

Etat actuel des recherches sur le vaccin anticholérique.

J.-M. Fournier

Unité du choléra et des vibrions, Centre national de référence des vibrions et du choléra, Institut Pasteur, Paris

Manuscrit n° PF 10. Journée en hommage au Professeur A. DODIN. Accepté le 19 octobre 1998.

Summary: Present State of Research on Cholera Vaccine.

Key-words: Cholera - Vaccine - Immunity - Prevention

Cholera remains today a major health problem in most developing countries. The long-term control of cholera depends on the improvement of hygiene but this is a distant goal for many countries. The availability of an effective cholera vaccine is thus important for the prevention of cholera in such countries. More than a century after the first attempt to vaccinate against cholera by FERRAN in Spain, there is still no truly effective cholera vaccine. A bacterial fraction vaccine, referred to as CH1 + 2 was prepared by Professor A. DODIN. A field trial of this vaccine was carried out in Zaire in 1983. Significant protection was observed but this vaccine was not evaluated in additional trials. Two other oral cholera vaccines, developed in Sweden and in the USA, were widely experimented on human beings: a combination of cholera toxin B-subunit and inactivated bacterial cells, and a live attenuated vaccine containing the genetically manipulated Vibrio cholerae O1 strain CVD 103-HgR. Despite their efficiency as evaluated in field trials (inactivated vaccine) or on volunteers (live vaccine), these vaccines have drawbacks that may limit their usefulness as practical vaccines. Protection induced by the inactivated vaccine was transient in young children, lasting only approximately for six months. One of the safety concerns associated with live vaccines is a possible reversion to virulence. Efforts should be continued to find a better cholera vaccine. A new vaccine development program based upon the hypothesis that immunoglobulin G directed to the O-specific polysaccharide of Vibrio cholerae O1 could confer protective immunity to cholera. This program may lead to the development of a cholera conjugate vaccine to elicit protection in infants.

Résumé :

Mots-clés : Choléra - Vaccin - Immunité - Prévention

Le choléra reste encore aujourd'hui un problème important de santé publique dans la plupart des pays en voie de développement. L'éradication du choléra nécessite une amélioration de l'hygiène mais il s'agit d'un objectif difficile à atteindre pour ces pays. Il serait donc intéressant de disposer d'un vaccin anticholérique qui permettrait de prévenir les épidémies de choléra dans ces pays. Plus d'un siècle après le premier essai de vaccination contre le choléra par FERRAN, en Espagne, il n'existe toujours pas de vaccin anticholérique vraiment efficace. Le Professeur A. DODIN avait préparé un vaccin appelé fraction CH1 +2. Un essai clinique de ce vaccin a été réalisé au Zaire en 1983. Une protection significative a été obtenue mais aucun autre essai de ce vaccin n'a été pratiqué. Deux autres vaccins oraux, développés en Suède et aux Etats-Unis, ont été expérimentés à grande échelle : un vaccin inactivé constitué de la sous-unité B de la toxine cholérique et de bactéries entières tuées et un vaccin vivant contenant la souche atténuée génétiquement Vibrio cholerae CVD 103-HgR. Malgré leur efficacité évaluée sur le terrain (vaccin inactivé) ou sur des volontaires (vaccin vivant), ces vaccins présentent des inconvénients. La protection induite chez les enfants par le vaccin inactivé est transitoire, ne durant qu'environ six mois. Le principal risque représenté par le vaccin vivant atténué est celui d'une réversion vers la virulence. Il est donc nécessaire de poursuivre les recherches sur la vaccination anticholérique. Un nouveau programme de développement de vaccin anticholérique est fondé sur l'hypothèse que les immunoglobulines G dirigées contre le polysaccharide spécifique O de Vibrio cholerae O1 protégeraient contre le choléra. Ce programme pourrait conduire au développement d'un vaccin conjugué protecteur chez l'enfant.

Je vais vous entretenir d'un sujet qui a préoccupé Monsieur DODIN pendant plus de dix années de sa carrière, sujet qui lui a procuré des espoirs mais aussi des déceptions. Il s'agit de la vaccination anticholérique.

Les orateurs précédents ont insisté sur la gravité et l'importance actuelle du choléra ainsi que sur les problèmes posés par sa prévention. L'expérience des pays développés a clairement montré que seule l'élévation du niveau d'hygiène, consistant à traiter les eaux de consommation, à assainir les effluents et à développer l'éducation sanitaire, permet d'éradiquer le

choléra de façon définitive. Mais il est clair que, dans les pays actuellement atteints par le choléra, cette élévation du niveau d'hygiène demandera plusieurs années, voire plusieurs décennies. Dans ces conditions, il est permis de penser que seule une vaccination permettrait d'éradiquer le choléra dans ces pays.

L'histoire de la vaccination contre le choléra a pourtant très bien commencé. Dès 1884, alors que le vibron cholérique avait été découvert en 1883-1884, un premier vaccin anticholérique était mis au point par un médecin espagnol, Jaime FERRAN. Ce vaccin, selon son auteur bien sûr, a donné de

très bons résultats. Il a cependant été violemment critiqué par les pasteuriens de l'époque, et d'autant plus critiqué que, quelques années après, un élève de METCHNIKOFF, Waldemar HAFFKINE, a lui aussi mis au point un vaccin anticholérique. Waldemar HAFFKINE a essayé son vaccin qui, d'ailleurs, n'était pas très différent de celui de FERRAN, dès 1893 - donc moins de dix ans après la découverte de l'agent du choléra. Il l'a essayé de façon extensive en Inde. Là encore, selon HAFFKINE, les résultats étaient très bons. Mais, selon d'autres auteurs, ils l'étaient moins et finalement, de façon un peu surprenante, un siècle après ces tentatives, on ne dispose toujours pas de vaccin anticholérique totalement satisfaisant.

En un siècle, de nombreux travaux ont cependant été réalisés sur la vaccination anticholérique et je vais passer rapidement en revue les vaccins qui ont été utilisés ou expérimentés. Ils peuvent être classés en trois catégories: vaccins inactivés utilisés par voie sous-cutanée, vaccins inactivés utilisés par voie orale et vaccins atténués vivants utilisés aussi par voie orale.

Le vaccin inactivé administré par voie sous-cutanée est, en fait, le vaccin descendant de ceux de FERRAN et de HAFFKINE. Il contient des bactéries entières inactivées par la chaleur, le phénol ou le formol. Ce vaccin induit des anticorps vibriocides et confère une protection d'environ 50% pendant une durée de 3 à 6 mois. Encore commercialisé en France jusqu'à l'an dernier, il a été retiré du marché au cours de l'année 1997, si bien qu'actuellement, en France, il n'y a pas de vaccin anticholérique disponible. L'usage de ce vaccin a été largement déconseillé par l'OMS du fait de son pouvoir protecteur insuffisant et de trop courte durée. Lorsque la toxine cholérique, qui est le principal facteur de virulence du vibrion cholérique, a été découverte, des auteurs ont immédiatement essayé de mettre au point un vaccin en utilisant cette toxine détoxifiée. Pour ces auteurs, l'induction d'anticorps dirigés contre la toxine cholérique devait protéger contre le choléra, comme cela avait été le cas pour la vaccination antitétanique. Les premiers essais qui ont été réalisés par voie sous-cutanée dès les années 70 ont cependant montré qu'il n'y avait pas de protection. Cela n'a pas découragé d'autres auteurs de continuer à utiliser la toxine cholérique dans un vaccin anticholérique. Toujours dans les années 70, des extraits de surface du vibrion cholérique ont été utilisés en Asie et ont donné une protection qui n'était pas très supérieure à celle conférée par le vaccin classique puisqu'elle n'était que de 43 % sur une période de 3 ans.

Devant l'échec relatif des vaccins utilisés par voie sous-cutanée et comme le choléra est une maladie à porte d'entrée digestive, plusieurs auteurs ont pensé, et pensent encore d'ailleurs, que la protection serait mieux induite par voie orale. Le premier vaccin utilisé pour provoquer une immunité locale contenait la toxine détoxifiée mais, là encore, pas plus que par voie sous-cutanée, cette toxine n'entraîne de protection par voie orale. Une mention particulière doit être faite aujourd'hui du vaccin oral mis au point par Monsieur DODIN, qu'il avait appelé fraction CH1 +2. Cette fraction vaccinnante était constituée d'un extrait de surface du vibrion cholérique, purifiée par filtration sur gel. Ce vaccin, sur lequel André DODIN a travaillé pendant plus de dix ans, a été étudié sur plus de 36 000 personnes au Zaïre en 1983. Il a induit une protection de 80 % au cours d'une épidémie survenue quelques mois après la vaccination. Malgré ce résultat très encourageant, aucun autre essai de ce vaccin n'a été réalisé, si bien qu'aujourd'hui il est absolument impossible de savoir s'il était efficace ou non.

Un autre vaccin oral, constitué de bactéries entières, a conféré une protection de 52 % pendant trois ans. Il a en fait été utilisé comme témoin dans le cadre de l'étude d'un autre vaccin oral, mis au point en Suède par J. HOLMGREN et coll. Ce vaccin contient des bactéries entières tuées par la chaleur ou par le formol, auxquelles a été ajoutée la sous-unité B de la toxine cholérique. Les premiers résultats de l'expérimentation de ce vaccin, réalisée au Bangladesh entre 1985 et 1989 sur plus de 60 000 personnes, étaient très intéressants puisque la protection était de 85 % dans les 6 premiers mois. Malheureusement au bout de 3 ans, la protection retombait à un taux de 51 %, de telle sorte que ce vaccin ne s'avérait pratiquement pas beaucoup plus efficace que les bactéries entières et qu'en fait l'addition de la sous-unité B de la toxine cholérique n'augmentait le taux de protection que pendant les six premiers mois après la vaccination.

Mettant à profit les progrès de la génétique bactérienne et de la biologie moléculaire, des auteurs américains ont mis au point des vaccins oraux vivants, visant à stimuler l'immunité locale en se multipliant dans le tube digestif. Le premier vaccin utilisé a été une souche mise au point par R.A. FINKELSTEIN et coll. par mutation à la nitrosoguanidine. Cette souche n'était pas suffisamment atténuée et provoquait des diarrhées chez les sujets vaccinés. Une seconde souche, la souche CVD 103HgR, a été obtenue par délétion des gènes codant pour les facteurs de virulence du vibrion cholérique. Cette souche a été abondamment étudiée par M. LEVINE et coll. à Baltimore aux Etats-Unis. Elle procure une très bonne protection chez des volontaires éprouvés avec une souche virulente. Un essai clinique à grande échelle de ce vaccin est en cours en Indonésie.

L'utilisation de vaccins oraux pose cependant plusieurs problèmes. D'une part, le vaccin oral inactivé est moins efficace chez les jeunes enfants qui, dans les pays atteints par le choléra, sont particulièrement touchés par cette maladie. D'autre part, les vaccins oraux atténués présentent un risque de retour à la virulence et le choléra n'est pas une maladie suffisamment grave pour justifier l'emploi d'un vaccin potentiellement dangereux. Par ailleurs, ces vaccins vivants sont moins efficaces chez les sujets malnutris, ainsi que chez les sujets ayant déjà des anticorps vibriocides. Or, de tels sujets se trouvent justement dans les pays exposés au choléra.

Il n'existe donc pas encore de vaccin anticholérique, efficace et sans danger et il est nécessaire de poursuivre des recherches sur la vaccination anticholérique.

De façon assez paradoxale, les auteurs qui ont beaucoup travaillé sur la mise au point des différents vaccins contre le choléra n'ont jamais étudié de façon approfondie l'immunité anticholérique. En effet, ces auteurs n'ont pas vraiment cherché à répondre clairement à la question : quels anticorps protègent contre le choléra ?

Pour mettre au point un vaccin anticholérique il est en effet indispensable de répondre à trois questions :

- quelle est la spécificité des anticorps protecteurs ?
- quelle est leur classe ?
- quelle est leur origine ?

Pour ce qui concerne la spécificité des anticorps protecteurs, il est important de savoir si ces anticorps sont dirigés contre la toxine cholérique ou bien s'ils sont dirigés contre le corps bactérien ? L'absence de protection croisée entre *Vibrio cholerae* O1 et *Vibrio cholerae* O139, qui a été constatée en Inde et au Bangladesh en 1992, démontre clairement que les anti-

corps antitoxine cholérique ne sont pas protecteurs. En effet, ces souches produisent la même toxine cholérique. Donc, s'il n'y a pas de protection croisée, c'est bien que les anticorps antitoxine cholérique ne protègent pas. De même, dans un modèle d'infection expérimentale de souris nouveau-nés, il a été montré que des anticorps monoclonaux dirigés contre la toxine cholérique n'étaient pas protecteurs. Si les anticorps protecteurs ne sont pas dirigés contre la toxine cholérique, il est possible qu'ils soient dirigés contre la bactérie entière.

De fait, il existe deux arguments en faveur d'un rôle protecteur des anticorps antibactériens :

- Tous les vaccins efficaces chez l'homme entraînent des taux élevés d'anticorps vibriocides. Ces anticorps lysent les vibrions en présence de complément et exercent cette activité lytique en se fixant à la surface de la bactérie.

- Des anticorps monoclonaux dirigés contre le lipopolysaccharide de *Vibrio cholerae* O1 sont protecteurs chez le souriceau nouveau-né. Ce résultat, publié aux Etats-Unis en 1993, a été confirmé dans l'unité du choléra et des vibrions en 1995.

Les anticorps protecteurs sont vraisemblablement dirigés contre l'antigène O1 de *Vibrio cholerae* et ce sont par conséquent des anticorps antibactériens.

La deuxième question à poser est celle de l'origine, locale ou générale, de ces anticorps. De nombreux auteurs pensent que les anticorps protecteurs contre le choléra sont des anticorps d'origine locale, c'est-à-dire des immunoglobulines A sécrétées, puisque le choléra est une maladie à porte d'entrée locale.

Quelle que soit la réponse à cette question - je n'ai pas de réponse et, en fait, je pense que personne ne l'a, parce que; malgré tout ce qui a été écrit sur le rôle protecteur des IgA sécrétoires contre le choléra, rien n'a jamais été prouvé expérimentalement - il est clair que l'immunité locale à IgA sécrétoires reste aujourd'hui très difficile à stimuler. En effet, la seule méthode actuellement efficace pour stimuler une immunité locale à IgA sécrétoires consiste en l'utilisation de vaccins vivants qui présentent des risques de réversion vers la virulence.

On peut alors se demander s'il n'existe pas un autre mécanisme immunitaire de protection contre le choléra qui serait d'origine générale. Il s'agirait d'une protection médiée par des immunoglobulines G d'origine sérique.

Il existe un argument très fort en faveur de cette hypothèse. Il s'agit d'une corrélation observée entre le titre des anticorps vibriocides sériques et la protection contre le choléra. Cette corrélation a été observée lors de plusieurs études épidémiologiques réalisées en Asie, aussi bien au cours qu'en dehors d'épidémies, chez des sujets vaccinés ou chez des sujets non vaccinés. Mais les auteurs partisans d'une immunité strictement locale ont toujours écrit que ces anticorps sériques ne peuvent pas être responsables de la protection, qu'ils ne sont que des marqueurs et non les effecteurs de la protection. Selon ces auteurs, les effecteurs seraient des IgA sécrétoires mais, en fait, aucune corrélation n'a jamais été démontrée entre le taux d'IgA sécrétoires et la protection contre le choléra.

Il faut donc poser la question suivante : des anticorps d'origine sérique peuvent-ils être impliqués dans la protection contre le choléra ?

Une première observation en faveur de cette hypothèse est qu'il existe bien un passage d'anticorps de classe IgG du sérum vers la lumière intestinale par diffusion passive. Des obser-

vations faites chez l'homme au cours d'expérimentations cliniques ont montré l'existence d'une diffusion passive d'IgG du sérum vers la lumière intestinale. Des observations similaires ont été faites chez la souris dans notre laboratoire. F. BOUGODOGO et coll. ont montré que des anticorps monoclonaux anti-*Vibrio cholerae* O1 injectés par voie intraveineuse étaient retrouvés dans la lumière intestinale.

Deux autres arguments sont aussi en faveur de cette hypothèse. Il s'agit de l'observation de la diminution du portage rhinopharyngé d'*Haemophilus influenzae* b après vaccination par un conjugué. Le vaccin contre *Haemophilus influenzae* b est constitué d'un polysaccharide capsulaire couplé à une protéine porteuse pour rendre ce polysaccharide immunogène. Ce vaccin s'est révélé très efficace contre les méningites à *Haemophilus influenzae* b - ce que les auteurs du vaccin, évidemment, attendaient. Mais ce que ces derniers n'avaient pas prévu, c'est que ce vaccin diminuerait le portage rhinopharyngé d'*Haemophilus influenzae* b. La seule hypothèse proposée actuellement pour expliquer l'effet du vaccin sur le portage rhinopharyngé d'*Haemophilus influenzae* b chez les sujets vaccinés est le passage d'anticorps sériques de classe IgG vers la muqueuse rhinopharyngée. Cette observation et d'autres observations sur les mécanismes d'action de vaccins bactériens ou viraux qui sont actuellement mis sur le marché ont amené un auteur américain, J.-B. ROBBINS, lequel avait d'ailleurs mis au point le vaccin contre *Haemophilus influenzae* b, à proposer que la lutte contre des micro-organismes à porte d'entrée intestinale pouvait être effectuée par des anticorps de classe IgG sériques pénétrant par diffusion passive au niveau de la muqueuse intestinale. Ces anticorps, préexistants à l'infection, permettraient d'éliminer le germe dès le début de l'infection, c'est-à-dire au moment où il y a très peu d'agents et où les anticorps peuvent être très efficaces.

Nous avons aussi montré que des anticorps monoclonaux de classe IgG spécifiques de l'antigène O1 de *Vibrio cholerae* O1 sont à la fois vibriocides et agglutinants, immobilisent les vibrions *in vitro* et sont protecteurs dans un modèle d'infection du souriceau nouveau-né. Le fait que ces anticorps possèdent plusieurs fonctions permet de comprendre qu'à partir du moment où ils passent dans la lumière intestinale, ils vont pouvoir combattre efficacement le vibron cholérique en l'agglutinant, en l'immobilisant et en facilitant son élimination par les mouvements mucociliaires.

Ces constatations et les résultats que je viens de décrire nous amènent maintenant à proposer une nouvelle approche de la vaccination anticholérique. Elle consiste en la mise au point d'un conjugué constitué de l'antigène polysaccharidique O1 de *Vibrio cholerae* O1 couplé par une liaison covalente à une protéine porteuse et visant à stimuler une immunité générale à IgG. Ce vaccin serait réalisé sur le modèle du vaccin polysaccharidique contre les méningites à *Haemophilus influenzae* b. Il serait destiné en priorité à la vaccination des enfants et le succès du vaccin à *Haemophilus influenzae* b nous encourage dans cette voie. Enfin, ce vaccin étant injectable, il serait parfaitement intégrable dans le programme élargi des vaccinations de l'OMS.

Une bibliographie complète sur la vaccination anticholérique se trouve dans la référence suivante :

FOURNIER JM - Actualité de la vaccination anticholérique. *La Lettre de l'Infectiologie*, 1997, XII, 24-29. (voir page suivante)

Bibliographie

1. AA - Le choléra en 1994. Partie I. *Relevé épidémiologique hebdomadaire de l'OMS*, 1995, **70**, 201-208.
2. GOMA EPIDEMIOLOGY GROUP - Public health impact of Rwandan refugee crisis: what happened in Goma, Zaire, in July, 1994? *Lancet*, 1995, **345**, 339-344.
3. AA - *Guide pour la lutte contre le choléra*. Genève: OMS, 1993.
4. SACK DA - Underestimating the cholera problem and the potential for vaccination - a case for accelerating the use of cholera vaccines. *Bull Inst Pasteur*, 1995, **93**, 229-235.
5. LEVINE ML & PIERCE NF - Immunity and vaccine development. In: BARUA D & GREENOUGH III WB, eds. *Cholera*. New York, Plenum Medical Book Company, 1992, 285-327.
6. MOSLEY WH, AZIZ KMA, MIZANUR RAHMAN ASM, CHOWDHURY AKMA, AHMED A & FAHIMUDDIN M - Field trials of monovalent Ogawa and Inaba cholera vaccines in rural Bangladesh: three years of observation. *Bull OMS*, 1973, **49**, 381-387.
7. DODIN A, MASENGO B & LOUCQ C - Résultats contrôlés du vaccin anticholérique oral de l'Institut Pasteur au cours de l'épidémie du Shaba-Zaire en 1983. *C R Acad Sc Paris*, 1984, **299** Série III, 205-207.
8. CLEMENS JD, SACK DA, HARRIS JR, VAN LOON F, CHAKRABORTY JI *et al.* - Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh: Results from three-year follow-up. *Lancet*, 1990, **335**, 270-273.
9. HOLMGREN J & SVENNERHOLM AM - New vaccines against bacterial enteric infections. *Scand J Infect Dis*, 1990, **70** (suppl), 149-156.
10. HOLMGREN J, OSEK J & SVENNERHOLM AM - Protective oral cholera vaccine based on a combination of cholera toxin B subunit and inactivated cholera vibrios. In: WACHSMUTH IK, BLAKE PA & OLSVIK Ø, eds. - *Vibrio cholerae and cholera: Molecular to global perspectives*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994, 415-424.
11. SANCHEZ JL, TROFA AF, TAYLOR DN, KUSCHNER RA, DEFRAITES RF *et al.* - Safety and immunogenicity of the oral, whole cell/recombinant B-subunit cholera vaccine in North American volunteers. *J Infect Dis*, 1993, **167**, 1446-1449.
12. AA - Voyages internationaux et santé, vaccinations exigées et conseils d'hygiène, rectificatif à l'édition 1995. *Relevé épidémiologique hebdomadaire de l'OMS*, 1995, **70**, 103-104.
13. LEVINE MM & KAPER JB. Live oral cholera vaccine : from principle to product. *Bull Inst Pasteur*, 1995, **93**, 243-253.
14. LEVINE MM, KAPER JB, HERRINGTON D, KETLEY J, LOSONSKY G *et al.* - Safety, immunogenicity, and efficacy of recombinant live oral cholera vaccines, CVD 103 and CVD 103-HgR. *Lancet*, 1988, **2**, 467-470.
15. MEKALANOS JJ, WALDOR MK, GARDEL CL, COSTER TS, KENNER J *et al.* - Live cholera vaccines : perspectives on their construction and safety. *Bull Inst Pasteur*, 1995, **93**, 255-262.
16. KENNER JR, COSTER TS, TAYLOR DN, TROFA AF, BARRERAORO M *et al.* - Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J Infect Dis*, 1995, **172**, 1126-1129.
17. WALDOR MK & MEKALANOS JJ - Emergence of a new cholera pandemic: Molecular analysis of virulence determinants in *Vibrio cholerae* O139 and development of a live vaccine prototype. *J Infect Dis*, 1994, **170**, 278-283.
18. BERCHE P, POYART C, ABACHIN E, LELIEVRE H, VANDEPITTE J *et al.* - The novel epidemic strain O139 is closely related to the pandemic strain O1 of *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis*, 1994, **170**, 701-704.
19. STROEHER UH, JEDANI KE, DREDGE BK, MORONA R, BROWN MH *et al.* - Genetic rearrangements in the rfb regions of *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**, 10374-10378.
20. KAPER JB, MICHALSKI J, KETLEY JM & LEVINE MM. Potential for reacquisition of cholera enterotoxin genes by attenuated *Vibrio cholerae* vaccine strain CVD 103-HgR. *Infect Immun*, 1994, **62**, 1480-1483.
21. BLANCHE P, SICARD D, GARCIA JS, PAUL G & FOURNIER JM - Septicemia due to non-O:1 *Vibrio cholerae* in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis*, 1994, **19**, 813.
22. SANCHEZ JL, HAYASHI KE, KRUGER HF, MEZA R, ENGLISH CK *et al.* - Immunological response to *Vibrio cholerae* O1 infection and an oral cholera vaccine among Peruvians. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995, **89**, 542-545.
23. ARYA SC - Utility of rapid monoclonal antibody-based coagglutination test for direct detection of *Vibrio cholerae* O1 and/or O139 in stool samples. *J Clin Microbiol*, 1995, **33**, 509.
24. SZU SC, GUPTA R & ROBBINS JB -Induction of serum vibriocidal antibodies by O-specific polysaccharide-protein conjugate vaccines for prevention of cholera. In: WACHSMUTH IK, BLAKE PA & OLSVIK Ø, eds. - *Vibrio cholerae and cholera: Molecular to global perspectives*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994, 381-394.
25. GUPTA RK, SZU SC, FINKELSTEIN RA & ROBBINS JB - Synthesis, characterization, and some immunological properties of conjugates composed of the detoxified lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba bound to cholera toxin. *Infect Immun*, 1992, **60**, 3201-3208.
26. SZU SC, GUPTA R, KOVAC P, TAYLOR DN & ROBBINS JB - Development of O-specific polysaccharide-protein conjugates is based upon the protective effect of serum vibriocidal antibodies against cholera. *Bull Inst Pasteur*, 1995, **93**, 269-272.
27. ROBBINS JB, SCHNEERSON R & SZU SC - Perspective: Hypothesis: Serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. *J Infect Dis*, 1995, **171**, 1387-1398.
28. ROBBINS JB, CHU CY & SCHNEERSON R -Hypothesis for vaccine development - Protective immunity to enteric diseases caused by nontyphoidal *Salmonellae* and *Shigellae* may be conferred by serum IgG antibodies to the O-specific polysaccharide of their lipopolysaccharides. *Clin Infect Dis*, 1992, **15**, 346-361.
29. GLASS RI & BLACK RE- The epidemiology of cholera. In: BARUA D & GREENOUGH III WB, eds. - *Cholera*. New York : Plenum Med. Book Co., 1992, 129-154.
30. APTER FM, MICETTI P, WINNER LS, MACK JA, MEKALANOS JJ & NEUTRA MR - Analysis of the roles of antilipopolysaccharide 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 Immun*, 1993, **61**, 5279-5285.
31. MOSLEY WH- The role of immunity in cholera. A review of epidemiological and serological studies. *Texas Rep Biol Med*, 1969, **27**, S227-S241.
32. MOSLEY WH, McCORMACK WM, AHMED A, ALAUDDIN CHOWDHURY AKM & BARUI RK- Report of the 1966-67 cholera vaccine field trial in rural East Pakistan. 2. Results of the serological surveys in the study population - The relationship of case rate to antibody titre and an estimate of the inapparent infection rate with *Vibrio cholerae*. *Bull OMS*, 1969, **40**, 187-97.
33. MOSLEY WH, WOODWARD WE, AZIZ KMA, MIZANUR RAHMAN ASM, ALAUDDIN CHOWDHURY AKM *et al.* - The 1968-1969 cholera-vaccine field trial in rural East Pakistan. Effectiveness of monovalent Ogawa and Inaba vaccines and a purified Inaba antigen, with comparative results of serological and animal protection tests. *J Infect Dis*, 1970, **121**, S1-S9.
34. BOUGOUDOOGO F, VELY F, NATO F, BOUTONNIER A, GOUNON P *et al.* - Protective activities of serum immunoglobulin G on the mucosal surface to *Vibrio cholerae* O1. *Bull Inst Pasteur*, 1995, **93**, 273-283.
35. PRIGENT-DELECOURT L, COFFIN B, COLOMBEL JF, DEHENNIN JP, VAERMAN JP & RAMBAUD JC - Secretion of immunoglobulins and plasma proteins from the colonic mucosa: an *in vivo* study in man. *Clin Exp Immunol*, 1995, **99**, 221-225.
36. WERNET P, BREU H, KNOP J & ROWLEY D- Antibacterial action of specific IgA and transport of IgM, IgA, and IgG from serum into the small intestine. *J Infect Dis*, 1971, **124**, 223-226.
37. BOUVET JP, BELEC L, PIRES R & PILLOT J - Immunoglobulin G antibodies in human vaginal secretions after parenteral vaccination. *Infect Immun*, 1994, **62**, 3957-3961.
38. PIER GB, MELULENI G & GOLDBERG JB - Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from the murine gastrointestinal tract is effectively mediated by O-antigen-specific circulating antibodies. *Infect Immun*, 1995, **63**, 2818-2825.
39. TAKALA AK, ESKOLA J, LEINONEN M, KAYHTY H, NISSINEN A *et al.* - Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type-b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis*, 1991, **164**, 982-986.
40. BARBOUR ML, MAYONWHITE RT, COLES C, CROOK DWM & MOXON ER - The impact of conjugate vaccine on carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis*, 1995, **171**, 93-98.
41. SCHNEERSON R, BARRERA O, SUTTON A & ROBBINS JB - Preparation, characterization and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugate. *J Exp Med*, 1980, **152**, 361-76.