Virulencia, inmunogenicidad y capacidad de colonización de cepas atenuadas de Vibrio cholerae *administradas de forma simultánea en modelos animales*

Luis García Imia, Bárbara Cedré Marrero, Adriana González Quintero, Hilda García Sánchez, Tania Valmaseda Pérez, Gemma Año López, José Luis Pérez Quiñoy, Arturo Talavera Coronel

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

RESUMEN

Disponer de una vacuna eficaz y segura contra el cólera, continúa siendo la mejor alternativa para el control de la enfermedad. En Cuba se ha obtenido un grupo de cepas atenuadas de *V. cholerae* y una de ellas —la cepa 638— ha sido evaluada en voluntarios inoculados por vía oral. En el presente trabajo se realizó la evaluación preclínica de virulencia, inmunogenicidad y capacidad colonizadora de las cepas 638 y 413 de *V. cholerae* de los serotipos Ogawa e Inaba respectivamente, administradas simultáneamente en animales de experimentación. Ambas cepas mostraron un nivel de atenuación aceptable y una capacidad colonizadora comparable entre ellas y con la de las cepas salvajes utilizadas como control. Además, lograron niveles de seroconversión apreciables a los 7 días de inoculados y altos títulos de anticuerpos específicos contra antígenos de *V. cholerae*.

Palabras claves: cepas atenuadas, colonización, inmunogenicidad,virulencia

Biotecnología Aplicada 2002;19:133-137

SUMMARY

Virulence, Immunogenicity and Colonizing Capability of *Vibrio cholerae*-attenuated Strains Simultaneously Administered in Animal Models. To obtain an efficacy and safety vaccine against cholera, continues being the best alternative for the control of the illness. In Cuba, a group of attenuated strains of *V. cholerae* and has been obtained, one of them —the strain 638—, was evaluated in volunteers inoculated by oral route. In this study, it was conducted a pre-clinical evaluation of virulence, inmunogenicity and colonization capacity of 638 and 413 strains of *V. cholerae* from the serotypes Ogawa and Inaba respectively, administrated simultaneously in animal models. Both strains showed similar levels of colonizing and seroconversion in 7 days after inoculation and high levels of specific antibodies against LPS from *V. cholerae*.

Keywords: attenuated strains, colonization, immunogenicity, virulence

*I*ntroducción

El cólera constituye un problema de salud emergente en muchas regiones del mundo. El serogrupo O1 de *Vibrio cholerae* es el principal agente causal de esta enfermedad, el cual se divide en dos biotipos: Clásico y El Tor sobre la base de criterios bioquímicos y fenotípicos. Ambos biotipos se encuentran separados en tres serotipos debido a diferencias antigénicas en su lipopolisacárido superficial, ellos son: Ogawa, Inaba e Hikojima, este último carece de interés clínico [1].

En la sexta pandemia los vibrios predominantes fueron de biotipo Clásico. La séptima y actual pandemia se caracteriza por el predominio casi absoluto de *V. cholerae* O1 toxigénico biotipo El Tor serotipo Inaba, lo que enfatiza la necesidad de contar con una vacuna segura y efectiva contra la enfermedad causada por este biotipo, aunque existe certeza acerca de que las cepas de *V. cholerae* cambian en cada epidemia como respuesta a la inmunidad en las poblaciones afectadas [2]. Otro elemento a considerar es el cambio en la frecuencia de aislamiento de serotipo Inaba a Ogawa durante la actual pandemia en América Latina.

Diferentes estrategias se adoptan para el desarrollo de una vacuna contra esta enfermedad, varias de estas vacunas se encuentran actualmente en ensayos de terreno. La primera generación de cepas vacunales atenuadas se obtuvo por deleción de los genes que codifican la subunidad A de la toxina de cólera (CTA) en cepas de biotipo Clásico y El Tor para producir las cepas CVD103 y JBK 70 [3], respectivamente. La primera , a partir de la cepa de biotipo Clásico 569B con la deleción del gen que codifica CTA y con la conservación del gen responsable de la síntesis de la subunidad B (CTB). Con estas condiciones, esta cepa fue significativamente menos reactogénica. Posteriormente se incluyó un gen de resistencia al mercurio para dar lugar a la cepa CVD103HgR que ha sido intensamente investigada en ensayos controlados en voluntarios [4].

Esta cepa vacunal es segura, no reactogénica y altamente protectora en niños, no obstante adolece de las siguientes limitaciones: es menos protectora contra retos con vibrios El Tor y debido a su pobre capacidad de colonización se requieren altas dosis para lograr una buena inmunogenicidad [5].

Se conoce que la protección contra el cólera es altamente dependiente de la estimulación de una respuesta inmune mucosal, lo cual ha favorecido el concepto de una vacuna administrada por vía oral [6]. Estudios epidemiológicos en áreas endémicas indican que la infección natural por cólera produce una inmunidad protectora de larga duración contra un eventual ataque de esta enfermedad, caracterizada por altos niveles de

✉ Autor de correspondencia

1. Finkelstein RA. Cholera enterotoxin (Choleragen): a historical perspective1. In: Racua D, William R, editors. Cholera. New York: Greennugh III Plenum Medical Book Company; 1992. p.49-64.

2. Barua D. History of cholera. In: Racua D, William R, editors. Cholera. New York: Greenough III Plenum Medical Book Company; 1992. p.1-36.

3. Levine M M, Kaper JB, Herrington D, Losonsky G, Morris JG, Clements ML, *et al*. Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. Infect Immun 1988; 56:161-7.

4. Levine MM, Black RE, Clements ML, Cisneros L, Nalin DR, Young CR. Duration of infection-derived immunity to cholera. J Infect Dis 1981;143:818-20.

5. Finkelstein RA. Why do we not yet have a suitable vaccine against cholera? In: J Mestecky, editor. Advance in mucosal immunity. New York: Plenum Press; 1995. p.1633-40.

6. Hase CC, Thai LS, Boesman-Finkelstein M, Mar VL, Burnette WN, Kaslow HR, *et al*. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains producing inactive cholera toxin analogs. Infect Immun 1994;62:3051.

IgA secretora antibacteriana, lo que se traduce en una efectiva respuesta inmune a nivel de mucosa [7].

Para estudiar el cólera se han desarrollado diversos modelos animales. A pesar de la limitación fundamental ocasionada por el hecho de que la infección natural con *V. cholerae* no ocurre en animales, algunos de estos modelos han proporcionado información relevante a la enfermedad humana [8]. Entre éstos se ha descrito el modelo de inoculación oral con reducción de la acidez estomacal y el peristaltismo [9] y el de inoculación intraduodenal [10], ambos en conejo adulto para evaluar la inmunogenicidad de preparados vacunales y el modelo de ratón neonato para estudiar la diarrea inducida por cepas de *V. cholerae* y que es particularmente útil en el estudio de la colonización de las cepas [11, 12].

Los genes que codifican la toxina de cólera (CT), principal responsable de los síntomas de la enfermedad se encuentran ubicados en el elemento génico denominado CTX ϕ, un segmento de ADN presente en el cromosoma de cepas toxigénicas de *V. cholerae* [13].

El grupo de Biología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNC) de La Habana, Cuba ha obtenido un grupo de cepas de *V. cholerae* de los biotipos Inaba y Ogawa genéticamente atenuadas, entre ellas una nueva cepa —la 638— candidata a vacuna que fue construida por deleción del profago CTX ϕ e inserción de *celA* que codifica la endogluconasa A de *Clostridium thermocellum* [14]. Se demostró que esta cepa ha sido bien tolerada e inmunogénica en voluntarios adultos inoculados oralmente. Una propiedad ventajosa de esta cepa es que posee un marcador con un gen reportero que codifica una actividad que no está presente en otras bacterias entéricas por lo que permite diferenciar la cepa vacunal de otros vibrios ambientales [14].

En este trabajo se presenta la evaluación preclínica en ratón neonato y conejo adulto de dos cepas de *V. cholerae* administradas simultáneamente, en cuanto a virulencia, capacidad de colonización e inmunogenicidad, y constituye el primer informe de estudios de este tipo para cepas administradas simultáneamente.

Materiales y Métodos

Cepas utilizadas

Todas las cepas de *V. cholerae* utilizadas en el presente trabajo, así como su procedencia se detallan en la Tabla 1. Se utilizaron cepas de los biotipos Clásico y El Tor y serotipos Inaba y Ogawa conservadas a -70°C en caldo triptona soya (TSB) con leche descremada (MERCK, Alemania) al 10% y glicerol (MERCK, Alemania) al 20%.

Se evaluaron dos cepas atenuadas obtenidas en el CNIC y se utilizaron como controles las cepas parenterales que le dieron origen y la cepa vacunal CVD103HgR obtenida en el Centro para el Desarrollo de Vacunas de Maryland, EE.UU.

Los inóculos se prepararon de la siguiente manera: las cepas se cultivaron en medio casaminoácido extracto de levadura (CAYE) a 37 °C, 8 h, 200 rpm para el ensayo de la dosis letal 50% (DL50) y en medio TSB durante 6 h , 37 °C, 200 rpm para los ensayos de colonización intestinal e inmunogenicidad.

Tabla 1. Cepas de *V. cholerae*.

Cepas	Fenotipo/origen	Procedencia
C7258	El Tor Ogawa, Perú 1991	Dr. R. Finkelstein, Missouri, EE.UU.
C6706	El Tor Inaba, Perú 1991	Dr. R. Finkelstein, Missouri, EE.UU.
413	*ctxA⁻ ctxB⁻ zot⁻ ace⁻ orfU⁻ cep⁻* obteida a partir de la C6706	CNIC, Cuba
638	*ctxA⁻ ctxB⁻ zot⁻ ace⁻ orfU⁻ cep⁻ hap*::*celA*, obtenida a partir de la C7258	CNIC, Cuba
CVD103HgR	Clásico Inaba ctxA⁻ hlyA::HgR	CVD, Maryland, EE.UU.

ctxA, gen para la subunidad A de la toxina de cólera; *ctxB*, gen para la subunidad B de la toxina de cólera; *zot*, gen para la toxina de la zónula ocluida; *cep*, gen para "core encoded pilus"; *orfU* gen para "open reading frame"; *ace*, gen para la toxina accesoria de cólera; *hap*, gen para la hemaglutinina proteasa; *celA*, gen para la endogluconasa A de *C. thermocellum*; *hlyA*, gen para la hemolisina de *V. cholerae*.

Dosis letal 50% (DL50)

Los valores de DL50 se determinaron usando el modelo de ratón lactante [15]. Se inocularon por vía oral grupos de 10 ratones balb/c de 2-3 días de nacidos con diluciones que contenían desde 10^3 a 10^7 vibrios de cada cepa o de la mezcla de cepas atenuadas en igual proporción (1:1), en 20 µL de tampón fosfato salino (PBS). La mortalidad se determinó luego de 72 h y la DL50 se calculó según el método de Reed L.J. y Muench M [16].

Colonización intestinal

Este método se realizó básicamente según Cedré y colaboradores [17]. Grupos de 10 ratones balb/c entre 3-5 días de nacidos fueron inoculados oralmente con 10^5 células viables de cada cepa o combinación de ellas en una proporción 1:1. Pasadas 24 h, los animales fueron sacrificados, se extrajo el intestino delgado y se cuantificó el número de organismos viables mediante el plaqueo de diferentes diluciones del homogenato intestinal en medio agar Luria Bertani (LB). La actividad endogluconasa se detectó cubriendo las placas de agar LB con 7 mL de agarosa (MERCK, Alemania) al 0,7% y carboximetilcelulosa (OXOID, Reino Unido) al 0,5% en buffer citrato fosfato pH 6,3. Las placas se incubaron 2 h a 60 °C, y luego se tiñeron con Rojo Congo al 1% y se destiñeron con NaCl 1M. El índice de competencia se definió como la proporción de la cepa 638 sobre la cepa 413 luego del conteo del crecimiento de los vibrios en el intestino de los animales y la identificación de la cepa 638 por la formación de un halo de actividad celulolítica alrededor de la colonia a diferencia de la 413 que carece del gen [14].

Immunogenicidad

Se empleó el modelo de inoculación intraduodenal en conejos blancos Nueva Zelanda (2-2,5 Kg) [10]. Se realizó una laparotomía de 3 cm en el abdomen de los animales, se localizó el duodeno y se inyectaron en el espacio luminal 5 mL de una suspensión bacteriana que contenía 10^9 UFC de la cepa 638 y 413 individualmente o en una mezcla (1:1). Para cada inóculo se usaron tres conejos, así como tres de ellos se usaron como control y recibieron PBS en lugar de bacterias viables.

7. Jertborn M. Immune response in human after oral cholera vaccination. Sweden: University of Goterborg; 1987.

8. Richardson SH. Animal models in cholera research. In: Wachsmuth I, Blake PA, Olsvik O, editors. *Vibrio cholerae* and Cholera. Molecular to global perspectives, Washington, DC: American Society for Microbiology; 1994. p.203-21.

9. Spira WM, Sack RB, Froelich JL. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. Infect Immun 1981;32:739-47.

10. García L, Oliva R, Cedré B, Valmaseda T, García H, Talavera A, *et al.* Intraduodenal inoculation of adult rabbits for evaluating the immunogenicity of genetically attenuatted *Vibrio cholerae* strain. Laboratory Animal Science 1998;48(5):538-41.

11. Beachey EH. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J Infect Dis 1981;143:325-45.

12. Levine MM, Black RE, Clements ML, Lanata C, Sears S, Honda T, *et al.* Evaluations in humans of attenuated *Vibrio cholerae* El Tor Ogawa strain Texas Star-SR as a live oral vaccine. Infect Immun 1984;43:515-22.

13. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science 1996; 272:1910-4.

14. Robert A, Silva A, Benítez J, Rodríguez 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* endogluconase A. Vaccine 1996;14:1517-22.

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

16. Reed LJ, Muench H. A single method for estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg 1938;27:493-7.

17. Cedré B, García L, García H, Fariñas M, Talavera A, Infante JF. Intestinal colonization of the infant mouse model by attenuated and virulent *Vibrio cholerae* strains. Arch Med Res 1998;29:231-4.

La sangre se colectó por punción de la arteria central de la oreja los días 0, 7, 14, 21 y 28. Los anticuerpos antibacterianos se midieron por ELISA con lipopolisacárido (LPS) Inaba y Ogawa de *V. cholerae* como recubrimiento de la fase sólida en placas Nunc Maxisorp (NUNC, Dinamarca). Después de la incubación con el suero diluido en PBS se añadió a todos los pozos conjugado anti IgG de conejo-peroxidasa de rábano picante (SIGMA, EE.UU.) diluido 1:2000. Las placas se revelaron con *o*-fenilendiamina (SIGMA, EE.UU.), y se leyeron a una densidad óptica de 492 nm. Se consideró el título de anticuerpos como la interpolación de la dilución de la muestra que da una un valor de absorbancia de 0.4 por encima del blanco [10].

El título de anticuerpos vibriocidas se midió por un microensayo descrito por Cedré y colaboradores [18]. En placas estériles de 96 pozos se realizaron diluciones dobles seriadas de los sueros a titular en solución salina al 0,85 %. Se añadió 25 µL de una mezcla de 10^7 UFC/mL de las cepas *V. cholerae* VC 13 y VC 12 Clásico Inaba y Ogawa respectivamente, (recomendadas como cepas de referencia para este ensayo por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, EE.UU.) con complemento humano diluido 1:5 y se incubaron las placas por 1 h a 37 ºC. Luego se añadieron 150 µL por pozo de caldo Cerebro Corazón (BHI) (OXOID, Reino Unido) que contiene glucosa (MERCK, EE.UU.) y púrpura de bromocresol (MERCK, EE.UU.) ambos al 2%. Después de 3 h de incubación a la misma temperatura se realizó la lectura por observación visual. El título vibriocida se calculó como la dilución más alta del suero que causa inhibición completa del crecimiento bacteriano.

Análisis estadístico

Los valores de colonización y de DL50 fueron transformados a $\log_{10}$. El índice de colonización de las cepas administradas de forma individual o mezcladas, así como los valores de DL50 se compararon usando el programa Statgraphics Plus 2.1 para Windows.

Resultados y Discusión

A partir de dos cepas de biotipo El Tor y de serotipos diferentes (Ogawa e Inaba), procedentes de aislamientos clínicos de la epidemia de esta enfermedad en Perú (C7258 y C6706), se obtuvieron las cepas atenuadas de primera generación (81 y 413) privadas de un grupo de genes relacionados con la virulencia de las mismas. Este fragmento genómico se denominó inicialmente * "cassette de virulencia" [19], pero más recientemente se ha descubierto que constituye el genoma de un fago filamentoso llamado CTX ϕ [13]. A partir de la cepa 81 se obtuvo la cepa 638 a la cual se le realizó una manipulación genética adicional para introducirle el gen que codifica la endogluconasa A de *C. thermocellum* en el sitio del gen de la hemaglutinina proteasa. Esta modificación permite el marcaje de una cepa vacunal potencial y consecuentemente su fácil identificación de cualquier otra cepa ambiental [14].

En el presente trabajo se han evaluado en modelos animales cepas atenuadas de *V. cholerae* de diferente serotipo obtenidas en el Dpto. de Biología Molecular del CNIC, la cepa 413 a partir de la cepa virulenta C6706 y la 638 obtenida debido a una segunda mutación realizada a la cepa 81 proveniente de la virulenta C7258.

Desde el descubrimiento del agente etiológico del cólera se han hecho múltiples intentos para desarrollar modelos animales para estudiar las interacciones entre *V. cholerae* y su hospedero humano. Hasta el momento ningún modelo animal reproduce todos los síntomas y signos de la enfermedad humana.

V. cholerae solo puede colonizar exitosamente el intestino delgado de animales lactantes con pocos días de nacidos [8]. Esta es la razón fundamental para que los estudios de virulencia y colonización se realicen en ratones neonatos.

La actividad β 1-4 endogluconasa se detectó fácilmente cuando la mezcla de las cepas 638 y 413 fue cultivada en placas con agar LB [14]. Cuando las células adheridas al epitelio intestinal del ratón neonato fueron contadas, las colonias de la cepa 638 aparecieron de color rojo rodeadas de un halo transparente. En el caso de la cepa 413 esta actividad enzimática no estuvo presente. Esta prueba es rápida, simple y sensible y muy útil para diferenciar cepas vacunales de los vibrios ambientales.

El ensayo de colonización competitiva mostró que las cepas 638 y 413 colonizaron el intestino de los ratones recién nacidos en la misma proporción cuando fueron administradas en forma independiente a pesar de que esta última cepa carece del gen *hap*.

Este resultado no mostró diferencias significativas entre la cepa marcada y no marcada con relación a su capacidad para colonizar. En este trabajo, se pudo demostrar que el índice de colonización de las cepas inoculadas de forma independiente o mezcladas son muy similares, por lo que podemos concluir que la capacidad de colonización no se afecta. Ambas cepas fueron capaces de colonizar en la misma magnitud que la cepa C7258 (control positivo) [17] y su índice de colonización fue 10 veces mayor que el de la cepa 569B usada como control negativo y de la que se ha publicado anteriormente su baja capacidad colonizadora [19]. La colonización intestinal es otro importante aspecto a tener en cuenta a la hora de evaluar una cepa atenuada como candidato vacunal contra el cólera.

En animales con pocos días de nacidos se ha logrado la infección y colonización efectiva de *V. cholerae*. Sin embargo, debido a que sus intestinos son fisiológica e inmunológicamente inmaduros, su uso se ha restringido a experimentos de colonización de corta duración y para estudios de patogenicidad, por lo que para la evaluación inmunológica de cepas candidatas a vacuna se ha escogido un modelo de inoculación intraduodenal en conejo adulto [10], donde a través de una sencilla y rápida intervención quirúrgica, se coloca el inóculo bacteriano directamente en el duodeno, evitando la acidez estomacal a la cual es sensible *V. cholerae*.

Los resultados de la evaluación de la capacidad colonizadora en el modelo de ratón neonato de las dos cepas atenuadas bajo estudio se presentan en la Tabla 2. No existen diferencias entre los valores de UFC/g de intestino obtenidos 18 h después de la inoculación con las cepas obtenidas por el grupo de trabajo del CNIC, independientemente de ser atenuadas o del tipo de manipulación genética a que fueron sometidas. Tampoco se aprecian diferencias

18. Cedré B, García H, García L, Talavera A. Estandarización y evaluación del ensayo vibriocida modificado. Revista Cubana de Medicina Tropical 1999;51(3): 156-9.

19. Lebens M, Holmgren J. Structure and arrengement of cholera toxin genes in *Vibrio cholerae* O139. FEMS Microbiol Lett 1994;117:197-202.

significativas en el índice de colonización entre ambas cepas atenuadas, ni entre ellas y la mezcla.

Aunque no existe un modelo animal capaz de reproducir todos los síntomas de la enfermedad, muchos de ellos han sido usados para estudiar diversos aspectos de la patogenia e inmunogenicidad de *V. cholerae* [8]. Uno de ellos es el modelo de ratón neonato el cual ha mostrado resultados satisfactorios en la evaluación de la virulencia. Uno de los parámetros usados para evaluar la virulencia de las cepas de *V. cholerae* es la DL50.

En la Tabla 3 se presentan los resultados de la determinación de la DL50 en el modelo de ratón neonato de ambas cepas atenuadas y sus correspondientes parentales. En este trabajo se encontraron diferencias significativas entre las dos cepas atenuadas bajo estudio y las cepas epidémicas que le dieron origen. Aunque no existen diferencias significativas entre las cepas atenuadas, los valores tienden a ser mayores para la cepa 638 de segunda generación por lo que la segunda manipulación genética, que la diferencia de la primera, pudo haber jugado un papel importante en el completamiento de su atenuación. Esta segunda manipulación consistió en la inactivación del gen de la hemaglutinina proteasa que se considera una proteína implicada en la virulencia de *V. cholerae*. No hay antecedentes en la literatura de la eliminación de este gen para reducir la reactogenicidad residual de cepas atenuadas, ni tampoco en estudios de virulencia de estas cepas en modelos animales. Pero las diferencias de 4 órdenes de magnitud en la dosis necesaria para provocar la muerte de la mitad de los animales entre las cepas atenuadas y las parentales es un indicio importante del éxito de la atenuación genética. Cuando las cepas atenuadas 638 y 413 son inoculadas por vía oral en el ratón neonato, de forma individual o mezcladas, los valores de DL50 fueron entre 100 a 1000 veces mayores que los observados para las cepas salvajes [20]. Esto es una clara señal de la atenuación lograda debido a que estas cepas no poseen los genes tóxicos ni de otros factores de virulencia que juegan un papel importante en la patogénesis de la enfermedad. Tampoco en la determinación de la DL50 se aprecian diferencias entre la mezcla y las cepas individuales que la integran.

En humanos, la reactogenicidad de cepas vivas atenuadas se ha correlacionado con diferentes niveles de colonización intestinal en un proceso complejo y multifactorial. Esto hace que el aumento significativo del valor de la DL50 no pueda sumirse como un criterio predictivo absoluto de su seguridad en humanos inoculados. No obstante, se ha publicado que el incremento entre 3 y 4 órdenes de magnitud ha correlacionado posteriormente con bajos niveles de reactogenicidad en humanos [20].

Las cepas 638 y 413 inoculadas de forma independiente o mezcladas mostraron resultados similares, sin diferencias significativas.

La cepa 413 presentó títulos vibriocidas ligeramente más bajos que el resto de las cepas en las muestras de suero correspondientes a los días 7,14 y 21, posiblemente debido a que uno de los tres animales alcanzó una respuesta baja evaluada por ELISA y vibriocida lo que redujo el valor promedio del grupo, por lo que sería recomendable un mayor número de animales en próximos experimentos.

Tabla 2. Índice de colonización de cepas atenuadas administradas individual o simultáneamente.

Individuales	638	413	81	C7258	C6706	CVD103HgR
Índ. coloniz.	$3,1x10^8$	$6,5x10^8$	$2x10^9$	$6x10^9$	$4,6x10^9$	$9x10^6$
Mezcladas	638	413				
Índ. coloniz.	$2,8x10^8$	$5,5x10^8$				

Cada resultado es el promedio de tres determinaciones para una $p<0,05$.

Tabla 3. Dosis letal 50 de cepas atenuadas administradas individual o simultáneamente

Individuales	638	413	81	C7258	C6706	CVD103HgR
DL50	$3,1x10^8$	$6,5x10^8$	$2x10^7$	$1,1x10^4$	$2,2x10^4$	$2,3x10^8$
Mezcladas		638-413				
DL50		$3x10^7$				

Cada resultado es el promedio de tres determinaciones para una $p<0,05$.

En conjunto los resultados de la evaluación en modelos animales de las cepas atenuadas 638 y 413 se puede afirmar que las cepas atenuadas de primera y segunda generación están realmente atenuadas al emplear los modelos animales de más amplio uso internacionalmente [8], conservan una capacidad colonizadora e inmunogénica comparable a la de las cepas que le dieron origen.

La única diferencia genotípica entre las cepas 638 y 81 radica en la inserción del gen *celA* (endogluconasa A) en el sitio del gen *hap* en la primera de ellas. Esta manipulación no afecta la capacidad de colonización, la virulencia ni la inmunogenicidad de la cepa 638 en modelos animales, pero le aporta un gen marcador que permite su simple identificación microbiológica de cualquier otra cepa de *V. cholerae*, mediante una técnica rápida y sensible. La inactivación de *hap* incrementa la duración de la adherencia de *V. cholerae* a células del epitelio intestinal en cultivo [21] y aumenta la adherencia y multiplicación de vibrios en células intestinales humanos [7].

La aplicación de este método en el presente estudio nos ha permitido comprobar que los niveles de inmunogenicidad tanto por ELISA como mediante la determinación de anticuerpos vibriocidas son comparables entre cepas atenuadas y virulentas.

Las cepas atenuadas obtenidas por el grupo de trabajo fueron igualmente inmunogénicas en este modelo que las parenterales virulentas que le dieron origen y la respuesta inmune que generaron fue significativamente superior a la encontrada para la cepa CVD103HgR, cepa vacunal de un producto autorizado en varios países de Europa y América. Achelson y colabaradores evaluaron la inmunogenicidad de esta cepa en conejos a los que administraron por vía oral entre 10^{10} y 10^{11} células en dos dosis separadas por 20 días y encontraron una respuesta de anticuerpos por ensayo vibriocida detectable, solo 5 semanas después de la segunda dosis, aún inoculando una dosis superior a la usada por nosotros [22]. En un esquema de una dosis con las cepas atenuadas hemos obtenidos altos títulos de anticuerpos anti LPS.

La respuesta inmune de los animales inoculados se presenta en las figuras 1 y 2. La respuesta inducida por la mezcla de las cepas atenuadas fue evaluada contra los serotipos Inaba y Ogawa por separado tanto para el ELISA como en el ensayo vibriocida.

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

21. Butterton JR, Ryan ET, Shahin RA, Calderwood SB. Development of a germ-free mouse model of *Vibrio cholerae* infection. Infect Immun 1996;64:4373-7.

22. Achelson DWK, Levine MM, Kaper JB. Protective immunity to Shiga-like toxin I following oral immunization with Shiga-like toxin I B-subunit-producing *Vibrio cholerae* CVD 103 HgR. Infect Immun 1996;64:355-7.

La mezcla de las cepas fue capaz de inducir una respuesta inmune significativa contra los serotipos Inaba y Ogawa usadas como antígeno. A pesar de que el pico de anticuerpos estuvo en todos los casos en el día 14 luego del inóculo, la seroconversión ocurrió desde el día 7 y los títulos se mantuvieron hasta el día 28 sin diferencias significativas entre los grupos.

El título de anticuerpos en los animales inoculados con cada cepa fue elevado y comparable al obtenido con la mezcla de ellas. En todos los casos hubo seroconversión frente a los serotipos Ogawa e Inaba con títulos altos y no se apreciaron diferencias entre los encontrados para cada serotipo. Aunque se miden niveles de anticuerpos en suero estos resultados reflejan una efectiva estimulación de la inmunidad de mucosa por ambas cepas administradas ya sea de forma individual o combinada ya que *V. cholerae* es un patógeno no invasivo y los anticuerpos en suero son el resultado de una estimulación del sistema inmune a nivel de mucosa [6]. La respuesta vibriocida en suero es el mejor correlato de protección para *V. cholerae* O1 y la mejor medida de una correcta estimulación de la inmunidad antibacteriana. Luego de una infección natural o experimental en humanos, el título de anticuerpos vibriocidas se incrementa varias veces. En áreas endémicas de cólera la repetida ingestión de *V. cholerae* da como resultado la presencia de altos títulos durante la vida adulta [23]. La respuesta vibriocida luego de un reto o vacunación de voluntarios adultos en áreas endémicas, es fundamentalmente de tipo IgM y de corta duración. Sin embargo, esta respuesta inicial es un marcador confiable de que se ha generado una inmunidad mucosal fuerte y duradera, ya que un alto porciento de voluntarios experimentalmente infectados o vacunados han estado protegidos en experimentos de reto [6]. A pesar de que los anticuerpos vibriocidas determinados por esta técnica no actúan a nivel de la mucosa, se ha demostrado que existe una correlación entre el título de anticuerpos vibriocidas y la protección y que personas con altos títulos están protegidos contra la colonización y la enfermedad [24]. Mosley y colaboradores han demostrado que los títulos después de la infección tienen un importante papel en la inmunidad y que títulos mayores de 20 están asociados con la protección [24]. Aunque Clements define un nivel elevado cuando los títulos son iguales o superiores a 1280 [25]. En cualquier caso, se puede considerar que las preparaciones vacunales administradas a los animales lograron un nivel significativo de anticuerpos protectores.

La respuesta de anticuerpos anti-LPS Ogawa e Inaba detectados por ELISA fue comparable a la respuesta vibriocida. Las cepas inoculadas individualmente mostraron títulos elevados y muy similares. En el caso de los animales inoculados con ambas cepas simultáneamente se obtuvieron títulos comparables entre ellos a los 7 días de inoculados.

En el día 14 hubo una ligera disminución en el nivel de anticuerpos contra el serotipo Ogawa en relación con el Inaba cuando las cepas fueron inoculadas de manera combinada, esto fue debido a que uno de los animales respondió más tarde frente a ese serotipo y afectó la media de los valores. No hubo diferencias significativas entre la respuesta determinada por ELISA y el ensayo vibriocida.

Recibido en agosto del 2001. Aprobado en julio del 2002.

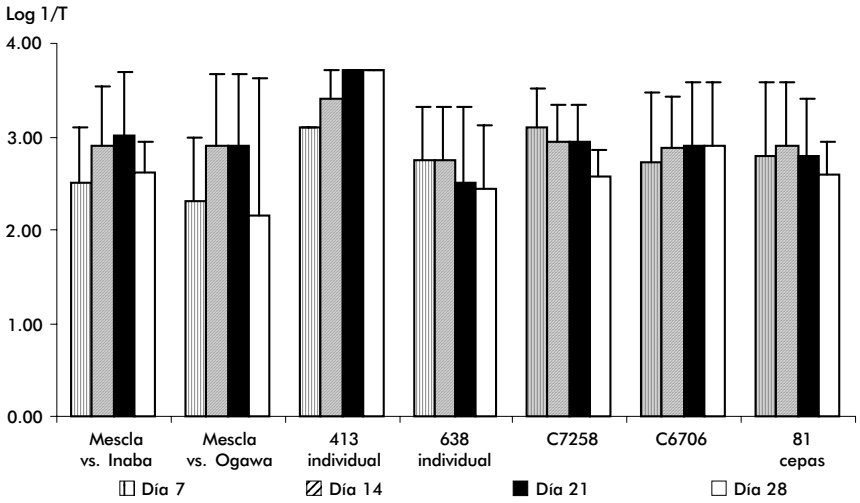

Figura 1. Título de anticuerpos vibriocidas en el suero de conejos inoculados con cepas atenuadas y sus parentales salvajes. Cada barra indica el promedio de tres animales.

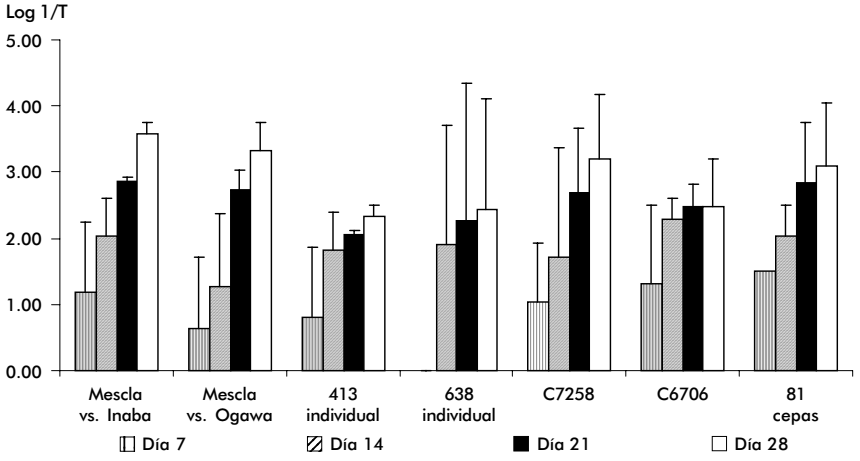

Figura 2. Título de anticuerpos anti-LPS por ELISA en el suero de conejos inoculados con cepas atenuadas y sus parentales salvajes. Cada barra indica el promedio de tres animales.

En la mayoría de las regiones del mundo, incluyendo América Latina, las epidemias de cólera están siendo provocadas por vibrios de biotipo El Tor, predominantemente serotipo Inaba. Sin embargo, también han ocurrido epidemias causadas tanto por biotipo Clásico como El Tor y serotipos Inaba y Ogawa de *V. cholerae* O1. Esto sugiere que una vacuna óptima debiera ser una combinación de cepas que representen a ambos biotipos y serotipos, por lo que desde el punto de vista epidemiológico sería recomendable aplicar dos cepas atenuadas de diferente serotipo en áreas donde ambos están presentes.

Los resultados del presente trabajo indican que la administración simultánea de dos cepas atenuadas en modelos animales mostraron resultados comparables a los obtenidos para las cepas individuales.

Agradecimientos

Agradecemos a la División de Modelos Animales del Instituto Finlay, especialmente al Dr. Juan Francisco Infante y a Mildrey Fariñas.

23. Glass RI, Svennerholm AM, Khan MR, Huda S, Huq MI, Holmgren J. Seroepidemiological studies of El Tor cholera in Bangladesh: association of serum antibodies levels with protection. J Infect Dis 1985;151:236-42.

24. Mosley WH, Benenson AS, Barui R. A serological survey for cholera antibodies in rural east Pakistan. Bull WHO 1968; 38:327-34.

25. Clemens JD, VanLoon F, Sack DA, Chakraborty J, Rao M R, Ahmed F, *et al.* Field trial of oral cholera vaccine in Bangladesh: serum vibriocidal and antitoxic antibodies as markers of the risk of cholera. J Infect Dis 1991;163:1235-42.