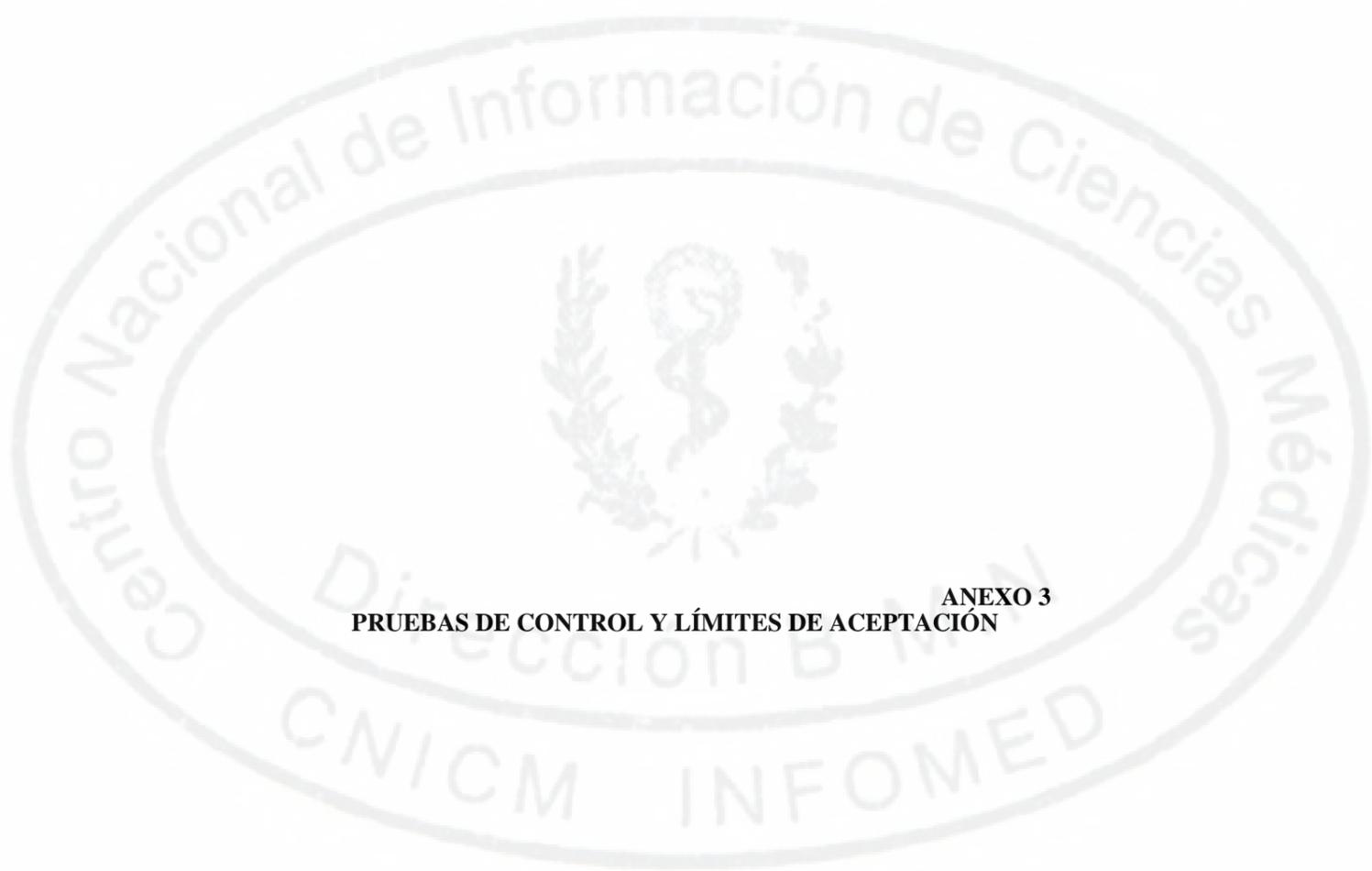
Fecha: // Fecha: //

Aprobado:

____ Cargo:

Firma:





ANEXO 3
PRUEBAS DE CONTROL Y LÍMITES DE ACEPTACIÓN

Controles para la liberación de los lotes de siembra de referencia.

Variable	Prueba	Tipo de prueba	Especificación	Tamaño de la muestra para una determinación
Identidad	Gram	Rutina	Bacilos Gram negativos en forma de coma	20 ^μ L/ámpula
	Siembra en agar selectivo TCBS	Rutina	Colonias amarillas, lisas de 2-4 mm de diámetro, ligeramente aplanadas	20(μL/ámpula
	Siembra en Agar Sangre de camero al 5%	Rutina	Colonias de 2-4 mm de diámetro, lisas de color grisáceo con formación de β hemolisis alrededor de las colonias	20(μL/ámpula
	Siembra en Agar Cerebro Corazón (BHI)	Rutina	Colonias 2-4 mm de diámetro, lisas, traslúcidas y de color crema	20(μL/ámpula
	Agar Hierro Kligler	Rutina	No fermentación de lactosa: superficie inclinada roja. Fermentación de glucosa, producción de ácido, no producción de gas ni de H ₂ S: fondo amarillo	1 colonia
	Agar Hierro Lisina	Rutina	Descarboxilación de la lisina: color morado intenso en todo el medio. No producción de gas ni de H ₂ S	La misma colonia anterior.
	Aglutinación en lámina	Rutina	Aglutinación con antisueros polivalente 01 y monovalente Ogawa. No aglutinación con antisueros 0139 ni monovalentes Inaba	30(μL/ámpula para cada suero (120 ^μ L en total) (30 μL/suero)
	Endoglucanasa A	Rutina	Halo transparente alrededor de todas las colonias	100 (μL/ámpula
RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)	Caracterización	Presencia de las bandas de restricción obtenidas en el DNA digerido con Bgl	200 (μL/ámpula	

	Cuerda	Rutina	Hilo mucoso de la lámina al asa	Una colonia de ABHI
	Oxidasa	Rutina	Color púrpura al oxidar el reactivo de la oxidasa	Una colonia de ABHI
	Catalasa	Rutina	Presencia de burbujas al reaccionar con el H ₂ O ₂	Una colonia de ABHI
	Cinética de crecimiento en zaranda	Rutina	D.O > 1 a las 6 horas de cultivo con X= 600 nm	500 (iL/ámpula
Potencia	Conteo de Viables	Rutina	> 10 ⁵ UFC/ámpula	100 ^L/ámpula
	Inmunogenicidad (Modelo Inoculación intraduodenal en conejos)	Caracterización	Títulos Ac. IgG anti LPS (ELISA)- 1,24-2,72 Título Ac. Bactericidas (Vibriocida) > 1:160	1mL/ámpula
	Colonización (Modelo de ratones neonatos)	Rutina	Incremento en 10 ² -10 ³ UFC del inóculo inicial (10 ⁵) ó Semejante a la cepa control (virulenta)	200(i L/ámpula
Virulencia	Dosis Letal Media (LD ₅₀) en ratones neonatos	Rutina	> 10 ⁶ UFC	500iL/ámpula
Seguridad	PCR (<i>ctx</i> , <i>hap</i>)	Rutina	Ausencia de las bandas correspondientes a los genes <i>ctx</i> y <i>hap</i>	200 ^L/ámpula

Controles para la liberación de los lotes de siembra de trabajo

Variable	Prueba	Tipo de prueba	Especificación	Tamaño de la muestra para una determinación
Pureza	Gram	Rutina	Bacilos Gram negativos en forma de coma	20µL / vial
Identidad	Siembra en agar selectivo TCBS	Rutina	Colonias amarillas, lisas de 2 - 4 mm de diámetro, ligeramente aplanadas	20µL / vial
	Agar Hierro Kligler	Rutina	No fermentación de lactosa: superficie inclinada roja. Fermentación de glucosa, producción de ácido, no producción de gas ni de H ₂ S: fondo amarillo	1 colonia
Identidad	Agar Hierro Lisina	Rutina	Descarboxilación de la lisina: color morado intenso en todo el medio. No producción de gas ni de H ₂ S	La misma colonia anterior.
	Siembra en Agar Sangre de camero al 5%	Rutina	Colonias de 2-4 mm de diámetro, lisas de color grisáceo con formación de P hemolisis alrededor de las colonias	20µL/ámpula
	Siembra en Agar Cerebro Corazón (BH1)	Rutina	Colonias 2-4 mm de diámetro, lisas, traslúcidas y de color crema	20µL/ámpula
	Aglutinación en lámina	Rutina	Aglutinación con antisueros polivalente 01 y monovalente Ogawa y No aglutinación con antisueros 0139 ni monovalentes Inaba	30µL/ámpula para cada suero (120µL en total) (30 µL/suero)
	Endoglucanasa A	Rutina	Halo transparente alrededor de todas las colonias	100µL / vial
	RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción)	Caracterización	Presencia de las bandas de restricción obtenidas en el DNA digerido con Bgl 1	200 µL/ámpula

	Cuerda	Rutina	Hilo mucoso de la lámina al asa	Una colonia de ABHI
	Oxidasa	Rutina	Color morado al oxidar el reactivo de la oxidasa	Una colonia de ABHI
	Catalasa	Rutina	Presencia de burbujas al reaccionar con el H ₂ O ₂	Una colonia de ABHI
Potencia	Conteo de Viables	Rutina	> 10 ⁵	100 nL / vial
Seguridad	PCR (<i>ctx</i> , <i>hap</i>)	Rutina	Ausencia de las bandas correspondientes a los genes <i>ctx</i> y <i>hap</i>	200 μ L/ámpula

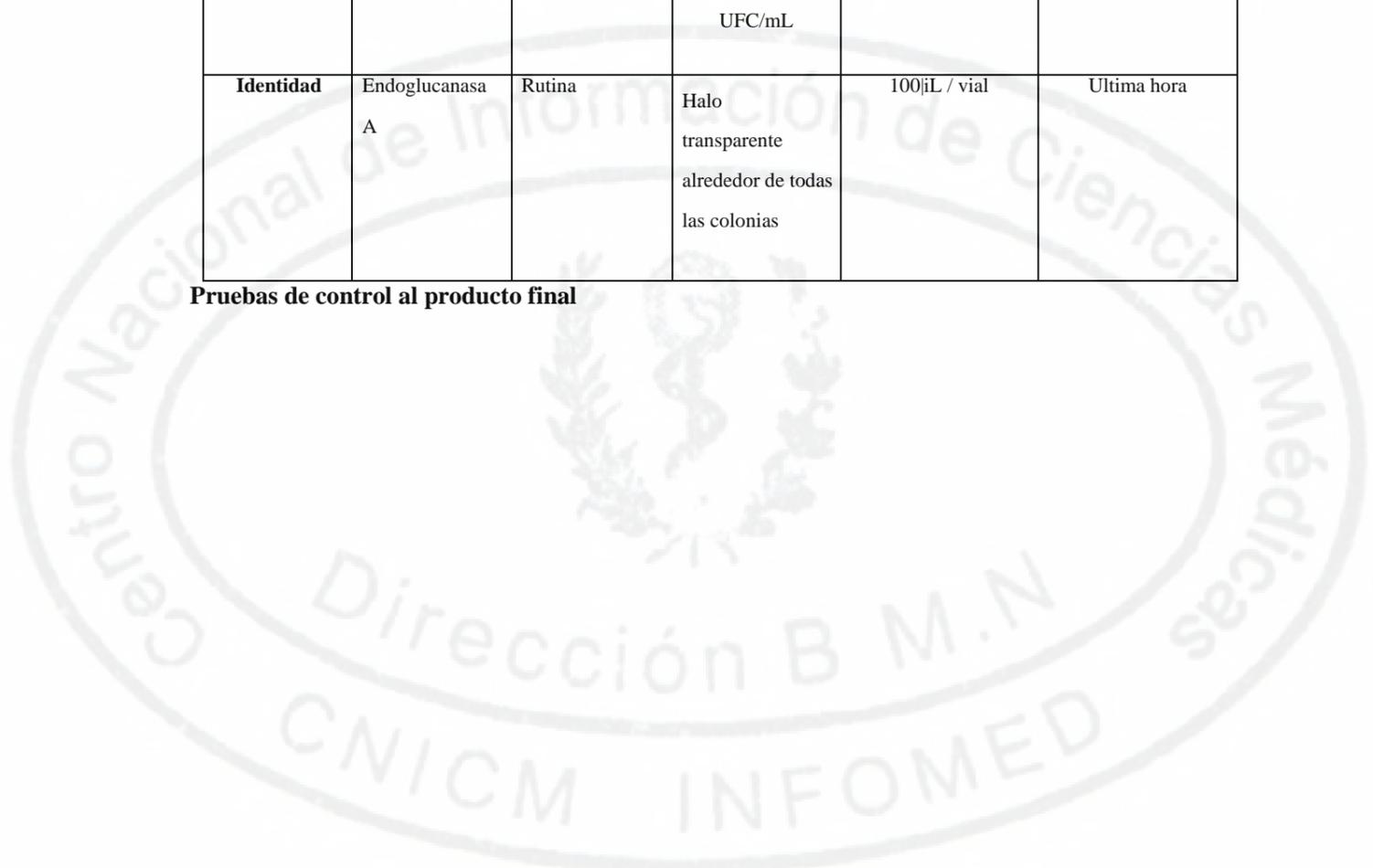
Controles de proceso. -Fermentación

Variable	Prueba	Tipo de prueba	Especificación	Tamaño de la muestra para una determinación	Frecuencia de determinación
Pureza	Gram	Rutina	Bacilos Gram negativos en forma de coma	20 μ L	Cada 1 hora
Crecimiento	Medición D. 0 a X= 600 nm	Rutina	D.O final > 3.5	5 mL	Cada 1 hora
Viabilidad	Conteo UFC/mL	Rutina	> 1 x 10 ⁹ UFC/mL	100 nL	Ultima hora

-Posterior a la filtración o centrifugación.

Variable	Prueba	Tipo de prueba	Especificación	Tamaño de muestra para una determinación	Frecuencia de la determinación
Viabilidad	Conteo UFC	Rutina	>1x10 ⁹ UFC/mL	100 nL	Ultima hora
Identidad	Endoglucanasa A	Rutina	Halo transparente alrededor de todas las colonias	100µL / vial	Ultima hora

Pruebas de control al producto final



Variable	Prueba	Tipo de prueba	Especificación	Tamaño de la muestra para una determinación
Pureza	Gram	Rutina	Bacilos Gram negativos en forma de coma	20µL / bulbo
Potencia	Conteo de Viables	Rutina	5x 10 ⁶ -7x 10 ⁷ UFC/bulbo	100 µL / bulbo
	Inmunogenicidad (Modelo de inoculación intraduodenal en conejos)	Caracterización	Títulos Ac. IgG anti LPS (ELISA)- 1,24- 2,72 Título Ac. Bactericidas (Vibriocida) > 1:160	1 mL / bulbo
	Colonización en el modelo de ratón neonato	Rutina	-Incremento en 10 ² -10 ³ del inoculo inicial ó -Semejante a la cepa control (virulenta)	200µL / bulbo
Identidad	Aglutinación en lámina	Rutina	Aglutinación con antiseros polivalente 01 y monovalente Ogawa y No aglutinación con antiseros 0139 ni monovalentes Inaba	120µL / vial (30 µL/suero)
	Endoglucanasa A	Rutina	Halo transparente alrededor de todas las colonias	100µL / bulbo
Seguridad	PCR (<i>ctx</i> , <i>hap</i>)	Rutina	Ausencia del gen <i>ctx</i> y <i>hap</i>	200 µL/ámpula