

## Estudio de la distribución y persistencia de la cepa *Salmonella typhi* Ty 21a expresando la subunidad B de la Toxina del Cólera (CTB) después de su administración a ratones por distintas vías

Sarmiento ME, Acosta A, Díaz J, Hidalgo C, Finalet J, Martínez M, Estévez P, Griñan I, Callis A, Infante JF, Oliva R, Fariñas M., García H, Pérez JL, Izquierdo L, Azahares E, Sierra G.

Instituto Finlay

### Resumen

En el presente trabajo se exponen los resultados de la distribución y persistencia de la cepa *Salmonella typhi* Ty 21<sup>a</sup> expresando la subunidad B de la Toxina del Cólera (CTB) después de su administración a ratones por distintas vías. En el estudio se comprobó la persistencia de la cepa vacunal varias semanas después de su administración, así como la estabilidad *in vivo* de la construcción genética utilizada.

### Introducción

La *Salmonella typhi* Ty 21a es una cepa vacunal viva atenuada utilizada para la prevención de la Fiebre Tifoidea en el humano (1,2), la cual ha sido obtenida a partir de la cepa patógena Ty 2a por mutación, con Nitrosoguanidina (3), del gen de la Galactosa U Epimerasa (gal E), enzima involucrada en la síntesis del lipopolisacárido (LPS).

Debido a que este vector ha demostrado su eficacia en la inducción de respuestas inmunes secretorias a nivel intestinal y en la prevención de la fiebre tifoidea en el humano, algunos grupos de investigación han explorado la posibilidad de usar la cepa vacunal Ty21a para expresar antígenos de otros enteropatógenos (4,5) con el fin de desarrollar vacunas múltiples de nueva generación para la administración por la vía oral.

En la cepa vacunal atenuada *Salmonella typhi* Ty 21a se han expresado gran variedad de antígenos provenientes de diferentes patógenos entre ellos se encuentran el antígeno O de la *Shigella sonnei* (4), la subunidad beta de la *E. coli* enterotoxigénica (5), antígeno proteico de superficie del *Streptococcus mutans*, (6), lipopolisacárido de *Vibrio cholerae* (7,8) y la subunidad S1 de la toxina de la *Bordetella pertussis* (9).

El cólera es una de las enfermedades donde reviste crucial importancia lograr la inducción de respuesta protectora a nivel intestinal por lo que la expresión de antígenos de *Vibrio cholerae* en vectores vivos atenuados de administración oral ha sido una de las estrategias desarrolladas. En este sentido la cepa Ty21a de *Salmonella typhi* expresando antígenos de *Vibrio cholerae* ha sido

evaluada como vacuna experimental en algunos estudios (4, 5, 6, 7, 8, 9).

El elemento patogénico más importante en la producción del cólera es la toxina producida por el microorganismo, constituida por dos subunidades (A y B) de las cuales la subunidad A es la responsable de la actividad tóxica de la misma y la subunidad B, constituida por cinco subunidades que se asocian formando un pentámero llamado CTB, el cual es el encargado de mediar la unión específica de la toxina al gangliósido GM1 presente en la membrana del enterocito, por lo que se piensa que la inducción de un adecuado nivel de anticuerpos IgA secretorios contra la subunidad B de la toxina podría bloquear la unión de esta al enterocito y por tanto evitar las manifestaciones clínicas de la enfermedad (10).

Nuestro equipo de trabajo ha desarrollado construcciones genéticas capaces de transformar genéticamente la cepa Ty21a de *Salmonella typhi* e inducir en la misma la expresión de la subunidad B de la toxina del cólera (Acosta A, Resultado no publicado), por lo que en este trabajo nos propusimos evaluar la distribución y persistencia de esta vacuna experimental después de su administración a ratones por distintas vías.

### Materiales y Métodos

**Cepas:** Se utilizó la cepa atenuada *Salmonella typhi* Ty21a (Empresa de Producción de Biológicos "Carlos J. Finlay") y la misma cepa transformada genéticamente con el plásmido pJF1 que contiene un gen que codifica la subunidad B de la toxina del cólera (CTB), un promotor inducible por IsoPropyl ThiolGalactósido (IPTG) y un gen de resistencia a la Ampicilina (11).

**Antibióticos:** Se usó la Ampicilina (Boehringer Mannheim) a una concentración de 50 µg/ml.

**Medios de Cultivo:** Se utilizó medio LB (Extracto de levadura (Oxoid) 0.5%, Triptona (Oxoid) 1%, Cloruro de Sodio (Pharmacia) 1%; Medio BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid); Medio Mac Conkey (Oxoid); Medio Kliger Iron Agar (Oxoid); Medio Lisina Iron Agar (Oxoid), los cuatro últimos preparados según las indicaciones del fabricante (12).

**Animales:** Para este estudio se emplearon un total de 111 ratones machos de la línea isogénica Balb/c suministrados por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) con un peso entre 22 y 28 g.

### Control de las Cepas Vacunales

**Estudio microbiológico:** Las cepas de *Salmonella typhi* Ty 21a transformada y no transformada fueron inoculadas en cuñas de medio Kligler Iron Agar y medio Lisina Iron (86) e incubadas a 37 °C durante 24 horas después de lo cual se evaluó su patrón de crecimiento (12).

**Curva de Crecimiento en presencia de Galactosa:** Para realizar el estudio de la curva de crecimiento de las cepas en presencia de Galactosa éstas se inocularon en medio LB con y sin Galactosa (0.5%) e incubadas a 37 °C, realizándose determinaciones seriadas de la DO de los cultivos a 600 nm con un espectrofotómetro Ultraspec III (Pharmacia).

**Estudio de la Expresión de CTB:** Para llevar a cabo el estudio de la expresión de CTB, fueron inoculados 5 mL de medio LB con y sin ampicilina con la cepa transformada y no transformada respectivamente. A los cultivos obtenidos después del crecimiento durante 16 horas a 37 °C con agitación (200 RPM) se les determinó la densidad óptica a 550 nm después de lo cual se tomaron volúmenes de los mismos según la siguiente fórmula:  $2/DO = \text{ml de cultivo a tomar}$ , lo que permite obtener cantidades equivalentes de células. Los volúmenes tomados de cada cultivo fueron centrifugados a 10 000 RPM a 4 °C durante 15 min tomando muestras del sobrenadante y llevando a cabo la sonicación del botón celular en 300  $\mu\text{L}$  de solución salina (NaCl 0.9 %) después de lo cual los cultivos restantes fueron inducidos con IPTG (50 $\mu\text{M}$ ) (Boehringer Mannheim) durante una hora a 37°C con agitación (200 RPM) tomándose muestras del sobrenadante y del sonificado del botón celular según la metodología descrita con anterioridad. A 100  $\mu\text{L}$  de las diferentes muestras de sonificado celular y del sobrenadante se les determinó cualitativamente la presencia de CTB mediante el método de GM1 ELISA (13).

**GM1 ELISA:** Para la realización de la técnica de GM1 ELISA se utilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo en "U" (Nunc). Las placas se recubrieron con GM1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) suministrado por el Dpto de Cólera del Instituto Finlay y el bloqueo fue con Leche descremada (Oxoid ) al 1%. El CTB (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) utilizado como control positivo fue suministrado por el Departamento de Cólera del Instituto Finlay. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-CTB (1 $\mu\text{g}/\text{M}$ ) (Dpto. de Monoclonales del Instituto Finlay) como primer anticuerpo y se usó un conjugado anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa obtenido en el Dpto. de Biología Molecular del instituto Finlay utilizado a una dilución de 1:8000.

Las placas fueron leídas a 492 nm en un lector de ELISA (Multiskan. Multisof. LabSystems ).

### Esquema de Inmunización

**Primera Inmunización:** Los animales fueron divididos en dos grupos: Grupo Recombinante (n = 63 ) y Grupo Control (n = 48).

El Grupo Recombinante fue dividido en tres subgrupos, los cuales fueron inmunizados con la cepa de *Salmonella typhi* Ty21a transformada con el plásmido pJF1.

El Grupo Control fue dividido en los mismos subgrupos que el Grupo Recombinante, pero fue inmunizado con la cepa de *Salmonella typhi* Ty21a no transformada .

Para preparar los inóculos se obtuvo cultivos de *Salmonella typhi* Ty21a transformada y no transformada en medio LB con y sin ampicilina respectivamente después de una incubación a 37 °C con agitación (200 RPM) durante 18 horas los cuales fueron centrifugados a 3000 RPM durante 15 min a 4°C después de lo cual el botón celular fue resuspendido en solución salina para obtener la concentración celular deseada.

El primer subgrupo del Grupo Recombinante (n = 21) fue inmunizado con 10<sup>9</sup> Unidades Formadoras de Colonias (UFC) del recombinante por la vía oral utilizando una cánula intraesofágica en un volumen de 0.1 mL previamente estos animales se habían mantenido en ayuno durante 12 horas, recibiendo 0.1 mL de una solución al 8% de bicarbonato de sodio por la misma vía 10 minutos antes de la inmunización. El segundo subgrupo (n = 21) fue inmunizado con 10<sup>9</sup> UFC del recombinante en un volumen de 0.1 mL por la vía endovenosa utilizando la vena dorsal de la cola, y el tercer subgrupo (n = 21) fue inmunizado con 10<sup>6</sup> UFC del recombinante en un volumen de 0.1 mL por la vía intraperitoneal. Estos subgrupos se denominaron respectivamente Oral Recombinante (OR), Endovenoso Recombinante (ER) e Intraperitoneal Recombinante (IR).

El Grupo Control fue subdividido en los mismos subgrupos que el Grupo Recombinante, inmunizándose los animales con la misma metodología pero con la cepa no transformada. Estos subgrupos se denominaron: Oral Control (OC) (n = 16); Endovenoso Control (EC) (n = 16) e Intraperitoneal Control (IC) (n = 16) .

### Estudio de la Biodistribución y Persistencia de las cepas vacunales

Para demostrar la presencia de las cepas vacunales en diversos órganos (hígado, bazo y ganglio linfático mesentérico) y su persistencia tiempo después de la inmunización se realizaron estudios microbiológicos, de biología molecular e histopatológicos.

Para realizar los estudios microbiológicos y de biología molecular se sacrificó y se les extrajeron los órganos a un animal de cada subgrupo a las 24 horas y a dos animales de cada subgrupo con una periodicidad semanal hasta la quinta semana.

Para llevar a cabo el estudio histopatológico se sacrificaron y extrajeron los mismos órganos a dos animales de cada uno de los subgrupos del grupo recombinante y a un animal de cada uno de los subgrupos del grupo control semanalmente durante 5 semanas.

**Estudio microbiológico:** Los órganos fueron extraídos en condiciones de esterilidad en un Flujo Laminar y macerados en 1 mL de Solución Salina estéril. 100  $\mu$ L de estas muestras, sembradas en caldo BHI y medio Mac Conkey con y sin ampicilina e incubadas durante 24 horas a 37°C. Los crecimientos obtenidos en medio BHI fueron sembrados en placas de Mac Conkey con y sin ampicilina, e incubados 24 horas a 37°C; las colonias compatibles con *Salmonella typhi* por siembra directa o a partir de siembra de crecimiento en medio BHI, fueron inoculadas en los medios Kligler y Lisina incubándose a 37°C durante 24 horas, después de lo cual se llevó a cabo su identificación definitiva de acuerdo con su patrón de crecimiento en dichos medios (12).

**Estudio de biología molecular:** Las colonias identificadas como *Salmonella typhi* después del estudio microbiológico fueron estudiadas mediante el método de purificación de plásmidos a pequeña escala por lisis alcalina (14), después de lo cual se realizó una electroforesis submarina en gel de agarosa (0.8%) con bromuro de etidio corrida a 100 volts en buffer TBE utilizando una fuente de electroforesis modelo EPS 400-500 (Pharmacia) y una cámara submarina modelo GNA-200 (Pharmacia) (14) para determinar su presencia en las muestras después de ser observadas en un transluminador ultravioleta Kodak y fotografiado el gel con una cámara polaroid Kodak. Su concentración fue estimada utilizando un cuantificador automático de ADN y ARN (GeneQuant DNA/RNA Calculator, Pharmacia). 1  $\mu$ g de cada aislamiento plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción EcoRI (Boehringer Mannheim) y Hind III (Boehringer Mannheim) según las instrucciones del fabricante, donde se comparó el patrón de restricción con el obtenido con el plásmido pJF1 después de digerido con las mismas enzimas. Dicha comparación se llevó a cabo después de correr las muestras en una electroforesis en gel de agarosa con la misma metodología utilizada con anterioridad.

**Estudio histopatológico:** Los órganos extraídos fueron fijados en formalol al 7% y de los recortes cortos o inclusiones en bloques de parafina. Para la tinción se aplicaron técnicas de coloración con hematoxilina y eosina, siendo observadas en un microscopio Olympus CH-2 en busca de lesiones características de la infección por *Salmonella* (15).

## Resultados y Discusión

### Control de las Cepas Vacunales

Se obtuvo un patrón de crecimiento típico de *Salmonella typhi* en los medios utilizados tanto para la cepa transformada como no transformada.

Se apreció una disminución de la DO de los cultivos de la cepa transformante y no transformante después de las 5 horas, mientras que este efecto no se produjo con los medios que no contenían Galactosa. Como se sabe, esta cepa mutada disminuye su viabilidad en presencia de Galactosa por lo que este método se utiliza como criterio de identificación de esta cepa mutada (1).

Se puso de manifiesto la expresión de la proteína recombinante en el sonificado del botón celular de la cepa transformada y la duplicación de la expresión después de su inducción con IPTG.

A pesar de que se utilizó una construcción genética con promotor inducible, el hecho de que se comprobara expresión constitutiva es un elemento que justifica la expresión "in vivo" del vector recombinante.

### Estudio de la Distribución y Persistencia de las cepas vacunales:

**Estudio microbiológico:** En la Tabla 1 se muestran los resultados del estudio de los órganos de los animales inmunizados donde se constató la presencia de la cepa vacunal a las 24 horas en hígado y bazo de los animales inmunizados por la vía endovenosa (ER, EC) y en hígado, bazo y ganglio mesentérico de los animales inmunizados por la vía intraperitoneal (IR, IC).

En los animales estudiados en la primera semana post-inoculación se obtuvo positividad en las muestras de hígado y bazo de los animales inmunizados con la cepa recombinante por la vía endovenosa (ER) e intraperitoneal (IR), mientras que en el Grupo Control, en los inmunizados por las vías endovenosa (EC) e intraperitoneal (IC), se obtuvo crecimiento en hígado, bazo y ganglios mesentéricos. En la segunda semana post-inoculación se obtuvo crecimiento en el bazo de los animales inmunizados por la vía endovenosa con el recombinante (ER) y en el bazo, hígado y ganglio del subgrupo inoculado por vía intraperitoneal con el recombinante (IR), mientras que en el Grupo Control, en los inmunizados por las vías endovenosa (EC) e intraperitoneal (IC), se obtuvo crecimiento a partir del ganglio mesentérico. En el análisis de la tercera semana post-inoculación se obtuvieron resultados positivos en hígado y ganglio en los animales inmunizados por vía endovenosa con el recombinante (ER) y en bazo, hígado y ganglio en los controles inmunizados por vía endovenosa (EC). En el grupo control inmunizado por vía oral (OC) se obtuvo positividad en bazo y ganglio mesentérico y en los controles inmunizados por vía intraperitoneal (IC) se obtuvo crecimiento en el hígado.

En la cuarta semana post-inoculación se obtuvo crecimiento en bazo e hígado de los animales inmunizados con el recombinante por la vía intraperitoneal (IR) y en el bazo de los controles inmunizados por las vías endovenosa (EC) e intraperitoneal (IC). En el estudio de la 5ta. semana post-inoculación no se obtuvo resultados positivos en ninguno de

los grupos estudiados. En los grupos inmunizados con la cepa recombinante los crecimientos se obtuvieron en las placas con y sin ampicilina mientras que en los animales inmunizados con la cepa no recombinante solo se obtuvo crecimiento en las placas sin antibiótico.

Todos los aislamientos compatibles con *Salmonella typhi* de acuerdo a su patrón de crecimiento en los distintos medios utilizados tuvieron un comportamiento similar al de la cepa de *Salmonella typhi* Ty21a en presencia de Galactosa. El comportamiento de la persistencia del microorganismo en los distintos subgrupos no fue homogéneo, aunque de forma general se constató la presencia del mismo en alguno de los órganos estudiados hasta la tercera semana post-inoculación en los animales inoculados con el recombinante por la vía endovenosa (ER) y hasta la cuarta semana en los inoculados con el recombinante por la vía intraperitoneal (IR) (Tabla 1). Otros autores expresando diferentes antígenos en la misma cepa han logrado persistencias similares en los animales inmunizados (16), iguales resultados se han obtenido después de la administración de *Salmonella typhimurium* recombinante en la misma especie (17), mientras que otros grupos han logrado una persistencia menor de cepas recombinantes de *Salmonella typhi* y de *Salmonella typhimurium* después de su administración a ratones (4).

En nuestro trabajo hemos logrado una persistencia relativamente prolongada de la cepa después de su administración con la posibilidad de que ejerza una estimulación sostenida del sistema inmunitario, en dependencia de los niveles de expresión de la proteína heteróloga.

En los grupos controles inmunizados con la cepa no transformada por las vías endovenosa (EC) e intraperitoneal (IC) se obtuvo un comportamiento similar en general al de los animales inmunizados con el recombinante por las mismas vías (ER, IR), aunque hubo una mayor persistencia en los animales inmunizados por la vía endovenosa (EC) (Tabla 1). Esto pudiera poner de manifiesto la existencia de alguna desventaja para la sobrevivencia de la cepa transformada genéticamente con respecto a la no transformada lo que ha sido encontrado por otros autores (18), mientras que en otros sistemas de expresión, utilizando como hospedero la *Salmonella typhimurium*, no se encontró diferencias en la persistencia de las cepas recombinantes y no recombinantes (16).

En cuanto a la distribución de las cepas después de su administración por distintas vías estas se encontraron con mayor frecuencia en bazo sin diferencias apreciables al comparar los animales inmunizados con la cepa recombinante y no recombinante. La localización en hígado siguió un patrón similar aunque con menos aislamientos positivos (Tabla 1). En cuanto al ganglio los aislamientos positivos predominaron en el grupo control. La distribución del microorganismo en general se comportó de acuerdo a lo esperado de acuerdo a las vías de administración utilizadas y a los mecanismos naturales de diseminación del microorganismo (19).

Con relación a la vía oral, los resultados obtenidos (Tabla 1) ponen en evidencia una distribución mas tardía e irregular de las cepas inoculadas probablemente debido a las dificultades inherentes a esta vía de inoculación.

**Tabla 1. Resultado del estudio microbiológico de los órganos de los animales inmunizados**

Grupos	Organos	24 horas	1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas	5 Semanas
OR	Bazo	-	-	-	-	-	-
	Hígado	-	-	-	-	-	-
	Ganglio	-	-	-	-	-	-
OC	Bazo	-	-	-	+	-	-
	Hígado	-	-	-	-	-	-
	Ganglio	-	-	-	+	-	-
ER	Bazo	+	+	+	-	-	-
	Hígado	+	+	-	+	-	-
	Ganglio	-	-	-	-	-	-
EC	Bazo	+	+	-	-	+	-
	Hígado	+	+	-	-	-	-
	Ganglio	-	+	+	-	-	-
IR	Bazo	+	+	+	-	+	-
	Hígado	+	+	+	-	+	-
	Ganglio	+	-	+	-	-	-
IC	Bazo	+	+	-	-	+	-
	Hígado	+	+	-	+	-	-
	Ganglio	+	+	+	-	-	-

(+) Aislamiento microbiológico compatible con *Salmonella Typhi*

(-) No crecimiento microbiano

**Estudio mediante técnicas de Biología Molecular**

En las muestras provenientes de los diferentes órganos (Tabla 2), se evidenció la presencia de plásmidos solo en los aislamientos provenientes de los grupos inmunizados con el microorganismo recombinante. Es de señalar que de los animales inmunizados por vía oral el estudio solo pudo ser realizado en el grupo que recibió el microorganismo no transformado ya que no pudo obtenerse cultivos positivos a partir de los animales inmunizados con el recombinante.

En todos los casos se comprobó la identidad del material obtenido con el plásmido pJF1.

Estos resultados ponen en evidencia la estabilidad *in vivo* del plásmido utilizado en la transformación de la cepa vacunal aunque en trabajos futuros debe determinarse la proporción de microorganismos recombinantes en los distintos aislamientos. En estudios realizados en modelos experimentales con BCG recombinante se ha encontrado estabilidad plasmídica hasta 16 semanas en aislamientos realizados a partir de ganglios linfáticos de animales inmunizados y hasta 4 semanas después de la inmunización en los aislamientos procedentes del bazo (20).

**Tabla 2. Estudio de la presencia de plásmidos en los aislamientos obtenidos a partir de los animales inmunizados**

Grupos	Organos	24 horas	1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas	5 Semanas
OR	Bazo	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	Higado	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	Ganglio	nc	nc	nc	nc	nc	nc
OC	Bazo	nc	nc	nc	-	nc	nc
	Higado	nc	nc	nc	nc	nc	nc
	Ganglio	nc	nc	nc	-	nc	nc
ER	Bazo	+	+	+	nc	nc	nc
	Higado	+	+	nc	+	nc	nc
	Ganglio	nc	nc	nc	+	nc	nc
EC	Bazo	-	-	nc	-	-	nc
	Higado	-	-	nc	-	nc	nc
	Ganglio	nc	-	-	-	nc	nc
IR	Bazo	+	+	+	nc	+	nc
	Higado	+	+	+	nc	+	nc
	Ganglio	+	nc		nc	nc	nc
IC	Bazo	-	-	nc	nc	-	nc
	Higado	-	-	nc	-	nc	nc
	Ganglio	-	-	-	nc	nc	nc

(+) Presencia de plásmidos

(-) Ausencia de plásmidos

(nc): no crecimiento.

**Estudio histopatológico:** En la tabla 3 aparecen los resultados del estudio histopatológico donde se aprecia la presencia de lesiones típicas de infección por *Salmonella* en hígado en la primera semana post-inoculación en los

animales inmunizados por vía endovenosa e intraperitoneal con la cepa no transformada (EC, IC). En el mismo órgano se encontraron lesiones en los animales inmunizados con la cepa recombinante por vía endovenosa en la segunda

## Cólera. Selección de Publicaciones

semana post-inmunización (Tabla 3). En la tercera semana post-inmunización aparecieron lesiones hepáticas características en el grupo inmunizado con el recombinante por la vía oral (OR) y en los grupos inmunizados con la cepa no transformada por las vías endovenosa e intraperitoneal (EC, IC) (Tabla 2).

En el estudio histopatológico realizado a los animales en la cuarta semana post-inmunización se evidenciaron lesiones características en el hígado en el grupo inmunizado con el recombinante por la vía oral (OR) y con la cepa no transformada por la vía endovenosa (EC).

En la quinta semana post-inmunización se observaron lesiones hepáticas típicas en los grupos inmunizados con el recombinante por la vía endovenosa (ER) y con la cepa no transformada por la vía intraperitoneal (IC) (Tabla 3).

El estudio histopatológico mostró una sensibilidad menor que los métodos microbiológicos (Tablas 1 y 3).

Es de señalar que solo se tomaron en este estudio como lesiones positivas las que resultaron características de infección por *Salmonella* y no se tomaron en cuenta gran cantidad de lesiones en diferentes órganos que si bien eran

altamente sugestivas no cumplían con todos los requisitos necesarios.

En algunos casos se complementaron los resultados del estudio microbiológico con el estudio histopatológico como sucedió por ejemplo en el subgrupo inmunizado con el recombinante por vía oral (OR) que resultó negativo en todos los estudios microbiológicos realizados (Tabla 1) obteniéndose sin embargo resultados positivos en este subgrupo en el hígado en la tercera y cuarta semana post inmunización.

No encontramos explicación a la aparición de lesiones características de salmonelosis solo en hígado en los grupos estudiados.

En resumen podemos plantear que en el presente trabajo se logro demostrar la persistencia, varias semanas después de su inoculación a ratones, de la cepa *Salmonella typhi* Ty 21<sup>0</sup> expresando la subunidad B de la toxina del cólera, lo que constituye un resultado alentador con respecto a su posible utilización como una vacuna experimental para la prevención del cólera.

**Tabla 3. Estudio histopatológico de los órganos de los animales inmunizados**

Grupos	Organos	1 Semana	2 Semanas	3 Semanas	4 Semanas	5 Semanas
OR	Bazo	-	-	-	-	-
	Higado	-	-	+	+	-
	Ganglio	-	-	-	-	-
OC	Bazo	-	-	-	-	-
	Higado	-	-	-	-	-
	Ganglio	-	-	-	-	-
ER	Bazo	-	-	-	-	-
	Higado	-	+	-	-	+
	Ganglio	-	-	-	-	-
IR	Bazo	-	-	-	-	-
	Higado	-	-	-	-	-
	Ganglio	-	-	-	-	-
IC	Bazo	-	-	-	-	-
	Higado	+	-	+	-	+
	Ganglio	-	-	-	-	-

(+) Lesiones características de infección por *Salmonella Typhi*

**Bibliografía**

1. Germanier R, Furrer E. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21<sup>a</sup> of *Salmonella typhi*: A candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *Journal Infect Dis* 1975; 131:553.
2. Levine MM. Clinical and fields trials with attenuated *Salmonella typhi* as live oral vaccines and a carrier vaccines. *Res Microbiol* 1990; 141: 807.
3. Hackett J. *Salmonella* based vaccines. *Vaccine* 1990; 8:5.
4. Formal SB. Construction of a potential bivalent vaccine strain: Introduction of *Shigella sonnei* Y antigens genes into the Gal E *Salmonella typhi* Ty 21<sup>a</sup> typhoid vaccine strain. *Infection and Immunity* 1981; 34(3): 746-750.
5. Clements JD, Morshidy S. Construction of a potential live oral bivalent vaccine for typhoid fever and cholera-E. coli related diarrheas. *Infect Immun* 1984; 46:564.
6. Curtiss R III, Goldschmidt, Pastian R, Lyons M, Mestecky J. Cloning virulence determinants form *Streptococcus mutans* and the use of recombinant clones to construct bivalent oral vaccine strains to confer protective immunity against S. mutans- induced dental caries. En: Hamada S, Michalek SM, Kiyono H, Menaker I, Mc Ghee. JR; eds. *Molecular Microbiology and Immunology of Streptococcus mutans*. New York: Elsevier Publishers, 1986:173.
7. Manining PA. Avirulent salmonellae expressing cloned vibrio genes as a potential bivalent typhoid cholera oral vaccine. En: Woodrow GC, Levine MM; eds. New York; Marcel Dekker Inc; 1990: 311-322.
8. Tacket CO .Safety, immunogenicity and efficacy against cholera challenge in humans of a Typhoid- cholera hibrid vaccine derived form *Salmonella typhi* Ty 21<sup>a</sup>. *Infection and Immunity* 1990;58(6):1620-1627.
9. Walker MJ. Specific lung mucosal and systemic immune response after oral immunization of mice with *Salmonella typhimurium aro A*, *Salmonella typhi* Ty 21<sup>a</sup>, and invasive *Escherichia coli* pressing recombinant pertussis toxin S1 subunit. *Infection and Immunity* 1992; 60(10):4260-4268.
10. Mekalanos JJ. Cholera toxin: Genetic analysis, regulation and role in pathogenesis. *Curr Topics Microbiol Immunol* 1985;11(8):97.
11. Martínez M, Hidalgo C, Finalet J, Estévez P, Acosta A, Sarmiento M, Aguila A, Arencibia I. Expresión de la subunidad B de la toxina del cólera en *Escherichia coli* y *Vibrio cholera*. *Avances en Biotecnología Moderna* 1994;2:30.
12. Bridson EY. *The Oxoid Manual.Culture Media*, 2-1;2-235. England:Unipath Limited, 1990.
13. Holgrem J, Svennerholm AM.Enzyme Linked Immunosorbent Assays for cholera serology. *Infect Immun* 1973;7:753-757.
14. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Raven Press, New York. 1989.
15. Robbins SL. *Patología Estructural y Funcional*. Ediciones Revolucionarias. La Habana.1986.
16. Cao Y, Wen Z, Lu D. Construction of a recombinant oral vaccine against *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* 1992;60(7):2823-2827.
17. Sjostedt, Sandstrom G,Tarnvik A. Humoral and cell mediated immunity in mice to a 17 kilodalton lipoprotein of *Francisela tularensis* expressed by *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* 1992;6(7):2855-2862.
18. Jun MQ, Quin YX, Xuan LC.Construction of a bivalent vaccine against typhoid fever and cholera diarrhea. *Science in China*.1990;33(1):44-49.
19. Meeting WHO. Potential use of live viral and bacterial vectors for vaccines.*Vaccine* 1990;8(10):425-437.
20. Burlein JE, Stover CK, Offut S, Hanson MS. Expression of foreign genes in mycobacteria. En: Bloom RB; eds. *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Washington: American Society for Microbiology, 1990:239-251.