

Protección inducida por una cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium en cuyes

Protection induced by an attenuated strain of *Salmonella* Typhimurium in guinea pigs

Christian Changanqui¹, Dennis Carhuaricra¹, María Chang¹,
Raúl Rosadio¹, Lenin Maturrano¹, Luis Luna^{1*}

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo evaluar la capacidad protectora de una cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium como candidata vacunal frente a un desafío experimental. Para ello, se utilizaron 51 cuyes hembra recientemente destetados, procedentes de una granja comercial, que fueron distribuidos en tres grupos de 17 animales: inoculado con cepa atenuada y desafiado, solo desafiado, y sin inoculación con cepa atenuada y sin desafío (control). Los animales, según los grupos, fueron inmunizados a las dos semanas de adaptación a las nuevas condiciones de crianza, y a las cinco semanas pos-inmunización fueron desafiados con una cepa virulenta de *S. Typhimurium*. El estado sanitario fue monitoreado durante cinco semanas pos-desafío y se recolectaron muestras fecales para evidenciar la excreción de IgA y de *S. Typhimurium*. Además, se realizaron necropsias a los animales que murieron, así como a los sobrevivientes al final del estudio, tomándose muestras de órganos para la evaluación microbiológica e histopatológica. No se observaron diferencias en la tasa de supervivencia ni en la ganancia diaria de peso entre los grupos desafiados. A nivel de lesiones, se observó mayor frecuencia de focos neumónicos y de afecciones intestinales en el grupo que fue solo desafiado en comparación con el grupo inoculado con la cepa atenuada y desafiado ($p < 0.05$).

Palabras clave: *Salmonella* Typhimurium, vacuna viva atenuada, cuy

¹ Grupo de Investigación SANIGEN, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

* E-mail: llunae@unmsm.edu.pe

Recibido: 19 de septiembre de 2022

Aceptado para publicación: 25 de septiembre de 2023

Publicado: 31 de octubre de 2023

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the protective capacity of an attenuated strain of *Salmonella* Typhimurium as a vaccine candidate against an experimental challenge. For this purpose, 51 recently weaned female guinea pigs from a commercial farm were used and distributed into three groups of 17 animals each: one group was inoculated with the attenuated strain and challenged, the second group was challenged only, and the third group served as a control (without attenuated strain and without challenge). The animals, according to their respective groups, were immunized after two weeks of adaptation to the new rearing conditions. Five weeks after immunization they were challenged with a virulent strain of *S. Typhimurium*. The health status was monitored for five weeks post-challenge and fecal samples were collected to demonstrate the excretion of IgA and *S. Typhimurium*. Additionally, necropsies were performed on the animals that died as well as on the survivors at the end of the study. Organ samples for microbiological and histopathological evaluation were taken. No significant differences in survival rate and daily weight gain were observed between the challenged groups. However, at the level of lesions, a higher frequency of pneumonic foci and intestinal affections were observed in the group that was only challenged compared to the inoculated group with the attenuated and challenged strain ($p < 0.05$).

Key words: *Salmonella* Typhimurium, live attenuated vaccine, guinea pig

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis en cuyes es causada por el serotipo Typhimurium de la bacteria *Salmonella enterica* subesp *enterica*. Es una enfermedad con tasas de mortalidad superiores al 90% y con una morbilidad mayor al 50% (Chauca, 1997, Morales *et al.*, 2007), pudiendo cursar sin signos clínicos aparentes, pero con efectos negativos en la absorción de alimentos y en la ganancia de peso (Bazán *et al.*, 2019). El Perú es el principal productor y consumidor de cuyes (*Cavia porcellus*), de allí que el desarrollo de tecnologías que puedan incrementar la producción y disminuir las pérdidas relacionadas a la infección por *S. Typhimurium* conllevarían a la mejora económica de los productores (Chauca, 1997; Zuñiga *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2015; Morales, 2017). No obstante, no se dispone que una vacuna que proteja a estos animales y evite las pérdidas económicas relacionadas con la enfermedad.

Dentro de las tecnologías vacunales, las vacunas vivas atenuadas representan una buena estrategia para la prevención de la salmonelosis y otras infecciones entéricas (Tennant *et al.*, 2015). Para uso humano existe una vacuna comercial con base a una cepa atenuada para la prevención de la fiebre tifoidea causada por *S. Typhi* y el cólera, causado por *Vibrio cholerae* (Kenner *et al.*, 1995). En animales de producción, como aves, también se dispone de una vacuna comercial para la prevención de la infección por *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, además de investigaciones de cepas vivas atenuadas para la prevención de enfermedades causadas por estas bacterias (McWhorter y Choulsakar, 2018; Kang *et al.*, 2022).

Para generar una cepa atenuada se requiere inactivar uno o varios genes relacionados con algunas funciones de la bacteria que no comprometan la capacidad básica de supervivencia. En general, los genes de elección a atenuar son aquellos relacionados a la

virulencia, a la capacidad de invasión, de supervivencia intracelular, o de la capacidad de degradar algún compuesto específico (Lin *et al.*, 2015). La eficiencia de estas cepas atenuadas es variable, pudiendo generar una inmunidad capaz de evitar la infección o disminuir el daño a los tejidos (Gómez, 2000).

La elaboración de vacunas que simulan una infección natural sin la gravedad que podría causar la infección por la bacteria puede contribuir enormemente a la protección de la infección (Chatfield *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 2012). En el caso de la salmonelosis, se opta por la administración por vía oral de una cepa atenuada para estimular una respuesta inmune de mucosas, incrementando los niveles de IgA que inhiben la invasión de la bacteria patógena. Por ese mismo hecho, la bacteria atenuada solo persiste para ocasionar una respuesta inmune, y que es eliminada posteriormente por el animal siendo incapaz de ocasionar una infección activa (Harrison *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997; Heithoff *et al.*, 1999; Curtis *et al.*, 2009).

Contar con una vacuna capaz de poder prevenir, o disminuir el efecto patógeno o el daño a los tejidos de la infección natural puede generar ganancias económicas a los productores. Ante esto, en el presente estudio se evalúa una cepa atenuada, como posible candidato vacunal contra la salmonelosis en cuyes como posible candidato vacunal con relación a su capacidad de disminuir las lesiones o los efectos negativos en la producción de la salmonelosis en cuyes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Ejecución

El ensayo experimental se llevó a cabo en el bioterio del Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria (FMV) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú.

Ética y Condiciones de Crianza

Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal (CEBA) de la FMV-UNMSM (CEBA 2020-6). Los cuyes fueron adquiridos de una granja en Pachacamac (Lima, Perú) y alojados en el área de crianza experimental en módulos metálicos de 1.60 m de altura, 0.75 m de ancho y 0.76 m de profundidad, alojando 5-6 animales por módulo. Las jaulas se adecuaron en un ambiente controlado de temperatura y humedad, con extracción constante del aire. Los cuyes recibieron alimentación y agua *ad libitum*. El alimento fue de tipo pellet balanceado, adquirido en la Planta de Alimentos Balanceados de la Universidad Agraria La Molina, Lima.

Grupos Experimentales

Se utilizaron 51 cuyes hembra de dos semanas de edad, agrupados aleatoriamente en tres grupos de 17 animales cada uno (Cuadro 1), y distribuidos uniformemente en 9 jaulas (5-6 animales por jaula). El cálculo del tamaño muestral se realizó con base a la fórmula de diferencia de dos proporciones, considerando una diferencia de mortalidad al desafío entre animales vacunados (80% de supervivencia) y no vacunados (30% de supervivencia) de 50%, un nivel de confianza de 95% y un poder de la prueba de 80%, resultando en el uso de 14 animales por grupo como mínimo.

Se tuvo un periodo de adaptación y seguimiento por 14 días, donde se tomaron muestras de heces para descartar la excre-

Cuadro 1. Grupos experimentales

Grupos	Tratamiento	Cuyes
1	Inoculado con cepa atenuada y desafiado	17
2	Solo desafiado	17
3	Sin inoculación con cepa atenuada y sin desafío (Control)	17

ción de salmonelas por los animales de experimentación. El descarte de salmonelas se realizó por técnicas microbiológicas estándares, descrito más adelante.

Cepa viva atenuada de *S. Typhimurium*

Se utilizó una cepa viva atenuada de *S. Typhimurium*, el cual se mantiene conservada a -80 °C en caldo LB (Luria Bertani) con glicerol al 20%. Estudios previos determinaron la carencia de la capacidad patogénica e invasiva en ensayos piloto previos *in vivo* y en el estudio de Changanaquí *et al.* (2022). El gen atenuado en la cepa vacunal participa en la respuesta frente al estrés dentro del hospedero y en la supervivencia en macrófagos. Para la reactivación y preparación del inóculo de la cepa atenuada, se siguieron los protocolos descritos por Changanaquí *et al.* (2022).

Cepa virulenta de *S. Typhimurium*

Para el desafío experimental se utilizó una cepa de *S. Typhimurium* de comprobada acción virulenta según estudios previos (Mejía *et al.*, 2019, Espinoza *et al.*, 2023), el cual fue aislado de un caso mortal de salmonelosis en un cuy procedente de una granja de crianza comercial en Pachacamac-Lima, en enero de 2016 y se mantiene conservado a -80 °C en glicerol al 20%. La reactivación se realizó según el procedimiento descrito por Mejía *et al.* (2019) y diluido finalmente en glucosa al 10% a una concentración de 10⁹ UFC/100 µl.

Procedimiento Experimental

La inoculación de la cepa atenuada (10⁸ UFC/cuy diluido en 100 µl de glucosa al 10%) a los cuyes del grupo 1 se realizó por vía oral, mezclado con el alimento peletizado. Los cuyes de los grupos 2 y 3 recibieron 100 µl de una solución de glucosa al 10%. La administración de los tratamientos se realizó colocando a los animales de forma individual en una jaula de metal con 5 g de alimento peletizado mezclado con el tratamiento asig-

nado. Los animales fueron supervisados hasta que ingirieron completamente el alimento.

Se realizó el seguimiento y monitoreo pos-inoculación por 21 días para detectar posibles signos clínicos adversos inducidos por la inoculación de la cepa atenuada y que el animal desarrolle una respuesta inmune contra la cepa inoculada. Posteriormente, los animales de los grupos 1 y 2 fueron desafiados con 10⁹ UFC/cuy de una cepa virulenta de *S. Typhimurium*, vía oral, diluidos en 100 µl de glucosa al 10%, administrados de la misma forma que la cepa atenuada. Posterior al desafío, los animales fueron observados durante 5 semanas (35 días) (Figura 1). Pasado este tiempo, se procedió al sacrificio y necropsia de los animales que sobrevivieron usando una combinación de ketamina y xilacina (Ket-A-Xyl[®], Agrovvet Market) a una dosis de 0.05-0.1 mg/animal vía IM como sedación y 2 ml de pentobarbital sódico a 6.5% (Halatal[®], Montana) intracardiaco. Los animales muertos durante el periodo pos-desafío y los que se sacrificaron al finalizar el estudio fueron sometidos a necropsia y toma de muestras para histopatología y aislamiento microbiológico.

Recolección de Datos

Toma de muestras fecales

Se tomaron muestras de heces de los tres grupos durante el periodo pos-inoculación de la cepa atenuada y pos-desafío en los días descritos en la Figura 1. Para esto, se tomaron 10 pellets frescos de heces recién excretados por jaula, haciendo un pool, para dividirlo en tres partes iguales, procesando cada parte como una muestra individual. Las heces se usaron para la cuantificación de IgA y de la excreción de *S. Typhimurium*.

Necropsias y toma de muestras

En los animales muertos durante el periodo de monitoreo pos-desafío y en los que fueron sacrificados al finalizar el estudio se

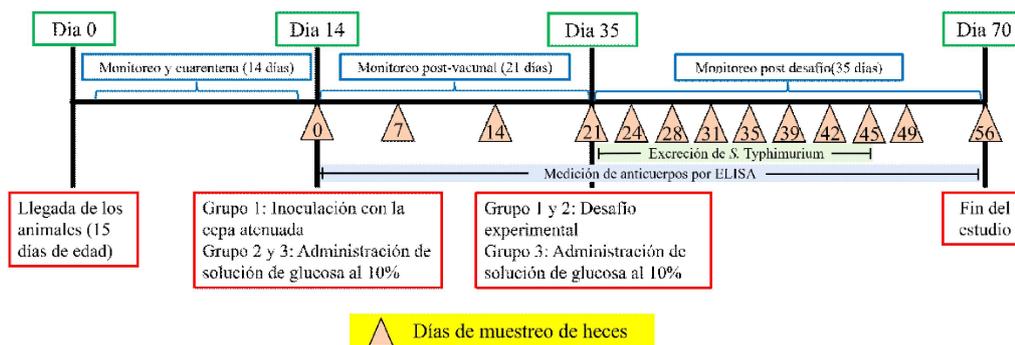


Figura 1. Esquema del cronograma de experimentación y de toma de muestras del estudio

realizó la necropsia respectiva registrando las lesiones características en órganos como intestino delgado, hígado, pulmón, nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), vesícula biliar, además de exudado en la cavidad abdominal, presencia de heces diarreicas en la zona perianal y pelo hirsuto al momento de la necropsia. Para el análisis histopatológico se tomaron muestras de intestino delgado, hígado y pulmón, y para el aislamiento de *S. Typhimurium*, se analizaron los mismos órganos, además del bazo.

Registro de pesos y consumo de alimento

Se registraron los pesos individuales en la recepción (día 0), en la inoculación con la cepa atenuada (día 14), en el desafío (día 35) y al final del estudio (día 56) usando una balanza digital electrónica de 5 kg (Miray). El pesaje se realizó en las mañanas, antes de la administración del alimento diario. La ganancia diaria de peso promedio se obtuvo dividiendo el peso ganado por el animal en cada intervalo de tiempo evaluado sobre el tiempo transcurrido en ese periodo en días.

El consumo de alimento fue determinado mediante el cálculo de la diferencia de peso del alimento ofrecido al inicio del día con el alimento recogido al finalizar el día y dividido por la cantidad de animales presen-

tes en la jaula, obteniendo un valor en gramos de consumo de alimento promedio por animal.

Medición de IgA anti-Salmonella mediante ELISA Indirecto in house

La medición de IgA se evaluó de forma semanal desde el periodo post inoculación de la cepa atenuada, en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 y 56 (Figura 1), la cual se realizó mediante una prueba de ELISA indirecto *in house*.

Obtención de antígeno total de *S. Typhimurium*

Los antígenos para el inmunoensayo fueron preparados usando el protocolo modificado de Ledesma *et al.* (2017) y Moreno (2018). Para ello, cepas de *S. Typhimurium* fueron colocadas en 50 ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (Merck) e incubadas a 37 °C por 24 h, para luego ser centrifugadas a 8500 g por 15 min a 4 °C. Los pellets celulares fueron lavados tres veces con buffer fosfato salino (PBS) y resuspendidos en 10 ml de PBS frío. Las células bacterianas fueron sonicadas en 7 pulsos de 10 s c/u, tomando 10 s entre pulsos, para luego centrifugarlo a 11000 g por 30 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la proteína soluble total usando un fluorómetro Qubit™ (Thermo Scientific).

Preparación de las placas de ELISA

Se tapizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de alta afinidad (Nunc Maxi-Sorp™) con 100 µl de proteína soluble total de *S. Typhimurium* a una concentración de 35 µg/ml e incubado a 37 °C por 1 h. Se realizaron tres lavados con 200 µl de buffer de lavado PBS-T (Tween 20 al 0.1% diluido en PBS). Se realizó el bloqueo de los pocillos colocando 200 µl de buffer de bloqueo (albumina sérica bovina al 3% diluido en PBS) e incubado a 4 °C durante 16 h, para luego realizar tres lavados con PBS-T. Posterior al lavado y secado, se procedió a usar las placas.

Obtención de IgA a partir de heces

Para la extracción de IgA se colocó 100 mg de heces en un tubo de microcentrífuga que contenía 1 ml de PBS y 50 µl de inhibidor de proteasas (Sigma Fast™, Sigma Aldrich). Se procedió a homogenizar con la ayuda de un vortex y luego centrifugado a 10 000 g por 10 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se almacenó a -20 °C. Estos se diluyeron a 1/200 en buffer de bloqueo para ser usado en la técnica de ELISA.

Procedimiento de ELISA

Se colocó por triplicado 100 µl por pocillo de cada muestra en una placa de ELISA. La placa con las muestras se incubó a 37° C por 1 h. Luego, se realizaron tres lavados con 200 µl/pocillo de buffer de lavado. Luego del secado de la placa, se colocaron 100 µl de un anticuerpo anti-IgA de cuyo conjugado con HRP (*Horseradish peroxidase*) (Sheep anti-Guinea Pig IgA Secondary Antibody, HRP, Invitrogen) a dilución 1/10000 en buffer de bloqueo. Se incubó a 37 °C por 1 h para luego realizar tres lavados más con el buffer de lavado antes de añadir 100 µl de sustrato cromógeno TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Sureblue™). Por último, las muestras fueron incubadas por 15 min a temperatura ambiente y leídas en un lector de placas de ELISA (Modelo 680 – Bio-Rad) a

una longitud de onda de 650 nm, para obtener los valores de absorbancia o densidad óptica (D.O.) de cada muestra.

Evaluación de la Excreción de *S. Typhimurium*

La excreción de *S. Typhimurium* fue realizado a partir de muestras de heces y analizado mediante qPCR. El análisis de la excreción se realizó en los días 21, 24, 28, 31, 35, 39, 42 y 45 pos-inoculación de la cepa atenuada (Figura 1) (0, 3, 7, 10, 14, 18, 21 y 24 días pos-desafío).

Extracción de ADN total de heces y condiciones de qPCR

Se utilizaron 100 mg de heces para la extracción de ADN total usando la prueba comercial QIAamp PowerFecal DNA Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la amplificación de ADN de *S. Typhimurium* por qPCR, se usaron los cebadores ttr-4 y ttr-6 descritos por Malorny *et al.* (2004) en un volumen final de 20 µL conteniendo 10 µL de SYBR Green Master Mix, 0.75 µL de cada cebador y 1 µL de ADN extraído. Las condiciones de reacción consistieron en una desnaturalización inicial de 95 °C por 5 min seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 1 min y 72 °C por 1 min.

Realización de la curva estándar

Para la realización de la curva estándar que permita la cuantificación absoluta de ADN de *S. Typhimurium* se utilizó una cepa de *S. Typhimurium* confirmada mediante PCR convencional. Se inoculó 100 µl de un cultivo fresco a un tubo conteniendo 10 ml de caldo LB, incubándose a 37 °C por 24 h. Se cuantificó el crecimiento obtenido del tubo mediante espectrofotometría ($1.0 \text{ OD}_{600} = 2.5 \times 10^8$ células). Luego se tomó 1 ml de este cultivo para extracción de ADN por medio del kit comercial GeneJET Genomic DNA Purifi-

cation Kit (Invitrogen) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se realizaron diluciones seriadas del ADN bacteriano a 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} usando agua libre de nucleasas y amplificado usando el protocolo descrito anteriormente.

Evaluación Histopatológica

La evaluación histopatológica se realizó en secciones de tejido derivado de órganos de los cuyes *post mortem*. Muestras de hígado, pulmones e intestino delgado fueron colocadas en una solución de formaldehído al 10% y después de un tiempo de fijación de 24 h se procesaron para seccionamiento de tejido y tinción con hematoxilina-eosina. Las láminas histopatológicas fueron observadas mediante un microscopio óptico (Zeiss, USA).

Patoscores de las lesiones del intestino delgado

Los cortes histológicos de intestino delgado fueron evaluados mediante la metodología descrita por Vishwakarma *et al.* (2012) a través de la asignación de un *patoscore*, el cual se basó en la observación de lesiones patológicas microscópicas específicas: edema en la submucosa (0-3 puntos), infiltración de polimorfonucleares (0-4 puntos), pérdida de células caliciformes (0-3 puntos), y ulceración epitelial (0-3 puntos). El puntaje obtenido por cada criterio fue sumado, obteniéndose un puntaje total de 0 - 13 puntos, el cual definió el grado de lesión del intestino, definiéndose como intacto (0 puntos), inflamación mínima (1-2 puntos), inflamación leve (3-4 puntos), inflamación moderada (5-8 puntos) o inflamación severa (9-13 puntos). Finalmente, se obtuvo un puntaje promedio por cada grupo experimental.

Análisis Estadístico

Se utilizó la prueba exacta de Fisher para determinar diferencias estadísticas entre los porcentajes de las lesiones macroscópicas y microscópicas. Las diferencias

estadísticas entre los valores de *patoscores*, pesos de los animales y valores relativos de IgA se evaluaron mediante la prueba del análisis de varianza previa evaluación de la normalidad mediante a prueba de Shapiro Wilk. Comparaciones pos-análisis fueron realizados con la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Efecto protector, lesiones macroscópicas e histopatología del candidato vacunal

De los 17 cuyes por grupo, 5 individuos de los grupos 1 y 2 murieron por efecto del desafío con la cepa virulenta, no habiendo diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$), en tanto que no hubo mortalidad en el grupo control ($p < 0.05$; Cuadro 2). La mortalidad ocurrió a partir del segundo día del desafío,

Cuadro 2. Mortalidad en 17 cuyes inoculados con una cepa atenuada y desafiados con una cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium

Grupos	Muertos
1 Inoculado con la cepa atenuada y desafiados	5
2 Solo desafiados	5
3 Control (No inoculado con la cepa atenuada y no desafiado).	0

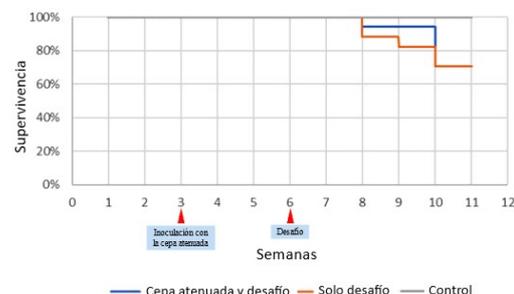


Figura 2. Curva de supervivencia en cuyes inoculados con una cepa atenuada y desafiados con una cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium

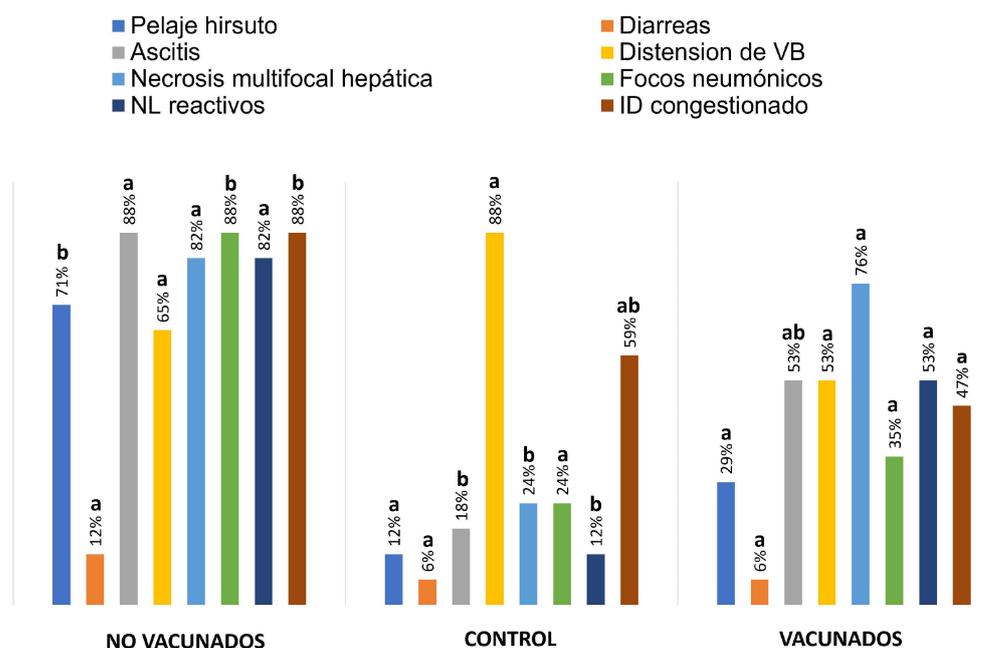


Figura 3. Frecuencia de lesiones macroscópicas en cuyes inoculados con una cepa atenuada y desafiados con una cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium. Las barras del mismo color indican la misma lesión para cada grupo experimental. Letras diferentes indican si hubo o no diferencia estadística entre cada una de las lesiones por cada grupo experimental.

siendo mayor en las últimas semanas del estudio para el grupo vacunado y desafiado, aunque terminando con igual número de muertes dentro de los dos grupos (Figura 2).

Lesiones macroscópicas

La Figura 3 muestra las lesiones macroscópicas encontradas en el estudio:

- Los cuyes del grupo 2 (desafiado no vacunado) tuvieron una mayor, pero no significativa frecuencia de ascitis ($p>0.05$) y mayor congestión en el intestino delgado que evidencia una enteritis activa en comparación con el grupo 1 (vacunado y desafiado) ($p<0.05$).
- Los grupos 1 y 2 presentaron una frecuencia similar de necrosis multifocal hepática ($p>0.05$).

- Hubo una mayor frecuencia de cuyes del grupo 2 con pelaje hirsuto en comparación con el grupo 1 ($p<0.05$).
- Se observó una mayor cantidad de animales con focos neumónicos en el grupo 2 frente al grupo 1 ($p<0.05$).
- No hubo diferencia significativa en la frecuencia de animales con vesícula biliar distendida, con diarreas ni con nódulos linfáticos mesentéricos reactivos entre los grupos 1 y 2.

Lesiones histopatológicas

El grupo 2 (desafiado no vacunado) presentó un mayor, pero no significativo porcentaje de animales afectados con neumonía hemorrágica multifocal y degeneración hidrópica hepática que el grupo 1 (vacunado y desafiado) ($p>0.05$). Por otro lado, el grupo 1

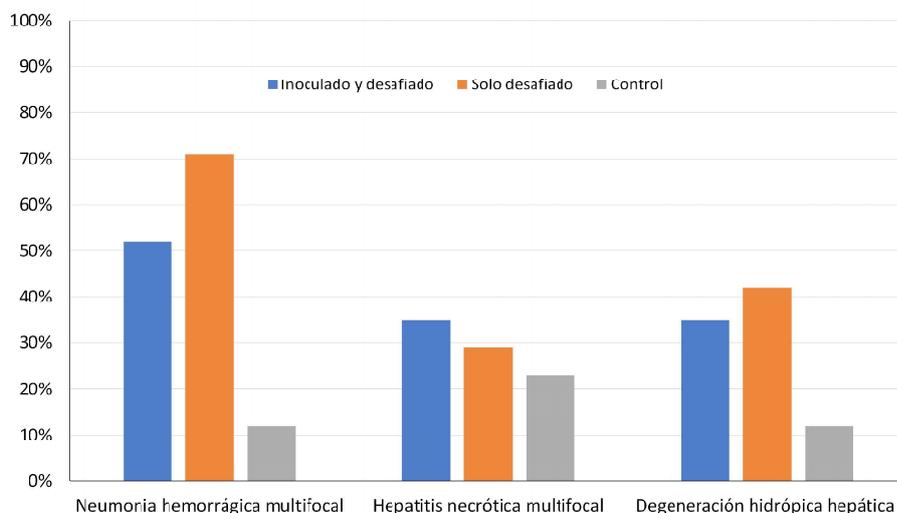


Figura 4. Frecuencia de lesiones histopatológicas en cuyes inoculados con una cepa atenuada y desafiados con una cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium

Cuadro 3. Promedio de patoscore obtenido en muestras de intestino delgado en 17 cuyes inoculados con una cepa atenuada y desafiados con una cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium

Grupos	Media ± EE
1 Inoculado con la cepa atenuada y desafiados	4.41±1.04 ^a
2 Solo desafiados	5.71±0.70 ^a
3 Control (No inoculado con la cepa atenuada y no desafiado)	0.29±0.18 ^b

^{a,b} Diferentes superíndices indican diferencia estadística (p<0.05)

presentó un mayor, pero no significativo porcentaje de animales afectados con hepatitis necrótica multifocal que el grupo 2 (p>0.05) (Figura 4). Las lesiones observadas en intestino delgado que fueron categorizados mediante los patoscores (edema en la capa submucosa, infiltración de células polimorfonucleares, pérdida de células caliciformes,

ulceración del epitelio intestinal) fueron similares entre los grupos 1 y 2, pero mayores a las observadas en el grupo control (Cuadro 3). El patoscore en los grupos 1 y 2 indica una inflamación leve y moderada, respectivamente, a nivel intestinal.

Respuesta inmune humoral a la inmunización, cuantificación y aislamiento de S. Typhimurium

En la evaluación de la respuesta humoral inducida frente al candidato vacunal no se observó una diferencia significativa en la reactividad de IgA entre los cuyes vacunados y desafiados (grupo 1) en comparación con los no vacunados y desafiados (grupo 2) (p>0.05), aunque se pudo notar valores ligeramente superiores en el grupo 1 durante todo el estudio (Figura 5). La excreción de *S. Typhimurium* (UFC por gramo de heces) se comenzó a observar el día 14 pos-desafío en el grupo desafiado no vacunado y a partir del día 21 en los grupos 1 y 2, siendo el grupo 2 el que presentó mayor excreción en los días 18 y 21 pos-desafío, lo cual muestra una posible tendencia. Por otro lado, el grupo 3 (control)

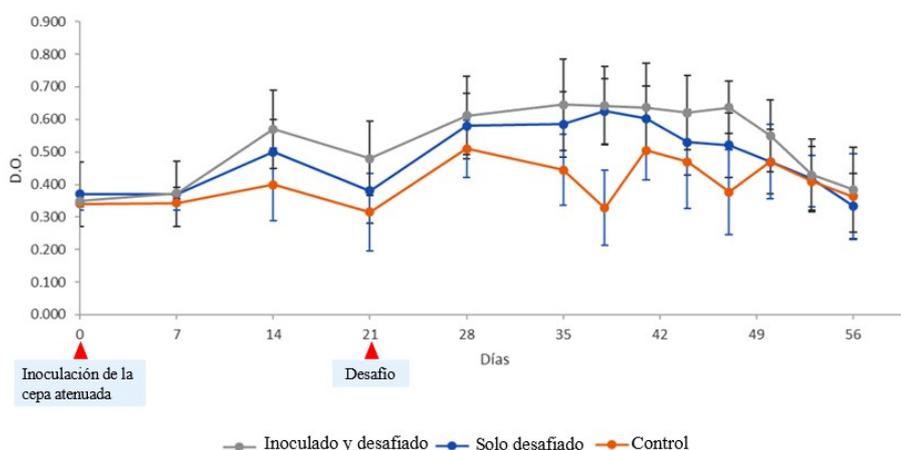


Figura 5. Resultados del ELISA para los niveles de IgA (DO 650) en cuyes inoculados con una cepa atenuada y desafiados con una cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium. Los puntos representan las medias y las barras a errores estándares (SE)

Cuadro 4. UFC/g de heces observados tras una reacción de PCR en tiempo real en las muestras de ADN extraídas de heces recolectadas de cuyes inoculados con una cepa atenuada y desafiados con una cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium

Días pos-desafío	Grupo 1 (Inoculado con la cepa atenuada y desafiados)	Grupo 2 (no vacunado no desafiado)	Grupo 3 (Control - No inoculado y no desafiado)
0	--	--	--
3	--	--	--
7	--	--	--
10	--	--	--
14	--	4.3 x 10 ¹	--
18	3.2 x 10 ¹	9.2 x 10 ²	--
21	3.5 x 10 ¹	1.9 x 10 ³	--
25	--	--	--

no evidenció excreción de *S. Typhimurium* en el periodo de evaluación (Cuadro 4).

En el aislamiento de *S. Typhimurium* del bazo, pulmones e hígado fue similar en los grupos 1 y 2 ($p > 0.05$). Por otro lado, se obtuvo un mayor aislamiento en el grupo 1 (desafiado no vacunado) con relación al grupo 1 (vacunado y desafiado) ($p < 0.05$), tal como se evidencia en la Figura 6.

Peso vivo y ganancia de peso

Tanto el peso vivo de los animales como la ganancia diaria de peso por tratamiento fueron estadísticamente similares en todas las etapas del estudio ($p > 0.05$). La ganancia diaria de peso, a pesar de que fue mayor en los animales inoculados con la cepa atenuada y desafiados en comparación con los otros dos grupos, no hubo diferencia estadística entre

Cuadro 5. Ganancia de peso diario (GPD) de cuyes inoculados con una cepa atenuada y desafiados con una cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium

Tratamientos	GPD (g)	D.E.
Inoculados y desafiados	9.74 ^a	1.78
Solo desafiados	8.66 ^a	1.77
Control	8.47 ^a	1.95

Promedios con superíndices similares son estadísticamente similares ($p > 0.05$)

estas (Cuadro 5). Asimismo, con relación al peso vivo, al término del estudio hubo una ligera diferencia a favor del grupo vacunado y desafiado como se observa en la Figura 7.

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo por finalidad evaluar la eficacia protectora vacunal en términos de mortalidad, lesiones e inducción de

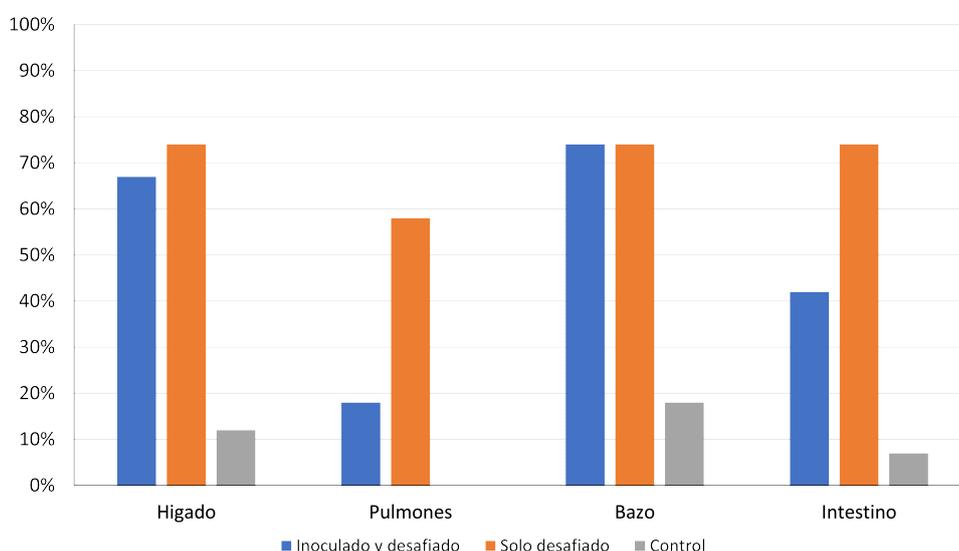


Figura 6. Resultados de aislamiento de *S. Typhimurium* por órgano en cuyes inoculados con una cepa atenuada y desafiados con una cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium

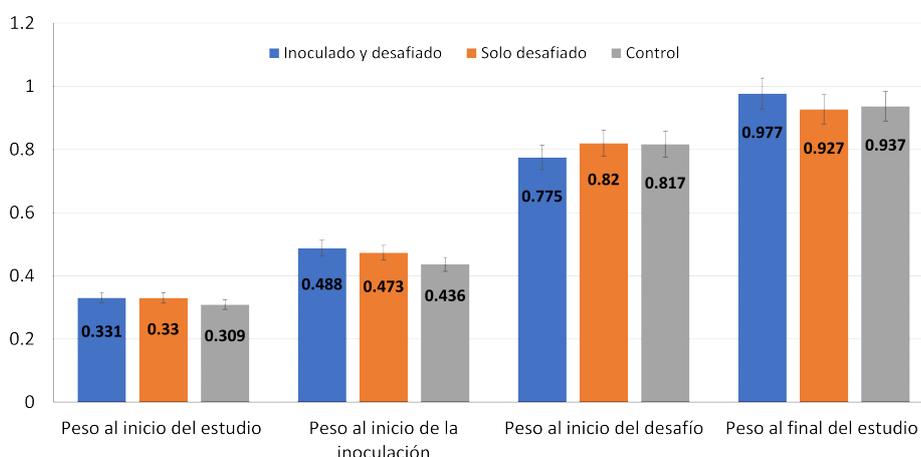


Figura 7. Promedio de pesos de los grupos experimentales con sus respectivos intervalos de confianza al 95%

anticuerpos IgA de una cepa atenuada de *Salmonella* Typhimurium de origen cobayo administrada oralmente a cuyes. Para ello se analizó la asociación entre la inoculación de una cepa atenuada y las lesiones causadas frente al desafío con una cepa virulenta, tomando para su evaluación las variables excreción de IgA en heces, excreción de *Salmonella* Typhimurium en heces, ganancia de peso, lesiones micro y macroscópicas y el aislamiento de *S. Typhimurium* en los órganos.

Se han llevado a cabo diversas experiencias con serotipos de *Salmonella*, tanto para el control de la enfermedad como para portadores de antígenos en animales de producción con resultados variables. Una de las características en común es que estas vacunas eran altamente inmunogénicas, con efectividad entre 75 a 100% y con alto porcentaje de seguridad, donde los genes atenuados en la mayoría de las cepas vacunales estuvieron relacionados con la virulencia (Singh, 2009; McWhorter y Chousalkar, 2018; Park *et al.*, 2020).

Una de las mediciones de importancia en la evaluación de una vacuna es el porcentaje de supervivencia pos-desafío. En este estudio, la mortalidad registrada en los grupos desafiados, tanto vacunados y como no vacunados fue similar (30%, 5/17). En el estudio de Tennant *et al.* (2015) se describe la eficacia de una cepa genéticamente atenuada en el gen *guaBA* de *S. Typhimurium* en ratones BALB/C que resultó en una supervivencia del 100% para el grupo inmunizado. En esa misma línea, Park *et al.* (2020) analizaron la eficacia de una cepa atenuada en el gen *yjeK* de *S. Typhimurium*, un gen relacionado con la expresión de una isla de patogenicidad que codifica una variedad de factores de virulencia. En ese estudio, la cepa fue administrada vía intraperitoneal en ratones BALB/C, logrando la supervivencia ante el desafío oral con una cepa *wild type* de *S. Typhimurium*.

En el presente estudio, la cepa usada para el desafío, a pesar de que se usó con éxito en un estudio previo (Espinoza, 2021), no generó la mortalidad esperada, lo que quizás no permitió evaluar adecuadamente este parámetro dentro de la eficacia de la cepa atenuada. Se ha demostrado que el mantenimiento de las cepas a bajas temperaturas puede influenciar la expresión de ciertos genes de virulencia (Huang *et al.*, 2015), o incluso la adaptación a medios de laboratorio y no replicarse en sus hospederos naturales puede alterar su capacidad patogénica, como ha sido demostrado en cepas patógenas de *E. coli* (Fernández-Brando *et al.*, 2012). Esto podría explicar la pérdida de la capacidad patogénica de la cepa de *S. Typhimurium* usada en el desafío experimental.

Para la mayoría de los parámetros evaluados, tales como la ganancia de peso, porcentaje de lesiones, excreción de IgA y eliminación de *S. Typhimurium* en heces no se encontró diferencia significativa entre los grupos tratados. Si bien la ganancia de peso fue similar entre los tres grupos, los cuyes vacunados y desafiados obtuvieron 50 y 40 g más al final del estudio que los grupos desafiado no vacunado y el control, respectivamente, lo cual podría explicarse en una mejor integridad en las células entéricas, traducándose en una mejor absorción de nutrientes, efecto que ha sido corroborado en estudios *in vitro* e *in vivo* en ratones y aves (Fiorentino *et al.*, 2013; Ghosal *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2021). A pesar de la diferencia entre los pesos entre los animales de los grupos experimentales, esto es una cuestión del azar y no propia del tratamiento experimental. Otros estudios, como el de Park *et al.* (2020) no observan diferencias estadísticas en los pesos finales en los individuos inoculados con una cepa atenuada de *S. Typhimurium* en relación con los animales desafiado.

Los valores de excreción de IgA en las heces no fueron estadísticamente diferentes entre el grupo inoculado con la cepa atenua-

da y desafiado con el grupo no vacunado no desafiado, aunque a partir del día 14 de la inoculación se encontraron niveles de IgA ligeramente superiores en el primer grupo. No obstante, los niveles de anticuerpos IgA no fueron los esperados y estadísticamente similares a los del grupo control. Factores como el protocolo de obtención de IgA, el tiempo y la forma de conservación de la muestra pueden alterar los niveles detectables de este tipo de anticuerpo en la muestra (Park *et al.*, 2014), además del estado fisiológico del animal (Campos-Rodríguez *et al.*, 2013).

Por otro lado, McWhorter y Chousalkar (2018), al evaluar la capacidad de inducción de IgA total en mucosa intestinal (íleon) de gallinas ponedoras, encontraron que la inoculación con la cepa silvestre de *S. Typhimurium* indujo una mayor expresión de IgA que la cepa vacunal, una cepa atenuada en el gen *aroA* y distribuida comercialmente para la prevención de salmonelosis en aves. Asimismo, Periaswamy *et al.* (2012), evaluando una cepa atenuada en un gen de virulencia (*ssaV*) de *S. Typhimurium* en un modelo de ratón sometido a inmunosupresión, demostró que la cepa atenuada fue capaz de inducir niveles mucho más altos de IgA anti-antígeno O de *Salmonella*, que aquellos que no fueron inoculados. Otros estudios, como el de Zhu *et al.* (2017), también lograron demostrar la capacidad de inducir niveles de IgA fecal en cerdos inoculados con una cepa viva atenuada de *S. Choleraesuis*.

Se encontró una mayor frecuencia de lesiones micro y macroscópicas compatibles con salmonelosis en los animales solo fueron desafiados en comparación con los controles y el grupo inoculado con la cepa atenuada y desafiado, especialmente en el caso de focos neumónicos e intestino. Por otro lado, se logró el aislamiento de *Salmonella*, tanto en hígado, bazo, pulmones e intestinos, en proporciones estadísticamente similares en los dos grupos desafiados. La presencia de lesiones y aislamiento de *Salmonella* en animales controles es porque no se trabajó con animales libres de patógenos (SPF), y a pe-

sar de que se realizó un descarte de salmonelas por las heces antes del inicio del estudio, estos microorganismos pueden permanecer en órganos de manera latente (Tischler y McKinney, 2010). Asimismo, el empleo de cepas atenuadas, incluso comerciales, no garantiza una inmunidad esterilizante y es posible observar lesiones pos-desafío y aislar el microorganismo usado en el desafío, así como la presencia de diarreas incluso en animales inmunizados (McWhorter y Chousalkar, 2018, Higginson *et al.*, 2021, Ji *et al.*, 2022).

En este contexto, el estudio de Lin *et al.* (2022) demuestra que en pollos SPF vacunados con una vacuna comercial bivalente en base a una cepa de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis*, se pudo aislar *S. Enteritidis* en el 67% de aves a partir de hisopados cloacales y en el 25% en tejidos en aves a los 14 días del desafío con *S. Enteritidis* y en el 25% de hisopados cloacales y en 16.7% de tejidos en aves desafiadas con *S. Typhimurium*; sin embargo, en ambos casos las aves fueron protegidas y no presentaron signos clínicos severos ni contaminación en los huevos.

Uno de los principales órganos afectados en animales infectados por *Salmonella* es el tracto intestinal. En esa línea, Vishwakarma *et al.* (2012) evaluaron el efecto de una cepa atenuada en un gen de virulencia (*ssaV*) en un modelo murino con inmunosupresión sobre el efecto del desafío obteniendo valores *patoscore* de 8 en animales desafiados sin vacunar y de 2-2.5 en vacunados y desafiados, siendo la principal lesión el edema en la membrana serosa y necrosis de las vellosidades intestinales. Estas lesiones fueron observadas también en este estudio, dando un *patoscore* de 5.71 en individuos del grupo de solo desafiados, 4.41 en inoculados con la cepa atenuada y desafiados y 0.29 en los individuos controles.

Es interesante resaltar que los animales pudieron eliminar *S. Typhimurium* hasta el último día donde se realizó esta evaluación, 21 días después del desafío, aunque las cantidades en relación con otros estudios es baja.

Así, los ratones inmunizados con la cepa vacunal en el estudio de Vishwakarma *et al.* (2012) eliminaron 10^8 UFC/g de heces hasta el día 28 post desafío; en tanto que en el estudio de Lin *et al.* (2022) se detectaron valores de $10^{1.1}$ UFC/g de heces de *S. Typhimurium* en el día 14 en aves SPF, un valor más similar al del presente estudio.

CONCLUSIONES

- No hubo una asociación significativa en el efecto protector contra la mortalidad frente al desafío experimental en los grupos experimentales desafiados.
- Los grupos experimentales desafiados no mostraron diferencia estadística en las lesiones macroscópicas y microscópicas ocasionadas por la cepa virulenta de *S. Typhimurium*.

Agradecimientos

Al Programa Proyecto Concytec - Banco Mundial «Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica», fuente financiadora del proyecto «Producción de una vacuna viva atenuada de *Salmonella Typhimurium* para mitigar el impacto de la salmonelosis en la crianza de cuyes», Contrato N.º 135-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV.

LITERATURA CITADA

1. **Bazán RV, Bezada QS, Carcelén CF, Yamada AG 2019.** Efecto de la infección subclínica de *Salmonella Typhimurium* sobre los parámetros productivos en la producción de cuyes de engorde (*Cavia porcellus*). Rev Inv Vet Perú 30: 1697-1706. doi: 10.15381/rivep.v30i4.17274
2. **Campos-Rodríguez R, Godínez-Victoria M, Abarca-Rojano E, Pacheco-Yépez J, Reyna-Garfías H, Barbosa-Cabrera RE, Drago-Serrano ME. 2013.** Stress modulates intestinal secretory immunoglobulin A. Front Integr Neurosci 7: 86. doi: 10.3389/fnint.2013.00086
3. **Changanquí C, Luna L, Carhuaricra D, Maturrano L, Rosadio R. 2022.** Niveles de IgA fecal en ratones inoculados con cepas atenuadas de *Salmonella Typhimurium*. Rev Inv Vet Perú 33: e22898. doi: 10.15381/rivep.v33i3.22898
4. **Chauca L. 1997.** Producción de cuyes (*Cavia porcellus*). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación FAO. [Internet]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/w6562s/w6562s00.html>
5. **Chatfield S, Strugnell R, Dougan G 1989.** Live *Salmonella* as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants. Vaccine 6: 495-498. doi: 10.1016/0264-410x(89)90271-5
6. **Curtis R, Wanda S, Gunn B, Zhang X, Tinge S, Ananthnarayan V. 2009.** *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains with regulated delayed attenuation *in vivo*. Infect Immun 77: 1071-1082. doi: 10.1128/IAI.00693-08
7. **Espinoza TM, Carhuaricra D, Maturrano HAL, Rosadio AR, Luna EL. 2023.** Efecto de la administración oral de estreptomycin en la mortalidad de cuyes inoculados con una cepa virulenta de *Salmonella Typhimurium*. Rev Inv Vet Perú 34: e24592. doi: 10.15381/rivep.v34i1.24592
8. **Fernandez-Brando RJ, Miliwebsky E, Mejías MP, Baschkier A, Panek CA, Abrey-Recalde MJ, Cabrera G, Ramos MV, Rivas M, Palermo MS. 2012.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 shows an increased pathogenicity in mice after the passage through the gastrointestinal tract of the same host. J Med Microbiol 61(Pt 6):852-859. doi: 10.1099/jmm.0.041251-0
9. **Fiorentino M, Lammers KM, Levine MM, Sztein MB, Fasano A. 2013.** *In vitro* intestinal mucosal epithelial

- responses to wild-type *Salmonella* Typhi and attenuated typhoid vaccines. *Front Immunol* 4:17. doi: 10.3389/fimmu.-2013.00017
10. **Ghosal A, Jellbauer S, Kapadia R, Raffatellu M, Said HM. 2015.** *Salmonella* infection inhibits intestinal biotin transport: cellular and molecular mechanisms. *Am J Physiol-Gastr L* 309: G123-G131. doi: 10.1152/ajpgi.00112.-2015
 11. **Gómez O. 2000.** Vacuna atenuada de *Salmonella* como vector de antígenos heterólogos. *Biomédica* 20: 131-143. doi: 10.7705/biomedica.v20i2.1056
 12. **Harrison J, Villarreal-Ramos B, Mastroeni P, Demarco R, Hormaeche C. 1997.** Correlates of protection induced by live Aro-*Salmonella* Typhimurium vaccines in the murine typhoid model. *Immunology* 90: 618-625. doi: 10.1046/j.1365-2567.1997.00158.x
 13. **Heithoff D, Sinsheimer R, Low D, Mahan M. 1999.** An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science* 284: 967-970. doi: 10.1126/science.284.5416.967
 14. **Higginson EE, Panda A, Toapanta FR, Terzi MC, Jones JA, Sen S, Permal-Booth J, et al. 2021.** Immunogenicity and efficacy of live attenuated *Salmonella* Typhimurium vaccine candidate CVD 1926 in a Rhesus macaque model of gastroenteritis. *Infect Immun* 89: e0008721. doi: 10.1128/IAI.00087-21
 15. **Huang DH, Wang K, Chiu CP, Pan TM, Tsai TY. 2015.** Effects of chemical and low-temperature treatments and adaption on the responses of virulence factor genes and outer membrane proteins in *Escherichia coli* O157:H7. *J Microbiol Immunol Infect* 48: 604-612. doi: 10.1016/j.jmii.2014.03.007
 16. **Ji HJ, Jang AY, Song JY, Ahn KB, Han SH, Bang SJ, Jung HK, et al. 2022.** Development of live attenuated *Salmonella* Typhimurium vaccine strain using radiation mutation enhancement technology (R-MET). *Front Immunol* 13: 931052. doi: 10.3389/fimmu.2022.-931052
 17. **Kang X, Yang Y, Meng C, Wang X, Liu B, Geng S, Jiao X, Pan Z. 2022.** Safety and protective efficacy of *Salmonella* Pullorum spiC and rafH deletion rough mutant as a live attenuated DIVA vaccine candidate. *Poultry Sci* 101: 101655. doi: 10.1016/j.psj.2021.101655
 18. **Kenner JR, Coster TS, Taylor DN, Trofa AF, Barrera-Oro M, Hyman T, Adams JM, et al. 1995.** Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J Infect Dis* 172: 1126-1129. doi: 10.1093/infdis/172.4.1126
 19. **Ledesma MM, Díaz AM, Barberis C, Vay C, Manghi MA, Leoni J, Castro MS, Ferrari A. 2016.** Identification of *Lama glama* as reservoirs for *Acinetobacter lwoffii*. *Front Microbiol* 8: 278. doi: 10.3389/fmicb.2017.00278
 20. **Lin IY, Van TT, Smooker PM. 2015.** Live-attenuated bacterial vectors: tools for vaccine and therapeutic agent delivery. *Vaccines (Basel)*. 3: 940-972. doi: 10.3390/vaccines3040940
 21. **Lin CS, Lu TL, Chen YA, Yu HY, Wu CY, Yang WY. 2022.** Safety of bivalent live attenuated *Salmonella* vaccine and its protection against bacterial shedding and tissue invasion in layers challenged with *Salmonella*. *Poultry Sci* 101: 101943. doi: 10.1016/j.psj.2022.101943
 22. **Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, Helmuth R. 2004.** Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl Environ Microbiol* 70: 7046-7052. doi: 10.1128/AEM.70.12.7046-7052.2004
 23. **McWhorter AR, Chousalkar KK. 2018.** A long-term efficacy trial of a live, attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine in layer hens. *Front Microbiol* 9:1380. doi: 10.3389/fmicb.2018.01380

24. **Mejía D, Salvatierra G, Maximiliano J, Rímac R, Carhuaricra D, Almeyda M, Luna L, Rosadio R, Maturrano L. 2019.** Expresión de citoquinas Th₁ (IL-2, IL-12, IFN- α , TNF- α), Th₂ (IL-4, IL-10, TGF- β) y Th₁₇ (IL-17) en linfocitos circulantes de cuyes inoculados con una cepa de campo de *Salmonella* Typhimurium. *Rev Inv Vet Perú* 30: 1750-1761. doi: 10.15381/rivep.v30i4.17188
25. **Morales S, Mattos J, Calle S. 2007.** Efecto de la muña (*Satureja parvifolia*) en la dinámica de la infección por *Salmonella enterica* en cobayos. En: XXX Reunión ALPA. Cusco: Asociación Latinoamericana de Producción Animal.
26. **Morales S. 2017.** Patógenos bacterianos y parasitarios más frecuentes en cuyes de crianza familiar-comercial en tres distritos de la Provincia de Bolognesi, departamento de Ancash en época de seca. Tesis de Maestría. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 72 p.
27. **Moreno G, Maximiliano J, Siuce J, Chero A, Medina G, Luna L, Rosadio R, Maturrano L. 2021.** Evaluación de la inmunogenicidad de una proteína recombinante de *Pasteurella multocida* para la prevención de la neumonía aguda en alpacas (*Vicugna pacos*). *Rev Inv Vet Perú* 32: e20924. doi: 10.15381/rivep.v32i4.20924
28. **Ortega G, Jiménez R, Ara M, Morales S. 2015.** La salmonelosis como factor de riesgo de mortalidad en Cuyes. *Rev Inv Vet Perú* 26: 676-681. doi: 10.15381/rivep.v26i4.11203
29. **Park J, Nagapudi K, Vergara C, Ramachander R, Laurence JS, Krishnan S. 2014.** Effect of pH and excipients on structure, dynamics, and long-term stability of a model IgG1 monoclonal antibody upon freeze-drying. *Pharm Res* 30: 968-984. doi: 10.1007/s11095-012-0933-z
30. **Park, S., Jung, B., Kim, E., Hong, S. T., Yoon, H., Hahn, T. W. 2020.** *Salmonella typhimurium* lacking YjeK as a candidate live attenuated vaccine against invasive *Salmonella* infection. *Front Immunol* 11: 1277. doi: 10.3389/fimmu.2020.01277
31. **Periaswamy B, Maier L, Vishwakarma V, Slack E, Kremer M, Andrews-Polymeris HL, McClelland M, et al. 2012.** Live attenuated *S. Typhimurium* vaccine with improved safety in immunocompromised mice. *Plos One* 7: e45433. doi: 10.1371/journal.pone.0045433
32. **Simon R, Tennant S, Galen J, Levine M. 2011.** Mouse models to assess the efficacy of non-typhoidal *Salmonella* vaccines: revisiting the role of host innate susceptibility and routes of challenge. *Vaccine* 29: 5094-5106. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.05.022
33. **Singh BR. 2009.** *Salmonella* vaccines for animals and birds and their future perspective. *Open Vaccine J* 2: 100-112. doi: 10.2174/1875035401002010100
34. **Tennant SM, Schmidlein P, Simon R, Pasetti MF, Galen JE, Levine MM. 2015.** Refined live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and enteritidis vaccines mediate homologous and heterologous serogroup protection in mice. *Infect Immun* 83: 4504-4512. doi: 10.1128/IAI.00924-15
35. **Tischler AD, McKinney JD. 2010.** Contrasting persistence strategies in *Salmonella* and *Mycobacterium*. *Curr Opin Microbiol* 13: 93-99. doi: 10.1016/j.mib.2009.12.007
36. **Vishwakarma V, Pati NB, Chandel HS, Sahoo SS, Saha B, Suar M. 2012.** Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TTSS-2 deficient fur mutant as safe live-attenuated vaccine candidate for immunocompromised mice. *Plos One* 7: e52043. doi: 10.1371/journal.pone.0052043
37. **Zhang X, Kelly S, Bollen W, Curtis R. 1997.** Characterization and immunogenicity of *Salmonella typhimurium*

- SL1344 and UK-1 delta crp and delta cdt deletion mutants. *Infect Immun* 1465: 5381-5387. doi: 10.1128/iai.65.12.5381-5387.1997
38. **Zhang H, Wang M, Jia J, Zhao J, Radebe SM, Yu Q. 2021.** The Protective Effect of *E. faecium* on *S. typhimurium* infection induced damage to intestinal mucosa. *Front Vet Sci* 8: 740424. doi: 10.3389/fvets.2021.740424
39. **Zhu L, Zhao X, Yin Q, Liu X, Chen X, Huang C, Sou X. 2017.** Mucosal IgA and IFN- γ ⁺ CD8 T cell immunity are important in the efficacy of live *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis vaccines 7: 46408. doi: 10.1038/srep46408
40. **Zuñiga J, Tur J, Milocco S, Piñeiro R. 2001.** Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Ed Interamericana. 682 p.