

Desarrollo de vacunas basadas en bacterias lácticas para inducir inmunidad en mucosas contra VIH[□]

Itza Luna Cruz*, Cristina Rodríguez Padilla*, Reyes S. Tamez Guerra*, Juan M. Alcocer González*



La epidemia de SIDA es el problema de salud pública más complejo en la actualidad y su impacto se refleja en la vida social y económica del mundo. El número de casos diagnosticados de VIH en el mundo por ONUSIDA, hasta diciembre del 2002, es de 42 millones. En México el número de casos hasta el 30 de septiembre de 2001

fue de 50,713 (Secretaría de Salud). México ocupa 13vo. lugar globalmente y el tercero en América en el número total de casos reportados.

Para nuestro país y otros en Latinoamérica es urgente el desarrollo y la aplicación de una vacuna que disminuya las tasas de morbilidad y mortalidad a causa de esta infección.¹ En la actualidad, virtualmente todas las infecciones por el VIH tienen como puerta de entrada las superficies de las mucosas, ya sea la genital para los casos de transmisión heterosexual; la mucosa gastrointestinal para los casos de transmisión vertical en el útero o después del parto por medio de la leche materna infectada;^{2,3} y en los casos de transmisión homosexual por contacto oral-genital o anal-genital.^{4,5} El tejido de las mucosas cuenta con un sistema inmune local con propiedades y funciones que en muchos aspectos están separados del resto del sistema inmunológico, por tal mo-

tivo, para combatir este virus y otros patógenos es necesario desarrollar vacunas que induzcan a inmunidad o protección en las mucosas, que son el sitio primario de entrada.^{6,7} Por otro lado, los vectores basados en bacterias recombinantes vivas representan una nueva tecnología para el desarrollo de vacunas:^{8,9} los vectores bacterianos recombinantes que se utilizan principalmente son: bacterias comensales, seguras e inocuas (bacterias ácido-lácticas)^{10,11,12} y bacterias patogénicas atenuadas (*Salmonella*,^{13,14,15} *Shigela*,^{16,17} *Listeria*,^{18,19,20,21} etc.). Las bacterias ácido-lácticas son microorganismos comensales de la mucosa intestinal y la genital; se han utilizado por muchos años en la industria de alimentos lácteos y por ende son bacterias comestibles, inocuas y amigables a nivel de la flora intestinal y vaginal;²² estas características las convierten en vectores ideales para el desarrollo de vacunas.^{23,24}

Es necesario encontrar nuevas vías y nuevos sistemas eficaces y seguros, que induzcan a inmunidad local y sistémica contra el virus, siendo el propósito de la presente investigación desarrollar bacterias ácido-lácticas modificadas genéticamente para generar vacunas basadas en vectores bacterianos vivos, seguros e inocuos y capaces de inducir inmunidad humoral contra el VIH en las mucosas.

Materiales y métodos

Construcción del plásmido recombinante

Se diseñaron dos oligonucleótidos para amplificar

□ El presente artículo está basado en la investigación «Desarrollo de vacunas basadas en bacterias lácticas: expresión de antígenos del VIH en *Lactococcus lactis* para inducir inmunidad en mucosas» galardonada con el Premio de Investigación UANL 2002 en la categoría de Ciencias Naturales otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre 12 de 2002.

* Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. E-mail: jalcocer@fcb.uanl.mx

por PCR el gen que codifica para la proteína de envoltura gp 120 del VIH subtipo B de 1447pb; a cada nucleótido se le añadió un sitio de reconocimiento para las enzimas Apa I y Xho I, respectivamente, para facilitar su clonación. El producto obtenido por PCR se purificó por medio del método comercial Gene-Clean II, y se clonó en el vector comercial pGEM-T. Se seleccionaron las colonias blancas que contenían el inserto de nuestro vector con el gen gp 120 por medio de un prep rápido; dichas colonias fueron caracterizadas por medio de la purificación del plásmido (mini-prep), seguido de la digestión enzimática con Apa I y Xho I que liberaron el inserto de 1447pb; se purificó el fragmento y se subclonó en el plásmido pVE5508 (obtenido del INRA, Francia) generando el plásmido p59Mgp120, el cual posee el promotor fuerte P59 específico de *Lactococcus* y la secuencia que codifica para el fragmento de anclaje en pared celular de la proteína M de *Streptococcus pyogenes*. Posteriormente se transformó a *L. lactis* por electroporación (Electro Square Porator ECM 830 BTX) en una cubeta de electroporación (Cuvettes Plus 4 mm BTX) con un pulso de 2500 volts, 200 oms, p.lenght 10 ms, 25 mf. Esta preparación se incubó en presencia de caldo M17 y posteriormente se siembran 100 ml de ésta en agar M17 (DIFCO), con 0.5 % de sacarosa y 5 µg /ml de eritromicina.

Detección de la expresión de la proteína gp120 del VIH en L.lactis por Western Blot

Para determinar si el *Lactococcus* expresa la proteína gp 120, las colonias seleccionadas, anteriormente se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12% y se transfirieron en una cámara semiseca a una membrana de nitrocelulosa, y en ellos se detectó la presencia de proteína con un anticuerpo primario 1:1000 (IgG anti-gp120 VIH monoclonal de ratón, CHEMICON) por quimioluminiscencia.

Detección de la expresión en la superficie externa de la proteína gp120 del VIH en L.lactis mediante el análisis de Whole-Cell ELISA

Sembrar la cepa de *L.lactis* a una densidad óptica de 0.6, centrifugar 10 min. a 10,000 rpm, resuspender el pellet en 1ml de PBS; repetir el paso anterior tres veces, cubrir la placa de ELISA con 200 µl de *L.lactis* en PBS e incubar toda la noche a 4°C;

descartar el exceso de bacteria, lavando tres veces con PBS-tween al 0.5%; bloquear la placa con 150µl de BSA al 3% en PBS-tween 0.5%, incubar 2 horas a 37°C, lavar tres veces con PBS-tween al 0.5%; adicionar 100 µl del anticuerpo primario (suero de paciente positivo por PCR y ELISA para VIH), incubar 2 horas a 37°C, lavar 3 veces con PBS-tween al .05%, adicionar 100µl del anticuerpo conjugado anti-IgG humano peroxidasa; incubar una hora a 37°C; lavar 3 veces con PBS-tween al 0.5%; y adicionar 100µl del sustrato ABTS, incubar por 5-10 minutos, adicionar solución de paro (fluoruro de sodio) y leer a 405 nm.

Grupos experimentales

Se realizaron los siguientes experimentos en grupos de tres ratones de 6 a 8 semanas de edad por unidad experimental: a) Se inmunizaron ratones por vía oral por medio de una sonda pediátrica con una sola dosis de 10^9 *Lactococcus* recombinantes vivos expresando la gp 120 de VIH y con 10^9 *Lactococcus* que no expresan la gp 120 como control. b) Se inmunizaron ratones por vía oral con tres dosis a los 0, 14 y 28 días de 10^9 *Lactococcus* recombinantes expresando la gp 120 del VIH y con 10^9 *Lactococcus* que no expresan la gp 120 como control.

Obtención de muestras

Se analizó la respuesta inmune en los animales inmunizados con *Lactococcus* recombinantes y no recombinantes, obteniendo a diferentes tiempos (10, 18 y 24 días después de la inmunización con una sola dosis; y a los siete días después de la última inmunización para los de tres dosis) muestras de suero, heces, lavados estomacales e intestinales, linfocitos de bazo y una muestra de intestino para histología. Analizando la producción de anticuerpos específicos contra gp 120 de VIH, la respuesta proliferativa, posibles daños en las mucosas y expresión de CD4 y Mac.

Medición de anticuerpos IgG e IgA en lavado estomacal, intestinal, heces y suero contra gp 120 por ELISA

Medición de anticuerpos por un kit comercial (viro-nostika). Para la medición de anticuerpos IgG e IgA específicos contra el VIH utilizamos una placa comercial, la cual contiene antígeno VIH-1 y se realizó

un Whole-Cell ELISA, donde se utilizó la bacteria como antígeno. Se recubrió la placa con 200 µl de lavado estomacal, intestinal, heces o suero; se incubó toda la noche a 4°C, se lavó la placa, se adicionaron 100 µl del segundo anticuerpo antiratón IgG o anti-IgA (SIGMA) conjugados con fosfatasa alcalina; se lavó y se adicionó el sustrato pNPP 2mg/ml (para- nitrofenilfosfato SIGMA), se incubó por 1 hora a 37°C y, finalmente, se leyó en un microlector de ELISA (BIOTEK Instruments) a 405nm.

Análisis histológico de los epitelios en estómago e intestino delgado

Para el análisis histológico de los epitelios en estómago e intestino se obtuvieron dos piezas de tejido de estómago e intestino de ratones inmunizados con una sola dosis de *L. Lactis* que expresa la gp120 y *L. lactis* normal; los cortes fueron aproximadamente de 1cm cada pieza y se fijaron en formalina al 10%, posteriormente se realizaron cortes histológicos de las muestras obtenidas sobre una laminilla y se tiñeron con hematoxilina y eosina; finalmente se colocó una gota de resina y un cubreobjetos para observar con microscopio.

Detección de la expresión de CD4 y Mac en la mucosa del estómago e intestino delgado por inmuno-histoquímica

Para la detección de la expresión de CD4 y Mac, utilizamos un kit para inmunohistoquímica (DAKO) para tal efecto se utilizó la siguiente técnica: colocamos la laminilla en xilol I por 5 min., posteriormente en xilol 2 por 5 min, deshidratamos el tejido con OH 100%, 80%, 70%, 50% por cuatro minutos cada uno, lavamos con agua; posteriormente aplicamos antígeno retroviral a 80°C por 20 minutos, enfriamos a temperatura ambiente, lavamos con agua destilada y con buffer; colocamos el bloqueador de peroxidasa al 3% (H₂O₂), lavamos con buffer; bloqueamos con biotina por 5 minutos, lavamos con buffer; adicionamos el anticuerpo primario en una dilución de 1:200 (anti-macrófago o anti-CD4) por 20 minutos, lavamos con buffer; adicionamos el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa por 15 minutos, lavamos con buffer; aplicamos estreptavidina por 15 minutos, lavamos con buffer; revelamos con diaminobenzidina por 30 segundos, lavamos con agua destilada, sumergimos la laminilla en hematoxilina por 20 segundos, la-

vamos con agua, posteriormente sometimos la laminilla a los alcoholes al 50%, 70%, 80%, 100%, xilol II y xilol I; finalmente, colocamos una gota de resina y un cubreobjetos para observar al microscopio.

Resultados

Teniendo la construcción deseada del vector en *L. Lactis*, se llevó a cabo el análisis de la expresión de la proteína recombinante.

P59gp120

Detección de la expresión de la proteína gp120 del VIH en L. lactis

Análisis por Western Blot

El Western Blot mostró la presencia de una sola proteína del tamaño esperado en varias clonas de *L. lactis*, mientras que donde se colocaron los extractos proteicos de las cepas control de *L. lactis* no se detectó banda alguna (figura1), es necesario hacer notar que aparentemente la clona 1 de *L. lactis* colocada en la línea 3 tiene un mayor nivel de expresión que las otras clonas de *L. lactis*.

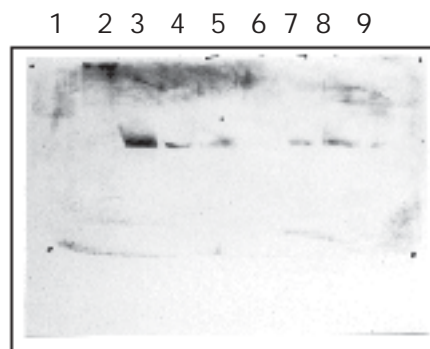


Fig. 1 Detección de la expresión de la proteína gp120 del VIH en *Lactococcus lactis* por Western Blot

Detección de la expresión en la superficie externa de la proteína gp120 del VIH en L. lactis

Análisis de Whole-Cell ELISA

Para detectar la gp120 en la superficie de *L. lactis* se utilizó suero de paciente VIH positivo por PCR y positivo para anticuerpos contra el virus por un ELISA comercial, también se usó suero de un individuo

negativo para VIH, como control. La clona 1 de *L. lactis* recombinante reaccionó significativamente con el suero del paciente con VIH (absorbancia de 1.8), mientras que la reacción por este sistema de ELISA con un suero normal tuvo una absorbancia 1.1 aproximadamente. De estos datos se deduce que la bacteria recombinante presenta adecuadamente la gp 120 en su superficie; ésta ha sido reconocida por los anticuerpos de un paciente con VIH generados en la infección natural, lo cual puede indicar que la clona 1 de *L. lactis* recombinante muestra en su superficie externa una gp120 con una conformación similar a la que muestra el virus durante el proceso de infección natural (figura 2).

Medición de anticuerpos IgG e IgA

Cuando administramos la bacteria recombinante por vía oral, se encontró que los niveles de IgG presentes en estómago fueron significativamente altos 10 días después de la inmunización con respecto a los otros tiempos en ambos sistemas; de igual manera, los niveles de IgG fueron significativamente altos en los lavados de ratones inmunizados con 3 dosis de 10^9 bacterias. Respecto a los niveles de IgA monomérica en estómago, no se encontraron diferencias significativas con respecto al control en los lavados de ratones inmunizados con 1 sola dosis y tampoco con tres dosis de bacteria (figura 3).

En intestino se detectaron niveles significativos de IgG a los 10 y 18 días de la inmunización con 1 dosis de bacteria en el ELISA comercial. Los niveles de IgA en intestino son significativamente altos 24 días después de la inmunización en el ELISA comercial; mientras que en los lavados de ratones inmunizados con 3 dosis solamente hay diferencias significativas en los niveles de IgG (figura 4).

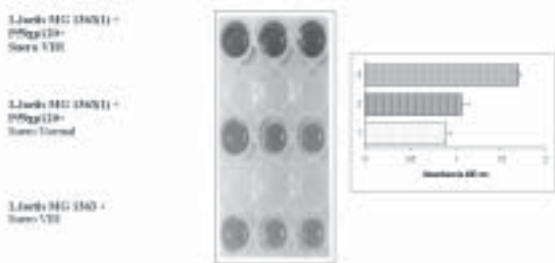


Fig.2 Detección de la expresión en superficie de la proteína gp 120 del VIH en *L. lactis* por Whole-Cell-ELISA.

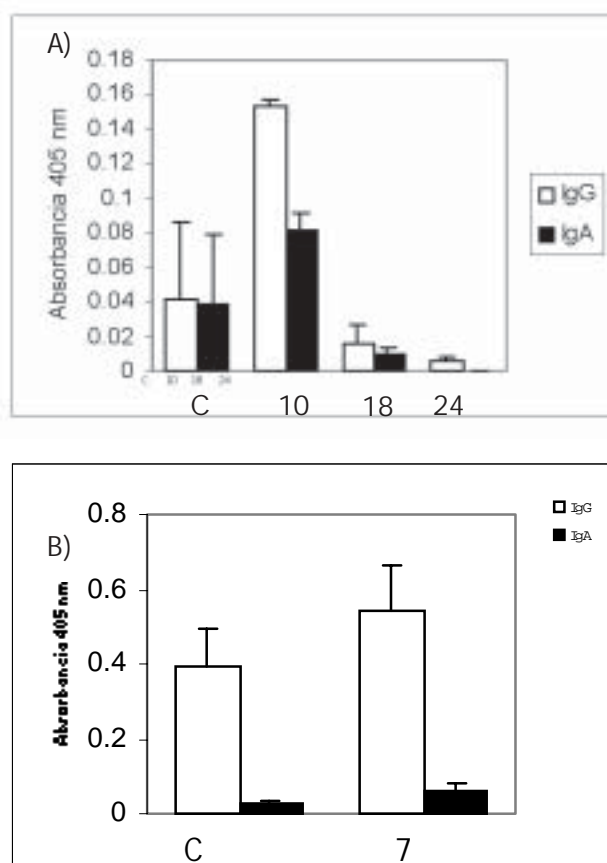


Fig.3.- Niveles de anticuerpos en lavado estomacal con 10^9 bacterias en A) 1 dosis y B) 3 dosis.

En cuanto a los niveles de anticuerpos en heces, aparentemente sólo la IgG parece tener valores significativos a los 10 días de la inmunización, mientras que en las muestras de ratones inmunizados con tres dosis no hay niveles significativos con respecto al control ni de IgG ni de IgA. Con respecto a los niveles de anticuerpos en suero, la IgG y la IgA se encuentran elevadas a los 10 días de la inmunización con la bacteria en el ELISA comercial; los niveles de IgA en suero aparentemente se encuentran ligeramente elevados a los 10 días de la inmunización (figura 6).

En lo que respecta al nivel de anticuerpos en suero de ratones inmunizados, con 3 dosis de bacterias recombinantes, solamente la IgG presenta niveles significativos con respecto al control (figura 6).

Análisis histológico de los epitelios en estómago e intestino delgado

El análisis histológico de las mucosas del estómago

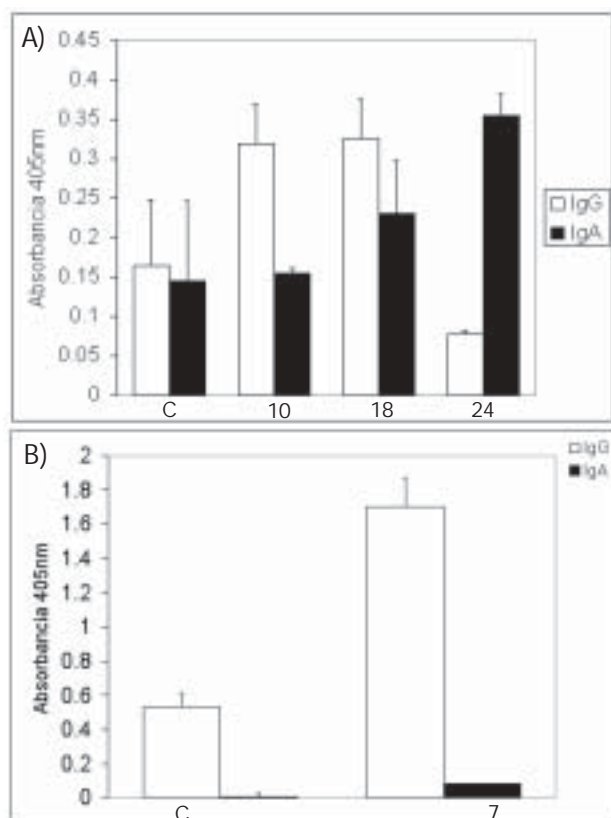


Fig. 4.- Niveles de anticuerpos en lavado intestinal con 10^9 bacterias en A) 1 dosis y B) 3 dosis

y del intestino a los 10, 18 y 24 días de la inmunización oral de 10^9 bacterias, indicó que no existen diferencias histológicas en los epitelios, que sean indicativas de daño o de alteraciones, pese a la administración de las bacterias normales y recombinantes.

Detección de la expresión de CD4 y Mac en la mucosa de estómago e intestino delgado por inmuno histoquímica

En la detección por inmuno histoquímica de la expresión de marcadores de linfocitos T(CD4) y macrófagos o monocitos (Mac), se encontró que hay un incremento en la expresión de CD4 y Mac en la mucosa del estómago y del intestino de los ratones inmunizados con *L.Lactis* recombinante a los 10 días, en comparación con la expresión en las mucosas de los ratones a los que se les administró la *L.Lactis* control (normal). Estos datos indican en conjunto que la administración oral de *L. lactis* modificada para expres-

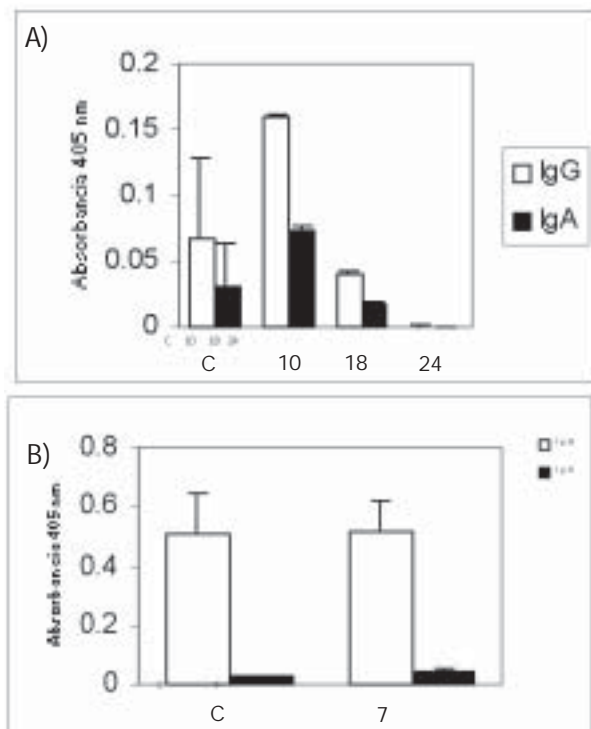


Fig.-5 Niveles de anticuerpos en heces con 10^9 bacterias en A) 1 dosis y B) 3 dosis.

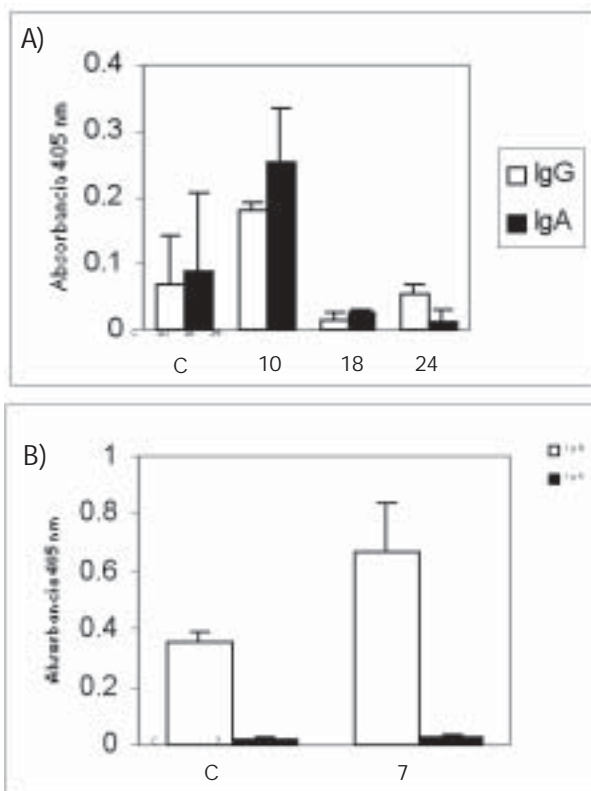


Fig.-6 Niveles de anticuerpos en suero con 10^9 bacterias en A) 1 dosis y B) 3 dosis.

sar la gp120 induce la producción de anticuerpos específicos en mucosas y en suero, así como la producción de linfocitos específicos contra el VIH y se asocia a un incremento en la expresión de CD4 y Mac en las mucosas. Por tanto, la inducción de inmunidad en mucosas usando bacterias lácticas modificadas para presentar en mucosas antígenos del VIH puede representar una estrategia tecnológica innovadora para desarrollar una vacuna contra el SIDA efectiva y segura.

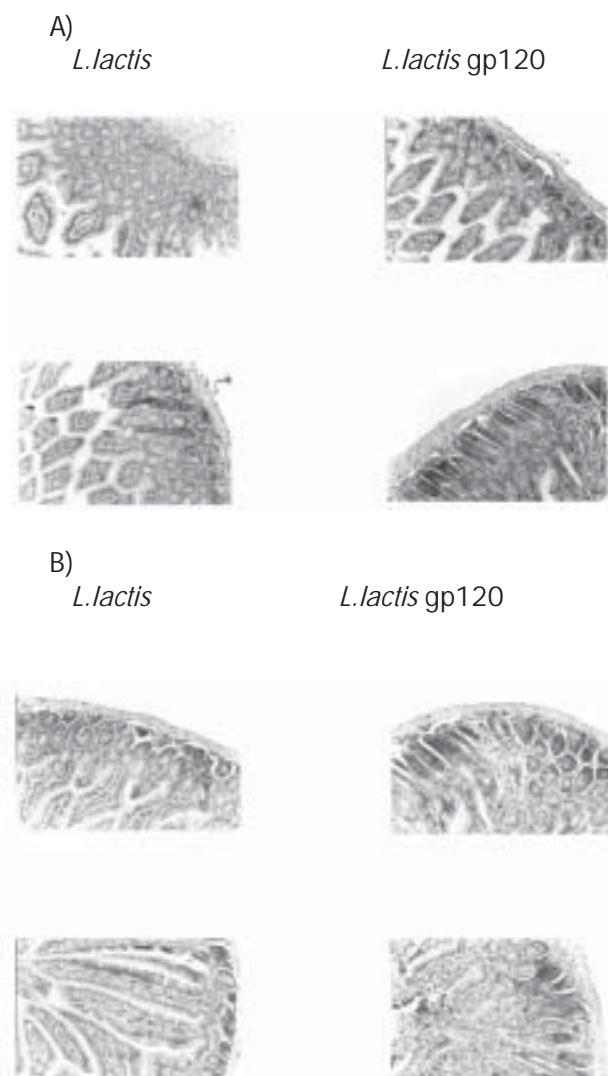


Fig.-7. Detección de la expresión de A) CD4 y B) Mac por Inmunohistoquímica en la mucosa intestinal. Los tejidos fueron obtenidos a los 10 días de la administración oral con una dosis de 10^9 bacterias.

Discusión

De los resultados obtenidos se deduce que la mayor respuesta encontrada de IgG fue a los 10 días de la inmunización, a diferencia de la IgA, que no se ve incrementada significativamente excepto en el examen del lavado intestinal. En resumen, encontramos que los niveles de IgG presentes en suero, en heces y mucosas (estómago, intestino delgado) fueron significativamente más altos a los 10 días de la inmunización con respecto a otros tiempos. Respecto a la IgA monomérica, solamente en intestino y en suero se detectaron niveles significativos; los máximos valores obtenidos de IgG se observaron cuando se inmunizó a los ratones con tres dosis de bacteria. A diferencia de un estudio donde se analizó el nivel de IgG y de IgA en ratones inmunizados por vía nasal con gp120 oligomérica, en el cual se detectó una fuerte respuesta de IgG y de IgA sistémica; sin embargo, esos autores no detectaron respuesta en lavados de mucosa vaginal, y en heces detectaron una débil respuesta de IgA²⁵. En otro estudio en el que también se midió la respuesta inmune en mucosas contra la toxina tetánica expresada en *Lactobacillus*, se inmunizaron ratones vía nasal con 10^9 bacterias y se encontró que los títulos de IgG en suero eran significativos en comparación con los controles y que la respuesta de IgA en mucosas también representaba valores significativos a los 10 días de la inmunización con 2 dosis de bacteria, pero cuando se inmunizaba con una sola dosis los valores de IgA no fueron significativos.²⁶

Otra estrategia para la generación de anticuerpos contra el VIH es la realizada por Giraud y cols.,²⁷ quienes inmunizaron ratones con RNA desnudo del vector SFV fusionado con la proteína gp 140 del VIH. Cuando cuantificaron la respuesta de IgG en suero a diferentes tiempos de inyección del virus (0, 10, 24, 38 y 60 días), encontraron que los niveles de IgG aparecieron en las muestras coleccionadas después de la segunda dosis, en el vigésimo cuarto día. Otro estudio que relaciona el nivel de anticuerpos con la dosis es el de Bruce y cols.,²⁸ inmunizan ratones con 10^8 o 5×10^7 adenovirus recombinantes con env; estos autores encuentran que los títulos de IgG en suero son mayores con la dosis alta y con bajas dosis los títulos son bajos. Podemos concluir que los valores obtenidos de IgG e IgA, en el presente estudio, en suero y sobretodo en mucosas con una sola dosis y con tres dosis significativas e impor-

tantes en la protección contra el VIH.

Con el objetivo de determinar si nuestra bacteria recombinante no produce alteraciones morfológicas en la mucosa, que sean indicativos de posible daño en ésta, se realizaron cortes histológicos para el análisis morfológico de los epitelios en estómago e intestino delgado de los ratones inmunizados con *L. lactis* recombinante y *L. lactis* control. Los resultados indican que aparentemente no hay ningún daño en la integridad de las mucosas gástrica e intestinal de los ratones inmunizados.

Una serie de estudios *in vivo* de la infección por VIS han determinado que los linfocitos intestinales no macrófagos son un blanco celular para la infección *in vitro* por el virus, ya que durante los primeros días de la infección por SIV en monos, la infección de macrófagos fue muy rara, y la mayoría de las células T infectadas estaban presentes en la mucosa intestinal y no en células T de sangre periférica.⁴ En consecuencia nuestros resultados son relevantes para la protección de la enfermedad desencadenando una buena respuesta inmune celular, ya que se indujo una fuerte expresión de CD4 en mucosas del estómago y del intestino. Por otra parte, los macrófagos de las mucosas son células de gran importancia porque constituyen una línea de defensa contra las infecciones y presentan características que los distinguen de los monocitos en sangre. Li Ling y cols.²⁹ realizaron un estudio en el que demuestran que los macrófagos intestinales reducen en mayor porcentaje la penetrabilidad del VIH en comparación con los macrófagos de sangre periférica; la prevalencia de estas células en las mucosas es de gran importancia. De acuerdo con nuestros resultados en la detección de Mac por inmuno histoquímica, observamos que la expresión de Mac se ve incrementada cuando se inmuniza con la bacteria recombinante en comparación con el control. El aumento en la expresión de CD4 y de Mac en mucosas puede inducir protección en la infección por VIH por inducción de inmunidad humoral y celular.

Resumen

En el presente trabajo se desarrolló un nuevo sistema de expresión de la proteína gp120 del VIH basado en bacterias lácticas, induciendo inmunidad humoral. Nuestros datos indican que la administración oral de *L. lactis* modificada para expresar la gp120 induce anticuerpos sistémicos y locales (a ni-

vel de mucosas) específicos, así como también estimulan la producción de linfocitos específicos contra el VIH y se asocia a un incremento en la expresión de CD4 y de Mac en las mucosas. La inducción de inmunidad en mucosas usando bacterias lácticas modificadas para presentar en mucosas antígenos del VIH puede representar una estrategia tecnológica para desarrollar una vacuna contra el SIDA efectiva y segura.

Palabras clave: VIH, Vacunas, *Lactococcus*, Bacterias lácticas, Inmunidad en mucosas.

Abstract

In this work we have developed a HIV gp120 protein expression system based on acid lactic bacteria, induced humoral immunity. Our results of oral administration with recombinant *L. lactis* gp120 induce systemic and local specific antibodies as well as specific lymphocytes against HIV gp120 associate with an improved expression of CD4 and Mac receptors on mucosas.

Keywords: HIV, Vaccines, *Lactococcus*, Lactic acid bacteria, Mucosal immunity.

Referencias

1. Vincent T, DeVita, Jr S, Hellman S, Rosenberg. AIDS Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention . 4 Ed. Lippincott-Raven. 1997. pp 29-39.
2. Newell M. Mechanisms and timing of mother-to-child transmission of HIV-1. AIDS 1998;12:831-837.
3. Smith, PD. Wahl SM. Immunobiology of mucosal HIV-1 infection. Mucosal immunology, 2 ed. San diego: Academic; 1999.
4. Janoff, Edward. Smith P. Emerging concepts in gastrointestinal aspects of VIH-1 pathogenesis and management. Gastroenterology 2001;120:607-621.
5. Lei Lu. Walker, W. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. Am J Clin Nutr 2001;73:1124S-1130S.
6. McGhee JR, Kiyono H. New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. Infect Agents Dis. 1993 Apr; 2 (2):55-73.
7. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Gastro-

- intestinal tract as a major site of CD4 T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* 1998;280:427-431.
8. Boyaka PN, Marinaro M, Vancott JL, Takahashi I, Fujihashi K, Yamamoto M, van Ginkel FW, Jackson RJ, Kiyono H, McGhee JR. Strategies for mucosal vaccine development. *Am J Trop Med Hyg* . 1999 Apr;60(4 Suppl): 35-45.
 9. Shalaby WS. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. *Clin Immunol Immunopathol*. 1995 Feb;74(2):127-34.
 10. Gerritse K, Posno M, Schellekens MM, Boersma WJ, Claassen E. Oral administration of TNP-Lactobacillus conjugates in mice: a model for evaluation of mucosal and systemic immune responses and memory formation elicited by transformed lactobacilli. *Res Microbiol*. 1990.Sep-Oct;141(7-8):955- 62.
 11. Fromen RC, Drevet P, Robert A, Menez A, Leonetti M. Recombinant Staphylococcus Strains as Live vectors for the Induction of Neutralizing Anti-Diphtheria Toxin Antisera. *Inf and Immunity*, Oct 1999.5007-5011.
 12. Medaglini, D. Commensal bacteria as vector for mucosal vaccines against sexually transmitted diseases: vaginal colonisation with recombinant streptococci induce local and systemic antibodies in mice. *Vaccine*. 1997. 15,1330-1337.
 13. Curtiss,r, and Kelly, SM. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate ciclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and innunogenetic. *Infect.Immun*. 1997 55,3035-3043.
 14. Hess,J. Superior efficaccy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. E.E.U.U*. 1996. 93,1458-1463.
 15. Darji, A. Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium* . *Cell* 1997. 91,765- 775.
 16. Fennely,G.J. Mucosal DNA vaccine immunization against measles with a highly attenuated *Shigella flexneri* vector. *J. Immunol*. 1999. 162,1603-1610.
 17. Kotloff, K.L. Safety, immunogenicity, and transmissibility in humans of CVD 1203, a live vaccine *Shigella flexneri* 2^a vaccine candidate attenuated by deletions *in aro A* and *vir G*. *Infect.Immun*. 1996. 64,3055-3061.
 18. Dietrich,G. Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nat Biotechnol*. 16, 181-185.
 19. Edelman ,R. Safety and immunogenicity of recombinant bacille Calmette-guerin (rBCG) expressing *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A(OspA) lipoprotein in adult volunteers: a candidate lyme disease vaccine. *Vaccine* 1999. 17, 904-914.
 20. Farber,J.M. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *Int. J. Food. Microbiol*. 1996. 30, 145-156.
 21. Goossens,p.L. Attenuated *Listeria monocytogenes* as a live vector for induction of CD8 T cell in vivo: a study with the nucleoprotein of the lymphocytic choriomeningitis virus. *Int. Immunol*.1995. 7, 797-805.
 22. Mercenier,A. Acid Lactic bacteria as live vaccine. In *Probiotics: A critical review* (Tannock, G.W. ed.) Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.1999. pp 113-127.
 23. Aso Y, Akaza H, and the BLP study group. Prophylactic effect of a Lactobacillus casei pre recurrence of superficial bladder cancer. *Urol. Int*. 1992;49:125-129
 24. Nagler C. Man the barrier! Strategic defences in the intestinal mucosa. *Nature reviews immunology* 2001;1:59-67.
 25. VanCott T, Kamiski R, Mascola J. HIV-1 neutralizing antibodies in the genital and respiratory tracts of mice intranasally immunized with oligomeric gp 120. 1998. *J of Immunology*. 2000-2012.
 26. Grangette C, Muller AH, Goudercourt MC, Turneer M, Mercenier A. Mucosal Immune Responses and Protection against Tetanus Toxin after Intranasal Immunization with Recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infection and Immunity*, Mar,2001,1547-1553.
 27. Giraud A, Battail N, Piga N. Generation of monoclonal antibodies to native human immunodeficiency virus type 1 enveloped glycoprotein by immunization of mice with naked RNA. *J of Virol Meth*.79. 1999,75-84.
 28. Bruce BC, Akrigg A, Shape A. Replication-deficient recombinant adenoviruses expressing the human immunodeficiency virus Env antigen can induce both humoral and CTL immune response in mice. *J. General Virology*. 1999, 80,1621-2628.
 29. Li L, Meng G, Graham M, Smith P. 1999. Intestinal macrophages display reduce permissiveness yo HIV-1 and decresed surface CCR5. *Gastroenterology* 1999.116:1043-53.