



ELISA Cualitativo de IgA anti-Lipopolisacárido de *Vibrio cholerae* en Saliva de Humanos

Judith del Campo¹.

Rolando Ochoa².

Miriam Lastre

Gustavo Bracho

Carlos Taboada

Miriam Díaz

Oliver Pérez³.

¹judithc@finlay.edu.cu

²DACTA

³Departamento de Inmunidad Básica y Clínica, DACTA, Instituto Finlay, la Habana, Cuba.

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

Se estandarizó un ELISA para detectar, en saliva, IgA contra el lipopolisacárido, principal antígeno protectogénico de *Vibrio cholerae*. Los voluntarios fueron inoculados por vía oral con dosis de 0, 107, 108, 109 unidades formadoras de colonias (ufc) del candidato vacunal El Tor Ogawa, cepa 638. Las muestras de saliva fueron tomadas seriadamente, a los 0, 7, 8, 9, 10 y 14 días postinoculación. Se consideró seroconversión si las densidades ópticas eran superiores al nivel de corte y si los incrementos en cualquier tiempo después de la inoculación duplicaban los valores iniciales. Los resultados del ELISA en saliva se compararon con: el ELISPOT, el Vobriocida y además con los grupos experimentales. Se obtuvieron sensibilidades de 90.3, 92.85 y 93.3%; especificidades de 86.9, 89.5 y 96.0%; 96.0%, valores predictivos positivos de 95.0, 96.2 y 98.2%, 98.2%; valores

predictivos negativos de 77.0, 79.2 y 85.7% y eficiencias de 89.4, 90.2 y 94.1% , respectivamente. Se demostró la presencia de IgA anti LPS en saliva de los individuos inoculados con el candidato vacunal, así como una mayor concentración con el inóculo (109 ufc) y se obtuvo la máxima positividad a los 9 días.

PALABRAS CLAVE: Córrea; Saliva; Mucosa; IgA; ELISA.

SUMMARY

An ELISA technique for IgA antibodies against *V. cholerae* lipopolysaccharide (LPS) in saliva was standardized. Humans volunteers were orally immunized with 0, 107, 108, 109 colony forming units of the candidate vaccine strain 638, El Tor Ogawa. Saliva samples were collected at 0, 7, 8, 9, 10 and 14 days after oral administration. Seroconversion was considered if IgA titers determined by optical density were higher than the cutoff value and if a two-fold increase of the initial titer was found. The technique was compared to the ELISPOT and to the Vibriocidal Antibody Assay and also the results obtained were compared to the experimental groups showing sensitivity of 90.3, 92.85, 93.3%; specificity of 86.9, 89.5, 96.0%; positive predictive value of 95.0, 96.2, 98.2%; negative predictive value of 77.0 y 79.2, 85.7% and efficiency of 89.4, 90.2, 94.1% respectively. The presence of specific IgA against LPS in saliva was demonstrated after immunization with the vaccine candidate. The results showed a kinetic profile with a maximum of IgA titter at day 9 post immunization with the highest frequency of positive titers found in the group immunized with 109 cfu.

KEY WORDS: Córrea; Saliva; Mucosa; IgA; ELISA.

INTRODUCCIÓN

El cólera es una infección aguda del tracto gastrointestinal, causada por *Vibrio cholerae*, que se caracteriza, en los casos graves, por la aparición brusca de diarreas acuosas no sanguinolentas y abundantes, vómitos, deshidratación rápida (provocada por la pérdida de líquido), desequilibrio electrolítico, acidosis metabólica, hipopotasemia y colapso hipovolémico con insuficiencia cardíaca.

En los casos no tratados se produce la muerte dentro de las 24 horas de su aparición (1, 2). La infección se disemina a través de la vía fecal-oral (3).

Los mecanismos inmunes relacionados con el Córrea comprenden una inmunidad antitóxica y antibacteriana. Estas respuestas ocurren fundamentalmente a nivel de mucosa y son mediadas por anticuerpos de clase IgA el cual neutralizan la colonización intestinal, así como la unión de la subunidad B de la toxina colérica (CT) a su receptor específico (4,5). Se ha determinado que el lipopolisacárido (LPS) es el que induce mejor respuesta de anticuerpos y que estos se correlacionan con la protección (6). La IgA anti LPS puede prevenir la enfermedad por: aglutinación de *Vibrio* y atrapamiento en la mucosa, inhibición de su movilidad, prevenir la adherencia al epitelio y potenciar la acción antibacteriana de la lactoferrina y la lactoperoxidasa (6-9).

Por ser *V. cholerae* un microorganismo no invasivo, el cual genera una respuesta inmune a nivel de la mucosa intestinal y que la propia enfermedad confiere protección duradera, un preparado vacunal contra el Córrea debe ser oral, preferiblemente con una bacteria viva o que, en el proceso

de producción, conserve en lo posible la estructura nativa (10,11). Recientemente, el Centro Nacional de Investigaciones Científicas y el Instituto Finlay obtuvieron un grupo de cepas atenuadas de *V. cholerae* delecionadas en el “cassette” de virulencia; entre ellas se encuentran cepas del biotipo El Tor serotipo Ogawa (12-14).

La protección en humanos de un candidato vacunal se realiza mediante el reto con *Vibrio* parentales no atenuados. No obstante, el vibriocida serico y el ELISPOT en sangre periférica son las técnicas más aceptadas para correlacionar con la inducción de una buena inmunogenicidad y protección. Éstas requieren la toma de muestras de sangre seriadas en el caso del vibriocida y gran volumen a los 7 días en el caso del ELISPOT. Además, el Vibricida mide la respuesta de IgG e IgM serica y no la IgA, que es la de más interés. Por su parte, el ELISPOT es una técnica costosa y, a pesar de medir IgA, es a nivel de sangre y no a nivel efector, mucoso. Por ello, nos propusimos la estandarización de un ELISA cualitativo en Saliva para determinar la inducción de IgA anti LPS Ogawa de *V. cholerae* en voluntarios inoculados por vía oral y valorar la aparición de IgA específica a nivel efector, así como estudiar el efecto de la dosis y cinética en la respuesta inducida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Universo. Doscientos ochenta voluntarios cubanos sanos entre 18 y 40 años de edad, sin antecedentes de vivir en zonas endémicas de Córlera y no haber sido vacunados contra esta enfermedad, formaron parte de este estudio. Ciento diez fueron empleados para determinar el valor de corte del ELISA y el resto constituyó el grupo experimental del ensayo clínico del candidato vacunal, teniendo en cuenta los requisitos de inclusión y exclusión establecidos en el proyecto de Córlera del Instituto Finlay (14). Las dosis orales fueron de: 0 (placebo); 107; 108 y 109 de *V. cholerae* El Tor Ogawa, cepa 368 (12-14). Las muestras de saliva fueron tomadas de forma seriada, a los 0, 7, 8, 9, 10 y 14 días post-inoculación. Éstas se obtuvieron por estimulación masticatoria para garantizar que provengan de las glándulas parótidas donde se ha reportado que las concentraciones de IgA son mayores. Dichas muestras fueron inactivadas a 56 C por 15 minutos, centrifugadas a 9000 g y conservadas a -20oC hasta su uso (16).

ELISA Indirecto de IgA en Saliva. Para el recubrimiento se utilizó 100 μ L por pozo de LPS Ogawa purificado en el Departamento de Bacterias Enteropatógenas del Instituto Finlay (13) y éste fue diluido en solución salina tamponada con fosfatos (SSTF) 0.15 M, pH 7.2. Se incubó durante 16 horas a 4°C y se evaluaron concentraciones de recubrimiento desde 2.5 hasta 80 μ g/mL de antígeno. Las placas fueron bloqueadas con leche descremada al 3% diluida en SSTF. Se aplicaron 100 μ L de las muestras por duplicado, previamente diluidas (1:2 a 1:8) y se incubaron 0.5, 1 y 2 horas a 37°C. Se usaron dos controles: uno positivo, construido a partir de un suero con alto título de IgA anti-LPS diluido entre 1:50 hasta 1:16000 y otro negativo de una muestra de saliva, sin IgA anti LPS diluido 1:2 a 1:8. Se utilizó un conjugado anti IgA humana peroxidasa (Sigma) y se incubó 0.5 y 1 hora a 37 C. Las diluciones de las muestras, los controles y el conjugado se realizaron en la solución de bloqueo con Tween 20 al 0.05%. Se añadió 100 μ L/pozo de solución sustrato compuesta por 0.5 μ L de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% en tampón citrato pH 5, usándose como cromógeno 6 mg O-Phenylenediamine (Sigma) y se incubaron las placas durante 30 minutos en cámara oscura a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción con 50 μ L por pozo de HCl 2.5 N y se efectuó la lectura a 492 nm en un lector de microELISA (Titertek

Multiskan, Finland). Posterior a cada incubación se realizaron cuatro lavados sucesivos con SSTF 0.15 M, pH 7.2 con Tween 20 al 0.05%.

Criterios de Aceptación de una Placa. En cada placa se usaron 4 réplicas de la muestra control negativo y del control positivo. Se calcularon las absorbancias promedios, sus desviaciones estándares (DE) y los límites superior e inferior (promedio 2DE) de las réplicas de los controles positivo y negativo con vistas a eliminar los valores extremos. Cada placa se aceptó cuando: el promedio de las réplicas del control positivo fue mayor que el nivel de corte de cada placa y ninguna o sólo una de las réplicas del control negativo o del positivo fueran rechazadas.

Nivel de Corte. Se calculó el cociente entre la absorbancia de cada una de las 110 muestras de individuos sin inmunizar y el promedio de las réplicas del control negativo. Se seleccionó como nivel de corte el mayor valor normalizado encontrado.

Criterio de positividad. Se consideró una muestra positiva si, al menos en uno de los tiempos posteriores al inóculo, se cumplieron los dos criterios siguientes: un incremento 2 entre las absorbancias pre y post-inoculación y el valor de absorbancia post-inoculación fue mayor que el valor del nivel de corte de la placa.

ELISPOT. Para la evaluación de las células formadoras de anticuerpos (CFA) se emplearon placas de 96 pozos de nitrocelulosa (Millipore), recubiertas con 25 µg/mL de LPS Ogawa y se incubaron durante toda la noche a 4 C. Las placas fueron bloqueadas con RPMI, se colocaron las células mononucleares periféricas en concentraciones de: 105; 2.5 x 105; 5 x 105 ó 106 y se incubaron durante 4 h. Se utilizó un conjugado anti IgA o anti IgG humana peroxidasa (Sigma) y se incubó toda la noche a 4 C. Se añadió posteriormente el sustrato 3-amino-9 ethylcarbazole en buffer citrato, pH 5. Los resultados fueron procesados y expresados como CFA x 106 células. Posterior a cada incubación se realizaron cuatro lavados sucesivos con SSTF 0.15 M, pH 7.2 con Tween 20 al 0.05% (14).

Ensayo de Anticuerpos Vibriocidas. La determinación de la actividad vibriocida fue realizada según Cedré y cols (15). Brevemente, el día anterior a la prueba, se siembra la cepa VC 12 Clásico Ogawa que se mantenían conservadas en congelación a -70oC en Skim Milk al 10% y Glicerol al 20%, en placas de BHI y se incuban a 37°C; se pasan colonias aisladas de las placas a las cuñas con el mismo medio y se incuban 4h a 37oC. El crecimiento se recoge con solución salina estéril 0.85% y la suspensión celular se ajusta en un fotocolorímetro a una densidad óptica (DO) entre 0.9 y 0.95, a una longitud de onda de 550 nm. La suspensión se diluye 1:10 y se mezcla con igual volumen de complemento humano diluido 1:5. Se añaden 25 uL de esta mezcla en una placa de microtitulación estéril en la que previamente se habían realizado diluciones de los sueros a probar desde 1:10 hasta 1:20 480 en solución salina. La placa se incuba 1 h a 37oC y luego se añade 150 uL por pozo, de medio BHI que contiene Glucosa y Púrpura de Bromocresol en solución, ambos al 2%. Se incuba nuevamente durante 4 h y se procede a la lectura por observación visual. El título se define como la dilución mayor del suero en la que se observa inhibición completa del crecimiento bacteriano reflejado por la invariabilidad del color del medio de cultivo.

Procedimiento estadístico. Se realizaron tablas de contingencias para calcular los parámetros de control para un inmunoensayo cualitativo: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) y la eficiencia del sistema comparando los resultados de la técnica de

ELISA con los métodos ELISPOT, Vibriocida y con el grupo experimental (17). Se usó la prueba X2 (χ^2 =0.05) para detectar la influencia de la dosis con la prevalencia de IgA específica.

ELISPOT o Vibriocida o Grupos Experimentales			
ELISA	Positivos	Negativos	Totales
Positivos	a	B	a+b
Negativos	c	D	c+d
Totales	c	b+d	a+b+c+d

a: Número de individuos considerados como positivos en el ELISA y positivos por el método de referencia (verdaderos positivos).

b: Número de individuos considerados como positivos en el ELISA y negativos por el método de referencia (falsos positivos).

c: Número de individuos con resultados negativos por el ELISA y positivos por el método de referencia (falsos negativos).

d: Número de individuos considerados negativos por el ELISA y negativos por el método de referencia (verdaderos positivos)

Sensibilidad se definió como la proporción de muestras positivas identificadas correctamente por la prueba de referencia.

$$\text{Sensibilidad} = (a / (a+c)) \times 100$$

Especificidad: se definió como la proporción de muestras negativas identificadas correctamente por la prueba de referencia.

$$\text{Especificidad} = (d / (d+b)) \times 100$$

VPP: es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente positivo cuando el resultado de la prueba resulta positivo.

$$\text{VPP} = (a / (a+b)) \times 100$$

VPN: es la probabilidad que tiene un individuo de ser realmente negativo cuando el resultado de la prueba resulta negativo.

$$\text{VPN} = (d / (d+c)) \times 100$$

Eficiencia: es la capacidad de un sistema analítico para detectar correctamente la mayor cantidad de verdaderos positivos y verdaderos negativos.

$$\text{Eficiencia} = ((a+d) / (a+d+b+c)) \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para determinar la concentración óptima de recubrimiento se ensayaron diferentes concentraciones de LPS Ogawa. A partir de 20 g/mL no se incrementó la absorbancia del control positivo y se alcanzó la zona de meseta, la cual se extiende hasta 40 g/mL observándose un efecto gancho en 80 g/mL, concentración en la que la señal disminuye. Decidimos trabajar con una concentración de recubrimiento de 25 g/mL para tomar un valor por encima del límite mínimo y alejado de los extremos de la zona de meseta (Fig. 1).

Para determinar la dilución óptima de las muestras, se empleó saliva en diluciones sucesivas hasta 1:8. Se seleccionó como dilución óptima 1:2, donde se pudo comprobar la mayor discriminación pre y post-inoculación (Fig. 2).

Como control positivo se empleó un suero con alto título de IgA anti LPS, por la necesidad de contar con suficiente volumen de muestra para su empleo en todos los ensayos y garantizar la reproducibilidad de los resultados en los diferentes ensayos clínicos prospectivos. Sus resultados sólo se usaron para la aceptación de las placas y no para determinar el valor de corte. Para garantizar que el comportamiento de este control fuera similar al de las muestras de saliva se probaron diferentes diluciones. La dilución de trabajo seleccionada fue 1:400, DO similar al de las muestras de saliva positivas con títulos bajos.

La mejor combinación entre los tiempos de incubación de las muestras y el conjugado fue de 2 h para las primeras y 1 h para el segundo (Fig. 3).

El valor de corte fue calculado en base a la normalización de las muestras negativas. Después de normalizadas cada una de las 110 muestras se seleccionó el mayor valor normalizado para un 100% de especificidad que fue 4.1. Con el nivel de corte seleccionado se determinaron los parámetros de control de las 170 muestras experimentales del ensayo.

Se determinó la sensibilidad, la especificidad, el VPP, el VPN y la eficiencia del ensayo comparando el ELISA con el ELISPOT, el Vibriocida y el grupo experimental. Las sensibilidades fueron 90.3, 92 y 93.3%, respectivamente. Las especificidades fueron 86.9, 89.5 y 96.0%, respectivamente. Estos resultados de sensibilidad y especificidad son elevados y se encuentran dentro de los límites reportados (17). Los VPP fueron de 95.0, 96.2 y 98.2%, respectivamente, es decir, la posibilidad de que las muestras positivas por ELISA sean verdaderas positivas, es elevada. Los VPN fueron 77.0 y 79.2 y 85.7%, respectivamente. Por último, la eficiencia del método fue 89.4, 90.2 y 94.1%, respectivamente y estos valores se encuentran dentro de límites aceptables (17).

Como puede observarse, a pesar de la alta correspondencia entre las técnicas, los mejores resultados fueron al comparar el ELISA con el grupo experimental, pues no todos los inmunizados inducen buena respuesta de anticuerpos (17-20). Por otro lado, Nuestro ensayo fue capaz de discriminar entre el grupo control (dosis 0) y los grupos con diferentes concentraciones de *V. cholerae*, ($p < 0.05$).

Con vistas a valorar si la dosis influía en la presencia de IgA específica se agruparon los datos de acuerdo al inoculo (0, 107, 108 y 109). Se observó la existencia de una respuesta dosis-dependiente donde al aumentar la concentración del inoculo aumentó la respuesta, siendo la de 109 la de mayor número de casos positivos detectados por ELISA ($p < 0.05$) (Fig. 4). }

El sistema inmune mucoso se encuentra integrado, por lo que las respuestas inducidas en las placas de Peyer pueden ser evaluadas a distancia como, por ejemplo, en la saliva. Esta muestra es fácil de obtener y proviene, fundamentalmente de las parótidas, si el método de obtención es por masticación (16,18). Además, para evitar la acción de las proteasas de esta secreción se puede

trabajar inmediatamente a temperaturas bajas o realizar la inactivación de las mismas (19). Los intentos de detección de IgA en saliva en vacunas de Córrea no han tenido resultados totalmente satisfactorios, pues en algunos casos los tiempos de toma de las muestras han sido muy espaciados (semanal) (20-22).

La aparición de IgA en saliva la detectamos a los siete días (primer día evaluado) después de administrar por vía oral el candidato vacunal, apreciando aumentos progresivos a los ocho y nueve días, declinando la respuesta a los diez hasta desaparecer a los catorce días (Fig. 4). Esto pudiera explicar la negatividad observada en ocasiones en otros ensayos (22-25).

Conociendo que existen mecanismos de recirculación linfocitaria y un sistema de mucosas común, estas células B IgA+ específicas pueden abandonar las placas de Peyer y ganglios linfáticos regionales, recirculando por la sangre periférica y colonizando la lámina propia y otros sitios efectores. La marcada disminución a los catorce días pudiera estar ocasionada por la menor migración de linfocitos B a la mucosa bucal, con relación a los que se dirigen al intestino, donde se produjo la colonización o porque las células plasmáticas, las cuales arriban a la mucosa bucal, comienzan a dejar de producir IgA, pues los plasmocitos son células terminales (26).

En resumen, el ELISA desarrollado permitió la detección de la IgA anti-LPS en saliva con una alta sensibilidad, especificidad y valores predictivos. La aparición de la IgA siguió una adecuada cinética y fue dosis dependiente. Resultados que pueden ser extrapolados a la evaluación de otras vacunas mucosales.

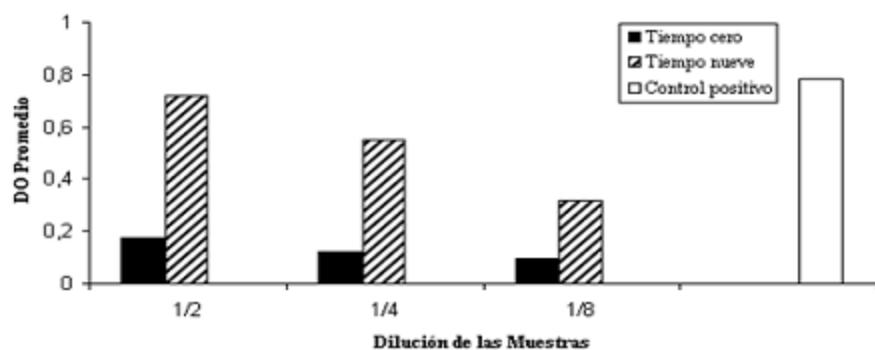
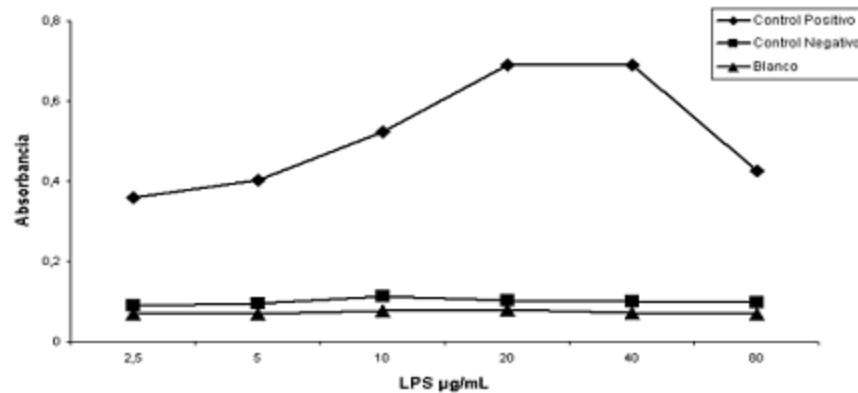




Figura 3
Determinación de los tiempos de incubación óptimos de las muestras y el conjugado

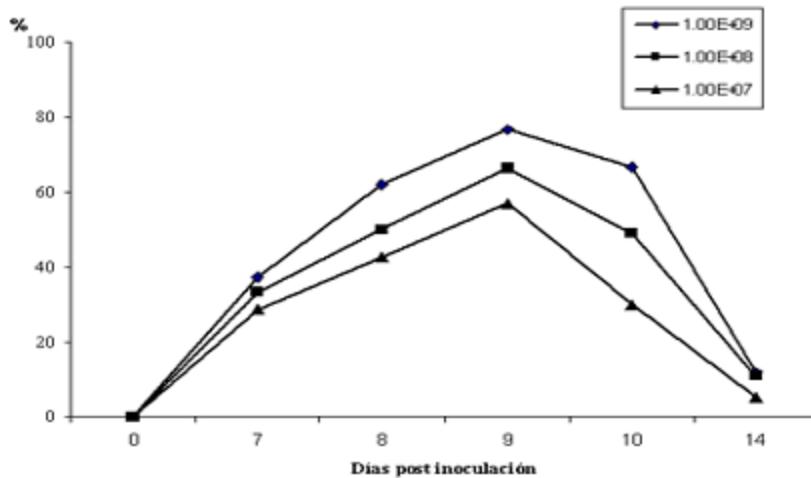


Figura 4
Porcentaje de positividad según seriadamente de obtención de la Saliva

BIBLIOGRAFÍA

1. Giono S, Gutiérrez L, and Hinojosa AM. Manual de procedimientos para el aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* O1: En Publicación Técnica del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica No 10 México D. F 1991.
2. Mims CA, Playfair J, and Roitt IM. Microbiología Médica In Mosby 1995.
3. Instituto Pedro Kouri. Cólera: Incidencia/Cólera. Mortalidad/Estadística vital. Boletín Epidemiológico 1995;5:98.
4. Dunn-Walters D, Hackett M, Boursier L, Ciclitira PJ, Morgan P, Challacombe SJ, and Spencer J. Characteristics of Human IgA and IgM Genes Used by Plasma Cell in the Salivary Gland Resemble Those Used in Duodenum But Not Those Used in the Spleen. *J. Immunol.* 2000;164:1595-1601.
5. Jonson G, Svennerholm AM, and Holmgren J. Expression of virulence factors by classical and El Tor *Vibrio cholerae* in vivo and in vitro. *Microbiology Ecology* 1990;74:221-223.
6. Apter FM, Plichetti P, and Winner LS. Analysis of the Roles of Anti Lipopolysaccharide and Anti-cholera Toxin Immunoglobulin A (IgA) Antibodies in Protection Against *Vibrio*

- cholerae and Cholera Toxin by use of Monoclonal IgA Antibodies in vivo. *Infect. and Immun.* 1993;61:5279-5285.
7. Mackinnon LT, Ginn E, and Seymour GJ. Decreased salivary immunoglobulin A secretion rate after intense interval exercise in elite kayakers. *Eur. J. Appl. Physiol.* 1993;67:180-184.
 8. Winner L, Mack J, and Weltzin R. New model for analysis of mucosal immunity: Intestinal secretion of specific monoclonal immunoglobulin A from hybridoma tumors protects against *Vibrio cholerae* infection. *Infect. and Immun.* 1991;59:977-982.
 9. Finlay B and Siebers A. Mechanisms of mucosal colonization and penetration by bacterial pathogens. En: J. A. Roth, editor. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 2nd ed, 1995:33-43.
 10. Mortimer PP and Parry JV. Non-Invasive Virological Diagnosis: Are Saliva and Urine specimens adequate substitutes for Blood?. *Reviews Medical Virology* 1991;1:73-78.
 11. Bloom PD and Bocdeker EC. Mucosal Immune Responses to Intestinal Bacterial Pathogens. *Seminars in Gastrointestinal Disease* 1996;7:151-166.
 12. Benitez J, Silva A, Rodríguez BL, Fando R, Campos J, Robert A, et al. Genetic manipulation of *Vibrio cholerae* for vaccine development: Construction of live attenuated El Tor candidate vaccine strains. *Arch. Med. Res.* 1996;27:275-283.
 13. Robert A, Silva A, Benitez J, Rodríguez BL, Fando R, and Campos J. 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;14:1517-1522.
 14. Benitez J, García L, Silva A, García H, Fando R, Cedré B, et al. Preliminary Assessment of the Safety and Immunogenicity of a new CTX-negative, Hemagglutin/Protease-Defective El Tor Candidate Cholera Vaccine Strain. *Infect. and Immun.* 1998;66:539-545.
 15. Cedré B, García L, García H, Fariñas M, Talavera A, and Infante JF. Intestinal colonization of the infant mouse model by attenuated and virulent *Vibrio cholerae* strains. *Arch Med Res.* 1998;29(3),231-234.
 16. Czerkinsky C, Sevennerholm A, Quiding M, Jonsson R, Holmgren J. Antibody- Producing Cells in Peripheral Blood and Salivary Glands after Cholera Vaccination of Humans. *Infect and Immun.* 1991;59:996-1001.
 17. Ochoa R, Martínez JC, Estrada E, García A, Ferriol X, Blanco R, and Sotolongo F. Validación de Inmunoensayos Cualitativos Usados para Evaluar la Inmunogenicidad de Vacunas. *VacciMonitor* 2000;9:17-20.
 18. Dunn-Walters D, Hackett M, Boursier L, Ciclitira PJ, Morgan P, Challacombe SJ, and Spencer J: Characteristics of Human IgA and IgM Genes Used by Plasma Cell in the Salivary Gland Resemble Those Used in Duodenum But Not Those Used in the Spleen. *J. Immunol.* 2000;164:1595-1601.
 19. Black RE, Levine MM, Clements ML, and Holmgren J. Protective efficacy in man of killed whole *Vibrio* oral cholera vaccine with and without the B subunit of Cholera Toxin. *Infect. and Immun.* 1987;77:1116-1129.
 20. Levine MM. Immunity to cholera as evaluated in volunteers. Eds. *Cholera and related diarrheas*, Basel. S. Karger 1980:195.
 21. Jertborn M, Svennerholm AM, and Holmgren J. Gut Mucosal, and Serum Antitoxic and Antibacterial Antibody Responses in Swedes after Oral Immunization whit B Subunit- Whole Cell Cholera Vaccine. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immun.* 1984;75:38-43.

22. Jertborn M, Svennerholm AM, and Holmgren J. Saliva, Breast Milk, and Serum Antibody Responses as Indirect Measures of Intestinal Immunity after Oral Cholera Vaccination or Natural Disease. *J. Clin. Microb.* 1986;24:203-209.
23. Czerkinsky C, Quiding M, Eriksson K, and Holmgren J. Induction of Specific Immunity at Mucosal Surfaces: Prospects for vaccine development. *Advances in Mucosal Immunology*, Edited by J. Mestecky et al., Plenum Press, New. York: Plenum Press; 1995:1409-1415.
24. Viret JF, Favre D, Wegmuller B, Herzog J, Que JU, Cryz SJ, and Lang AB: Mucosal and Systemic Immune Response in Humanas after Primary and Booster Immunizations with Orally Administered Invasive and Noninvasive Live Attenuated Bacteria: *Infect. and Immun.* 1999;3680-3685.
25. Bouvet J-P and Fischetti VA. Diversity of Antibody-Mediated Immunity at the Mucosal Barrier. *Infect. and Immun.* 1999;67:2687-91.
26. Ogra PL, Mestecky J, and Lamm ME. *Handbook of Mucosal Immunology*. Academic Press Inc; 1994.