

ARCHIVO HISTÓRICO



El presente artículo corresponde a un archivo originalmente publicado en el **Boletín de la Escuela de Medicina**, actualmente incluido en el historial de **Ars Medica Revista de ciencias médicas**. El contenido del presente artículo, no necesariamente representa la actual línea editorial. Para mayor información visitar el siguiente

vínculo: <http://www.arsmedica.cl/index.php/MED/about/submissions#authorGuidelines>

Vacunas y otras medidas de prevención de Gastroenteritis Viral y Bacteriana

* D. Herrington

* M. Rennels

* M. Levine

RESUMEN

Los avances en el conocimiento de la etiología y patología de las infecciones entéricas han llevado, en años recientes, al desarrollo de múltiples candidatos de vacunas contra los agentes que producen diarrea, con especial énfasis en aquellos que causan mayor morbilidad, mortalidad y consecuencias nutricionales. Algunas de estas vacunas están completando las últimas fases de evaluación de eficacia en estudios de mayor escala en terreno, mientras otras todavía no alcanzan o están recién empezando esta etapa. Numerosos gobiernos de países en desarrollo tienen el firme propósito de mejorar la atención de salud primaria mediante la inmunización de lactantes. Podemos, entonces, anticipar que en el futuro cercano se incorporarán en los programas de inmunización algunas vacunas nuevas contra infecciones entéricas.

INTRODUCCION

Aproximadamente dos tercios de la población mundial viven bajo condiciones de pobreza; el hacinamiento y las condiciones sanitarias inadecuadas favorecen la transmisión de numerosos patógenos que producen diarrea. La gastroenteritis de origen infeccioso es responsable de altas tasas de morbilidad, mortalidad y consecuencias nutricionales adversas en niños menores de dos años de edad.

En los últimos años se ha producido un aumento considerable en el conocimiento de los agentes que causan diarrea, tanto desde el punto de vista epidemiológico como en sus mecanismos patogénicos; como consecuencia de estos avances se ha hecho posible preparar antígenos para inmunizaciones contra algunos de estos agentes. Estos progresos nos hacen tener optimismo en que en el futuro cercano se pueda contar con novedosas alternativas para el control de infecciones entéricas, especialmente la inmunización con vacunas de alta eficacia y carentes de efectos secundarios. En este artículo se discutirán brevemente las medidas no específicas que son de utilidad en la prevención de diarrea y una puesta al día en las etapas en que se encuentra el desarrollo de variados agentes inmunizantes contra los principales patógenos entéricos.

* Centro de Desarrollo de Vacunas, División de Medicina Geográfica, Departamento de Medicina Interna y División de Enfermedades Infecciosas, Departamento de Pediatría, Escuela de Medicina, Universidad de Maryland, Baltimore.

MEDIDAS INESPECIFICAS PARA PREVENIR LA TRANSMISION DE PATOGENOS ENTERICOS

Lactancia materna. Estudios prospectivos de lactantes en países en desarrollo han mostrado que mientras se mantiene la lactancia materna exclusiva (o se recibe alimentación suplementaria mínima), las infecciones entéricas son muy poco frecuentes y los lactantes siguen una curva de crecimiento normal. Estas observaciones indican un efecto altamente protector de la lactancia materna. Por otra parte, estudios epidemiológicos han demostrado menores tasas de ataque y menor severidad de cuadros gastrointestinales en lactantes alimentados con leche materna.

El balance general de evidencias acumuladas indica que la lactancia materna es altamente protectora contra infecciones entéricas severas. Los factores que contribuyen a este efecto protector incluyen: anticuerpos específicos tipo IgA secretoria (que resiste las enzimas digestivas en el tracto gastrointestinal del lactante), linfocitos, lactoferrina (que por sí sola o en combinación con anticuerpos secretorios tienen actividad antibacteriana), lisosoma, la flora intestinal acidúrica típica de lactantes con leche materna y, finalmente, la limpieza fisiológica de la forma de administrar la alimentación.

Considerando estos factores, la promoción de la lactancia materna es una de las metas más importantes en educación sanitaria en los programas de control de enfermedades diarreicas. Esto es especialmente cierto en áreas en que las condiciones higiénicas son deficientes y el nivel de contaminación ambiental con patógenos intestinales es alto.

Tecnología materna. Los patógenos que causan diarrea se transmiten por agua, alimentos o manos contaminadas con heces. Estudios epidemiológicos ambientales han demostrado que alimentos que se dejan a temperatura ambiente por algunas horas, presentan un alto nivel de contaminación con coliformes. La incidencia de diarrea por *Escherichia coli* enterotoxigénica en lactantes en Bangladesh se correlaciona con la temperatura ambiente y consecuentemente con el nivel de contaminación de los alimentos.

El término "tecnología materna" se acuñó para referirse a intervenciones simples que pueden ser implementadas por las personas que están a cargo

de niños, con el objetivo de minimizar la contaminación fecal del ambiente inmediato de éstos y así disminuir la transmisión de patógenos entéricos. Los fundamentos de este enfoque de educación sanitaria requieren que las madres acepten ciertas prácticas que generalmente significan trabajo adicional, agregando preocupaciones a mujeres que están saturadas de trabajo. Algunas de estas intervenciones incluyen: lavado de manos con agua y jabón antes de preparar los alimentos, después de cualquier manipulación de materiales potencialmente contaminados con heces e, idealmente, antes de tomar al niño; eliminar cualquier alimento perecible que haya estado más de 4 horas a temperatura ambiente; hervir el agua que se usa para preparar alimentos de los niños o el agua que se les da para beber; lavar los utensilios de alimentación con agua caliente. Estas intervenciones son extremadamente simples y verdaderamente son efectivas. Sin embargo, representan una cantidad de trabajo considerable para una madre promedio en poblaciones en desarrollo donde la mujer tiene presiones para realizar un sinnúmero de labores. Además, las irregularidades en la disponibilidad de agua o de combustible, pueden hacer difícil la práctica del hábito de lavarse las manos o hervir el agua. Finalmente, la preparación de alimentos y la forma en que los lactantes y niños menores son criados obedecen generalmente a prácticas culturales y creencias que se pasan de una generación a otra. Como resultado, con frecuencia es muy difícil iniciar cambios importantes en el cuidado de los niños. Toda intervención debe considerar las costumbres y creencias locales, requiriéndose frecuentemente un estudio antropológico previo.

Mejoramiento de las fuentes de agua e instalaciones sanitarias. La intervención más importante para disminuir la transmisión de enfermedades entéricas es la disponibilidad de agua potable y de instalaciones sanitarias para la eliminación de deposiciones. Estas deben ser cultural y tecnológicamente apropiadas y deben proveerse en conjunto con un programa de educación para su uso. Algunos países han realizado avances considerables en proveer de agua potable y medios de eliminación de desechos producidos por el hombre en pueblos pequeños y aldeas rurales. Se han logrado también progresos importantes en el desarrollo de bombas y depósitos para agua, simples, baratos y fáciles de reparar, así como sanitarios apropiados

en áreas donde no hay agua de cañería. Para alcanzar un efecto beneficioso rápido, es indispensable iniciar simultáneamente un programa de educación sanitaria. Sin embargo, la alta tasa de crecimiento de algunas poblaciones (particularmente en regiones de Africa) y prolongadas sequías (también principalmente en Africa), han hecho que se observe poco progreso en la disponibilidad de agua e instalaciones sanitarias en extensas áreas de países en desarrollo. Al mismo tiempo, muchas instalaciones han sido superadas en su capacidad, por el crecimiento de la población y migración a las ciudades.

VACUNAS CONTRA INFECCIONES ENTERICAS

La información epidemiológica disponible apoya la conclusión de que la infección natural previa con *E. coli* enterotoxigénica, *Shigella*, rotavirus y *Vibrio cólera* O1, produce inmunidad protectora. Además, hay evidencias directas por inoculación experimental en voluntarios humanos, que confirman que infecciones por *V. cólera*, *E. coli* enterotoxigénica, *Shigella*, rotavirus y *Campylobacter jejuni* confieren una protección significativa contra inoculación subsiguiente con cepas homólogas (y a veces con cepas de serotipos heterólogos). Estos estudios son el fundamento para intentar desarrollar vacunas y producen cierta confianza en que la inmunización contra agentes de diarrea en niños y adultos podría ser exitosa.

Vacunas contra rotavirus. Desde que el rotavirus fue descubierto en 1973 por la Dra. Ruth Bishop y sus colegas, éste se ha reconocido como el agente más importante de diarrea aguda severa en niños menores. Prácticamente, todos los niños del mundo sufren la infección durante sus primeros años de vida. Se estima que el rotavirus es el responsable de la muerte de sobre un millón de niños por año, debido a diarrea con deshidratación.

La gran importancia de rotavirus como causa de diarrea aguda infantil ha impulsado intensos esfuerzos hacia el desarrollo de una vacuna que, por lo menos, prevenga el desarrollo de diarrea severa y deshidratación. Hasta hoy los mecanismos de protección contra la diarrea por rotavirus no están claramente dilucidados. Como se presume que es importante la producción de anticuerpos locales en el intestino, el desarrollo de vacunas se ha focalizado en la obtención de una cepa atenuada que pueda ser inoculada por vía oral.

Las cepas que han sido probadas inicialmente son heterólogas (producen infección en otras especies), por la simple razón de que es más fácil cultivar cepas virales de animales que cepas de humanos. Tres cepas de rotavirus de animales han sido estudiadas en lactantes: dos cepas de origen bovino y una de mono *rhesus*. La primera cepa bovina evaluada fue la vacuna RIT 4237. Esta cepa es derivada de un rotavirus aislado de Nebraska, causante de diarrea en terneros. Los estudios preliminares demostraron que la vacuna era segura e inmunogénica cuando se administraba a lactantes mayores.

Posteriormente se demostró en Finlandia que esta vacuna producía una protección clínica de 82% contra diarrea de mediana severidad producida por rotavirus, en lactantes de 6 a 12 meses de edad. Sin embargo, estudios de esta vacuna en países en desarrollo no produjeron protección significativa. Otro problema de esta vacuna es que la dosis a administrar era tan alta, que la producción en cultivo de tejido no era eficiente y resultaba muy cara. Actualmente esta vacuna ha sido prácticamente abandonada.

La segunda cepa bovina que ha sido estudiada en niños es la cepa WC3, que está siendo evaluada en el Hospital de Niños de Filadelfia y el Instituto Wistar. Hasta el momento, la vacuna ha demostrado ser moderadamente inmunogénica y no reactogénica. Los datos disponibles en relación a la eficacia de esta vacuna son bastante prometedores.

La vacuna contra rotavirus que ha sido evaluada más extensamente es la cepa de rotavirus de mono *rhesus* MMU 18006 (VRR), que fue aislada originalmente de un mono *rhesus* de 3,5 meses de edad con diarrea aguda. Dos características que inicialmente hicieron a esta cepa particularmente atractiva son: el antígeno de neutralización que es virtualmente idéntico al de rotavirus humano de serotipo 3; y el hecho de que crece fácilmente y en altos títulos en tejidos de cultivo. Estudios en niños han mostrado que esta vacuna produce infección en humanos y es altamente inmunogénica en lactantes con dosis de 10^4 a 10^6 virus. Estudios iniciales en niños mayores y lactantes demostraron que la vacuna se asociaba a un corto período de fiebre y deposiciones de menor consistencia, sin presentar diarrea o vómitos. Un estudio posterior demostró que los episodios febriles eran menos frecuentes y de menor intensidad en lactantes menores que todavía tenían anticuerpos maternos. La eficacia de esta vacuna está siendo evalua-

da en diferentes centros del mundo. Los resultados preliminares de estos estudios sugieren que ha sido eficaz en algunos centros y no en otros. Estas diferencias pueden estar relacionadas con los serotipos prevalentes en las diversas regiones. No hay mucha información en relación a si la infección con un serotipo de rotavirus produce protección cruzada contra otros serotipos. Como es posible que la vacuna proteja solamente contra el serotipo 3, en el laboratorio del Dr. Albert Kapijian en el Instituto Nacional de Salud, Maryland, se han transferido los genes que codifican la producción del antígeno de neutralización (VP7) pertenecientes a los serotipos humanos 1, 2 y 4 a la cepa atenuada de monos *rhesus*. De esta forma, la vacuna tendría cuatro componentes diferentes que podrían administrarse separados o juntos, dependiendo del serotipo predominante en el área. Estas cepas están siendo evaluadas en la actualidad para determinar su seguridad e inmunogenicidad en humanos.

Los esfuerzos para desarrollar una vacuna contra este importante agente de diarrea han sido intensos; son prometedores y, es probable que en el futuro cercano se cuente con una primera generación de vacuna oral para su uso en lactantes.

Vacunas contra *E. coli* enterotoxigénica este es un enteropatógeno no invasor que se adhiere a los enterocitos en la parte proximal del intestino delgado donde produce una enterotoxina termolábil (LT) y/o una enterotoxina termo-estable (ST). ST es un polipéptido de bajo peso molecular (2000-6000). LT tiene una estructura y mecanismo de acción muy similar a la toxina del cólera; consiste en una subunidad biológicamente activa (A) y 5 subunidades que se unen a receptores de membrana (B). La bacteria se adhiere a las células intestinales mediante estructuras proteicas filamentosas de superficie llamadas fimbrias o pili, que actúan como factores de colonización. Se han descrito numerosos tipos antigénicos de fimbrias de *E. coli* enterotoxigénica, entre los cuales se incluyen los factores de colonización antigénicos I y II (CFA/I, CFA/II y fimbria E 8775). Se presume que existen otros antígenos fimbriales que actúan como factores de colonización, campo en el cual se realiza activa investigación.

Se han desarrollado vacunas tanto de antígenos purificados como de bacterias atenuadas para prevenir esta infección.

Vacunas de antígenos purificados. El propósito final sería desarrollar una vacuna sin organismos vivos que combine con toxoide LT/ST con antígenos fimbriales de colonización. Esta vacuna produciría inmunidad tanto antitóxica como anticolonización que funcionaría sinérgicamente. De hecho, en medicina veterinaria se han utilizado con éxito antígenos purificados, incluyendo toxoides y fimbria, en la prevención de infección con este organismo. Estos estudios consistieron en la inmunización parenteral de porcinos y vacas con un toxoide o con fimbria de los tipos K88, K99 o 987 (equivalentes a CFA/I, CFA/II y fimbria E8775 de *E. coli* enterotoxigénica que infectan a humanos); los animales desarrollaron una respuesta inmune específica con detección de anticuerpos en la leche materna. Los porcinos y terneros recién nacidos que amamantaban de estos animales, mostraron una significativa protección contra diarrea grave cuando fueron inoculados con *E. coli* enterotoxigénica que tenía una fimbria homóloga. En contraste, los recién nacidos que amamantaban de animales no inmunizados desarrollaron diarrea de curso fatal. Estos estudios veterinarios estimularon la investigación para el desarrollo de una vacuna de antígenos purificados para proteger contra diarrea causada por estos organismos en humanos.

Un avance notable fue el desarrollo por Klippstein y cols. de toxoides que estimulan la producción de anticuerpos neutralizantes contra LT y ST. Esto fue especialmente importante ya que ST es polipéptido muy pequeño, que había mostrado ser un mal inmunógeno y que no inducía protección cuando se estudió en voluntarios humanos. Klippstein combinó químicamente ST sintética, biológicamente activa, con las subunidades B de LT (subunidades que no son tóxicas sino que se unen a receptores de membrana), resultando un toxoide que tiene menos de 0,15% de la actividad tóxica biológica demostrada por las toxinas originales usadas en su producción.

Estos autores ya iniciaron la prueba de este toxoide en humanos.

Recientemente, los mismos investigadores produjeron una vacuna completamente sintética que combina ST sintética y un péptido sintético de la subunidad B de LT y demostraron su inmunogenicidad en voluntarios.

Otros antígenos purificados bajo evaluación como vacunas orales, son las fimbrias CFA/I y CFA/II. Estudios realizados en conejos han mos-

trado que tanto CFA/I como CFA/II son altamente inmunogénicos y han producido una potente respuesta de IgA intestinal. Sin embargo, en estudios preliminares en humanos, esta vacuna no ha sido efectiva, lo que se ha atribuido a la posible acción de las enzimas gástricas proteolíticas sobre las proteínas fimbriales. Esto ha incentivado la búsqueda de formulaciones que liberen la vacuna sólo una vez pasado el estómago.

E. coli enterotoxigénica atenuada. El otro enfoque de prevención de diarrea por este agente en humanos está encaminado al uso de cepas atenuadas que contengan los antígenos críticos para producir una respuesta inmune adecuada. Se presume que algunas cepas serán capaces de colonizar el intestino delgado después de la administración oral de una dosis única y producir una respuesta inmune adecuada a los antígenos críticos, sin causar efectos secundarios significativos. El reconocimiento de los antígenos críticos es básico en este enfoque, ya que las cepas de *E. coli* enterotoxigénica constituyen un grupo heterogéneo en cuanto a serotipos O:H, producción de toxinas de fimbria presentes en su superficie. La disponibilidad de tecnología de recombinación de ácido desoxiribonucleico (ADN) ha hecho posible la construcción de cepas que comparten múltiples antígenos críticos en una combinación que no se encuentra en la naturaleza.

El prototipo de cepa atenuada, E1392-75-2A, fue investigado por Levine y cols. Esta cepa, que fue proporcionada por el Dr. Bernard Rowe, Colindale, Londres, Inglaterra, es una variante no enterotoxigénica con factor de colonización II, derivada de una cepa enterotoxigénica. Aunque aproximadamente un 20% de los receptores de esta vacuna desarrollaron escasas deposiciones sueltas después de la administración de la vacuna, se produjo una alta producción de anticuerpos anti-CFA/II tanto en fluido intestinal (IgA), como en suero (IgG) y una dosis única confirió protección significativa contra la inoculación experimental en voluntarios con cepas patógenas de *E. coli* enterotoxigénica. Basados en estos prometedores resultados preliminares, se le han incorporado a esta misma cepa, mediante técnicas de recombinación de ADN, genes que codifican para la producción de otros antígenos críticos como la subunidad B de la toxina termoestable. Otros investigadores han intentado insertar genes de la subunidad B y de los factores de colonización en la cepa atenuada

da T y 21a de *Salmonella typhi* que en sí no produce diarrea. Entre las ventajas de obtener una vacuna oral viva atenuada contra *E. coli* enterotoxigénica, se mencionan la capacidad de inmunizar con un número de dosis menores y a bajo costo.

Estos serían factores importantes para su uso en áreas de menor desarrollo.

Vacunas contra E. coli enteropatógena. Los serotipos de *E. coli* enteropatógena que se conocían como agentes de diarrea infantil en los años 1940 a 1950 se reconocen actualmente como un grupo separado de *E. coli* que causan diarrea por mecanismos no mediados por producción de toxinas de LT o ST ni por invasión de las células intestinales. Estos organismos poseen un plasmidio de peso molecular entre 55 a 65 MDa que contiene los genes que permiten a la bacteria adherirse a células HEP-2 en tejidos de cultivo y a los enterocitos *in vivo* con una lesión histológica patognomónica al microscopio electrónico. Los genes del plasmidio que codifican estas propiedades han sido llamados "factor de adherencia enteropatógena" (FAE). Los plasmidios que contienen FAE se encuentran en la mayoría de las cepas de *E. coli* con serogrupos 055, 011, 0119, 0127, 0128 y 0142. Estos serogrupos se conocen actualmente con el nombre de *E. coli* enteropatógena clase I. Un segundo grupo o clase II está compuesto por *E. coli* enteropatógena de serogrupos 044, 086 y 0114, en los cuales plasmidios con FAE son muy poco frecuentes.

Estudios en voluntarios han demostrado que, en las *E. coli* de clase I, es necesaria la presencia del plasmidio con FAE para la expresión completa de la patogenicidad de la bacteria. Se encontró también que las bacterias con plasmidios con FAE elaboran una proteína de membrana de peso molecular 94.000, que no se encuentra en otras *E. coli* y los individuos infectados con estos organismos tienen una significativa respuesta inmunológica contra esta proteína. Este hallazgo permite la posibilidad de desarrollar una vacuna contra *E. coli* enteropatógena, purificando esta proteína de membrana y administrarla por vía oral o bien traspasar los genes que codifican su producción a una bacteria transportadora como podría ser la cepa atenuada de *Salmonella typhi* T y 21a u otras cepas atenuadas.

Vacunas contra Shigella. En contraste con *E. coli* enterotoxigénica, las especies del género *Shigella*

son organismos invasores, que penetran y se multiplican en los enterocitos del intestino delgado distal y colon. Un número muy pequeño de organismos (tan bajo como 10 organismos/ml en el caso de *S. dysenteriae*) son capaces de iniciar la infección, lo que la hace una infección altamente contagiosa. Las vacunas a bacterias muertas consistentes en organismos intactos inactivados, han demostrado ser inefectivos como vacunas, tanto en inoculación experimental en voluntarios como en estudios de terreno en mayor escala. La vacuna a organismo atenuado mejor estudiada es la cepa dependiente de estreptomycin desarmada por Mel y cols. Estas vacunas, sin embargo, no tienen utilidad en salud pública porque requieren de múltiples dosis para estimular la inmunidad y no se conoce la lesión genética precisa para su atenuación.

Elegantes investigaciones, llevadas a cabo por Formal y col, sobre los mecanismos moleculares de patogenicidad de la *shigellosis* han permitido nuevos enfoques en el desarrollo de vacunas contra estos agentes. Los genes que determinan la producción de antígenos considerados inmunológicamente importantes, son transferidos a organismos no patogénicos que actúan como transportadores, expresan estos antígenos y los presentan a las células inmunes intestinales.

Una de estas cepas desarrolladas fue la producción de un híbrido de *Shigella sonnei*/*Salmonella typhi* para la administración oral. Formal y col. movilizaron un plasmidio de 120 Mda de *S. sonnei* que contiene los genes que codifican para la producción de antígeno 0, a la cepa de vacuna de *S. typhi* Ty21a. El híbrido resultante, *S. typhi* 5076-1C, produce los antígenos 0 de *S. typhi* y *S. sonnei*. Esta cepa se ha demostrado que es segura, genéticamente estable, muy inmunogénica y confiere protección contra la inoculación experimental, según se ha demostrado en estudios en voluntarios humanos. En 1987 han sido iniciados estudios de terreno con esta cepa a mayor escala.

Formal y col. han preparado además una vacuna contra *S. Flexneri* 2a, mediante la inmovilización del plasmidio de este organismo que confiere su invasividad y codifica la producción de su antígeno 0, a una cepa de *E. coli* K-12. Esta vacuna ha demostrado ser segura e inmunogénica en monos y, en el futuro cercano, se realizarán estudios de efectos secundarios e inmunogenicidad en humanos.

BIBLIOGRAFIA

1. Mata, L.J.: The children of Santa Maria Cauqué. A prospective field study of health and growth Cambridge MASS: MIT press, 1978.
2. Kanaaneh, H.: The relationship of bottle-feeding to malnutrition and gastroenteritis in a pre-industrial setting. *J. Trop. Pediat.* 18:302-306, 1972.
3. Mata, L.J.; Urrutia, J.; Lechtig, A.: Infection and malnutrition of children of a low socioeconomic rural community. *Am. J. Clin. Nutr.* 24:249-254, 1971.
4. Jelliffe, D.B.; Jelliffe E.F.P.: Breast milk and infection and nutrition of children of a low socioeconomic rural community. *Am. J. Clin. Nutr.* 24:249-254, 1971.
5. Feachem, R.G.; Koblinsky, M.A.: Interventions for the control of diarrhoeal diseases among young children: promotion of breast feeding. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 62:271-291, 1984.
6. Black, R.E.; Merson, M.H.; Rowe, B.; et al.: Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea: acquired immunity and transmission in an endemic area. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 59:263-268, 1981.
7. Kapikian, A.Z.; Wyatt, R.G.; Greenberg, H.B.; et al.: Approaches to immunization of infants and young children against gastroenteritis due to rotavirus. *Rev. Inf. Dis.* 2:459-469, 1980.
8. Vesikari, T.: Progress in rotavirus vaccination. *Pediat. Infect. Dis.* 4:612-614, 1985.
9. Edelman, R.: Development and deployment of rotavirus vaccines. *Pediat. Infect. Dis.* 6:704-710, 1987.
10. Levine, M.M.; Kaper, J.B.; Black, R.E.; et al.: New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. *Microbiol. Rev.* 47:515-550, 1983.
11. Tramont, E.C.; Chung, R.; Berman, S.; et al.: Safety and antigenicity of typhoid- *Shigella sonnei* vaccine (strain 5076-1C). *J. Infect. Dis.* 149:133-136, 1984.
12. Black, R.E.; Levine, M.M.; Clements, M.L.; Lonsky, G.; Herrington, D.; Berman, S.; Formal, S.B.: Prevention of Shigellosis by a *Salmonella typhi*-*Shigella sonnei* bivalent vaccine. *J. Infect. Dis.* In press.
13. Levine, M.M.; Tramont, E.C.: Vaccines against enteric infections. *Front. Gastrintest. Res.* 13:355-369, 1986.