

Vaccins et vaccination anticholériques.

B. Ivanoff (1) & C. L. Chagnat (2)

(1) International Vaccine Institute, PO Box 14, Kwanak, Séoul, Corée.

(2) OMS, 20 rue Appia, 1211 Genève 27, Suisse.

Journée en hommage au MG LAPEYSSONNIE, Le Pharo, Marseille, 20 mars 2002

Summary: Anticholeric vaccines and vaccination.

Cholera is still an important diarrhoeal disease in developing countries. The impact of cholera outbreak is tremendous for a country at human and economic level. WHO estimates that diarrhoeal diseases cause about 2.8 million deaths per year in developing countries. Officially, cholera is causing around 120.000 deaths per year. The poorest population (from slums and refugee camps) are the most vulnerable target for cholera infection. Development of simple cheap and effective vaccine is highly recommended.

This article aims at giving an update on the currently available and future vaccines for the prevention of diarrhoea due to *Vibrio cholerae* O1 and O139.

Résumé :

Le choléra est encore aujourd'hui une maladie diarrhéique importante dans les pays en voie de développement. Souvent controversée elle entraîne des épidémies qui sont catastrophiques pour un pays sur le plan humain et économique. L'OMS estime en effet à environ 2,8 millions le nombre de morts, dues aux maladies diarrhéiques, qui sont à déplorer chaque année dans les pays en voie de développement. Sur ce chiffre, il est attribué officiellement au choléra environ 120.000 morts. Les populations les plus démunies (bidonvilles, camps de réfugiés) paient un lourd tribut à cette maladie. La mise au point d'un vaccin simple, peu coûteux et efficace semble être plus que jamais d'actualité.

Le but de cet article est de faire le point sur les vaccins actuels et futurs destinés à la prévention des diarrhées dues à *Vibrio cholerae* O1 et O139.

cholera
attenuated vaccine
inactivated vaccine
sub-unit vaccine
oral route
serogroup O1
serogroup O139

choléra
vaccin atténué
vaccin inactivé
sous unité
voie orale
séro groupe O1
séro groupe O139

Introduction

Le concept de prévention du choléra par la vaccination, dans les pays en voie de développement, n'est pas encore admis par tous et reste encore aujourd'hui un sujet de controverse. L'existence même de la maladie est bien souvent cachée par les responsables politiques des pays où elle sévit pour des raisons économiques évidentes. Un pays déclarant officiellement des cas de choléra voit, en effet, immédiatement chuter son activité touristique et commerciale s'il exporte des fruits de mer ou des produits maraîchers.

Les recommandations habituelles basées sur l'hygiène personnelle et l'amélioration des canalisations d'eau et d'égouts sont efficaces si elles sont appliquées convenablement. Malheureusement, pour des raisons essentiellement économiques, la réalité est bien différente. L'OMS estime en effet à environ 2,8 millions le nombre de morts qui sont à déplorer chaque année dans les pays en voie de développement. Ces décès sont causés par les infections dues à *V. cholerae*, *S. Typhi*, *E. coli* ETEC, *Shigella* et rotavirus. Sur ce chiffre, on attribue au choléra environ 120 000 morts.

Le traitement des cas de choléra par les sels de réhydratation a montré son efficacité sur les personnes malades capables d'atteindre les centres de traitement assez rapidement. Mais cela n'est pas possible pour l'ensemble d'une population et les malades qui ne peuvent atteindre ces centres, pour différentes raisons, viendront malheureusement grossir les statistiques de mortalité. C'est pour ces populations et celles à risque (camp de réfugiés, bidonvilles...) que le développement de vaccins anticholériques efficaces est important. Nous décrivons dans cet article les vaccins actuellement disponibles et ceux qui sont en cours de développement puis nous concluons par les recommandations de l'OMS sur l'utilisation de ces vaccins.

Les vaccins actuellement disponibles

L'ancien vaccin constitué de bactéries inactivées administrées par voie parentérale n'est plus recommandé de nos jours par l'OMS. Il n'entraînait qu'une protection d'environ 50 % pendant 3-4 mois. Depuis, des progrès importants ont

été réalisés et de nouveaux vaccins sont actuellement considérés comme potentiellement utilisables en santé publique.

Jusqu'en 1992, le sérotype O1 de *Vibrio cholerae* était le seul à pouvoir provoquer des épidémies. À la fin de 1992, un autre sérotype, le O139, a fait son apparition en Inde et au Bangladesh (7, 9, 13). Les vaccins actuellement disponibles ne concernent que le sérotype O1; il n'existe pas encore, sur le marché, de vaccins destinés à prévenir les infections dues au sérotype O139. Les vaccins anticholériques disponibles actuellement sont tous donnés par voie buccale. Deux sont actuellement disponibles sur le marché (en Suède et en Suisse) et ont reçu leur autorisation de mise sur le marché dans plusieurs pays. Il s'agit d'un vaccin inactivé et d'un vaccin vivant atténué.

Vaccin oral inactivé

Ce vaccin est constitué de souches de *V. cholerae* classique et El Tor, Inaba et Ogawa, inactivées par la chaleur ou le formol, auxquelles on a additionné 1 mg de sous-unités B obtenues par recombinaison génétique. Le but de ce vaccin est d'entraîner une réponse en anticorps, dirigée à la fois contre la sous-unité B de la toxine et contre les antigènes somatiques (essentiellement antigène O du LPS). Les anticorps antitoxine sont dirigés contre la sous-unité B et empêchent la fixation de la toxine sur le GM1 ganglioside. Le vaccin est administré sous un volume de 120 ml chez l'adulte et moitié moins chez le jeune enfant, avec du bicarbonate pour protéger la sous-unité B de l'acidité gastrique.

Ce vaccin, conçu dans les laboratoires du Dr Jan HOLMGREN à Göteborg, est produit par la société "SBL Vaccine" (Swedish Bacteriological Laboratory, Active Biotech) de Stockholm sous l'appellation Dukoral®; il est administré par voie buccale en deux doses à huit jours d'intervalle. Ce vaccin, évalué en zone d'endémicité cholérique au Bangladesh, a entraîné une protection de 86 % pendant 6 mois chez tous les sujets vaccinés. Deux ans après la vaccination, les personnes âgées de plus de 5 ans étaient encore protégées à 62 %. La protection était encore de 50% trois ans après la vaccination. Cependant, les enfants de moins de 5 ans voyaient leur protection décroître régulièrement 6 mois après la vaccination. Ce vaccin est efficace contre le biotype classique et le biotype El tor (4, 17). Son efficacité apparaît 7 jours après la deuxième dose. Ce vaccin a obtenu sa licence d'utilisation en Suède, Norvège, Pérou, Argentine, Guatemala, Salvador, Honduras et au Nicaragua. En raison d'une parenté antigénique entre la sous-unité B et l'entérotoxine thermolabile (LT) d'*E. coli* ETEC, ce vaccin a entraîné une protection de 67 %, contre les diarrhées à *E. coli* ETEC, pendant les trois premiers mois qui ont suivi l'administration de 2 ou de 3 doses. Il est intéressant de noter que la protection obtenue était semblable pour les diarrhées dues à des souches d'*E. coli* produisant uniquement de l'entérotoxine LT et pour celles produisant *in vitro* à la fois LT et ST (toxine thermostable). Cela laisse donc supposer qu'*in vivo*, chez des patients infectés avec des souches d'ETEC LT-ST, c'est la toxine LT qui joue le rôle le plus important dans le pouvoir pathogène.

Vaccin oral atténué

Le deuxième vaccin est un vaccin vivant conçu dans les laboratoires de Mike LEVINE à Baltimore (États-Unis) et produit par la société "SSVI" (Swiss Serum and Vaccine Institute) de Berne (Suisse) sous l'appellation Orochol®. Il est donné par voie buccale en une seule dose. Son efficacité apparaît 7 jours après l'administration de la dose unique vaccinante. Préparé à partir d'une souche dérivée de la souche pathogène classique

Inaba 569B ne produisant pas de toxine Shiga-like, il a été donné à des volontaires nord-américains à la dose de 10⁸ bactéries, et a entraîné de bonnes réponses en anticorps vibriocides et antitoxine (1, 15, 21). Afin de pouvoir suivre son éventuelle dissémination dans l'environnement, des gènes codant la résistance au mercure (Hg), ont été insérés au niveau du locus de l'hémolysine. Ainsi la souche vaccinale devient capable de pousser, sur un milieu contenant du mercure (sous forme de sel HgCl₂), alors que la souche sauvage ne le peut pas. Une dose unique a entraîné une protection significative chez des volontaires nord-américains qui avaient reçu une dose d'épreuve de bactéries pathogènes de biotype classique (95 % de protection) ou El Tor (65 % de protection) de sérotypes Inaba ou Ogawa.

Avant de l'étudier à grande échelle dans les pays en développement, une étude du pouvoir vibriocide chez des volontaires asiatiques a été menée (11). Une différence significative a été trouvée entre le taux de séroconversion de ces volontaires et celui obtenu chez des volontaires américains. Aussi a-t-il été décidé de reprendre cette étude en augmentant d'un log la concentration du vaccin en bactéries. Une autre étude a donc été conduite chez des enfants indonésiens âgés de 5 à 9 ans (20). Aucune réaction secondaire importante n'a été observée. Des doses de 10⁸ n'entraînaient que 5 à 16 % de séroconversion, tandis que des doses de 10⁹ et 10¹¹ produisaient respectivement 75 % et 81 % de séroconversion. C'est la raison pour laquelle une formulation à 10⁹ a été retenue pour les ressortissants des pays en voie de développement. Il est recommandé de ne pas prendre le vaccin Orochol au cours d'infections intestinales ou au cours de traitement antibiotique (laisser 7 jours d'intervalle après le traitement). De même une éventuelle prophylaxie antipaludéenne ne devra commencer qu'une semaine après la prise d'Orochol (16). Ce vaccin a obtenu sa licence d'utilisation en Suisse, en Finlande, en Argentine, au Pérou, aux Philippines, au Canada (Mutacol®) et est en attente de réponse pour les États Unis et d'autres pays d'Europe.

Une étude clinique de phase III a été conduite en Indonésie, avec un suivi de quatre ans, pour déterminer l'efficacité d'une dose unique de ce vaccin oral. Dans un contexte de faible incidence de choléra pendant plus d'un an, le taux de protection obtenu a été très faible (18). D'autres études de protection sont nécessaires avant de se prononcer sur l'efficacité réelle de ce vaccin. En résumé, du fait de son efficacité démontrée chez des volontaires nord-américains, ce vaccin est considéré comme utile chez les voyageurs mais ne peut être recommandé, aujourd'hui, pour une utilisation en santé publique.

Les futurs vaccins

Vaccin oral inactivé produit au Vietnam

Un transfert de technologie du vaccin inactivé suédois contre le sérotype O1 a été effectué entre la Suède et le Vietnam il y a quelques années. Sur les recommandations de l'OMS, la composition de ce vaccin a été légèrement modifiée. Il contient en effet 50 % de biotype El Tor, au lieu de 25 %, ainsi qu'une concentration accrue en MSHA (Mannose Sensitive Haemagglutinin). Il est administré en deux doses à une semaine d'intervalle sous un volume de 1,5 ml car il ne renferme pas de sous-unité B qui nécessite l'addition de tampon entraînant ainsi un volume beaucoup plus important pour le vaccin suédois (120 ml *versus* 1,5 ml). Ce tampon est destiné à diminuer les effets de l'acidité gastrique sur la structure de la sous-unité B. Ce faible volume rend ce vaccin très attractif pour les vaccinations de masse. Deux personnes peuvent ainsi vacciner 800 à 900 personnes par jour. Un essai, conduit entre

1992 et 1993 au Vietnam, a permis de montrer une efficacité protectrice de 66 % après 8 mois de suivi, dans toutes les tranches d'âge (18). Un nouveau vaccin bivalent O1 + O139, produit à l'Institut Pasteur de Nha Trang, est actuellement en évaluation de phase III chez 300000 personnes. Les premiers résultats d'immunogénicité sont encourageants (2). Ces deux vaccins (monovalent O1 et bivalent O1+ O139) ne sont utilisés qu'au Vietnam et n'ont pas de licence d'utilisation à l'extérieur du pays. Un accord vient d'être signé avec la firme Biofarma en Indonésie pour la production de ces vaccins sous conditions de BPF (bonnes pratiques de fabrication), ce qui devrait permettre de les utiliser à l'extérieur du Vietnam.

Vaccin oral atténué

Vaccins contre le sérotype O1

Peru 15

Le biotype El Tor sévissant actuellement en Amérique du Sud, il était logique de vouloir développer un vaccin contre le sérotype O1, à partir de souches El Tor ayant fait la preuve de leur pouvoir pathogène en Amérique latine ou dans d'autres régions. C'est ce qui a été fait par MEKALANOS (5, 11) qui a choisi 3 souches provenant du Pérou (Inaba), du Bangladesh (Ogawa) et du Bahrein (Ogawa).

Les gènes codant des toxines (*ctx A*, *ace*, *zot*) ont subi une délétion, donnant naissance aux 3 souches dénommées Peru 2, Bang 2 et Bah 2. Puis la série n° 3 (Peru 3, etc..) fit son apparition avec la délétion du gène *recA* (gène de recombinaison). La délétion du gène *recA* et l'insertion de la sous-unité B de la toxine cholérique donnèrent naissance à la série 4 (Peru 4 etc.). Les souches "3" ont un promoteur de choc thermique pour le gène *ctx B* et les souches "4" ont un promoteur *ctx* pour *ctxB*. La série Peru 5 etc.. est dérivée des mutants "2" par insertion du gène *ctx B* à l'intérieur du gène de structure *LacZ*.

Peru 5, Bang 5 et Bah 5 ont été données à trois volontaires pour évaluer leur pouvoir de colonisation et leur pouvoir immunogène à une dose de 2×10^8 bactéries. Sur les trois volontaires, deux ont montré une bonne colonisation, et le troisième a présenté des diarrhées. Si l'on augmente la dose à 10^8 , 6 volontaires sur 6 montrent une bonne colonisation, et l'un d'entre eux a des diarrhées. Une étude d'efficacité avec dose d'épreuve (El Tor), menée un mois plus tard, montra que les 6 sujets vaccinés n'ont présenté aucune diarrhée alors que 6 volontaires non vaccinés en ont développé. Ceci démontre qu'une souche El Tor privée de ses facteurs de toxicité est capable d'entraîner une protection contre une dose d'épreuve à l'aide du biotype El Tor.

À cause des effets secondaires produits par ces candidats vaccins, John MEKALANOS a préparé des souches ayant un potentiel de colonisation plus faible (souches filamenteuses, et de mobilité déficiente), baptisées Peru 14, qui ont entraîné une bonne réponse immune et ont été bien tolérées, administrées à des volontaires en une dose. Dans une étude d'efficacité réalisée sur un petit nombre de volontaires, une dose d'épreuve de El Tor Inaba a été administrée 4 mois après la vaccination et une protection de 80 % a été observée. Une autre souche avec une mobilité encore plus faible, Peru 15, a été également évaluée chez des volontaires et a entraîné une protection de 84 % chez des volontaires ayant reçu une dose d'épreuve de la souche El Tor pathogène. Il est intéressant de noter que la déficience en mobilité de la souche Peru 15 ne semble pas entraîner de diminution de sa capacité de colonisation de l'intestin, suggérant ainsi que la perte de mobilité atténuée le pouvoir réactogène par un mécanisme autre que celui qui réduit la colonisation. Ce vaccin sera évalué prochainement au Ban-

gladesh dans le cadre d'une collaboration entre l'OMS et l'Institut International des Vaccins (IVI) à Séoul.

Vaccin 638 et 638 T

Ce candidat vaccin, préparé à Cuba, est donné par voie orale en une seule dose (3). Il s'agit d'une souche vivante atténuée, El Tor Ogawa, ayant subi une délétion au niveau des gènes *ctx* et de la partie terminale *AttRSI* du chromosome de *Vibrio cholerae* ainsi que du gène codant la protéase de l'hémagglutinine A (HA/P). Le but est d'empêcher la fixation du phage CTX, qui incorpore normalement la partie *ctx* codant les différentes toxines (*ctx AB*, *zot*, *ace*, *cep*) au niveau d'*AttRSI*. On obtient ainsi une souche atténuée négative en phage CTX. Ce candidat vaccin donné en une seule dose par voie orale en phase I à des volontaires a fait preuve d'une bonne innocuité et d'une bonne immunogénicité. Une nouvelle souche atténuée thymidine dépendante, nommée 638 T (6), a été préparée par la même équipe et doit être prochainement évaluée en phase clinique I chez des volontaires.

Vaccins contre le sérotype O139

CVD112

Avant de développer le CVD112, le groupe de M. LEVINE à Baltimore, Maryland, a fait plusieurs observations importantes sur le *V. cholerae* O139 (souche AI1837) chez des adultes volontaires nord-américains. Le groupe a montré que la souche d'épreuve AI1837 était capable d'entraîner des diarrhées à une concentration de 10^8 , que les réponses en IgA provenant des ASC (cellules sécrétant des anticorps) étaient principalement dirigées contre la capsule de AI1837 plutôt que vers son LPS, que les réponses en anticorps vibriocides étaient faibles et qu'une dose d'épreuve initiale conférait une protection de 83 % contre une nouvelle dose d'épreuve homologoue.

CVD112 a été construit par délétion mutation de AI1837 en suivant une approche identique à celle prise pour le développement des vaccins anti-cholériques O1. Des délétions ont été pratiquées dans la cassette de virulence et les gènes *ctxB* et celui codant la résistance au Hg ont été insérés au niveau du locus de l'hémolysine. Ce candidat vaccin a été évalué chez des volontaires nord-américains, chez lesquels il a fait preuve d'une bonne innocuité et a entraîné une protection de 83 % contre une dose d'épreuve de la souche pathogène.

Le groupe de John MEKALANOS à Boston a construit plusieurs vaccins atténués de *V. cholerae* O139 par délétion multiple (gènes codant la cassette de virulence et la capacité de recombinaison) appliquée à deux souches de *V. cholerae* O139, les souches MO10 et AI4456 isolées respectivement à Madras et à Dacca. Ainsi atténuées, ces souches ne peuvent plus incorporer le matériel génétique toxique du phage CTX.

Souches atténuées de *S. typhi* exprimant des antigènes de *V. cholerae*

Les chercheurs australiens ont été parmi les premiers à introduire dans des souches de Ty21a (*Salmonella Typhi* atténuée), des gènes codant la production de l'antigène O de sérotype Inaba de souche de *V. cholerae* biotype classique. L'intérêt était de pouvoir utiliser une souche porteuse qui avait déjà fait la preuve de son innocuité. La souche Ty21a renfermant un plasmide stable codant l'antigène O Inaba a été donnée à des volontaires à la dose de 10^{11} bactéries vivantes, avec un tampon, en deux doses espacées d'un mois. Aucune réaction secondaire importante n'a été observée; le vaccin entraîne une réponse significative en anticorps dirigés contre le LPS Inaba; par contre, la réponse en anticorps vibriocides est restée modeste. Ce concept est également utilisé pour d'autres antigènes comme ceux des *Shigella*, de l'hépatite B ou de *Plasmodium*.

Nouveaux Vaccins injectables "sous-unités"

Une nouvelle approche a été prise par J. ROBBINS du NIH à Bethesda et J.-M. FOURNIER de l'Institut Pasteur de Paris. Les nouveaux candidats vaccins injectables sont préparés à partir d'antigène O du LPS de *V. cholerae* O1 ou O139, couplé à une protéine porteuse qui est soit l'exoprotéine A de *Pseudomonas aeruginosa* (ROBBINS *in*: 10), soit l'anatoxine tétanique (FOURNIER *in*: 14). Ces candidats vaccins injectés à des souris ont fait preuve d'un bon pouvoir immunogène. Leur efficacité chez l'homme reste à démontrer. Le principe est basé sur l'apparition d'IgG d'origine sérique au niveau de la lamina propria puis de la muqueuse intestinale par un phénomène de transsudation.

Recommandations de l'OMS

Une réunion s'est tenue à l'OMS sur le thème de l'utilisation des vaccins anticholériques en situation d'urgence (8). Parmi les recommandations énoncées, la plus importante semble être la suivante :

"Le vaccin oral inactivé WC-B doit être pris en considération parmi les moyens destinés à prévenir le choléra dans les populations considérées à risque d'épidémie dans les six mois à venir et non pas pendant une épidémie. Ces populations à risque incluent, de façon non restrictive, les réfugiés et les populations des bidonvilles. Une réserve de plus de deux millions de doses devra être constituée dans ce but."

Conclusion

Le choléra reste un problème de santé publique important pour certains pays en voie de développement où il sévit à l'état endémique. D'importants progrès ont été réalisés dans le développement de nouveaux vaccins ayant fait preuve d'innocuité et d'une efficacité satisfaisante. L'utilisation des vaccins actuellement disponibles ne fait pas encore l'unanimité et reste à définir. D'autres candidats vaccins sont à l'étude et pourront être utilisés dans le cadre d'un polyvaccin contre les maladies diarrhéiques. Il existe en effet la même approche par voie injectable basée sur l'utilisation de conjugués sucrés pour les shigelloses, le choléra et la fièvre typhoïde.

Références bibliographiques

- AREHAWARATANA PS, SINGHARAJ P, TAYLOR N, HOGE C, TROFA A *et al.* - Safety and Immunogenicity of Different Immunization Regimens of CVD103HgR Live Oral Vaccine in Soldiers and Civilians in Thailand. *J Infect Dis*, 1992, **164**, 1042-1048.
- BENITEZ J, GARCIA L, SILVA A, GARCIA H, FANDO R *et al.* - Preliminary assessment of the safety and immunogenicity of a new CTX phage negative, hemagglutinin/protease defective El Tor strain as a cholera vaccine candidate. *Infect Immun*, 1999, **67**, 539-545.
- BERCHE P & IVANOFF B - Vers la huitième pandémie de choléra. *Presse Méd*, 1994, **23**, 872-873.
- BLACK R.E, LEVINE B, CLEMENS ML, YOUNG CR, SVENNERHOLM AM & HOLMGREN J - Protective efficacy in human of killed whole *Vibrio*-oral cholera vaccine with and without the B subunit of cholera toxin. *Infect Immun*, 1987, **55**, 1116-1120.
- BOUTONNIER A, VILLENEUVE S, NATO F, DASSY B & FOURNIER JM - Preparation, immunogenicity and protective efficacy in a murine model, of conjugate vaccine composed of the polysaccharide moiety of the lipopolysaccharide of *Vibrio cholerae* O139 bound to tetanus toxoid. *Infect Immun*, 2001, **69**, 3488-3493.
- GUPTA R, TAYLOR D, BRILA D, ROBBINS JB & SZU SC - Phase I evaluation of *Vibrio cholerae* O1, serotype Inaba, polysaccharide cholera toxin conjugates in adult volunteers. *Infect Immun*, 1998, **66**, 3095-3099.
- IVANOFF B & CLEMENS J - Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et microbiologiques de la nouvelle souche de *Vibrio cholerae* O139. *Méd Trop*, 1994, **54**, 75-77.
- KOLLARITSCH H, QUE JU, KUNZ C, WIEDERMAN G, HERZOG C & CRYZ SJ - Safety and Immunogenicity of live oral cholera and typhoid vaccines administered alone or in combination with antimalarial drugs, oral polio vaccine or yellow fever vaccine. *J Infect Dis*, 1997, **175**, 871-875.
- KOTLOFF KI, WASSERMAN SS, O'DONNELL S, LOSONSKY GA, KAPER JB & SRIVASTAVA BS - Safety and immunogenicity in North Americans of a single dose of live Oral cholera vaccine CVD103HgR: Results of a randomized, placebo-controlled, double-blind crossover trial. *Infect Immun*, 1992, **60**, 4430-4432.
- LEVINE MM, KAPER JB, HERRINGTON D, KETLEY J, LOSONSKY G *et al.* - Safety immunogenicity and efficacy of recombinant live oral cholera vaccine CVD103 and CVD103-HgR. *Lancet*, 1988, **2**, 467-470.
- OMS - Potential use of oral cholera vaccines in emergency situations *Report WHO meeting Geneva (12-13 May 1999)*.
- 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**, 703-704.
- RICHIE E, PUNJABI N, SIDHARTA Y, PEETOSUTAN K, SUKANDAR M *et al.* - Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD103HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. *Vaccine*, 2000, **18**, 2399-2410.
- SANCHEZ JL, VASQUEZ B, BEGUE RE, MEZA R, CASTELLARES G *et al.* - Protective efficacy of oral whole-cell/recombinant-B-subunit cholera vaccine in Peruvian military recruits. *Lancet*, 1994, **344**, 1273-1275.
- SIMANJUTAK SC, WITHAM N, PUNJABI N, HEPPNER DG, LOSONSKY G *et al.* - Safety and Immunogenicity of single dose live oral cholera vaccine CVD103HgR in 5-9 years old Indonesian children. *Lancet*, 1992, **340**, 689-694.
- TACKET CO, LOSONSKY G, NATARO JP, MICHALSKY J, KAPER JB & LEVINE MM - Onset and duration of protective immunity in challenged volunteers after vaccination with live oral cholera vaccine CVD103HgR. *J Infect Dis*, 1992, **166**, 837-841.
- TRACH DD, CAM PD, KE NT, RAO MR, DINH D *et al.* - Investigations of the safety and immunogenicity of a new killed oral cholera vaccine developed in Vietnam. *Bull Org Mond Santé*, 2002, **80**, 2-8.
- TRACH DD, CLEMENS JD, KE NT, THUY HT, SON ND *et al.* - Field trial of a locally produced, killed, oral cholera vaccine in Viet Nam. *Lancet*, 1997, **349**, 231-235.
- VALLE E, LEDON T, CEDRE B, CAMPOS J, VALMASEDA T *et al.* - Construction and characterization of a nonproliferative El Tor cholera vaccine candidate derived from strain 638. *Infect Immun*, 2000, **68**, 6411-6418.
- WALDOR MK, WOODS A, PEARSON DN, SADOFF J & MEKALANOS JJ - Molecular analysis of novel *Vibrio cholerae* strains and development of live vaccines prototypes. *J Infect Dis*, 1994, **170**, 278-283.
- WALDOR MW & MEKALANOS JJ - ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. *Infect Immun*, 1994, **62**, 72-78.