

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Ensayo piloto de inmunogenicidad y toxicidad preclínica de la vacuna *Salmonella typhi* conjugada en ratas Sprague Dawley.

Autores: Mildrey Fariñas-Medina*, Reynaldo Oliva-Hernández, Juan F. Infante-Bourzac, Yolanda Valdez-Abreu, Darcy Nuñez-Martínez, Tania Valmaceda-Pérez, Tamara Hernández Salazar, Sonsire Fernández-Castillo.**

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P. 11600, Ciudad de La Habana, Cuba.

Email: mfarinas@finlay.edu.cu; roh@finlay.edu.cu

Datos curriculares: * Doctora en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Especialista en Tecnología de Avanzada de Nivel II. Vicepresidencia de Investigación-Desarrollo, Instituto Finlay.

** Autor para la correspondencia: Doctor en Medicina Veterinaria y Zootecnia. MSc en Medicina Veterinaria Preventiva. Especialista en Tecnología de Avanzada de Nivel I y Profesor Asistente. Director de Preclínica, Vicepresidencia de Investigación-Desarrollo, Instituto Finlay.

Resumen

Los fármacos y vacunas que serán utilizados en humanos deben pasar los estudios preclínicos para demostrar su inocuidad y beneficios; en estos estudios es mandatorio contar con un modelo animal relevante. Por lo que el objetivo de este trabajo constituyo en primer lugar demostrar la relevancia de las ratas Sprague Dawley (SD) como modelo a través de su respuesta inmunológica al candidato vacunal conjugado contra la *Salmonella typhi* utilizando la técnica de ELISA. En segundo lugar evaluar de forma preliminar los posibles efectos toxicológicos de este producto a través diferentes estudios. Fueron utilizados animales de ambos sexos a los cuales se les administró un volumen de 0.2 mL vía intramuscular del candidato vacunal que contenía una dosis de 2 µg. Se utilizó un esquema de dos dosis y con un intervalo de 7 semanas realizándose evaluaciones serológicas semanales, síntomas clínicos, consumo de agua, alimentos, peso corporal, análisis hematológicos y estudios anatomopatológicos macroscópicos e histopatológicos. Se concluye que las ratas SD resultaron ser un modelo relevante al responder inmunológicamente al producto y no evidenciarse de forma preliminar posibles efectos toxicológicos adversos.

Palabras claves: estudio piloto, toxicología preclínica, inmunogenicidad, vacuna salmonella conjugada, ratas Sprague dawley.

Abstract

Drugs and vaccines to be utilized in humans must pass preclinical studies to prove its safety and benefits, in these studies is mandatory to have at least one relevant animal model. Therefore the aims of this work were to demonstrate the relevance of Sprague Dawley rat (SD) for the evaluation of immunogenicity of the *Salmonella typhi* conjugate vaccine by ELISA, in addition to the preliminary evaluation of toxicological effect by clinical and pathological studied. Animals of both sex received 0.2 mL/2 µg of vaccine candidate intramuscularly in two doses with a time interval of seven weeks. Weekly serological, clinical and haematological determinations were made with a pathological examination at the end of the experiment in order to identify toxicological effects. Taking into evaluation the antibody response in both sex with the immunization schedule, the animal model demonstrated to be good for the evaluation of the humoral immunogenicity of the conjugate vaccine. During the study were not evident signals of toxicological alterations. SD rats are useful model for the evaluation of immunogenicity of salmonella conjugated vaccine without preliminary not evidences of toxicity.

Keys words: Pilot trial, preclinical toxicity, immunogenicity, conjugated salmonella vaccine, Spreague Dawley rats.

Introducción

La fiebre tifoidea es una enfermedad entérica invasiva causada por *Salmonella entérica* serovar *Typhi*. Anualmente se reportan aproximadamente 21 millones de casos y 600 000 muertes, afectando principalmente a niños en edad escolar (5-15 años) y < 5 años ⁽¹⁾. La vacunación contra la fiebre tifoidea sigue siendo una medida importante de control. Actualmente existen 2 tipos de vacunas licenciadas en uso contra esta enfermedad: la variante compuesta por polisacárido purificado y la variante compuesta por bacterias atenuadas, pero ninguna de las dos está licenciada para su uso en niños menores de 2 años, siendo éste el grupo de edad el de mayor tasa de mortalidad (4% vs 0.4%) en comparación con el grupo 5-15 años de edad ⁽²⁾. Ambas vacunas presentan otras desventajas; la cepa atenuada componente de la vacuna oral Ty21a requiere varias dosis (3 ó 4) para inducir una respuesta inmune efectiva lo cual resulta complejo de llevar a cabo en muchos países en desarrollo ⁽³⁾. Por otra parte, las vacunas basadas en polisacáridos planos no inducen memoria inmunológica por lo que es necesaria la revacunación cada cierto período de tiempo, y adicionalmente no son efectivas en niños pequeños ⁽⁴⁾.

Se conoce que la conjugación de polisacáridos a proteínas portadoras produce una reversión en el patrón de respuesta Timo independiente inducida por los polisacáridos hacia un patrón Timo dependiente lo que origina la inducción de respuesta inmune de larga duración y efectiva en infantes ⁽⁵⁾. Por lo que la obtención de una vacuna conjugada contra la fiebre tifoidea pudiera dar solución a esta problemática. Siendo el objetivo de este trabajo en primer lugar demostrar la relevancia de las ratas Sprague Dawley (SD) como modelo animal para los estudios preclínicos toxicológicos de rigor a través de su respuesta inmunológica al candidato vacunal conjugado contra la salmonella y en segundo lugar evaluar de forma preliminar los posibles efectos toxicológicos de este producto a través de evaluaciones clínicas, hematológicas y anatomopatológicas. Este diseño se basó, fundamentalmente, en la información recopilada de la Resolución No. 152/92 MINSAP ⁽⁶⁾, las Pautas de la OECD para la Evaluación de Fármacos ⁽⁷⁾, los

Estándares de Medicamentos de la Comunidad Europea y las normas de la Agencia Europea para la Evaluación de Productos Medicinales (8).

Materiales y Métodos

Animales: Se usaron Ratas Sprague Dawley de ambos sexos de 6-7 semanas de edad con un peso vivo de 155-185g las hembras y de 190-225g los machos. Procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) y recepcionados con sus correspondientes certificados de calidad higiénico-sanitaria.

Los animales fueron mantenidos bajo condiciones convencionales con un régimen de iluminación de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. El alimento consistió en pienso concentrado para roedores suministrado por el CENPALAB, con sus correspondientes certificados de calidad bromatológica e higiénico-sanitaria, tanto éste como el agua fueron suministrados "ad libitum".

Los animales fueron alojados en cajas modelo T4 (Macrolón, TECNIPLASTIC) a razón de 6 por caja, donde el encamado utilizado fue bagazo de caña de azúcar desmeollado con previa esterilización en autoclave a 121°C y 1,5 atmósferas de presión durante 25 minutos; el cual se cambió 2 veces por semana.

Todos los procedimientos del estudio, incluyendo los métodos de eutanasia, fueron sometidos a la consideración, análisis y aprobación del comité de ética institucional en observancia de lo establecido en cumplimiento de las buenas prácticas y regulaciones de seguridad biológica.

Diseño Experimental

A los animales se le administró una vacuna experimental de *Salmonella Typhi*, Lote 1209, por vía intramuscular en un volumen/dosis de 0.2mL/2 µg, con un esquema de dos dosis y un intervalo de 7 semanas, se le administro al grupo placebo los componentes de la vacuna sin el antígeno y solución salina fisiológica al 0.9 % para los grupos controles (Tabla No.1).

Composición por unidad de dosis de la sustancia en ensayo***Sustancias activas:***

Polisacárido Capsular Vi de *Salmonella typhi* conjugado con anatoxina de *Corynebacterium diphtheriae* 5 µg.

Sustancias auxiliares:

<u>Ingredientes</u>	<u>Concentración</u>
Cloruro de sodio	4,150 mg
Hidrógeno fosfato de disodio dihidratado	0,065 mg
Dihidrógeno fosfato de sodio dihidratado	0,023 mg
Tiomersal	0, 01 %
Agua para Inyección	<u>C.S</u>

Parámetros y Variables Analizadas

Se realizó la exploración clínica de los animales diariamente, prestando especial atención al punto de inoculación y a la aparición y/o manifestación de síntomas como: cojera, piloerección, postración, movimientos involuntarios, ataxia, salivación, lagrimeo, excitación o depresión, incoordinación y diarreas entre otros que pudieran ser observados durante el estudio.

Se evaluó el consumo de agua y alimentos en días alternos, así como el peso corporal de los animales semanalmente. Se obtuvieron muestras de sangre para los estudios serológicos por técnica de ELISA semanalmente hasta tiempo 63 y hematológicos a partir de la segunda dosis a los 3 días y semanalmente hasta los 21 días después de aplicada la segunda dosis. Cuando se observó la declinación del título de anticuerpo (Ac) se procedió a la realización de la segunda dosis y se continuó su evaluación hasta la última eutanasia. Se realizaron estudios anatomopatológicos macroscópicos y microscópicos,

con especial interés en el punto de inoculación, los nódulos linfáticos regionales (ganglio poplíteo e inguinal profundo), los cuales se fijaron en formol neutro al 10%.

Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se creó una base de datos en Microsoft Excel y se procesaron los mismos utilizando el programa estadístico STATISTICA 6.0 ⁽⁹⁾. Para todos los casos se aplicó como criterio de significación estadística $p < 0.05$. Para las variables continuas (peso corporal, consumo de agua y consumo de alimento) se realizó un análisis de comparación múltiple, incluyendo la comprobación de la normalidad de los datos, así como el chequeo de la igualdad de varianza. Los grupos de datos que cumplieron lo antes señalado se procesaron por ANOVA y los que no lo cumplieron por la prueba de Kruskal-Wallis.

Resultados y Discusión

Signos clínicos y Mortalidad

No se registraron síntomas clínicos ni muertes asociadas al producto durante el estudio.

Peso Corporal

Todos los animales incrementaron su peso corporal ($p < 0.05$) durante el estudio (Gráfico 1 y 2), tampoco se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos experimentales, siendo los machos los que mostraron un ritmo de crecimiento mayor que las hembras ($p < 0.05$). El peso alcanzado por las ratas en el período estudiado se correspondió con los valores históricos observados para ratas Sprague Dawley en nuestras instalaciones durante la evaluación preclínica de otros productos ⁽¹⁰⁻¹¹⁾.

Consumo de Agua

Este parámetro se comportó de forma similar entre todos los grupos evaluados (Gráficos No. 3 y 4), los machos consumieron más que las hembras ($p < 0.05$) siendo de 24,44 – 40,32 mL para los primeros y de 21,53 – 31,59 mL para las hembras. En general, estos

resultados se correspondieron con los valores históricos observados para las ratas de esta categoría en nuestras instalaciones (10-11).

Consumo de Alimentos

El consumo de alimentos en el estudio, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamientos ($p < 0.05$, Gráficos 5 y 6), los machos consumieron más que las hembras ($p < 0.05$), de 18,72 – 31,41g los machos y de 13,90 – 25,03g las hembras, todo lo cual coincidió con las medias históricas de los animales de esta línea y categoría (10-11).

Estudio Serológico

En general, los grupos vacunados de ambos sexos, no difieren estadísticamente en los valores de IgG contra polisacárido Vi en el tiempo, excepto en T14 y T21 donde los machos alcanzan valores significativamente superiores ($p < 0.05$).

En comparación con los grupos Placebo y Control, las hembras vacunadas alcanzaron valores significativamente superiores, excepto en T0 y T56-T63. En el caso de los machos, no se observaron diferencias significativas entre el grupo Vacunado y los grupos Placebo y Control en los tiempos T0, T42, T45-T49 y T56-T63.

Los títulos de anticuerpos por ELISA mostraron niveles considerados de anticuerpos (Gráfico No.7) de la vacuna Salmonella conjugada tanto para hembras como para machos, difiriendo entre estos en T35, donde los títulos de Ac. para las hembras fue inferior, lo cual pudiera estar relacionado al sexo y respuesta del grupo. Según el ensayo por ELISA hubo respuesta hasta el T7(42), tiempo en el que declino el título de anticuerpos, siendo el momento de aplicación de la segunda dosis. Sin embargo, era de esperar una respuesta secundaria en aumento, que no se constato en este estudio. Esto pudiera verse afectado por la N de animales utilizadas en este tipo de estudio, que tiene objetivo exploratorio y de cumplimentación con uno de los principios de las 3Rs; la reducción, diseñándose los mismos con la menor cantidad de animales posible, o por la posibilidad de que la concentración de antígenos (Ag) sea aún muy elevada para la

especie y haya existido una especie de saturación o bloqueo del sistema inmunológico, el cual se ha visto ocurrir en estudios similares pero cuando se aplican reiteradas dosis de Ag frecuentemente (12).

Estudio Hematológico

Los parámetros sanguíneos evaluados resultaron satisfactorios al encontrarse dentro de los rangos fisiológicos reportados para la especie bajo nuestras condiciones y corroborado por los valores de referencia descritos para la especie por algunos autores (13-16); esto nos permite realizar una correcta evaluación y fiabilidad del comportamiento de esta especie y línea bajo condiciones experimentales.(Tabla 2 y 3). No obstante se encontraron algunas diferencias que comentamos a continuación. En la primera eutanasia (3 días después de la 2da dosis) se observó diferencia entre los grupos ($p < 0.05$) en el parámetro RGR en los machos; mientras que a los 14 días después de la 2da dosis (3era eutanasia) se registraron diferencias entre los parámetros de VCM, CMH y CMHC, en las hembras, para VCM entre controles con placebos y placebos con vacunados ($p < 0.05$), para CMH y CMHC entre controles y vacunados con $p < 0.05$. En los machos para este mismo tiempo se registraron diferencias para los parámetros de RGR, CMH, CMHC, con $p < 0.05$, para los tres, entre controles y vacunados; y placebos con vacunados. A los 21 días después de aplicada la 2da dosis y realizada la última eutanasia, solo observamos diferencia en los machos para el parámetro de la serie roja correspondiente a CMHC entre placebos y control ($p < 0.05$). En cuanto a los resultados obtenidos en la serie blanca (Tabla No.3), se observó a los 14 días diferencias entre controles y vacunados para los parámetros de N y L ($p < 0.05$). Estas diferencias encontradas, no se consideran de valor toxicológico ya que como se podrá apreciar a continuación en los resultados de los estudios anatomopatológicos; no se observaron daños o lesiones en órganos hematopoyéticos, por otra parte puede haber influido el hecho de la cantidad de animales evaluados en cada eutanasia, toda vez, que los valores medios se correspondieron con los rangos normales descritos en la literatura para las ratas (18, 19) y en particular para la línea Sprague Dawley (13-16).

Estudio Anatomopatológico

En el estudio anatomopatológico macroscópico realizado establecemos que en los animales pertenecientes a los grupos vacunados, placebo y control no se observaron lesiones en ninguna de las cuatros eutanasias realizadas.

Mientras que en los estudios histopatológicos se observaron algunos procesos discretos de reacción por parte del sistema inmune a nivel de los ganglios linfáticos regionales cercanos al punto de inoculación con escasa importancias toxicológica al ser observados en los tres grupos que componían el ensayo; descritos como presencia de folículos secundarios subcapsulares en estos órganos. Los órganos del sistema hematopoyético tales como médula ósea roja, glándulas adrenales, así como otros relacionados a este como el bazo, no evidenciaron cambios o lesiones en ellos. Estos hallazgos han sido descritos en estudios similares, donde se administran productos que activan el sistema inmune como el caso de las vacunas ⁽¹⁷⁾.

Conclusiones

Las ratas SD demostraron ser un modelo animal relevante al responder inmunológicamente al candidato vacunal de *Salmonella typhi conjugada* demostrado por la técnica de ELISA y de forma preliminar no se evidenciaron efectos toxicológicos de este producto a través de los estudios clínicos, hematológicos y anatomopatológicos realizados.

Tabla No.1: Diseño Experimental

Grupos	N/Sexo	Via	Frecuencia Semanas	1er Eutanasia	2da Eutanasia	3era Eutanasia	4ta Eutanasia
Vacuna	12H/12M	I/M	0 y 7	3H/3M	3H/3M	3H/3M	3H/3M
Placebo PBS+Tiomersal	12H/12M	I/M	0 y 7	3H/3M	3H/3M	3H/3M	3H/3M
Control (SSF)	12H/12M	I/M	0 y 7	3H/3M	3H/3M	3H/3M	3H/3M

Leyenda:

H: hembras

M: Machos

SSF: Solución Salina Fisiológica 0.9%

1er Eutanasia: 3 días post a 2da dosis

2da Eutanasia: 7 días post a 2da dosis

3era Eutanasia: 14 días post a 2da dosis

4ta Eutanasia: 21 días post a 2da dosis

Tabla No. 2: Parámetros hematológicos de las células de las serie roja. Ensayo piloto de la vacuna conjugada contra *Salmonella typhi*.

Grupos Experimentales	HGB (g/dl)	RGR (x10 ⁶ /μl)	HCT (%)	VCM (fl)	CMH (pg)	CMHC (g/d)	PLT (x10 ³ /μl)
3 días después de la 2da dosis							
Machos							
Control	13,54±0,50	8,13±0,29	46,80±1,64	57,00±2,55	16,70±0,79	29,28±0,66	608,40±200,82
Placebo	13,80±0,73	7,35±0,60	46,00±5,48	58,20±1,64	18,26±1,47	31,50±3,39	674,20±63,03
Vacunados	13,72±0,28	8,26±0,20	47,40±0,55	58,20±1,64	16,58±0,55	28,64±0,50	785,00±110,66
Hembras							
Control	13,64±0,68	6,82±1,01	45,80±4,76	57,00±1,22	20,34±2,96	35,70±5,56	619,33±186,23
Placebo	11,94±1,51	5,65±0,35	42,60±6,50	58,00±5,00	21,08±2,55	35,52±5,19	586,40±94,45
Vacunados	13,06±0,61	6,83±1,17	46,80±1,92	57,80±1,64	21,46±3,25	37,16±5,51	575,00±188,90
7 días después de la 2da dosis							
Machos							
Control	14,18±0,44	7,64±1,75	47,60±1,52	54,80±4,38	19,52±6,31	36,76±16,30	703,80±115,04
Placebo	14,52±0,54	8,78±0,71	48,60±1,34	57,00±1,58	16,62±1,36	29,12±2,46	688,00±159,95
Vacunados	13,66±0,58	7,95±0,65	46,20±1,79	56,00±1,87	16,74±2,02	29,92±3,74	662,40±208,77
Hembras							
Control	13,98±1,09	6,76±1,35	47,20±2,59	57,20±1,79	20,76±4,04	36,22±7,34	664,12±176,75
Placebo	13,78±0,34	6,71±0,68	46,20±1,48	60,20±2,59	20,42±2,16	34,10±4,98	661,00±182,43
Vacunados	13,40±1,13	5,69±1,03	46,20±2,59	57,40±3,65	24,02±4,09	42,48±10,35	655,80±151,68
14 días después de la 2da dosis							
Machos							
Control	12,86±0,32	7,56±0,30	42,60±1,14	56,00±2,35	16,60±1,53	29,54±1,87	602,00±32,71
Placebo	12,92±0,94	7,33±0,56	43,20±3,42	56,80±1,64	16,60±1,49	29,12±2,63	645,60±151,11
Vacunados	12,10±0,82	5,90±0,74	40,80±1,79	55,00±1,87	20,64±1,88	37,44±2,49	673,60±112,71
Hembras							
Control	11,74±0,36	5,42±0,44	40,40±1,52	59,00±2,35	21,78±2,03	36,94±3,31	606,40±143,60
Placebo	11,46±0,63	5,52±0,59	39,40±3,36	62,60±1,67	20,88±1,75	33,46±3,36	684,00±117,40
Vacunados	11,28±0,49	6,32±0,70	38,60±1,52	62,60±1,52	18,00±1,74	28,88±3,11	543,00±233,92
21 días después de la 2da dosis							
Machos							
Control	12,66±0,61	7,90±0,45	44,60±2,07	57,00±2,55	15,62±0,68	27,54±0,97	734,40±113,94
Placebo	12,68±0,54	8,07±0,45	46,40±2,30	57,00±1,22	15,36±0,70	26,86±0,72	700,00±23,63
Vacunados	11,96±0,63	7,29±0,65	43,00±3,16	56,00±1,58	16,32±0,88	29,04±1,14	734,80±130,49
Hembras							
Control	12,62±0,41	6,49±0,82	44,00±1,73	62,20±4,09	18,36±0,50	29,56±1,67	632,00±149,99
Placebo	12,62±0,45	6,84±0,24	44,00±2,45	62,60±3,05	18,46±0,83	29,40±1,38	716,40±99,59
Vacunados	12,72±0,75	7,01±0,31	44,00±2,45	63,80±2,49	17,86±0,84	28,06±1,41	709,00±40,37

Tabla No. 3: Parámetros hematológicos de las células de las serie blanca. Ensayo piloto de la vacuna conjugada contra *Salmonella typhi*.

Grupos Experimentales	LEUC (x10 ³ /μl)	N (%)	L (%)	M (%)	E (%)
3 días después de la 2da dosis					
Machos					
Control	8,02±1,68	15,80±3,11	84,00±3,08	0,20±0,45	0,00±0,00
Placebo	7,80±1,83	15,60±2,51	83,60±3,21	0,60±0,55	0,20±0,45
Vacunados	8,04±1,87	15,00±2,55	84,00±2,55	0,60±0,55	0,40±0,55
Hembras					
Control	7,06±1,47	11,20±2,59	86,20±6,76	0,40±0,55	0,20±0,45
Placebo	7,82±2,24	27,20±35,12	72,00±35,18	0,60±0,55	0,20±0,45
Vacunados	5,70±1,17	14,20±3,83	85,20±4,02	0,40±0,55	0,20±0,45
7 días después de la 2da dosis					
Machos					
Control	7,60±0,90	15,60±4,16	83,80±4,32	0,60±0,55	0,00±0,00
Placebo	8,90±1,29	13,40±3,44	85,20±2,28	0,80±1,30	0,40±0,55
Vacunados	8,54±1,37	15,20±4,02	84,00±4,80	0,20±0,45	0,20±0,45
Hembras					
Control	6,02±1,54	14,80±5,59	84,00±6,08	0,80±0,84	0,40±0,55
Placebo	6,02±1,51	13,60±4,72	85,60±5,08	0,80±0,84	0,00±0,00
Vacunados	6,24±1,22	16,80±5,07	82,40±4,56	0,60±0,89	0,20±0,45
14 días después de la 2da dosis					
Machos					
Control	6,28±1,67	16,60±6,58	81,80±6,22	0,60±0,55	0,40±0,55
Placebo	10,20±2,77	18,40±9,56	80,00±9,03	1,00±1,22	0,60±0,55
Vacunados	10,68±6,29	32,20±10,78	66,40±10,81	1,00±0,71	0,40±0,89
Hembras					
Control	6,16±2,14	10,40±2,07	88,80±1,92	0,20±0,45	0,60±0,55
Placebo	7,10±1,02	11,80±3,96	88,00±4,00	0,20±0,45	0,00±0,00
Vacunados	9,42±4,12	19,60±10,53	78,00±12,59	1,20±1,30	1,20±1,64
21 días después de la 2da dosis					
Machos					
Control	4,80±1,17	18,40±7,23	79,40±8,08	1,40±0,55	0,80±0,84
Placebo	7,02±2,29	20,20±4,60	78,00±5,10	1,00±0,00	0,80±0,84
Vacunados	7,00±3,91	22,00±4,69	76,00±4,85	1,60±0,55	0,40±0,89
Hembras					
Control	6,34±3,82	18,00±4,53	79,60±4,34	1,60±0,89	0,80±0,84
Placebo	5,52±2,04	18,60±3,58	79,40±3,78	1,00±0,71	1,00±0,00
Vacunados	6,98±2,91	18,20±2,17	80,00±2,55	1,20±0,84	0,60±0,55

Gráfico No.1: Comportamiento del peso corporal ratas SD hembras. Ensayo piloto de la vacuna conjugada contra *Salmonella typhi*.

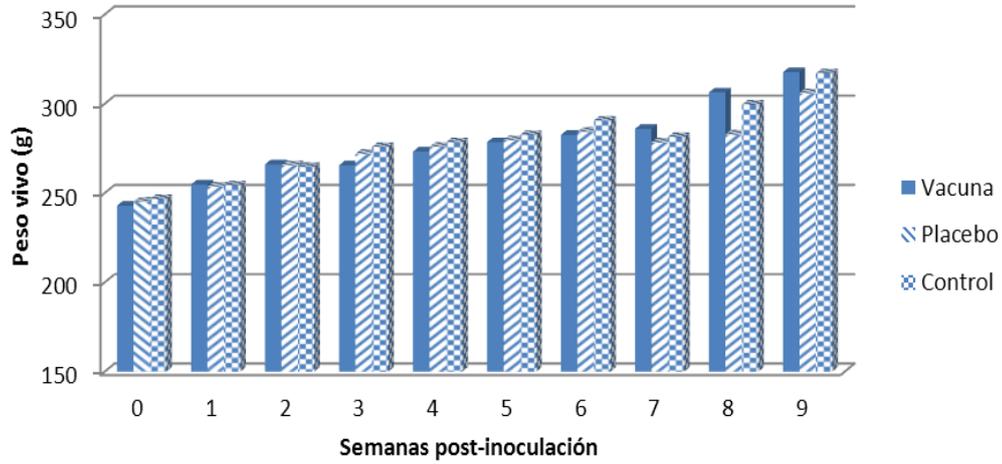


Gráfico No.2: Comportamiento del peso corporal ratas SD machos. Ensayo piloto de la vacuna conjugada contra *Salmonella typhi*.

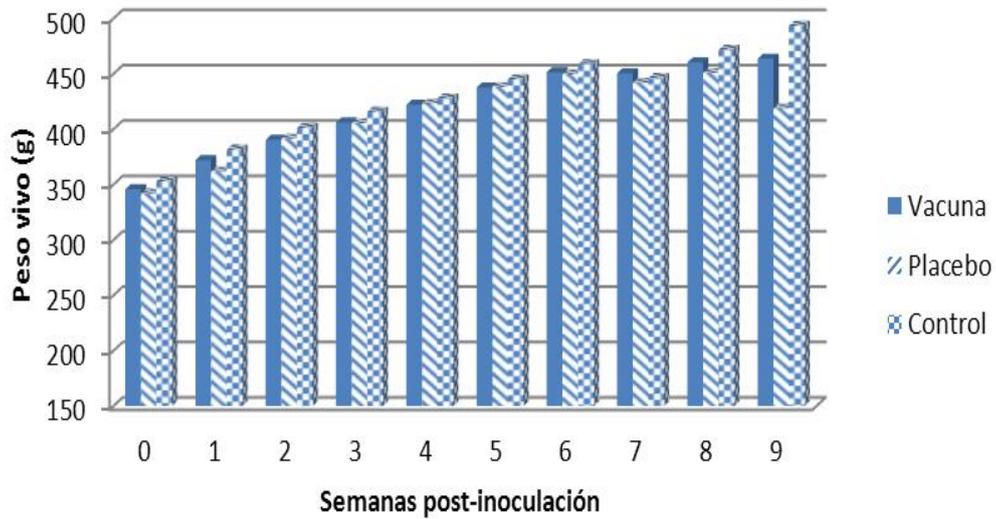


Gráfico No.3: Comportamiento del consumo de agua en taras SD hembras. Ensayo piloto de la vacuna conjugada contra *Salmonella typhi*.

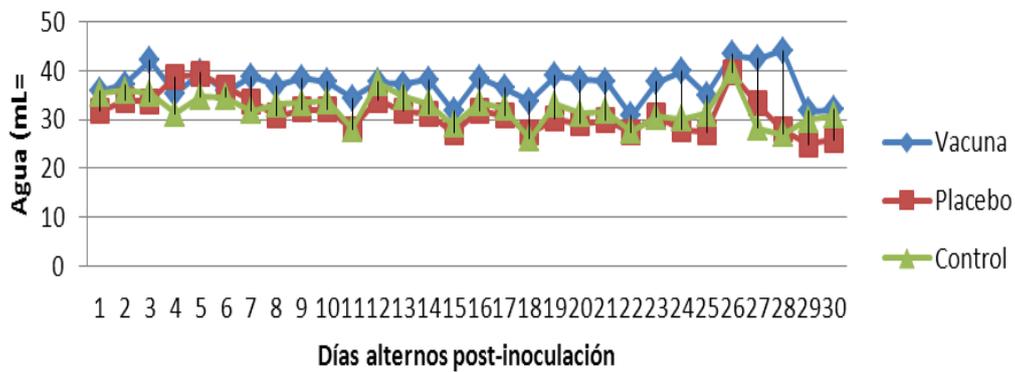


Gráfico No.4: Comportamiento del consumo de agua en ratas SD machos. Ensayo piloto de la vacuna conjugada contra *Salmonella typhi*.

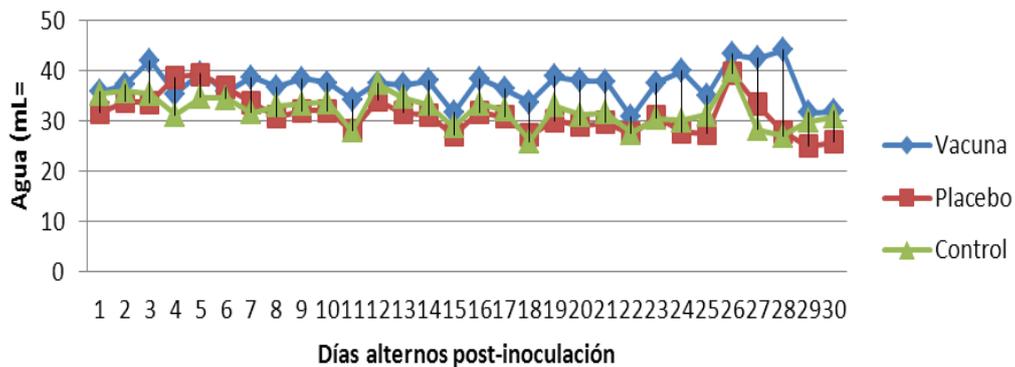


Gráfico No.5: Comportamiento del consumo de alimentos en taras SD hembras. Ensayo piloto de la vacuna conjugada contra *Salmonella typhi*.

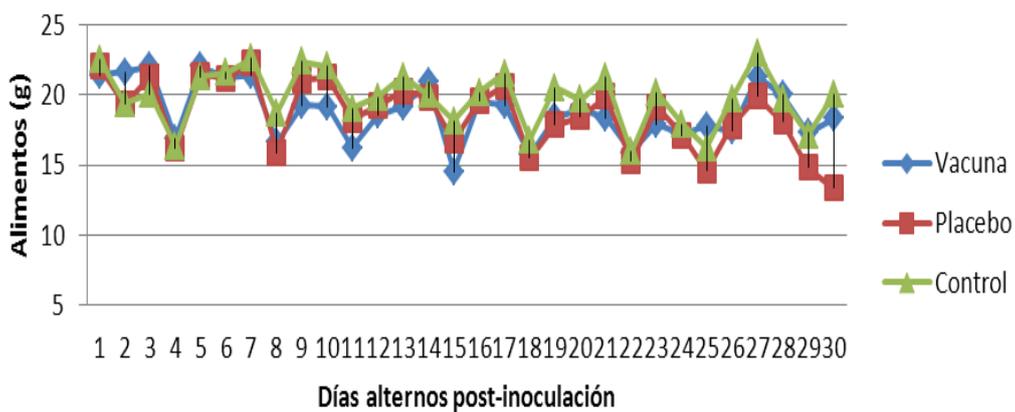
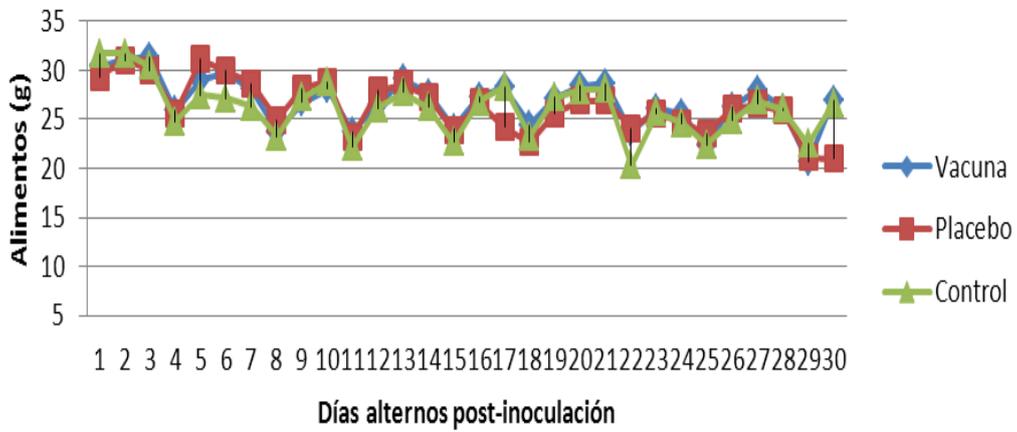


Gráfico No.6: Comportamiento del consumo de alimentos en taras SD machos. Ensayo piloto de la vacuna conjugada contra *Salmonella typhi*.



Referencias

1. Crump JA, Luby SP, Mintz ED. The global burden of typhoid fever. *Bull WHO* 2004; 82(5):346-53.
2. W.H.O.-World Health Organization: Typhoid vaccines: W.H.O. position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2008, 83(6): 49-60.
3. W.H.O.-World Health Organization: Feedback from the regions and countries on the implementation of SAGE recommendations on typhoid vaccines. 2010.
4. Jones C. Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *An Acad Bras Cienc* 2005;77(2):293-324.
5. Stein KE. Thymus-independent and thymus-dependent responses to polysaccharide antigens. *J Infect Dis* 1992;165(Suppl. 1):S49-52.
6. Buenas Prácticas de Laboratorio y Garantía de la Calidad en Ensayos Toxicológicos. Resolución No. 152/92. Editorial Ciencias Médicas. MINSAP 1993.
7. Organization for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Vol 1 and 2. Prot. 407. Paris 1993.
8. Normas sobre Medicamentos de la Comunidad Europea, Vol. III. "Directrices sobre la calidad, seguridad y eficacia de los medicamentos de uso humano". Directrices Fármaco-Toxicológicas. Página 91 (No. 2, secc. B, Cap. I, Parte 2, Anexo A Directiva 75/318/CEE). Versión español. Enero 1989 y 1998.
9. Statsoft for Windows. StatSoft, Inc. (2003). STATISTICA (data analysis software system), version 6.
10. Yulieé López, Marta Pastor, Juan Francisco Infante, Daiyana Díaz, Reynaldo Oliva, Sonsire Fernández, et al. Repeated dose toxicity study of *Vibrio cholerae*-loaded gastro-resistant microparticles. *J Microencapsul*. 2014;31(1):86-92
11. Yulieé López, Juan Francisco Infante, Sergio Sifontes, Daiyana Díaz, Viviana Pérez, Gemma Año et al. Pharmacology and toxicology of an oral tablet whole cells inactivated cholera vaccine in Sprague Dawley rats. *Vaccine* 2011; 29(19):3596-9.
12. Dania Bacardí, Karelia Cosme, Lizet Aldana, Nelson Merino, José Suárez, Omar Mosqueda, et al. Seguridad preclínica de la vacuna Quimi-Hib® adyuvada con fosfato de aluminio durante el desarrollo del producto. *Biotechnol Apl*, abr.- jun. 2013, vol.30, no.2, p.111-117. ISSN 1027-2852.
13. León ACG, Blanco D, Peña A, Ronda M, González B, et al. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en el CENPALAB, Cenp: SPRD. *REDVET*. 2011; 12 (11): 1-10. ISSN 1695-7504. Disponible: <http://www.veterinaria.org/revista/redvet/n111111.html>. Consultado: Diciembre 2014.

14. Charles River Laboratories, Inc. Charles River Labs-Research Models: Sprague Dawley Rat Informational Resources. Disponible: http://www.criver.com/research_models_and_services/research_models/SASCO_Sprague_Dawley.html. Consultado: Diciembre 2014
15. Taconic Technical Library. Taconic Sprague Dawley Phenotyping. Disponible: http://www.taconic.com/addinfo/SD_phenotyping.htm. Consultado: Diciembre 2014.
16. Canadian Council Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals.. Vol. I. Appendix IV. Hematology. Page. 86. ISBN 0-919087-00-0. 1984.
17. Mildrey Fariñas Medina, Daniel Francisco Arencibia Arrebola, Juan Francisco Infante Bourzac, Yolanda Valdés Abreu, Tamara Hernández Salazar, Reynaldo Oliva Hernández. Evaluación de la tolerancia local de la vacuna antimeningocócica ACW135 en ratas Sprague Dawley. Retel. No.42, Febrero-julio 2014. Disponible: <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=905>. Consultado: Enero 2015.
18. Pritchett KR, Corning BF. Biology and Medicine of Rats. In: Laboratory Animal Medicine and Management, Reuter J.D. and Suckow M.A. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), 2004; B2503.0904 (Last Updated: 29-Sep-2004).
19. National Bio Resource Project for the Rat in Japan (Last updated: 03 June 2005) (http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/nbr/strainsx/hematology_list.aspx)

Recibido: 27/02/15

Aceptado: 01/03/15