

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

BC/37659
IB/80810

INSTITUTO DE BIOLOGIA

T/UNICAMP

M523_c



Universidade Estadual de Campinas
 Instituto de Biologia
 Departamento de Genética e Evolução

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DA FÍMBRIA K99 DE *Escherichia coli*
 ENTEROTOXIGÊNICA EM UMA LINHAGEM ATENUADA $\Delta cya \Delta crp$
 DE *Salmonella typhimurium*: ANÁLISE DA RESPOSTA SÉRICA EM
 CAMUNDONGOS BALB/c**

SERGIO DE MENDONÇA

Orientador: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira

Este exemplar corresponde à redação final
 da tese defendida pelo (o) candidato a
Sergio Mendonça
 e aprovada pela Comissão Julgadora.

30/03/99 *W. Dias da Silveira*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
 Universidade Estadual de Campinas
 (UNICAMP) para a obtenção do título de
 Doutor em Ciências Biológicas, área de
 concentração Genética.

Campinas, 1999

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Departamento de Genética e Evolução

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

TITULARES:

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (orientador)



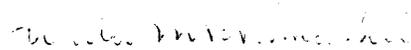
Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro



Prof. Dr. Domingos da Silva Leite



Profa. Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro



Prof. Dr. Marcelo Brocchi



SUPLENTES:

Prof. Dr. Tomomasa Yano

Prof. Dr. Gilson Paulo Manfio

LOCAL E DATA: Campinas, 29 de Março de 1999

UNIDADE	I (3)
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO	8737659
PROV.	223799
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	06/05/99
N.º CPG	123021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

M523c

Mendonça, Sergio de

Clonagem e expressão da fímbria K99 de *Escherichia coli* enterotoxigênica em uma linhagem atenuada $\Delta cya \Delta crp$ de *Salmonella typhimurium* : análise da resposta sérica em camundongos BALB/c / Sergio de Mendonça. Campinas, SP : [s.n.], 1999.

Orientador : Wanderley Dias da Silveira.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Clonagem molecular. 2. *Salmonella typhimurium*.
3. *Escherichia coli* - Genética. I. Silveira, Wanderley Dias da. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

À Luciana,

vitalidade e estímulo do meu caminho,

dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pela orientação, amizade e importante contribuição para a minha formação científica.

Aos Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro, Domingos da Silva Leite, Marcelo Brocchi e a Profa. Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro, pela participação na banca examinadora.

Aos Prof. Dr. Tomomasa Yano e Gilson Paulo Manfio pela participação como suplentes da banca examinadora.

Aos Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira e à Prof. Dra. Wirla Maria Silva Cunha Tamashiro, pela contribuição na pré-banca examinadora com valiosas sugestões.

Às Profa. Dra. Laura Maria Mariscal Ottoboni, Christine Hackel e Vera Solferini pela importante participação na banca do exame de qualificação.

Aos amigos da microbiologia, pelo que vivemos e aprendemos juntos nestes anos de convivência.

Ao técnico bioterista Marcos C. Meneghetti, pelo inestimável ajuda técnica no tratamento dos camundongos.

Ao sempre alegre Rovilson, pelas conversas animadas e fundamental ajuda nos experimentos de imunização.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular Bacteriana, pela agradável convivência e discussões técnicas.

Ao grande amigo e pesquisador Marcelo Brocchi, pelo auxílio em todos os momentos, otimismo e discussões científicas.

Ao amigo e colaborador Prof. Dr. José Pedrazzoli Jr., pela confiança, energia e oportunidade profissional.

Aos novos amigos da UNIFAG-USF, pelo apoio, amizade e alegre convivência diária.

À minha família, pelo amor, apoio emocional e compreensão dos muitos momentos que estive distante.

À Luciana, pela paciência, olhar crítico, amizade e amor em todos os momentos.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto 94/4457-2.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- BSA –soro albumina bovina
CT – toxina de *Vibrio cholera*
DAP –ácido diaminopimélico
DO –densidade ótica
EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva
ELISA –ensaio imunoenzimático
EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica
EPM – erro padrão da média
ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
GALT –tecido linfóide associado ao intestino
IgA – imunoglobulina A
IgG – imunoglobulina G
IgM – imunoglobulina M
LPS – lipopólissacarídeo
LT – toxina de *Escherichia coli* enterotoxigênica sensível ao aquecimento
OPD- dihidrocloro de o-fenildiamina
ORF – quadro de leitura aberta
pABA –ácido para-aminobenzóico
PAGE-SDS –eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS
PBS – tampão fosfato salina
SD – desvio padrão
SDS – dodecil sulfato de sódio
ST – toxina de *Escherichia coli* enterotoxigênica resistente ao aquecimento
TAE –tris acetato EDTA
TBE –tris borato EDTA
TCA – ácido tricloroacético
TE – tampão tris EDTA
UFC – unidade formadora de colônias

RESUMO

A bactéria *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é um patógeno que causa prejuízos à pecuária por provocar diarreia em suínos e bovinos recém-nascidos. A maneira mais eficiente para a prevenção de doenças infecciosas continua sendo a vacinação e uma das novas abordagens no desenvolvimento de vacinas é a utilização de microrganismos atenuados como carreadores de proteínas heterólogas. A bactéria *Salmonella* sp possui a capacidade de invadir e proliferar em órgãos, estimulando assim de forma mais eficiente o sistema imunológico do hospedeiro. Linhagens de *Salmonella typhimurium* infectam camundongos e estão sendo utilizadas como modelo para o desenvolvimento de vacinas. Neste trabalho foi clonado o operon da fímbria K99 de *Escherichia coli* enterotoxigênica em uma linhagem de *Salmonella typhimurium* atenuada por deleções duplas nos genes da adenil ciclase (*cya*) e do receptor do AMP cíclico (*crp*). A estabilidade plasmidial foi obtida pela utilização do sistema letal balanceado baseado no gene *asd*. A linhagem x3987-K99 obtida expressou a fímbria K99 *in vitro*, quando cultivada em meio LB líquido com aeração. Além disso, a expressão da fímbria K99 heteróloga não prejudicou a capacidade de invasão e persistência em placas de Peyer e baço de camundongos BALB/c. A análise dos títulos de imunoglobulinas produzidas pelos camundongos inoculados com uma única dose via oral, revelou que a linhagem x3987-K99 foi capaz de estimular uma resposta sérica anti-K99 e anti-*Salmonella*. Estes resultados recomendam a utilização da linhagem x3987-K99 para avaliação de sua proteção imunológica.

ABSTRACT

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is an important pathogen capable of causing disease in a great variety of animal species, including piglets and newborn calves. Vaccination continues to be an effective tool in the prevention of infectious disease. One of the new strategies in vaccines development is the use of attenuated microorganism as carriers of recombinant proteins. *Salmonella* sp have the ability to invade and to proliferate in organs, getting to stimulate in a more efficient way the host immune system. *Salmonella typhimurium* strains infect mice and they are being used as a model for vaccines development. In this work we cloned the ETEC K99 fimbriae operon in a *Salmonella typhimurium* strain attenuated by double deletions in adenil ciclase (*cya*) and cyclic AMP receptor protein (*crp*). Plasmidial stability was obtained by use of balanced lethal system based on *asd* gene. Our results shown that strain x3987-K99 when cultivated in liquid LB medium with aeration expresses K99 fimbriae *in vitro*. Besides, invasion ability and persistence of BALB/c mice Peyer's patches and spleen was not affected by expression of recombinant K99 fimbriae in this strain. A single oral immunization of BALB/c mice with strain x3987-K99 elicited elevated titers of anti-K99 and anti-*Salmonella* responses in serum. These results recommend the use of x3987-K99 strain in an evaluation study of protective immunity.

ÍNDICE GERAL

INTRODUÇÃO GERAL	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Características de <i>Escherichia coli</i>	4
1.1. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica para animais (ETEC)	5
1.2. Enterotoxinas	5
1.2.1. Enterotoxina termo-lábil (LT)	5
1.2.2. Enterotoxina termo-estável (ST)	6
1.3. Fatores de colonização	7
1.3.1. A fímbria K99	10
1.4. Vacinas contra <i>E. Coli</i>	12
1.4.1. Bacterinas, toxóides e atenuação	12
1.4.2. Tecnologia do DNA recombinante no desenvolvimento de vacinas	13
2. Características de <i>Salmonella</i> sp	14
2.1. Mecanismos de Patogenicidade	15
2.1.1 Adesão a Células Epiteliais da Mucosa	16
2.1.2. Invasão de células eucarióticas	17
2.1.3. Tolerância a fatores adversos	20
2.2. Gastroenterites causadas por <i>Salmonella</i> sp	23
2.3. Produção de toxinas	23
2.4. Presença de plasmídeo de virulência	24
2.5. Vacinas contra salmonelose	25
2.5.1. Atenuação de <i>Salmonella</i> sp.	25
2.5.2. Mutantes <i>galE</i>	26
2.5.3. Mutantes <i>aro</i>	26
2.5.4. Mutantes PhoP/PhoQ	27
2.5.5. Mutantes <i>cya crp</i>	27
2.5.6. Outras mutações	28
2.6. Resposta imunológica contra antígenos heterólogos	28
2.7. Integração de genes heterólogos no cromossomo de <i>Salmonella</i> sp	30

OBJETIVOS	32
1. Objetivos específicos	33
MATERIAIS E MÉTODOS	34
1. Plasmídios e linhagens bacterianas	35
2. Meios de cultura	37
3. Soluções de uso geral	39
4. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina	39
4.1. Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep)	39
4.2. Amplificação de DNA plasmidial	40
4.3. Extração de DNA plasmidial em grande escala	41
4.4. Quantificação de DNA por espectrofotometria	41
5. Clonagem molecular	41
5.1. Clivagem de DNA com enzimas de restrição	41
5.2. Purificação de fragmentos de DNA por eletroeluição	42
5.3. Reação de ligação	42
6. Transferência de DNA plasmidial entre linhagens	42
6.1. Transformação bacteriana	42
6.1.1. Preparo de células competentes	42
6.1.2. Adição de DNA às células competentes	43
6.2. Eletroporação	43
7. Extração de proteínas bacterianas	44
7.1. Extração de proteínas bacterianas de superfície	44
7.2. Precipitação de proteínas por sulfato de amônio	44
8. Produção de antisoro policlonal em coelhos	45
8.1. Absorção de antisoro policlonal	46
8.2. Soroaglutinação de bactérias	46
9. Preparação de antígeno anti- <i>Salmonella</i>	46
10. Eletroforese	47
10.1. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose	47
10.2. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)	47
8.3. Coloração de géis de poliacrilamida-SDS pela impregnação com prata	48

9. "Imunoblotting"	49
12. Curva de crescimento e viabilidade bacteriana.....	50
13. Imunização de camundongos BALB/c	51
14. Coleta de soro, extração e processamento dos órgãos, e persistência das bactérias nos camundongos BALB/c	51
15. Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	52
16. Análises estatísticas	53
RESULTADOS	54
1. Desenvolvimento da linhagem x3987-K99.....	55
2. Expressão da fímbria K99 na superfície bacteriana.....	58
3. Crescimento bacteriano e viabilidade celular.....	59
4. Purificação da fímbria K99.....	63
5. Persistência em placas de Peyer e baço de camundongos BALB/c	63
6. Resposta imune de camundongos	68
DISCUSSÃO	71
CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I. Características de fimbrias de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica isoladas de animais, quanto ao sorogrupo, toxinas relacionadas e hemaglutinação	8
Tabela II. Características de fimbrias de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica isoladas de animais, quanto à morfologia, peso molecular, localização genética e hospedeiro.....	8
Tabela III. Linhagens utilizadas neste trabalho.....	35
Tabela IV. Plasmídios utilizados neste trabalho	35
Tabela V. Concentração de uso dos antibióticos.....	39
Tabela VI. Soluções para a preparação de gel de poliacrilamida-SDS	48
Tabela VII. Seqüência de soluções para a impregnação de PAGE-SDS com prata	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático do <i>operon</i> da fímbria K99	11
Figura 2 . Modelo esquemático do plasmídeo pFK99.....	36
Figura 3. Modelo esquemático do plasmídeo pYA3137	36
Figura 4. Modelo esquemático do plasmídeo pSM40.....	37
Figura 5. Esquema da estratégia utilizada	56
Figura 6. Perfil eletroforético dos plasmídios pYA3137 e pSM40.....	57
Figura 7. Perfil eletroforético das proteínas de superfície das linhagens de <i>E.coli</i> e <i>Salmonella typhimurium</i> demonstrando a expressão da subunidade principal da fímbria K99 em diferentes condições de cultivo	60
Figura 8. Perfil eletroforético das proteínas de superfície e “imunoblotting” para confirmação da expressão da fímbria K99.	61
Figura 9. Curva de crescimento das linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> x3987 e x3987-K99 em cultura LB líquida com aeração	62
Figura 10. Perfil eletroforético das proteínas de superfície bacteriana da linhagem <i>Salmonella typhimurium</i> x3987-K99 precipitadas com diversas concentrações de sulfato de amônio.	65
Figura 11. Análise da persistência das linhagens vacinais x3987 e x3987-K99 em placas de Peyer de camundongos BALB/c	66
Figura 12. Análise da persistência das linhagens vacinais x3987 e x3987-K99 em baço de camundongos BALB/c	67

Figura 13. Análise da produção de anticorpos anti-*Salmonella* em camundongos BALB/c inoculados com linhagens x3987 ou x3987-K99.....69

Figura 14. Análise da produção de anticorpos anti-K99 em camundongos BALB/c inoculados com linhagens x3987 ou x3987-K9970

INTRODUÇÃO GERAL

A bactéria *Escherichia coli* é o microrganismo anaeróbio facultativo predominante na flora normal de mamíferos e aves, desempenhando importante papel na manutenção da fisiologia intestinal (Drasar & Hill, 1974). Entretanto, algumas linhagens podem tornar-se patogênicas a diversos hospedeiros, pela expressão de fatores de virulência.

O grupo de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) é um dos agentes infecciosos principais nas diarreias de animais. A patogenicidade destas amostras está ligada à produção de diferentes fatores de virulência como fímbrias e toxinas. Uma das fímbrias mais comuns encontradas em ETEC para bovinos, suínos e ovinos é a K99. Dentre as toxinas normalmente associadas a infecções intestinais, a termo-estável e pouco imunogênica ST-I é predominante (Gaastra & de Graaf, 1982). O controle das infecções causadas por este tipo de patógeno tem sido feito através de vacinação com bactérias mortas (bacterinas), bactérias atenuadas por métodos físico-químicos ou pela inoculação de toxinas antigênicas importantes na patogenicidade, purificadas e modificadas (toxóides). Entretanto, esses métodos mostraram-se pouco eficientes (Isaacson, 1985; Porter *et al.*, 1974).

O estudo molecular dos mecanismos de patogenicidade e fatores de virulência, aliado ao aprimoramento de técnicas que permitem a manipulação genética, levou a uma nova abordagem no desenvolvimento de vacinas. A construção de sistemas carreadores de epítomos antigênicos e a utilização de linhagens atenuadas através de técnicas de biologia molecular são alguns dos caminhos promissores para o desenvolvimento de vacinas mais eficientes e, certamente, mais seguras. Nos principais centros de desenvolvimento de vacinas do mundo, estudos já permitiram avanços na construção de sistemas carreadores e na atenuação molecular de algumas espécies de bactérias, como por exemplo *Vibrio cholera* (Kaper *et al.*, 1995) e espécies do gênero *Salmonella* (Chatfield *et al.*, 1989).

Deste modo, a clonagem e expressão da fímbria K99 de *Escherichia coli* enterotoxigênica em uma linhagem de *Salmonella typhimurium* atenuada por deleção nos genes *cya* e *crp* pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas multifatoriais. Para isso, foram analisadas a persistência em tecidos e a produção de anticorpos em modelo murínico.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Características de *Escherichia coli*

Escherichia coli (Escherich, 1885) é uma bactéria gram-negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae*, sendo considerada o anaeróbio facultativo predominante na flora bacteriana normal de mamíferos e aves, desempenhando importante papel na manutenção da fisiologia intestinal (Drasar & Hill, 1974). Entretanto, algumas linhagens podem apresentar fatores de virulência, tornando-se muitas vezes patogênicas ao hospedeiro.

A superfície da célula de *Escherichia coli* possui antígenos que estimulam reações imunológicas e que são, normalmente, utilizadas para a identificação sorológica da amostra e diferenciação entre linhagens patogênicas e não patogênicas. Dois dos antígenos mais utilizados com esta finalidade são o somático (O) e o flagelar (H). Os antígenos somáticos O são lipopolissacarídeos termo-estáveis complexos, constituintes da membrana externa, enquanto o antígeno flagelar H possui natureza protéica e é termo-sensível (Gaastra & de Graaf, 1982). Os fatores de virulência são responsáveis pelas infecções intestinais causadas pelas bactérias patogênicas, como diarréias agudas em mamíferos; além das infecções extraintestinais, como meningite, cistite e pielonefrite em humanos e infecções respiratórias em aves (Levine, 1984).

As linhagens de *Escherichia coli* que causam infecções intestinais podem ser classificadas em cinco categorias principais, de acordo com as características clínicas observadas nas síndromes diarréicas, propriedades de virulência, tipo de interação com a mucosa intestinal, diferenças epidemiológicas apresentadas e sorogrupos específicos: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (Mathewson, *et al.*, 1985; 1986; Levine, 1987; Nataro & Kaper, 1998). As linhagens que causam infecções intestinais apresentam algumas características comuns mesmo quando classificadas em grupos diferentes: (i) os fatores de virulência principais geralmente são codificados por plasmídios, (ii) existe uma interação característica com a mucosa intestinal do hospedeiro, (iii) ocorre a produção de toxinas e (iv) as linhagens são agrupadas em determinados sorogrupos O:H (revisado por Levine, 1987; Nataro & Kaper, 1998).

1.1. *Escherichia coli* enterotoxigênica para animais (ETEC)

O grupo das *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) é responsável por causar diarreia em humanos e em animais recém-nascidos, principalmente em países com baixo desenvolvimento sócio-econômico. Nestas regiões é comum ocorrerem duas a três infecções causadas por ETEC durante os três primeiros anos de vida das crianças. Foi verificado que em animais a bactéria *Escherichia coli* enterotoxigênica é o agente causador de cerca de um terço das diarreias em leitões recém-nascidos (Söderling & Mollby, 1978). A infecção por ETEC ocorre através da ingestão, pelo hospedeiro, de alimentos ou água contaminados. No aparelho digestivo, estas bactérias colonizam a porção proximal do intestino delgado (Hinson & Willians, 1989) e produzem enterotoxinas responsáveis pela síndrome diarreica (Betley *et al.*, 1986).

1.2. Enterotoxinas

As toxinas produzidas por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) são classificadas em dois tipos: toxina termo-lábil (LT), capaz de ser inativada com aquecimento a 60°C por 30 min e toxina termo-estável (ST), ativa mesmo após ser submetida a aquecimento a 100°C por 15 min. (Smith & Gyles, 1970; Scotland, 1988).

1.2.1. Enterotoxina termo-lábil (LT)

A enterotoxina LT é uma proteína imunogênica de alto peso molecular (85 KDa a 90 KDa) composta por uma subunidade A e cinco subunidades B (Levine, 1984). A subunidade B permite a ligação da holoenzima à membrana dos enterócitos pela interação com o gangliosídeo GM1 a superfície epitelial e glicoproteínas (Holmgren, 1973; Holmgren *et al.*, 1982). Após a ligação da subunidade B, a subunidade A é clivada em dois polipeptídeos, sendo que um deles (A₁) é internalizada e tem a capacidade de estimular a adenil ciclase por sua atividade ADP ribosilante (Gill & Richardson, 1980). Por isso ocorre um acúmulo de AMP cíclico, que causa uma secreção de fluidos ricos em eletrólitos pelas células da cripta e decréscimo da absorção de líquidos pelas células da base das vilosidades. O resultado desta secreção é a origem de um quadro clínico diarreico (Levine, 1984).

A enterotoxina LT é muito semelhante à toxina colérica (CT) em estrutura, atividade biológica e determinantes antigênicos e, além disso, os genes codificadores das duas toxinas mostram alto grau de homologia (Smith & Sach, 1973; Clements *et al.*, 1980; Dallas & Falcow, 1980; Betley *et al.*, 1986; Yamamoto *et al.*, 1987).

Duas formas diferentes de LT (LTh e LTp) foram encontradas em bactérias isoladas de humanos e suínos, respectivamente. As subunidades B das duas formas diferem em 4 dos 103 resíduos de aminoácidos, e as subunidades A₁ diferem em 1 dos 194 resíduos (Dykes *et al.*, 1985; Yamamoto *et al.*, 1987).

Uma forma variante de LT (LT-II) foi isolada a partir de fezes de búfalos com diarreia na Tailândia e apresenta atividade biológica semelhante à LT-I, apesar de não ser neutralizada por anticorpos anti-LT-I ou anti-CT (Green *et al.*, 1983; Pickett *et al.*, 1986). Os genes que codificam a LT-II parecem estar localizados no cromossomo bacteriano e produzem uma proteína de peso molecular de 87 KDa composta por duas subunidades, A e B (Holmes *et al.*, 1986; Pickett *et al.*, 1986). Duas variantes da toxina LT-II (LT-IIa e LT-IIb) foram descritas por Guth *et al.* (1986).

1.2.2. Enterotoxina termo-estável (ST)

Assim como a toxina LT, a toxina ST possui dois tipos principais denominados ST-I (ou STa) e ST-II (ou STb) (Whipp *et al.*, 1981).

A toxina ST-I é um pequeno polipeptídeo com imunogenicidade reduzida, a menos que esteja acoplada a uma proteína carreadora (Klipstein, *et al.*, 1982). ST-I é solúvel em metanol, ativa no modelo do camundongo recém-nascido e exerce sua atividade biológica através da estimulação da guanilato ciclase, elevando os níveis intracelulares de GMP cíclico (Hughes, *et al.*, 1978; Pickett *et al.*, 1986). A ativação da guanilato ciclase altera a membrana dos enterócitos e resulta numa elevada secreção de fluidos com conseqüente diarreia (Field *et al.*, 1978).

Verificou-se posteriormente, com a utilização de sondas específicas, que dentro do grupo ST-I existem dois tipos de toxinas: uma denominada STa1 ou STp, por ter sido

descoberta em *Escherichia coli* patogênica para suínos, e outra denominada STa2 ou STh, identificada em amostra patogênica para humanos (Moseley *et al.*, 1983).

A toxina ST-I é sintetizada como uma forma precursora de 72 aminoácidos, que após a maturação, origina pequenos peptídeos que possuem 6 resíduos de cisteína e apresentam 3 pontes dissulfeto, essenciais para a configuração tridimensional da forma ativa (Guerrant *et al.*, 1980; Chan *et al.*, 1981; Gariepy *et al.*, 1987).

As formas ativas das toxinas STh e STp são constituídas, respectivamente, por 19 e 18 resíduos de aminoácidos (Field *et al.*, 1978; Frantz *et al.*, 1984; Gariepy & Schoolnik, 1986). Estas seqüências apresentam grande homologia, tendo apenas 4 aminoácidos diferentes, 3 na região amino-terminal e 1 na região carboxi-terminal além de 1 aminoácido a mais na toxina STh. A capacidade de reconhecimento de receptores e toxigenicidade parece estar relacionada aos 13 resíduos de aminoácidos da região carboxi-terminal (Shimonishi *et al.*, 1982; Thompson & Gianella, 1985; Gariepy *et al.*, 1986).

A toxina ST-II é insolúvel em metanol, ativa em alça ligada intestinal de suínos com 5 a 7 semanas de idade e estimula a secreção intestinal através de um mecanismo que não envolve alterações das concentrações de nucleotídeos cíclicos (Kennedy *et al.*, 1984; Weickel *et al.*, 1986). Quando a toxina ST-II foi analisada em ensaio com alça ligada de suínos, observou-se uma secreção ativa de bicarbonato (Weikel *et al.*, 1986). Esta toxina é codificada por genes plasmidiais e sintetizada como uma cadeia polipeptídica de 71 aminoácidos, sendo os 23 primeiros correspondentes à região de peptídeo sinal. Entretanto, após a maturação, esta proteína fica constituída por 48 aminoácidos, com um peso molecular de 5 KDa. Não foi observada homologia significativa entre as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos das toxinas ST-I e ST-II (Lee *et al.*, 1983).

1.3. Fatores de colonização

Linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) produzem adesinas, fatores de colonização que favorecem a adesão à mucosa intestinal do hospedeiro com conseqüente resistência ao movimento peristáltico (Levine, 1984). Um tipo especial de adesina, denominado fimbria, apresenta estruturas protéicas filamentosas ou fibrilares

localizadas na superfície bacteriana (Mooi & de Graaf, 1985). As fímbrias reconhecem receptores específicos de diversas células, incluindo enterócitos. A capacidade de aderir ou não a eritrócitos (hemaglutinação) de diferentes animais e do homem pode ser utilizada para identificação e classificação das diferentes fímbrias (Gaastra & de Graaf, 1982). Atualmente, são conhecidos vários tipos de fímbrias com antigenicidade, peso molecular e especificidade a receptores característicos, como mostram as Tabelas I e II.

Tabela I. Características de fímbrias de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de animais, quanto ao sorogrupo, toxinas relacionadas e hemaglutinação.

FÍMBRIA	SOROGRUPO	TOXINAS	HEMAGLUTINAÇÃO
K88 (F4)	O8, O9, O20, O45, O138, O147, O149, O157	ST, LT, ST+LT	cobaia, galinha
K99 (F5)	O8, O9, O20, O64, O101, O149	ST	cavalo, carneiro
987P (F6)	O8, O9, O20, O64, O141, O149	ST	ND (a)
F41	O9, O20, O64, O101	ST	humano, cobaia, cavalo, carneiro

(a) ND, não determinado com as espécies animais estudadas

Fonte - Gaastra & de Graaf, 1982.

Tabela II. Características de fímbrias de *Escherichia coli* enterotoxigênica isoladas de animais, quanto à morfologia, peso molecular, localização genética e hospedeiro.

FÍMBRIA	MORFOLOGIA	PM (a)	LOCALIZAÇÃO	ORIGEM
Tipo1 (F1)	rígida	15,7	cromossomo	animais, homem
K88 (F4)	flexível	27,5	plasmídio	suínos
K99 (F5)	flexível	16,5	plasmídio	suínos, bovinos,
987P (F6)	rígida	20,0	cromossomo	suínos
F41	flexível	29,5	cromossomo	suíno, bovino,
FY	flexível	20,0	ND (b)	bovinos

(a) PM, peso molecular em KDa (Kilodaltons)

(b) ND, não determinado

Fonte - Gaastra & de Graaf, 1982; Moon, 1990.

As fímbrias Tipo 1 (F1) são encontradas tanto em bactérias patogênicas quanto em não patogênicas. Possuem morfologia rígida, apresentam variação de fase (Klemm, 1986), não são termo-reguladas e a aglutinação de eritrócitos é inibida pelo açúcar D-manose (de Graaf, 1990).

As fímbrias hospedeiro-específicas incluem K88 (F4) (Orskov *et al.*, 1964), 987P (F6) (Nagy *et al.*, 1976), F42 (Yano *et al.*, 1986) e F165 (Fairbrother *et al.*, 1986), presentes em *Escherichia coli* isoladas de suínos; K99 (F5) (Orskov *et al.*, 1975) e F41 (de Graaf & Roorda, 1982), presentes em amostras de suínos, ovinos e bovinos; CFA/I, CFA/II (Evans *et al.*, 1975; Evans & Evans, 1978), CFA/III (Honda *et al.*, 1984), CFA/IV (Thomas *et al.*, 1982) e os fatores de colonização PCF0159 (Tacket *et al.*, 1987), PCF0149 (Knutton, *et al.*, 1987), PCF0166 (McConnell *et al.*, 1989), PCF09 (Heuzenroeder *et al.*, 1990) e PCF02 (Ricci, *et al.*, 1997) associadas a amostras de origem humana.

A expressão da maioria das fímbrias é regulada pela temperatura de crescimento da cultura de bactérias. Em temperaturas próximas a 37°C a maior parte das fímbrias são produzidas, enquanto a temperaturas entre 16°C e 25°C dificilmente se expressam (Mooi & de Graaf, 1985).

Algumas fímbrias de *Escherichia coli*, como Tipo1 e 987P, apresentam variação de fase, isto é, dentro de uma mesma população bacteriana que apresente estas fímbrias, algumas bactérias não as expressam devido à capacidade de inversão da região promotora, com conseqüente bloqueio da transcrição gênica (Hinson & Willians, 1989).

As fímbrias são compostas de várias subunidades protéicas que, após serem sintetizadas, são transportadas através das membranas e montadas na superfície celular. Geralmente 5 a 8 polipeptídeos produzidos pelo mesmo *operon* estão envolvidos no processamento, transporte e ancoragem das subunidades principais das fímbrias (Mooi *et al.*, 1982; de Graaf *et al.*, 1984; Norgren *et al.*, 1984; Mooi & de Graaf, 1985; van Die *et al.*, 1989).

Dois tipos morfológicamente diferentes de fímbrias são conhecidos. Um tipo morfológico é representado pelas fímbrias Tipo 1, CFA/I, CS1, CS2, CS4, CS5, CFA/III,

F42, F165 e PCFO159, constituídas por filamentos protéicos rígidos, com diâmetro de aproximadamente 7 nm. O segundo tipo morfológico é representado pelas fímbrias K88, K99, F41, CS3 e CS6, que são estruturas finas e flexíveis com diâmetro entre 2 a 5 nm, chamadas fibrilas ou fímbrias fibrilares (Levine, 1984; Mooi & de Graaf, 1985; Levine, 1987).

Os genes que codificam para as fímbrias de ETEC apresentam alto grau de homologia, indicando terem evoluído a partir de um único gene ancestral (Mooi & de Graaf, 1985).

A estrutura primária das subunidades estruturais de algumas fímbrias foram parcialmente ou totalmente sequenciadas (Mooi & de Graaf, 1985). Foi observada uma seqüência de aminoácidos conservada em maior grau na região carboxi-terminal e, em menor grau, na amino-terminal. Estas regiões estão envolvidas, provavelmente, com funções como transporte através da membrana externa, ancoragem, ligação entre as subunidades e manutenção da estrutura (Mooi & de Graaf, 1985). As porções centrais são mais variáveis e estão provavelmente relacionadas ao reconhecimento de diferentes receptores ou podem ter simplesmente divergido em resposta às pressões imunológicas, devido à menor importância estrutural e funcional atribuída a estas regiões (Mooi & de Graaf, 1985). Com relação à genética molecular dos diferentes fatores de colonização presentes em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênica, os genes responsáveis podem ser cromossômicos ou plasmidiais (de Graaf, 1990).

1.3.1. A fímbria K99

A análise dos determinantes genéticos responsáveis pela biossíntese da fímbria K99 foi detalhada. A organização do *operon* foi estudada após a clonagem no vetor plasmidial pBR325, construção de deleções e mutantes por inserção de transposon, análise da expressão gênica em minicélulas e análise da seqüência nucleotídica (van Embden *et al.*, 1980; de Graaf, 1990).

A análise da organização genética do determinante K99 revelou a presença de seis genes estruturais, designados *fanC-H* (*fan*, do inglês “factor adhesion ninety-nine”) (Figura1), os quais codificam polipeptídios de peso molecular variando entre 16,3 a 84,5

KDa (de Graaf *et al.*, 1984, Roosendaal, 1987). A subunidade principal da fímbria K99 é codificada pelo gene *fanC*. A inativação através de mutação nos genes *fanC*, *fanD* ou *fanE* origina linhagens não produtoras da fímbria K99, de hemaglutinação manose resistente negativa e aderência negativa. A Inativação de *fanF*, *fanG* ou *fanH* origina linhagens com diminuição da produção de antígeno e da capacidade de adesão (Jacobs, 1987; Roosendaal *et al.*, 1987). Todos os seis polipeptídios são sintetizados com uma seqüência de peptídeo sinal. Análise da seqüência nucleotídica da região localizada na extremidade anterior (“upstream”) ao gene *fanC* revelou a presença de dois quadros de leitura aberta (ORF, do inglês “open reading frame”), *fanA* e *fanB* (Roosendaal *et al.*, 1987).

Diversos fatores parecem influenciar na expressão de K99 em *E. coli* selvagem. Dentre os fatores, o AMP cíclico, a proteína receptora do AMP cíclico (*crp*) e a proteína *lrp* (leucine-responsive protein) são citados por vários autores e parecem estar envolvidos na regulação das 3 regiões gênicas do *operon* da fímbria K99 (van der Woude, *et al.*, 1990; Bertram *et al.*, 1994). Entretanto, estudos recentes demonstraram que a região 1, abrangendo do *fanA* ao *fanD*; a região 2, contendo *fanE* e *fanF* e a região 3, contendo *fanG* e *fanH*, são reguladas de forma independente (Inoue *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995).

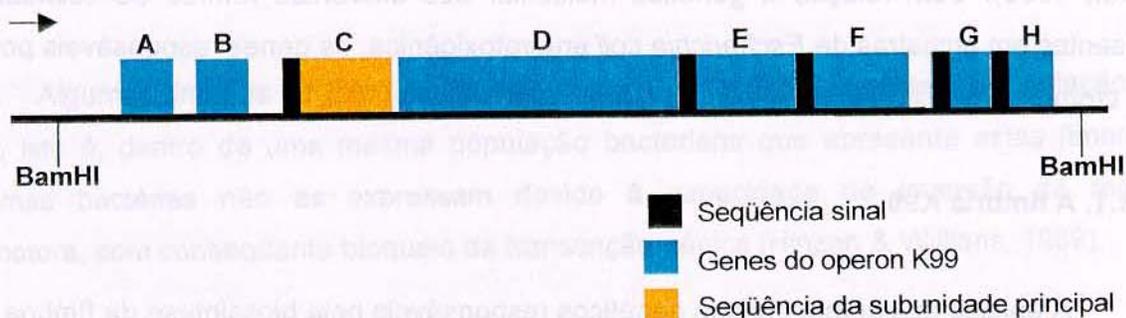


Figura 1. Modelo esquemático do *operon* da fímbria K99 (de Graaf, 1990). As letras referem-se às seqüências *fan* (do inglês, “factor adhesion ninety-nine”) e a seta indica a orientação da transcrição. Os sítios de restrição utilizados para o isolamento do *operon* estão indicados.

1.4. Vacinas contra *E. coli*

As vacinas bacterianas podem ser divididas em bacterinas, toxóides e bactérias vivas atenuadas (Isaacson, 1985).

1.4.1. Bacterinas, toxóides e atenuação

Bacterinas são preparações que contêm a célula total de bactérias mortas através de tratamentos físicos ou químicos. Toxóides são derivados não tóxicos de componentes das toxinas importantes. Atualmente, os toxóides são incluídos numa classe emergente e promissora de vacinas, as vacinas de subunidades. A grande vantagem do uso de vacinas de subunidades, em relação às bacterinas, deve-se a não utilização de componentes celulares que, além de não contribuírem para a ativação da resposta imunológica, poderiam ser tóxicos ao hospedeiro. Assim, a grande maioria de vacinas utilizadas na prevenção de infecções causadas por amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) tem sido baseada em preparados de enterotoxinas e fatores de colonização (Levine *et al.*, 1983).

A enterotoxina LT é fortemente imunogênica e, em experimentos de imunização, apresenta a capacidade de estimular a resposta imunológica com conseqüente produção de anticorpos anti-LT (Kaper & Levine, 1988). A enterotoxina STa, apesar de ser considerada um imunógeno fraco devido ao tamanho reduzido da sua forma ativa (Frantz & Robertson, 1981), pode adquirir maior capacidade imunogênica quando acoplada a uma proteína carreadora (Gianella *et al.*, 1981; Kauffman, 1981). De fato, quando a proteína de membrana externa OmpC foi utilizada como carreadora da toxina STa, a imunização de coelhos provocou uma produção de anticorpos em resposta às duas proteínas (Saarilahti, *et al.*, 1989).

Com relação às fímbrias de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), estas são consideradas fortemente imunogênicas e foram utilizadas no desenvolvimento de vacinas (Levine *et al.*, 1983). Diversos pesquisadores demonstraram que anticorpos produzidos a partir da inoculação de fímbrias são capazes de dificultar ou mesmo impedir a colonização do epitélio do intestino delgado do hospedeiro pelas bactérias (Rutter & Jones, 1973; Morgan *et al.*, 1978; Nagy *et al.*, 1978; Sojka *et al.*, 1978; Acres *et al.*, 1979; Isaacson *et al.*,

1980; Contrepois & Girardeau, 1985; Runnels *et al.*, 1987). Entretanto, os suínos recém-nascidos não apresentam o sistema imunológico totalmente formado, sendo dependentes de anticorpos adquiridos do colostro e do leite materno. A administração parenteral de fímbricas purificadas ou bacterinas em fêmeas grávidas induzem a produção de anticorpos que acabam sendo transferidos para os recém-nascidos através do colostro e do leite, mas não através da placenta. (Morgan *et al.*, 1978; Nagy *et al.*, 1978; Acres *et al.*, 1979; Isaacson *et al.*, 1983). Esta imunização, entretanto, não é capaz de proteger de maneira eficiente os recém-nascidos (Porter, *et al.*, 1974).

A imunização via oral, na maioria dos casos, tem apresentado maior eficiência quando comparada às demais vias, devido à capacidade de ativar diretamente o sistema imunológico intestinal, e conseqüentemente estimular a produção de IgA. Suínos imunizados via oral com bactérias mortas apresentaram níveis de produção de anticorpos apenas moderados (Porter, *et al.*, 1974), contrastando com a resposta obtida após utilização de bactérias vivas atenuadas, cujos resultados foram promissores (Moon, 1981; Moon *et al.*, 1988; Francis & Willgohs, 1991).

Linhagens de *Escherichia coli* atenuadas apresentam capacidade de expressar fímbricas como K88, K99 ou 987P e de colonizar a mucosa intestinal do hospedeiro, ativando de modo mais eficiente uma resposta imunológica, sem contudo levar ao desenvolvimento de doença. Fêmeas de suínos imunizadas por este método apresentam imunoglobulinas IgA e IgM no colostro e no leite, bem como IgG no soro sangüíneo (Moon, 1981; Moon *et al.*, 1988).

1.4.2. Tecnologia do DNA recombinante no desenvolvimento de vacinas

A aplicação da tecnologia do DNA recombinante no desenvolvimento de vacinas está contribuindo de maneira significativa na obtenção de linhagens que apresentem uma atenuação estável e segura, além de permitir a construção de carreadores para epítomos antigênicos responsáveis pela patogenicidade. Deste modo, linhagens podem ser desenvolvidas para expressar diversos epítomos antigênicos simultâneos, simplificando a produção e permitindo a imunização contra mais de um microrganismo (Chatfield, *et al.*, 1993).

As subunidades constituintes da estrutura da fímbria têm sido estudadas em relação à capacidade de expressar e carrear epítomos antigênicos exógenos, sem contudo evitar a montagem correta da fímbria. As regiões variáveis do gene estrutural da fímbria Tipo1 foram substituídas pelas seqüências gênicas do vírus da hepatite B, do antígeno C3 do vírus da poliomielite Tipo1 e do núcleo capsídeo do vírus da febre aftosa (Klemm & Hedegaard, 1990). Em muitos destes experimentos, a fímbria foi expressa na superfície bacteriana e reconhecida tanto por anticorpos anti-Tipo1 quanto por anticorpos contra os antígenos carregados. A substituição de regiões na subunidade *faeG* da fímbria K88ab, através da inserção de seqüências nucleotídicas conhecidas, e a análise da expressão destas através do mecanismo de secreção e montagem da fímbria também mostrou a possibilidade de utilização destas regiões hipervariáveis para clonagem de genes exógenos (Thiry *et al.*, 1989).

Um outro estudo utilizou a subunidade principal da fímbria K88ab para construir uma fusão com a proteína pré-S2 do vírus da hepatite B, também enfatizando a possibilidade de utilização deste sistema como vacinas recombinantes (Pedersen & Andersen, 1991). Estes resultados promissores iniciaram um novo campo de pesquisa e desenvolvimento de vacinas bacterianas pela utilização de fímbrias como carreadores de seqüências antigênicas. Entretanto, para uma vacina atingir índices elevados de eficiência imunológica, é importante estimular uma resposta simultânea antibacteriana e antitoxina, provocando assim um efeito sinérgico. Desta maneira, o desenvolvimento de linhagens atenuadas com capacidade de expressar antígenos fimbriares e antígenos de toxinas são de extrema importância (Francis & Willgohs, 1991).

2. Características de *Salmonella* sp

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e segundo Le Minor & Popoff (1987) e Reeves *et al.* (1989), é constituído por duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a primeira constituída por seis subespécies ou seja, *S. enterica* subespécie *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Entretanto, Holt *et al.* (1994) renomearam *S. enterica* como *S. cholerasuis* e a dividiram em seis subespécies: *cholerasuis*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Por ainda apresentarem discrepâncias, estes sistemas de classificação taxonômica em *Salmonella* sp ainda não

foram completamente adotados e muitos autores, ainda hoje, utilizam o antigo sistema de classificação antigênica de Kauffmann, baseado nos antígenos somáticos (O) e flagelares (H). Neste último sistema, cada sorovariedade é considerada uma espécie diferente. Desta forma, *S. enterica* subespécie *entérica*, sorovariedade Typhimurium, é simplesmente denominada *S. typhimurium*. Atualmente são conhecidos mais de 2300 sorovariedades diferentes de *Salmonella* sp (Popoff *et al.*, 1995). Neste trabalho será adotado o sistema de classificação de Kauffmann.

Com relação à patogenicidade, *Salmonella* sp pode causar, em mamíferos, infecções com diferentes graus de gravidade que vão desde gastroenterites até infecções sistêmicas graves, dependendo da espécie, sorovariedade bacteriana e do tipo de hospedeiro envolvido (Groisman *et al.*, 1990). *S. typhi* é o agente causador da febre tifóide, uma infecção sistêmica grave no homem; e *S. typhimurium* e *S. enteritides* são freqüentemente isoladas de casos de gastroenterites em humanos (Groisman *et al.*, 1990). Em camundongos, *S. typhimurium* pode causar um tipo de infecção que, em muitos aspectos, é semelhante à febre tifóide humana. Por apresentar esta característica, a infecção causada por *S. typhimurium* em camundongo vem sendo utilizada como modelo para o estudo da febre tifóide humana. Este modelo, chamado de murínico, tem permitido o estudo dos mecanismos de patogenicidade e caracterização de mutantes atenuados com relação à virulência em linhagens de *Salmonella* sp, além do desenvolvimento de vacinas e acompanhamento de sua eficiência quanto à estimulação da produção de anticorpos pelas linhagens vacinais (Salyers & Whitt, 1994).

2.1. Mecanismos de Patogenicidade

A infecção por *Salmonella* sp ocorre através da ingestão de alimentos ou água contaminados. Uma vez ingerida, a *Salmonella* sp inicia a infecção aderindo e invadindo células da mucosa intestinal, preferencialmente células M (Jones *et al.*, 1994). Estas células, encontradas no epitélio que recobre as placas de Peyer (Staats *et al.*, 1994), são especializadas na captura de antígenos da luz intestinal e apresentação destes para células do sistema linfóide associado ao intestino (GALT, do inglês "gut-associated lymphoid tissues"). A partir das células M, *Salmonella* sp pode invadir e proliferar em células do GALT

(macrófagos, principalmente) e, subseqüentemente, alcançar e proliferar na corrente sangüínea, linfonodos, fígado e baço (Groisman *et al.*, 1990).

Os mecanismos envolvidos com a patogenicidade de *Salmonella* sp estão longe de serem totalmente elucidados. Isto se deve, principalmente, à existência de diferentes etapas extra e intracelulares do ciclo infeccioso deste microrganismo, envolvendo a expressão e a regulação temporal precisa de diferentes genes ou grupos gênicos.

2.1.1. Adesão a Células Epiteliais da Mucosa

Linhagens de *S. typhimurium* e *S. typhi* expressam fímbria do tipo 1 (Ernst *et al.*, 1990; Rossolini *et al.*, 1993). Estas fímbrias são encontradas em vários gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e promovem a adesão às células eucarióticas através da ligação a resíduos de D-manose, sendo a adesão, inclusive, bloqueada por este carboidrato (Clegg & Gerlach, 1987). Algumas evidências demonstram que em *Salmonella* sp, a expressão deste tipo de fímbria promove a adesão a células HeLa e a eritrócitos de ratos (Ernst *et al.*, 1990; Rossolini *et al.*, 1993; Bäumler *et al.*, 1996b). A produção de fímbria tipo 1 parece, no entanto, não ser essencial para a patogenicidade de *Salmonella* sp (Ernst *et al.*, 1990; Rossolini *et al.*, 1993).

Recentemente, Bäumler & Heffron (1995) descreveram a presença, cromossomo de *S. typhimurium*, do operon *lpf* (do inglês "long polar fimbriae"). Bäumler *et al.*, (1996a, b) demonstraram que a fímbria promove a adesão de *S. typhimurium* a células Hep-2 e a células do intestino de camundongos. Nestas últimas, a adesão é dirigida preferencialmente às células M nas placas de Peyer. Linhagem contendo mutação no gene *lpfC* apresenta aderência reduzida a células M e DL₅₀ cinco vezes maior que a apresentada pela linhagem parental selvagem (Bäumler *et al.*, 1996a). Estes resultados sugerem uma função importante do operon *lpf* na patogenicidade de *S. typhimurium* e na adesão e invasão preferencial de células M exibidas por essas bactérias.

Uma terceira fímbria, chamada PE ("plasmid encoded") foi descrita em linhagens de *S. typhimurium* (Friedrich *et al.*, 1993; Bäumler *et al.*, 1996c). Esta fímbria é codificada pelo locus *pef* ("plasmid encoded fimbriae"), localizado no plasmídeo de virulência. Uma linhagem

de *S. typhimurium* contendo mutação em *pefC*, um dos genes responsáveis pela expressão desta fímbria, apresenta capacidade reduzida de adesão às microvilosidades intestinais de camundongos recém-nascidos (Bäumler *et al.*, 1996c).

Concluindo, *Salmonella* sp apresenta a capacidade de expressar diferentes fímbrias e estas, por sua vez, dirigem a adesão e posterior invasão de tipos celulares específicos presentes na mucosa intestinal do hospedeiro.

2.1.2. Invasão de células eucarióticas

A invasão de células eucarióticas por *S. typhimurium* envolve a formação de apêndices protéicos na superfície bacteriana chamados “invasomos”. Estes apêndices estão envolvidos com a indução de modificações fisiológicas na célula hospedeira, mais precisamente com rearranjos do citoesqueleto, resultado de um acúmulo de proteínas tais como a actina, α -actina, talina, tubulina, tropomiosina e ezirina, na região do contato e envolvendo a célula bacteriana (Ginocchio *et al.*, 1994). O resultado destas alterações é a formação de protrusões (“ruffles”) da membrana citoplasmática da célula hospedeira, através das quais a bactéria ganha acesso ao interior da mesma (Francis *et al.*, 1993). Estas alterações na membrana citoplasmática assemelham-se às alterações induzidas por uma variedade de estímulos, incluindo a ação de fatores de crescimento e a ativação de oncogenes (Galán, 1994).

Os invasomos formam-se na superfície da célula bacteriana aproximadamente 15 a 30 minutos após o contato com a célula hospedeira e são perdidos ou reabsorvidos em concomitância com a formação das protrusões (Ginocchio *et al.*, 1994). O contato entre a célula bacteriana e a hospedeira é necessário para a indução da formação dos invasomos. A perda ou absorção destes também é fundamental para a formação das protrusões celulares e, conseqüentemente, para a invasão (Ginocchio *et al.*, 1994).

O aumento da concentração intracelular de íons cálcio está envolvido diretamente com a formação dos “ruffles” e com a invasão da célula hospedeira (Pace *et al.*, 1993). Este aumento é causado pela ativação de canais de cálcio na membrana citoplasmática. Se diferentes vias de transdução de sinais bioquímicos, envolvendo receptores de membrana

externa em diversos tipos celulares, estão envolvidos neste processo, esta é ainda uma questão a ser respondida. No entanto, a ativação da enzima MAP quinase (MAPK, do inglês "mitogen-activated protein kinase) por fosforilação de um resíduo de tirosina, parece ser o ponto de convergência chave para todas as alterações observadas na célula hospedeira (Galán, 1994). A enzima MAP quinase, por sua vez, ativa a fosfolipase A2 (PLA2). Como resultado é produzido ácido aracdônico, que é subseqüentemente convertido em leucotrieno D4 (LTD4) e este, direta ou indiretamente, ativa os canais de cálcio causando um influxo de íons cálcio para o interior da célula (Pace *et al.*, 1993). Recentemente, Rosenshine *et al.* (1994) determinaram que um fator presente no sobrenadante de culturas de *S. typhimurium* era capaz de fosforilar a enzima MAP quinase, e que isso também ocorria quando o sobrenadante da cultura do mutante *invA*, não invasivo, era utilizado. Esses resultados refletem a complexidade dos sinais bioquímicos entre a célula bacteriana e a célula alvo envolvidos neste mecanismo.

As bases genéticas e moleculares da invasão de células de culturas eucarióticas por *Salmonella* sp são complexas e ainda existem muitos aspectos a ser elucidados. Um grande número de genes de *Salmonella* sp envolvidos com a invasão de células de mamíferos foram identificados (Elsinghorst *et al.*, 1989; Galán *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992; Stone *et al.*, 1992; Behlau & Miller, 1993; Groisman & Ochman, 1993; Jones & Falkow, 1994; Hueck *et al.*, 1995; Kaniga *et al.*, 1995). Muito interessante é a localização de grande parte dos 63 centissomos (Cs) no cromossomo de *S. typhimurium* (1 Cs equívale a 48 Kb). Esta região do cromossomo compreende uma seqüência de 40 Kb não presente no genoma de *E. coli* K12, e parece constituir uma "ilha de patogenicidade" (Mills *et al.*, 1995). Esta região é composta por 4 *loci*, *locus inv* ("invasion"), *locus spa* ("surface presentation antigens"), *locus sip* ("Salmonella invasion proteins") e *locus prg* ("PhoP repressed genes"), além de alguns genes acessórios (revisado por Galán, 1996). Curiosamente, embora inversão de alguns trechos estejam presentes, os genes desta região são ordenados da mesma maneira e apresentam similaridade com os genes *mxi*, *spa* e *ipa*, presentes no plasmídio de virulência de *Shigella* sp (Groisman & Ochman, 1993; Maurelli, 1994; Hueck *et al.*, 1995). Além do mais, estes genes de *Salmonella* sp e *Shigella* sp apresentam homologia com genes do plasmídio de virulência de *Yersinia* sp e com genes envolvidos na secreção e montagem de componentes flagelares em diferentes bactérias (Mills *et al.*, 1995). Os produtos gênicos destes *loci* estão envolvidos com a secreção de proteínas

necessárias à invasão de células eucarióticas, no caso de *Salmonella* sp, *Shigella* sp, *Yersinia* sp e de genes estruturais formadores do flagelo em outras bactérias. Juntos, estes *loci* compõem o sistema de secreção tipo III, *sec* independente (Galán, 1996).

Em *Salmonella* sp, o *locus inv* está ligado à secreção e montagem dos invasomos e mutações não polares em genes destes *locus* inibem a invasão de células de mamíferos (Ginocchio *et al.*, 1994). Mutações em *invA* e *invE* estão ligadas à capacidade de reabsorção ou perda dos apêndices necessários à invasão, uma característica que, como citado anteriormente, impede a formação dos “ruffles” e, conseqüentemente, a invasão (Ginocchio *et al.*, 1994). O gene *invC* codifica uma ATPase que, possivelmente, está ligada à hidrólise de ATP e ao fornecimento da energia necessária à formação dos invasomos (Eichelberg *et al.*, 1994). A única proteína codificada pelo *locus inv*, que é secretada para o meio de cultura, é a proteína InvJ, porém, sua função na fisiologia da invasão ainda não foi elucidada (Zierler & Galán, 1995). O último *locus* desta região a ser descrito foi o *locus sip* (“*Salmonella* invasion proteins”) (Hermant *et al.*, 1995; Hueck *et al.*, 1995; Kaniga *et al.*, 1995). Os genes *sipABCD* parecem formar um *operon* e apresentam similaridade com os genes *ipaABCD* (“invasion proteins antigens”), presentes no plasmídio de virulência de *Shigella* sp. Em *Shigella* sp, as proteínas Ipa são as responsáveis pelo processo invasivo (Goldberg & Sansonetti, 1993). As proteínas Sip, portanto, são possivelmente as responsáveis pela indução das modificações fisiológicas e estruturais na célula eucariótica hospedeira e participam estruturalmente da formação dos invasomos, sendo desta forma, proteínas alvo do sistema de secreção codificado pelos *loci inv*, *spa* e *prg*.

Em *Salmonella* sp, a transcrição dos genes necessários à invasão é induzida por crescimento em condições anaeróbicas (Jones & Falkow, 1994). Mutantes constitutivos para a expressão destes genes foram isolados após mutagênese com transposon (Lee *et al.*, 1992). Neste estudo, as inserções dos transposons estavam concentradas em um *locus* que foi chamado *hil* (do inglês, “hyper invasive *locus*”). Mutantes *hil* diferem das linhagens selvagens pela expressão constitutiva e, portanto, não indutiva dos genes ligados à invasão (Lee *et al.*, 1992). A anaerobiose é um dos fatores conhecidos que afetam o grau de “supercoiling” do DNA genômico bacteriano e este, por sua vez, altera a expressão de diferentes genes (Dorman, 1995). Galán & Curtiss (1990) demonstraram que a expressão do gene *invA* é alterada com a modificação do grau de “supercoiling” do DNA. Jones &

Falkow (1994) descreveram o gene *orgA* ("oxygen regulated gene"), um dos genes do *locus hil* que é ativado por baixas tensões de oxigênio. Posteriormente, foi demonstrado que o *locus hil* está localizado dentro da "ilha de patogenicidade" e é composto pelo gene *hilA*, pelo operon *prgHIJK* que codifica para fatores importantes para a invasão, e pelo gene *orgA* (Hueck *et al.*, 1995; Pegues *et al.*, 1995). A transcrição destes genes está sob o controle negativo de PhoP, um regulador transcricional cuja função na patogenicidade será discutida posteriormente. Recentemente, o papel regulatório deste *locus* na indução da invasão em condições anaeróbicas foi elucidado. O gene codificador de uma proteína regulatória, chamado *hilA*, foi descrito como responsável pelo fenótipo hiperinvasivo e como ativador transcricional da expressão de genes importantes para a invasão. A proteína HilA apresenta similaridade com proteínas da família de ativadores transcricionais OmpR-ToxR, o que reforça a idéia do papel deste gene na ativação de importantes fatores de patogenicidade (Bajaj *et al.*, 1995).

2.1.3. Tolerância a fatores adversos

Bactérias enteropatogênicas apresentam, invariavelmente, capacidade de resistir a diferentes fatores adversos encontrados tanto no meio ambiente como no interior do organismo hospedeiro. Estes fatores envolvem variações bruscas de temperatura, osmolaridade, pH e baixa disponibilidade de fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio, e ferro. *Salmonella* sp apresenta diferentes mecanismos para sobreviver a estas condições, os quais envolvem a síntese de sistemas para a captação de nutrientes essenciais presentes em poucas quantidades, principalmente no interior do organismo hospedeiro, além da expressão regulada de proteínas que garantem a sobrevivência da célula bacteriana a estas condições extremas (revisado por Foster & Spector, 1995).

Após a invasão da célula da mucosa intestinal, *Salmonella* sp é capaz de invadir células do sistema reticulo-endotelial, principalmente macrófagos, por um processo que envolve a formação de invasomos e de protrusões na célula alvo. Em macrófagos, a invasão por *Salmonella* sp ocorre através de um processo chamado macropinocitose, que leva à formação de um grande fagossomo (SP, do inglês, "spacious phagosomes") (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994), formado como o resultado de uma maciça absorção de fluidos. A formação dos SP ocorre principalmente na invasão de macrófagos por *Salmonella*

sp e é uma estrutura característica da invasão destas células retículo-endoteliais, não sendo observada na fagocitose de outras espécies bacterianas (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994). Desta forma, a formação do SP é induzida por *Salmonella* sp e, possivelmente, esta associada à sobrevivência destas no interior dos macrófagos (Alpuche-Aranda *et al.*, 1994). A capacidade de formação e manutenção destas estruturas também tem sido associada à especificidade de infecção do hospedeiro apresentada pelos diferentes sorotipos de *Salmonella* sp (Alpuche-Aranda *et al.*, 1995; Pascopella *et al.*, 1995).

Nos SP dos macrófagos, as células de *Salmonella* sp estão sujeitas a condições adversas como pH ácido, ataque de metabólitos tóxicos de oxigênio e nitrogênio e a presença de polipeptídios catiônicos com atividade bactericida, comumente chamados defensinas (Ouellette *et al.*, 1994). Nesta condição, foi estimado que a presença de genes codificadores de ao menos 40 proteínas bacterianas é induzido (Abshire & Neidhardt, 1993). Um dos *loci* responsáveis pela indução de alguns destes genes é o PhoP/PhoQ. Este *locus* codifica proteínas que fazem parte da família de ativadores transcricionais, com dois componentes, uma proteína sensora-quinase trans-membrânica que, uma vez ativada por fatores ambientais, fosforila um ativador transcricional citoplasmático. Este último, seletivamente, ativa ou inibe a expressão de um grupo específico de genes. Desta família, fazem parte, além de PhoP/PhoQ, as proteínas EnvZ/OmpR em *Escherichia coli* e *Salmonella* sp, BvgA/BvgS em *Bordetella pertussis*, ToxR em *Vibrio cholera*, entre outras (Gross *et al.*, 1989).

PhoQ é a proteína sensora que, ativada por fatores presentes nos SP, autocatalisa a fosforilação de sua extremidade carboxi-terminal voltada para o citoplasma celular (Véscovi *et al.*, 1994). Uma vez fosforilada, a extremidade carboxi-terminal catalisa a transferência do grupo fosfato para PhoP, o regulador transcricional (Véscovi *et al.*, 1994). PhoP torna-se ativo quando fosforilado, o que por sua vez ativa ou inibe a expressão de diferentes grupos gênicos. Até o momento, foram descritos 17 genes ativados por PhoP que coletivamente são chamados *pag* ("PhoP activated genes"). Os produtos de alguns genes *pag* estão envolvidos com a sobrevivência da bactéria no interior dos SP, sendo que mutantes sem a expressão de PhoP/PhoQ ou mutações em muitos dos genes *pag*, apresentam diminuição da capacidade de sobrevivência no interior dos SP (Véscovi *et al.*, 1994). Os genes cuja expressão é inibida por PhoP-P são chamados coletivamente *prg*

("PhoP repressed genes") (Véscovi *et al.*, 1994). Curiosamente, mutantes PhoP constitutivos (PhoP^C), são menos eficientes na capacidade de invadir células eucarióticas (Behlau & Miller, 1993). De fato, mutantes de *Salmonella* sp PhoP^C, apresentam deficiência na secreção de diferentes proteínas para o meio extracelular (Pegues *et al.*, 1995). Desta forma, alguns dos genes *prg*, provavelmente, estão envolvidos com a invasão de células eucarióticas, promovendo a secreção de proteínas importantes para o processo invasivo.

Uma das proteínas *pag* mais bem estudadas é a PagC. Esta é uma proteína de superfície que apresenta alto grau de homologia com proteína a Ail de *Yersinia* sp e Rck, codificada por um gene do plasmídeo de virulência de *Salmonella* sp (Véscovi *et al.*, 1994). Mutantes *pagC* apresentam capacidade reduzida de sobreviver no interior dos SP nos macrófagos (Miller *et al.*, 1993). O gene *phoN* foi um dos primeiros a ser descrito cuja transcrição é ativada por PhoP. Esse gene codifica uma fosfatase ácida não específica (Groisman *et al.*, 1992). O fato de *phoN* ser ativado por PhoP indicaria uma função de *phoN* na sobrevivência nos SP, entretanto, mutantes *phoN* não são atenuados com relação à virulência (Fields *et al.*, 1989). Este resultado indica que *phoN* não é essencial à sobrevivência da bactéria no interior dos macrófagos. Sequências homólogas a *phoN* foram encontradas somente em outras duas bactérias gram-negativas sendo que, possivelmente, este gene foi adquirido por transmissão horizontal (Groisman *et al.*, 1992). De fato, o conteúdo de G/C de *phoN* é menor do que a média descrita para genes de *Salmonella* sp (Groisman *et al.*, 1992).

Recentemente, Véscovi *et al.* (1996) demonstraram que os sinais extracelulares responsáveis pela ativação de PhoQ são íons Mg²⁺. Estes autores demonstraram que a expressão de genes regulados por PhoP/PhoQ é inversamente proporcional à concentração deste íon. Esta foi uma descoberta muito interessante, uma vez que estes íons, tradicionalmente, estão associados funções de mensageiros secundários ou atuando como cofatores de reações químicas. Estes resultados demonstraram a ação do Mg²⁺ como mensageiro na transdução de sinais de uma reação em cascata.

Outro *regulon* importante para a sobrevivência de *Salmonella* sp no interior de fagossomos dos macrófagos é o formado pelos genes *sap* ("sensitive to antimicrobial peptides") e pelo *operon pmr* ("polimixin resistance"). Estes genes estão envolvidos com a

codificação de proteínas ligadas à resistência contra defensinas (Parra-Lopes *et al.*, 1993; Rowland *et al.*, 1993; 1994).

2.2. Gastroenterites causadas por *Salmonella* sp

Alguns sorotipos de *Salmonella* sp que não *S. typhi* ou *S. paratyphi* são freqüentemente relacionados a infecções intestinais em humanos (Groisman *et al.*, 1990). Dentre estes, os mais freqüentes são *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. Os mecanismos de virulência implicados nestas infecções só recentemente começaram a ser elucidados. Com a utilização de células epiteliais intestinais T84 de origem humana, que formam uma camada única de células polarizadas em superfícies apical e basolateral, McCormick *et al.* (1993, 1995) desenvolveram um sistema modelo para a gastroenterite humana causada por *Salmonella* sp. Estes autores descreveram que a gastroenterite causada por *S. typhimurium* em humanos está relacionada à capacidade destas estimularem a migração de neutrófilos através da camada epitelial, possivelmente por meio de uma nova via de transdução de sinais. A migração destas células imunológicas, em última instância, causa a inflamação e danificação da mucosa intestinal, o que leva à diarreia.

2.3. Produção de toxinas

Foi descrita a produção de uma enterotoxina termo-lábil (LT) por uma linhagem de *S. typhimurium* (Prasad *et al.*, 1990). O gene cromossômico codificador desta toxina em *Salmonella* sp, chamado de “*Salmonella* toxin gene” (*stn*), foi clonado e sua seqüência nucleotídica determinada (Chopra *et al.*, 1994). O gene *stn* é formado por uma seqüência de 749 pb e codifica uma proteína (Stn) de 29730 Daltons. A toxina Stn não apresenta homologia com as enterotoxinas LT e CT produzidas por linhagens de *E. coli* enterotoxigênica e *Vibrio cholerae*, respectivamente. Curiosamente no entanto, quando a toxina Stn foi purificada de clones recombinantes de *E. coli*, apresentou a capacidade de ativar a produção de AMP cíclico (AMPc), atividade esta semelhante à exibida pelas enterotoxinas LT e CT citadas. A atividade biológica de Stn foi também inativada por antissoro policlonal anti-CT, indicando a existência de alguns epítomos antigênicos em comum entre estas duas toxinas (Prasad *et al.*, 1990). “Imunoblotting” realizado a partir de extratos celulares totais e periplasmáticos de linhagens *S. typhimurium* LT2, selvagem e

atenuadas, contendo deleções nos genes *cya/crp/asd* e utilizando antissoro policlonal anti-toxina LT-1, não foram capazes de detectar, nestas linhagens, a toxina Stn (Covone *et al.*, 1998). Assim, a função desta toxina na virulência deve ainda ser elucidada.

Além da Stn, outras enteroxinas termo-lábeis produzidas por *Salmonella* sp, foram descritas (Sears & Kaper, 1996). Estas toxinas foram capazes de aumentar a secreção no teste de alça ligada de coelhos, causar alongamento em células CHO em cultura e aumentar a permeabilidade de células da epiderme de ratos, porém, suas funções na patogenicidade ainda devem ser elucidadas.

Libby *et al.* (1994) descreveram a produção de uma hemolisina por *S. typhimurium*, chamada de salmolisina (Sln), e a caracterizaram como sendo um importante fator de virulência. Curiosamente, esta proteína apresenta homologia com as proteínas regulatórias MprA de *E. coli* e PecS de *Erwinia chrysanthemi*. Esta observação fez surgir a hipótese de que, na verdade, este gene codifique um ativador transcricional (Dehoux & Cossart, 1995). Maiores esclarecimentos com relação a estes resultados são, portanto, fundamentais para a elucidação da função desta hemolisina em *Salmonella* sp.

2.4. Presença de plasmídio de virulência

Com a exceção de *S. typhi*, outras espécies do gênero *Salmonella* apresentam plasmídios de alto peso molecular (Guiney *et al.*, 1994). Estes plasmídios foram, inicialmente, denominados plasmídios crípticos mas, atualmente, muitas características, incluindo a codificação de fatores de virulência, são atribuídos a genes presentes nestes plasmídios. Em *S. typhimurium*, diferentes isolados analisados apresentam um plasmídio de 60 MDa também conhecido como plasmídio de virulência (Sanderson, 1995). Plasmídios de alto peso molecular também foram descritos para *S. enteritidis*, *S. choleraesuis* e *S. dublin*, entre outras (Guiney *et al.*, 1994). Embora heterogêneos com relação ao peso molecular e seqüência de nucleotídeos, estudos de hibridação evidenciaram algumas regiões com alto grau de homologia. Uma destas regiões, de 7,8 Kb, define o *locus* Spv (“*Salmonella* plasmid virulence”), codificando cinco proteínas que parecem estar envolvidas na multiplicação da bactéria no interior do organismo hospedeiro, mas não com a invasão de células eucarióticas (Gulig & Curtiss III, 1987).

Outros genes de virulência também foram mapeados no plasmídio de *S. typhimurium*. O gene *rck* ("resistance to complement killing") que codifica uma proteína de membrana externa de 17 KDa possivelmente inibidora da lise bacteriana mediada pelo sistema complemento (Hafferman *et al.*, 1992); o gene *traT*, associado à resistência ao soro (Sukupolvi *et al.*, 1990) e o *locus pef*, codificador de uma fímbria já discutida no item 2.1.1., localizado entre as duas origens de replicação deste plasmídio (Friedrich *et al.*, 1993).

2.5. Vacinas contra Salmonelose

A utilização de linhagens do gênero *Salmonella*, mortas por diferentes tratamentos físicos ou químicos, em imunizações orais ou parenterais é extremamente restrita, já que é pouco imunogênica e não é capaz de ativar uma eficiente resposta imunológica secretória ao nível de mucosa intestinal (Cárdenas & Clements, 1992). Desta forma, a utilização de linhagens vivas atenuadas, que persistem e multiplicam-se por um breve período nos tecidos do organismo hospedeiro, é necessária para a indução de uma resposta imunológica mais efetiva. Este fato, associado à capacidade de invadir e proliferar em células do retículo endotelial, faz de *Salmonella* sp um atraente agente carreador de epítomos antigênicos para o desenvolvimento de vacinas multifatoriais.

2.5.1. Atenuação de *Salmonella* sp

Uma série de mutantes atenuados de *Salmonella* sp com relação à virulência foram descritos e alguns propostos como vacinas vivas atenuadas (revisões em Cárdenas & Clements, 1992; e Curtiss III *et al.*, 1994). O desenvolvimento destes mutantes não é uma tarefa fácil, pois tais linhagens devem ser capazes de proliferar e persistir no organismo hospedeiro durante tempo suficiente para induzir uma efetiva resposta imunológica. Além disso, as mutações responsáveis pela atenuação devem ser altamente estáveis de forma a tornar nula a probabilidade de reversão desta característica. Bacon *et al.* (1950) foram os primeiros a investigar a não virulência de certos mutantes auxotróficos de *S. typhi*. Estes estudos indicaram que mutantes com necessidade de suplementação de purinas, ácido *p*-aminobenzóico (*p*ABA) e aspartato apresentavam reduzida virulência em camundongos. Desde então, esforços foram somados para se construir linhagens vivas atenuadas que

constituíssem bons carreadores de epítopos antigênicos. A seguir estão descritas algumas das principais mutações que atenuam a virulência.

2.5.2. Mutantes *galE*

Germanier & Fürer (1971) foram os primeiros a demonstrar a avirulência e a imunogenicidade de mutantes *galE* de *S. typhimurium* em camundongos e, posteriormente, propuseram a utilização desta linhagem de *S. typhi* mutante *galE*, Ty21a, como vacina viva atenuada (Germanier & Fürer, 1975). O gene *galE* codifica a enzima UDP-glicose-4-epimerase, que catalisa a isomerização reversível de UDP-glicose em UDP-galactose. Mutações no gene *galE*, portanto, acarretam deficiência na produção de lipopolissacarídeos (LPS) completos que são sintetizados a partir de UDP-galactose. Quando quantidade suficiente de galactose é adicionada ao meio de cultura, tais mutantes produzem LPS completos, mas as células bacterianas sofrem lise devido ao acúmulo tanto de galactose-1-fosfato quanto de UDP-galactose.

Inicialmente, acreditou-se que *S. typhi* Ty21a era atenuada devido à mutação *galE* e à deficiência na produção de cápsula (Vi), uma outra característica apresentada por esta linhagem. Entretanto, Hone *et al.* (1988) demonstraram que deleções nos genes *galE* e *vi* não são suficientes para atenuar a virulência de *S. typhi* Ty. O mutante Ty21a foi obtido através de mutagênese com N-metil-N'-nitro-N-nitroguanidina, um agente mutagênico não específico, portanto a sua atenuação deve-se, provavelmente, a outras mutações ainda não caracterizadas. Apesar disso, esta linhagem era a única de *S. typhi* liberada para ser usada como vacina viva (Cárdenas & Clements, 1992).

2.5.3. Mutantes *aro*

Hoiseth & Stocker (1981) foram os primeiros a obterem mutantes de *S. typhimurium* com mutações em genes da via biossintética dos aminoácidos aromáticos (genes *aro*), utilizando mutagênese com transposon Tn10. Estes autores demonstraram que mutações no gene *aroA* eram associadas à diminuição da virulência. Posteriormente, linhagens contendo mutações em outros genes da mesma via biossintética foram obtidas e mostraram-se, invariavelmente, avirulentas e imunogênicas (Dougan *et al.*, 1988). Como

conseqüência, mutantes análogos de *S. typhi* também foram construídos (Hone *et al.*, 1991).

Mutações que interrompem a via biossintética dos aminoácidos aromáticos provocam, em *Salmonella* sp, auxotrofia para 2,3-dihidroxibenzoato e para o ácido *p*-aminobenzóico (*p*ABA), substratos não disponíveis nos tecidos de mamíferos. No entanto, a avirulência parece ser devida principalmente à auxotrofia para *p*ABA (Curtiss & Kelly, 1987).

As observações de que em animais de laboratório a administração na dieta de *p*ABA é capaz de restituir a virulência de mutantes *aro* (Bacon *et al.*, 1951) associada à presença de *p*ABA em alimentos, levaram a seguinte pergunta: existe a possibilidade de reversão fenotípica de mutantes *aro*, quando usados em programas de imunização em massa nas regiões onde se faz uso de alimentos com *p*ABA?

2.5.4. Mutantes *PhoP/PhoQ*

Como mencionado no item 2.1.3., os genes *phoP/phoQ* estão envolvidos com a ativação de genes importantes para a resistência aos fatores adversos presentes no interior de fagossomos dos macrófagos e células polimorfonucleares, e ainda, com a inibição de genes que controlam a invasão de células eucarióticas. Desta forma, não é surpreendente que mutantes *phoP* nulos ou *phoP* constitutivos sejam atenuados (Behlau & Miller, 1993; Miller *et al.*, 1993; Véscovi *et al.*, 1994). Recentemente, Hohmann *et al.* (1995) descreveram a construção de um vetor suicida que permite a inserção estável de genes heterólogos em *pagC* e a fusão gênica entre as seqüências estruturais do antígeno e do promotor de *pagC*.

2.5.5. Mutantes *cya crp*

AMP cíclico (AMPc) e o receptor para AMP cíclico (CRP) são reguladores gerais necessários à transcrição de muitos genes e *operons* envolvidos com o transporte e quebra de catabólitos (Curtiss & Kelly, 1987). Sistemas usados para o transporte de fontes de carbono estão sob o controle positivo de AMPc como também várias aminoácido-permeases (Curtiss & Kelly, 1987). A concentração de AMPc no interior das células

influencia a lisogenização por fagos temperados, a síntese de pili ou fímbrias, de flagelo e de pelo menos uma proteína da membrana externa, a OmpA (Movva *et al.*, 1981).

Curtiss & Kelly (1987) descreveram a construção de linhagens de *Salmonella* sp com deleções nos genes codificadores para adenil ciclase (*cya*) e para o receptor de AMPc (*crp*). Estas linhagens $\Delta cya \Delta crp$ foram atenuadas na virulência, imunogênicas e propostas como candidatas a vacinas vivas orais.

Paralelamente, um sistema de estabilização da expressão de antígenos heterólogos *in vivo* foi desenvolvido (Galán *et al.*, 1990). Utilizando o sistema de expressão descrito a seguir, várias linhagens recombinantes, expressando determinantes antigênicos de diversas origens, foram construídas e utilizadas com sucesso na indução de resposta imunológica (Curtiss *et al.*, 1994; Doggett *et al.*, 1993; Redman *et al.*, 1994, 1995; Schödel *et al.*, 1994).

Assim, as concentrações de AMPc encontradas nos tecidos e em células de mamíferos (0,1 a 1 μ M) são muito inferiores às necessárias para que mutantes *cya* exibam o fenótipo selvagem (0,1 a 1 mM). De qualquer forma, a inclusão da mutação *crp* previne qualquer benefício que a célula bacteriana pudesse obter pela captação de AMPc dos tecidos invadidos. Desta forma, a possibilidade de reversão de mutantes *cya/crp* para o fenótipo selvagem é praticamente inexistente, o que torna estas linhagens seguras tanto para sua utilização como vacinas vivas quanto como carreadoras de epítomos antigênicos ao GALT (Curtiss & Kelly, 1987).

2.5.6. Outras mutações

Mutações nos genes *ompR* (Pickard *et al.*, 1994), *htrA* (Johnson *et al.*, 1991) e *h-ns* (Harrison *et al.*, 1994) atenuaram a virulência em *Salmonella* sp. Mutantes sensíveis à temperatura e atenuados na virulência também foram descritos. Entretanto, uma característica destes últimos é a alta frequência de reversão ao fenótipo parental, o que limita a sua utilização como vacinas vivas (Cárdenas & Clements, 1992).

2.6. Resposta imunológica contra antígenos heterólogos

A determinação dos fatores que influenciam a resposta imunológica a antígenos carregados por *Salmonella* sp ainda é motivo de discussão. Diferentes autores demonstraram que para alguns antígenos, o fator determinante de efetividade da resposta imunológica é a quantidade produzida pela bactéria recombinante, sendo a localização do antígeno na mesma um fator de menor importância (Leclerc *et al.*, 1994; Wick *et al.*, 1994). Hess *et al.* (1996), entretanto, demonstraram que para alguns antígenos sua secreção pela linhagem vacinal é necessária para a indução de proteção. Adicionalmente, Karem *et al.* (1995) obtiveram diferentes resultados com relação à resposta imunológica contra o mesmo antígeno, quando este foi expresso a partir de promotores constitutivos ou indutíveis, e em linhagens de *S. typhimurium* contendo diferentes mutações atenuantes. Coletivamente, estes dados sugerem a existência de vários fatores que determinam tanto o tipo de resposta imunológica induzida quanto o seu potencial efeito protetor.

Estes fatores dependem não somente das características do antígeno e da linhagem vacinal de *Salmonella* sp, mas também da via de imunização e de como o antígeno é processado e apresentado ao sistema imunológico. A grande questão é que os fatores envolvidos na resposta imunológica contra antígenos carregados por vetores vivos ainda são pouco compreendidos (Leclerc *et al.*, 1994). A perfeita compreensão destes fatores não só permitirá o desenvolvimento de vacinas mais efetivas, como também a perfeita modulação do tipo de resposta requerida, através da utilização de vacinas especificamente formuladas para a sensibilização de célula

Um dos fatores importantes na determinação da eficiência da resposta imunológica contra antígenos carregados por *Salmonella* sp é a estabilidade de expressão destes *in vivo* (Hone *et al.*, 1988). A utilização de plasmídios com marcas de resistência a antibióticos para esta finalidade está frequentemente associada com instabilidade e com segregação de células livre de plasmídios, sendo assim incapazes de produzir o antígeno após poucos ciclos de replicação (Hone *et al.*, 1988).

Uma das formas de estabilizar tal expressão é a construção de proteínas antigênicas híbridas onde a expressão está sob o controle de promotores indutíveis em

condições específicas e encontradas, preferencialmente, no interior do organismo hospedeiro. Este é o caso do promotor *nirB*, indutível em condições anaeróbias ou microaeróbias (Chatfield *et al.*, 1992) ou promotores de *pagC/D*.

Outra forma de estabilização da expressão é o desenvolvimento de sistemas letais balanceados (Galán *et al.*, 1990; Morona *et al.*, 1994). Estes sistemas se baseiam na complementação em “trans” de mutações em genes essenciais para a sobrevivência da bactéria, através da introdução de plasmídios contendo o gene selvagem ativo como também os genes codificadores da proteína antigênica. Desta forma, colônias com segregação plasmial são rapidamente eliminadas, garantindo-se a colonização dos tecidos hospedeiros apenas por células bacterianas contendo o plasmídio. Um destes sistemas faz uso do gene *asd*, que codifica a enzima aspartato- β -semialdeído-dehidrogenase, uma enzima da via biossintética da lisina que apresenta como composto intermediário o ácido diaminopimélico (DAP). O DAP é um importante constituinte da parede celular em bactérias gram-negativas e mutantes *asd* são lisados após poucos ciclos de replicação (Galán *et al.*, 1990).

2.7. Integração de genes heterólogos no cromossomo de *Salmonella* sp.

Algumas seqüências do genoma de *Salmonella* sp já foram utilizadas com o propósito de inserir seqüências heterólogas. O *operon* histidina foi utilizado para expressão do fator de colonização K88 (Hone *et al.*, 1988) de amostras de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC) e da subunidade B da toxina termo-lábil (LT) de ETEC (Cárdenas & Clements, 1993). Neste sistema, desenvolvido originalmente por Hone *et al.* (1988), os plasmídios utilizados no processo de integração são eliminados através de diversas etapas. Os genes *aro*, que codificam proteínas que atuam na síntese dos compostos aromáticos, também foram utilizados (Strugnell *et al.*, 1990). Neste sistema, a integração de seqüências heterólogas está associada à atenuação da virulência. Recentemente, os genes *pagC* e *pagD* foram utilizados como seqüências alvo (Hohman *et al.*, 1995). Neste sistema, as inserções são igualmente atenuantes mas, engenhosamente, foram projetadas de tal forma a permitir que a transcrição do gene heterólogo, após integração cromossômica, estivesse sob o controle dos promotores dos genes *pagC* ou *pagD*. Desta forma, proteínas heterólogas seriam produzidas quase exclusivamente no interior dos macrófagos. Hohman

et al. (1995) utilizando este sistema para a expressão de PhoA, uma fosfatase alcalina de *E.coli*, obtiveram a indução de altos títulos de imunoglobulina IgG.

Nos últimos dez anos, grandes avanços foram feitos na busca de um sistema que possa servir como vacina ideal de modo a estimular uma resposta imune humoral e mediada por célula, apresentar atenuação geneticamente definida e de caráter irreversível, e que seja capaz de expressar epítomos heterólogos estáveis externamente à bactéria. A utilização de uma linhagem de *Salmonella typhimurium* atenuada por deleção nos genes *cya/crp* e inserção do *operon* da fimbria K99 em um plasmídio estabilizado por complementação gênica pretende contribuir para o desenvolvimento de uma cepa vacinal capaz de induzir uma resposta imunológica frente a este antígeno e que seja eficaz, segura e de aplicação simples por via oral.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi clonar e expressar o gene que codifica a fímbria K99 de *Escherichia coli* em uma linhagem de *Salmonella typhimurium* atenuada por deleção nos genes *cya* e *crp*.

1. Objetivos Específicos

- Construir um plasmídio contendo o *operon* da fímbria K99 de *Escherichia coli*.
- Inserir o plasmídio construído em uma linhagem de *Salmonella typhimurium* atenuada por deleção nos genes *cya* e *crp*.
- Avaliar a expressão da fímbria pela linhagem recombinante em diferentes condições de cultura.
- Analisar a persistência em placas de Peyer e baço da linhagem recombinante em modelo animal.
- Avaliar a estabilidade plasmidial *in vivo*.
- Analisar a resposta sérica de anticorpos do modelo animal para antígenos de *Salmonella typhimurium*.
- Analisar a resposta sérica de anticorpos do modelo animal para a fímbria K99.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Plasmídios e linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas e plasmídios utilizados neste trabalho estão relacionados nas Tabelas III e IV, respectivamente.

Tabela III. Linhagens utilizadas neste trabalho.

LINHAGEM	CARACTERÍSTICAS	ORIGEM
<i>Escherichia coli</i> HB101	$\Delta(gpt-proA)62 leuB6 thi-1 hsdS_B20 supE44$ $ara-14 galK2 lacY1 mcrB_B rpsL20 (Str^R) xyl-5$ $mtl-1 recA$	Miller, <i>et al.</i> , 1972; Neidhardt, <i>et al.</i> , 1987.
<i>Escherichia coli</i> HB101-K99	HB101 contendo o plasmídio pFK99 e expressando a fímbria K99	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i> x6212	$\Phi80d lacZ \Delta M15 deoR \Delta(lacZYA-argF)U169$ $supE44 \lambda-gyrA recA1 relA1 endA1 \Delta asdA4$ $\Delta[zhf-2::Tn10] hsdR17 (r-m+)$	Curtiss III, <i>et al.</i> , 1994
<i>Salmonella typhimurium</i> x3987	pStV1+ $\Delta cya-12 \Delta crp-11 \Delta asdA1$ $\Delta [zhf-4::Tn10]$	Curtiss III, <i>et al.</i> , 1994
<i>Salmonella typhimurium</i> x3987-K99	x3987 contendo o plasmídio pSM40 e expressando a fímbria K99	Este trabalho

Tabela IV. Plasmídios utilizados neste trabalho.

PLASMÍDIO	CARACTERÍSTICA	ORIGEM
pFK99	pBR325 contendo o operon da fímbria K99	Van Embden, <i>et al.</i> , 1980
pYA3137	Asd+, plasmídio de expressão com origem de replicação do pUC18	Curtiss III, <i>et al.</i> , 1994
pSM40	pYA3137 contendo o operon da fímbria K99	Este trabalho

Nas figuras 2, 3 e 4 estão esquematizados respectivamente os plasmídios pFK99, pYA3137 e pSM40.

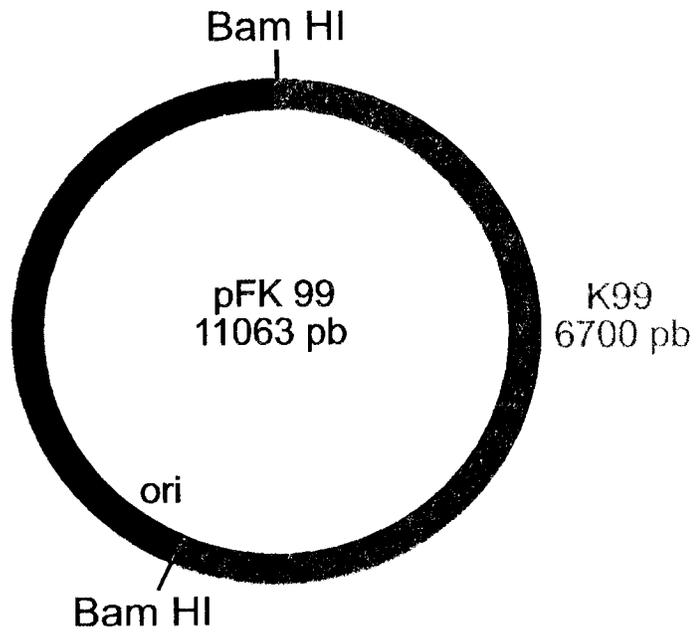


Figura 2 . Modelo esquemático do plasmídio pFK99.

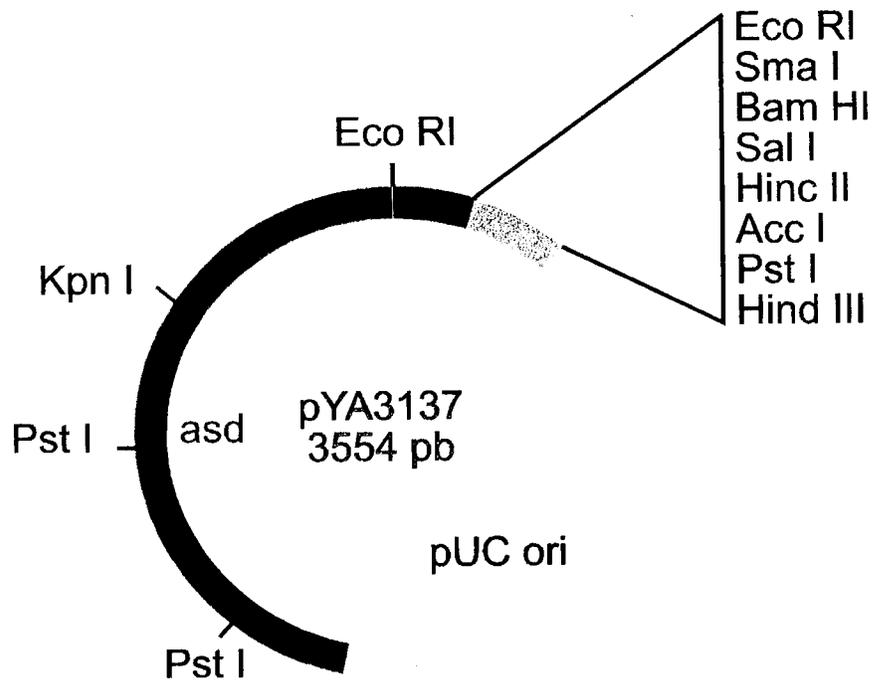


Figura 3. Modelo esquemático do plasmídio pYA3137.

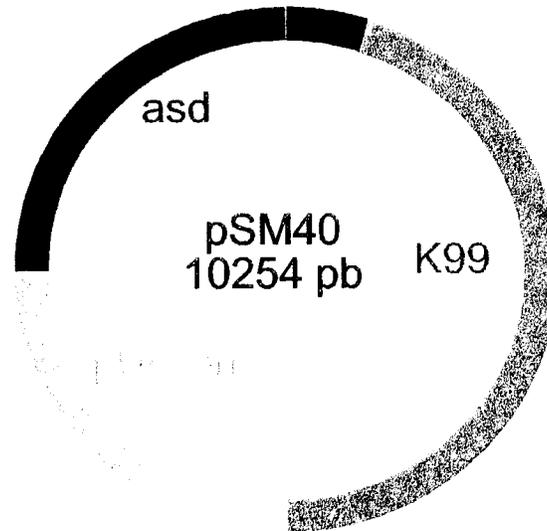


Figura 4. Modelo esquemático do plasmídeo pSM40.

2. Meios de cultura

Todos os meios utilizados na manutenção, cultivo e ensaio das amostras bacterianas foram preparados com reagentes de boa procedência e H₂O destilada. Para esterilização, os meios foram autoclavados a 121°C por 20 min e estocados a 4°C por, no máximo, uma semana. Nos ensaios, quando necessário, foram acrescentados agentes antimicrobianos nas concentrações descritas na tabela V. Os mutantes *asd* foram cultivados com o acréscimo de ácido diaminopimélico (DAP) ao meio, na concentração final de 50µg/ml. Foi acrescentado ágar bacteriológico (Difco) nas concentrações de 15 g/L e 7 g/L no preparo de meio sólido e semi-sólido (estoque de uso), respectivamente. No preparo do meio sólido, as placas foram secas a 37°C por 30 min com as tampas levemente deslocadas. As placas não utilizadas no dia foram armazenadas a 4°C por no máximo 1 semana, envolvidas em plástico para evitar dessecação. As linhagens foram estocadas em meio LB acrescido de glicerol 30% e armazenados a -70°C.

MEIO LB Líquido (Luria - Bertani)

Triptona	10,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
NaCl	5,0 g
NaOH 1N	1,0 ml
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

MEIO MINCA (K99)

KH ₂ PO ₄	1,3 g
NA ₂ HPO ₄ (2H ₂ O)	10,1 g
Glicose	1,0 g
Casaminoácido	1,0 g
Extrato de levedura	1,5 g
H ₂ O q.s.p.	1000 ml
Ágar difco	1,5 g
Solução de sais	1 ml

SOLUÇÃO DE SAIS PARA MINCA

MgSO ₄ (7H ₂ O)	10 g
MnCl ₂ (4H ₂ O)	1 g
FeCl ₃ (6H ₂ O)	0,135 g
CaCl ₂ (2H ₂ O)	0,4 g
H ₂ O q.s.p.	1000 ml

As soluções forma filtradas em filtro Millex (Millipore) com diâmetro de poro 0,22µm e distribuídas em alíquotas.

Tabela V. Concentração de uso dos antibióticos.

Antibiótico	Concentração final ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicilina (Ap)	50
Cloranfenicol (Cm)	20
Canamicina (Km)	30
Ácido nalidíxico (An)	15
Estreptomicina (Sm)	30
Tetraciclina (Tc)	12

3. Soluções de uso geral

Todas as soluções utilizadas foram preparadas com reagentes de grau P.A. e H₂O destilada e deionizada Milli-Q (Millipore Inc.). As soluções foram esterilizadas, quando necessário, por autoclavação a 121°C por 20 min ou por filtração em membrana Millex 0.22 μm (Millipore Inc.).

4. Extração de DNA plasmidial por lise alcalina

4.1. Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Miniprep) (Birboin & Doly, 1979)

As linhagens bacterianas foram inoculadas em 4 ml de meio LB contendo o agente antimicrobiano de seleção adequado e incubadas a 37°C por 18 horas. Foram transferidos 1,5 ml de cada cultura para tubos eppendorf (1,5 ml) e centrifugados a 13000 rpm por 1 min. O sobrenadante foi removido e o sedimento eluído em 100 μl de solução I (EDTA 10 mM, tris-HCl 25 mM pH 8,0). O tubo foi mantido em gelo por 5 min e 200 μl de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%) foram adicionados, homogeneizando-se por inversão. A suspensão clara e viscosa foi mantida em gelo por 3 min e, após este período, foram adicionados 150 μl de solução III (acetato de sódio 3 M pH 4,8). O tubo foi invertido por alguns segundos para a formação da rede de DNA e mantido em gelo por 15 min para precipitação de proteínas, fragmentos de parede e membrana, RNA de alto peso molecular e DNA cromossômico. A preparação foi centrifugada a 13000 rpm por 6 min e 400 μl de

sobrenadante transferidos para um tubo eppendorf novo, onde 1 ml (2,5 vezes o volume inicial) de etanol 100% gelado foi acrescentado para a precipitação do DNA plasmidial. O tubo foi homogeneizado por inversão, mantido a -20°C por 1 h e então centrifugado a 13000 rpm por 6 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento, após secagem, eluído em $40\ \mu\text{l}$ de TE (10 mM tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) para análise do perfil de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose. Nas preparações de DNA plasmidial a ser digeridas com enzimas de restrição, o sedimento obtido foi ressuscitado em $100\ \mu\text{l}$ de solução IV (acetato de sódio 0,1 M, tris-HCl 0,05 M pH 8,0) e adicionados $200\ \mu\text{l}$ (2 vezes o volume) de etanol 100% gelado. O tubo foi invertido, mantido a -20°C por 1 h e novamente centrifugado a 13000 rpm por 6 min. Após secagem, o sedimento foi eluído em $36\ \mu\text{l}$ de TE (tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) e acrescentado $4\ \mu\text{l}$ de RNase A (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para concentração final de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.2. Amplificação de DNA plasmidial

Os plasmídios a ser extraídos por lise alcalina em grande escala foram previamente amplificados. Para tanto, linhagens bacterianas foram inoculadas em tubo com 4 ml de LB e incubadas por 18 h a 37°C . Uma diluição 1:100 foi realizada em um erlenmeyer com 50 ml de meio LB e este incubado sob agitação de 150 rpm a 37°C até atingir a fase logarítmica de crescimento ($\text{DO}_{600} \sim 0,5$). Uma nova diluição foi feita, agora de 1:10, em 2 frascos erlenmeyer com 50 ml de meio LB cada. Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm a 37°C até uma $\text{DO}_{600} \sim 0,6$. Foram adicionados 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol e os frascos foram mantidos sob agitação por 18 h. A ação do cloranfenicol inibe a síntese protéica bacteriana sem afetar a replicação plasmidial, desta forma aumentando o número de plasmídios por célula bacteriana. A cultura foi transferida para tubos de polipropileno de 50 ml e centrifugado a 5000 rpm por 10 min e o sedimento celular submetido a extração plasmidial em grande escala.

4.3. Extração de DNA plasmidial em grande escala (Sambrook *et al.*, 1989)

O sedimento obtido por amplificação plasmidial foi ressuscitado em 5 ml de solução I (EDTA 10 mM pH 8,0, tris-HCl 25 mM pH 8,0, glicose 50 mM, lisozima 2 mg/ml). Aos tubos mantidos em gelo por 30 min foram adicionados 10 ml de solução II (NaOH 0,2 N, SDS 1%). Os tubos foram, então, invertidos suavemente, recolocados em gelo por 5 min e a lise alcalina interrompida pela adição de 7,5 ml de solução III (acetato de sódio 3 M). Após incubação de 30 min no gelo, a preparação foi centrifugada a 12000 rpm por 15 min e o sobrenadante transferido para outro tubo pela filtração através de gaze esterilizada. A precipitação de DNA foi feita pela adição de 13,5 ml (0,6 vezes o volume) de isopropanol gelado seguida de incubação a -20°C por 1 h e centrifugação a 10000 rpm por 10 min. O sedimento foi lavado com 10 ml de etanol 70%, seco à temperatura ambiente e ressuscitado em 1 ml de TE (tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM). A purificação de DNA foi feita utilizando-se o kit "Wizard™ DNA clean-up system" (Promega), de acordo com as especificações do fabricante.

4.4. Quantificação de DNA por espectrofotometria (Sambrook *et al.*, 1989)

O DNA obtido nas extrações foram quantificados em espectrofotômetro (Beckman DU-65). As preparações foram diluídas 50, 100 e 500 vezes e analisadas quanto à absorbância nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. A leitura a 260 nm permite calcular a concentração de ácidos nucleicos. Uma unidade de absorbância a 260 nm (DO_{260}) corresponde a 50 µg/ml de DNA dupla fita, 40 µg/ml de DNA fita simples e RNA, ou 20 µg/ml de oligonucleotídeos fita simples. A razão entre as leituras obtidas em 260 nm e 280 nm (DO_{260}/DO_{280}) fornece uma estimativa da pureza da amostra. Preparações puras de DNA apresentam valores DO_{260}/DO_{280} entre 1,8 e 2,0.

5. Clonagem molecular

5.1. Clivagem de DNA com enzimas de restrição

As enzimas de restrição foram utilizadas de acordo com as especificações dos fabricantes (Amersham Pharmacia, Gibco-BRL).

5.2. Purificação de fragmentos de DNA por eletroeluição (Sambrook *et al.*, 1989)

Os plasmídios clivados com as enzimas de restrição adequadas tiveram os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose em tampão TAE 1X (tris-acetato 0,04 M, EDTA 1 mM). Os fragmentos de interesse foram detectados por visualização em luz ultravioleta de onda longa, para minimizar a ocorrência de mutações, e cortados do gel. Os pedaços de agarose contendo os fragmentos foram colocados em tubos de diálise e submetidos a uma eletroeluição de 100 V por 1h, seguido de uma rápida inversão de polaridade por 1 min a 50 V. O DNA contido no líquido do tubo de diálise foi precipitado por etanol e eluído em 30 μ l de H₂O deionizada.

5.3. Reação de ligação

Os vetores plasmidiais e fragmentos de DNA foram ligados através da ação da enzima T⁴ DNA ligase (Amersham Pharmacia), conforme o método descrito por Sambrook *et al.* (1989), respeitando-se as condições sugeridas pelo fabricante.

6. Transferência de DNA plasmidial entre linhagens

6.1. Transformação bacteriana

6.1.1. Preparo de células competentes

A linhagem de *E. coli* receptora x6212 foi inoculada em 3 ml de LB com DAP e incubada a 37°C por 18 h. Uma alíquota da cultura foi transferida para 50 ml de LB em frasco erlenmeyer numa diluição de 1:20 ou 1:100 e incubada sob agitação de 150 rpm a 37°C, até atingir a DO₆₀₀ ~0,5. A cultura foi dividida em dois tubos de polipropileno esterilizados (25 ml/tubo) e mantida em gelo por 10 min. A seguir, esta cultura foi centrifugada a 5000 rpm por 10 min a 4°C, o sobrenadante retirado e o sedimento eluído em 20 ml de solução de CaCl₂ 0,1 M. Os tubos foram mantidos em gelo por 10 min e centrifugados nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi retirado e ambos os sedimentos eluídos em 2 ml de CaCl₂ 0,1 M, sendo então transferidos para tubos de ensaio

de vidro previamente gelados, em alíquotas de 200 μ l onde permaneceram em gelo durante no mínimo 4 h.

6.1.2. Adição de DNA às células competentes

Foram adicionados 100 ng de DNA às células competentes, que foram mantidas por 40 min em gelo. A seguir, foram submetidos a um choque térmico de aquecimento por 5 min a 37°C, seguido de resfriamento em gelo por 2 min. Em cada tubo foram adicionados 800 μ l de meio LB com glicose numa concentração final de 0,4% e, após incubação a 37°C por 45 min, o conteúdo foi transferido para outro tubo. Este foi centrifugado a 13000 rpm por 2 min, sendo o sedimento eluído em 100 μ l de LB. A preparação foi inoculada em placas de petri sem DAP. As placas foram incubadas a 37°C por 18 h e as colônias isoladas analisadas por extração plasmidial por lise alcalina em pequena escala, seguida de clivagem com enzimas de restrição para confirmação da inserção do plasmídeo correto.

6.2. Eletroporação

A linhagem de *Salmonella typhimurium* receptora x3987 foi transferida de uma cultura de 18 h para erlenmeyers (diluição 1/50) contendo 50 ml de LB. Após atingir a fase logarítmica ($DO_{600} \sim 0,5$), as culturas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min a 4°C. Os sedimentos foram eluídos em 3 ml de glicerol 10% gelado, o volume completado para 10 ml e esta lavagem com glicerol repetida por mais duas vezes. Por fim, os sedimentos foram eluídos em 300 μ l de glicerol 10% e distribuídos 60 μ l por cubeta de quartzo de 0,2 cm³. O DNA a ser eletroporado foi mantido em uma solução aquosa livre de sais numa concentração de 200 ng/ μ l e no máximo 5 μ l foram adicionados à cubeta. Em um aparelho "Gene Pulser System" (Bio Rad) foi aplicado 2,5 V a 800 ohms e 25 μ F. Imediatamente após a eletroporação, as células foram transferidas para tubos com 1 ml de LB e glicose numa concentração final de 0,4%. Após incubação por 1 h a 37°C a cultura foi centrifugada, eluída em 100 μ l e distribuída em placas com meios seletivos. As placas foram incubadas a 37°C por 18 h e as colônias isoladas analisadas por extração plasmidial por lise alcalina em pequena escala, seguida de clivagem com enzimas de restrição para confirmação da inserção do plasmídeo correto.

7. Extração de proteínas bacterianas

7.1. Extração de proteínas bacterianas de superfície

As linhagens bacterianas HB101, HB101-K99, x3987 e x3987-K99 foram inoculadas em placas de petri (6 placas por amostra) em meio Minca ou em meio LB. As células foram coletadas com o auxílio de bastão de Drigalski, após adição de 1 ml de PBS pH 7,2 por placa ou centrifugado por 5 min a 12000 rpm no caso de cultura líquida. A preparação submetida a 10 passagens através de agulha de bisel 23 em seringa de 5 ml e transferida para tubos eppendorf. Os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 4 min, sendo o sobrenadante transferido para tubos novos, onde foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) 40%, em um volume adequado para concentração final de 10%. Os tubos foram mantidos em gelo por 20 min e novamente microcentrifugados. O sedimento foi eluído em etanol:éter (1:1) por agitação vigorosa e mantido em gelo por 20 min, quando nova microcentrifugação foi realizada. A lavagem com etanol:éter foi repetida outras duas vezes e o sedimento final foi ressuscitado em 250 µl de PBS. Antes de ser realizada a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (PAGE-SDS), foi adicionada à preparação igual volume de solução de eluição de proteínas 2X (tris-HCl 100 mM pH 6,8, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, 2-mercaptoetanol 10%), seguida de fervura a temperatura de 100°C por 5 min.

7.2. Precipitação de proteínas por sulfato de amônio

A linhagem *Salmonella typhimurium* x3987-K99 foi transferida de um pré-inóculo para erlenmeyers, totalizando um volume de 2000 ml de meio de cultura LB. Essa cultura foi mantida a 37°C numa agitação de 150 rpm por 18 horas. As bactérias foram sedimentadas numa centrifugação de 7000 rpm por 10 min a 4°C e ressuscitadas em 60 ml de PBS. Para a separação das fímbrias, foram realizadas passagens seriais da preparação em seringa com agulha de bisel n^o 18, seguidas de aquecimento a 65°C por 15 min. O sobrenadante total da centrifugação a 10000 rpm por 10 min foi transferido para um erlenmeyer. A precipitação das proteínas foi feita pela adição de sulfato de amônio até as concentrações desejadas. As soluções foram agitadas por 1 hora a 4°C e, a seguir, centrifugadas a 10000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro

erlenmeyer e o procedimento de precipitação repetido para outras concentrações, enquanto o precipitado foi eluído em 3 ml de PBS pH 7,4. As concentrações de sulfato de amônio utilizadas foram 10%, 20%, 40%, 60% e 80%.

As precipitações assim obtidas foram transferidas e recuperadas por diálise com 2000 ml de PBS pH7,4 por 48 horas, com trocas a cada 12 horas. Após a diálise, uma alíquota de 20 μ l de cada precipitado foi adicionada a igual volume de solução de eluição de proteínas 2X (tris-HCl 100 mM pH 6,8, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, 2-mercaptoetanol 10%), seguida de fervura a temperatura de 100°C por 5 min e analisada em PAGE-SDS.

8. Produção de antissoro policlonal em coelhos (Sambrook *et al.*, 1989)

A proteína da subunidade principal da fímbria K99 foi extraída da linhagem HB101-K99 (pFK99) por extração de proteínas de superfície, seguida de precipitação com sulfato de amônio e a seguir homogeneizada, com volumes iguais de PBS pH 7,4 e de adjuvante Freund (Sigma) completo, através de um sistema conector de seringas. Dois coelhos de 1,5 kg foram selecionados e 10 ml de sangue retirados para obtenção do soro normal pré-imunização destes animais. Este soro foi conseguido pela centrifugação a 12000 rpm por 30 s, após o descolamento e retração do coágulo. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e armazenado a -20°C até o momento dos ensaios biológicos. A solução homogeneizada do antígeno foi inoculada intramuscularmente na parte interna das coxas traseiras dos coelhos.

O mesmo procedimento foi realizado após 21 dias do primeiro inóculo, utilizando-se adjuvante incompleto de Freund (Sigma), como estímulo de resposta imune secundária, e repetido por mais 2 vezes a cada 7 dias, ou seja, nos 28^o e 35^o dias após a primeira inoculação. Decorridos mais 7 dias coletaram-se 10 ml de sangue de cada animal para ser analisado quanto ao título de anticorpos produzidos em provas de soroaglutinação em lâmina. O antissoro policlonal obtido (título 1/512) foi absorvido contra a linhagem HB101 não produtora de fímbria (título final 1/64) e analisado quanto à existência de anticorpos em experimentos de soroaglutinação.

8.1. Absorção de antissoro policlonal

A linhagem bacteriana utilizada como controle positivo HB101-K99 (pFK99), capaz de expressar a fímbria K99, e a amostra controle negativo HB101 foram inoculadas em placas de Petri com meio Minca ágar a partir de um pré-inóculo e incubadas a 37°C por 16 h. Uma alíquota de 500 µl do antissoro a ser absorvido foi transferida para tubo eppendorf sendo o crescimento bacteriano da placa com HB101 coletado e adicionado ao antissoro. O tubo foi incubado a 37°C por 30 min, centrifugado a 13000 rpm por 2 min e o sobrenadante cuidadosamente transferido para outro tubo. O antissoro foi analisado quanto à capacidade de aglutinação com a linhagem HB101 e o procedimento repetido até não ser mais observada soroaglutinação com esta amostra (título 1/64). O antissoro foi, então, analisado em relação a soroaglutinação com a linhagem HB101-K99 (pFK99) crescida em meio Minca sólido a 37°C para ser observada sua especificidade e dosagem.

8.2. Soroaglutinação de bactérias

As linhagens bacterianas a ser analisadas por soroaglutinação foram inoculadas em placas de Petri com meio Minca a partir de um pré-inóculo crescido a 37°C ou a 16°C. As placas foram mantidas sob as mesmas condições até crescimento bacteriano adequado. Um raspado de cada amostra bacteriana foi analisada em relação à soroaglutinação frente aos antissoros brutos, absorvidos (título 1/64) e frente à solução salina. Em uma placa de vidro foram adicionados 20 µl de antissoro ou solução salina e um raspado bacteriano adicionado e homogeneizado com o auxílio de um palito esterilizado. Foi considerado como resultado positivo a observação de grumos de bactérias.

9. Preparação de antígeno anti-*Salmonella*

A linhagem x3987 foi cultivada em erlenmeyers com 100 ml de até atingir uma DO_{600} de 0,7 (10^9 bactéria/ml), sendo posteriormente centrifugada em tubo de polipropileno de 50 ml a 5000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento eluído em PBS pH 7,2 por 2 vezes seguidas de novas centrifugações. O sedimento final foi ressuspendido em PBS pH7,2 num volume suficiente para atingir uma concentração de

10^{11} bactérias por ml (1 ml para 100 ml de cultura inicial). As células foram mortas por aquecimento a 80°C por 10 min e estocadas a -20°C até a sua utilização.

10. Eletroforese

10.1. Eletroforese de DNA plasmidial em gel de agarose (Sambrook *et al.*, 1989)

Agarose na concentração adequada foi dissolvida em tampão TBE 1X (tris-borato 0,09 M, EDTA 2 mM) sob aquecimento e dispensada em molde de acrílico para solidificação a temperatura ambiente. Alíquotas de DNA foram adicionadas à solução de eluição de DNA (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, ficoll 15%) e aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada com tampão TBE 1X e submetida a uma diferença de potencial (5 V/cm). Após o tempo adequado, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (5 µg/ml) por 1 h a temperatura ambiente, ou por 16 h a 4°C e visualizado em transluminador de luz ultravioleta de onda curta. Exposição a filme preto e branco 125 ISO (Kodak) por 10 s foi utilizado como registro definitivo dos resultados. A revelação e ampliação seguiram especificações do fabricante.

10.2. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

A eletroforese de proteínas seguiu metodologia descrita por Laemmli (1970), e o gel foi preparado de acordo com especificações do "Hoefer Electrophoresis Catalog and Exercises" (1990-1991). A corrida eletroforética utilizou o equipamento da Pharmacia LKB modelo 2001 e as soluções foram preparadas conforme mostrado na Tabela VI, para gel de separação na concentração 12,5% e gel de empacotamento na concentração 4%, nas quantidades suficientes para o preparo de dois géis simultâneos. As soluções foram misturadas por agitação branda constante e a eletroforese foi realizada com tampão de corrida tris-glicina (tris 0,025 M pH 8,3, glicina 0,192 M, SDS 0,1%) sob uma diferença de potencial de 120 V por 4 h ou corrente elétrica de 15 mA/gel durante 12 h.

Tabela VI. Soluções para a preparação de gel de poliacrilamida-SDS

SOLUÇÕES	Gel de Separação (e) 12,5% poliacrilamida	Gel de Empacotamento (e) 4% poliacrilamida
30% A (a) 2,7% BisA (b)	25 ml	2,66 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	15 ml	—
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	—	5,0 ml
SDS (c) 10%	600 μ l	200 μ l
H ₂ O destilada	19,1 ml	12,2 ml
Persulfato de Amônio 10%	300 μ l	100 μ l
TEMED (d)	20 μ l	10 μ l

(a) acrilamida

(d) N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamina

(b) bis-acrilamida

(e) quantidade suficiente para dois géis

(c) dodecil sulfato de sódio

10.3. Coloração de géis de poliacrilamida-SDS pela impregnação com prata (Blum *et al.*, 1987)

O gel de poliacrilamida-SDS foi retirado do equipamento de eletroforese e transferido para um recipiente onde as soluções foram trocadas de acordo com a seqüência descrita na Tabela VII. Durante toda a coloração o gel foi manipulado com o auxílio de luvas e mantido sob agitação orbital constante. A revelação foi interrompida quando as proteínas se tornaram adequadamente visíveis.

Após a coloração, os géis foram fotografados e recolocados no recipiente para as imersões em metanol 30% por 30 min, seguidas de glicerol 3% por mais 30 min. Após este procedimento, os géis foram plastificados em papel celofane e armazenados.

Tabela VII. Sequência de soluções para a impregnação de PAGE-SDS com prata

SOLUÇÕES	TEMPO
Fixador (etanol 50%, ácido acético 12%, 0,5 ml/L de formaldeído a 37%)	> 1 h
Etanol 50%	3X 20 min
Tiosulfato de Sódio 0,02%	1 min
H ₂ O destilada	3X 20 s
Marcador (nitrato de prata 0,2%, 0,75 ml/L formaldeído a 37%)	20 min
H ₂ O destilada	2X 20 s
Revelador (carbonato de Sódio 6%, tiosulfato de sódio 0,4 mg/L, 0,5 ml/L de formaldeído a 37%)	~ 10 min
H ₂ O destilada	2X 20 s
Bloqueador (metanol 50%, ácido acético 12%)	10 min

11. "Imunoblotting"

A metodologia de "imunoblotting" para transferência de proteínas separadas em gel de poliacrilamida-SDS foi realizada de acordo com o descrito em Sambrook *et al.* (1989). Dois géis de poliacrilamida idênticos foram submetidos a eletroforese simultaneamente, sendo um utilizado para transferência de proteínas para um papel de filtro de nitrocelulose e outro corado com impregnação pela prata. Este procedimento permitiu a comparação entre o padrão de migração das amostras protéicas e o observado no filtro após a revelação com peroxidase.

O filtro de nitrocelulose foi cortado no tamanho exato ao do gel e colocado em recipiente com H₂O deionizada por 5 min. Dois pedaços de papel Whatman 3MM também foram cortados no tamanho do gel e imersos em tampão de transferência (glicina 39 mM, tris-HCl 48 mM pH 8,3, SDS 0,037%, metanol 20%). O sistema de transferência foi montado de tal forma que o gel de poliacrilamida estivesse em contato com o filtro de nitrocelulose e ambos revestidos externamente pelos papéis Whatman 3MM, sendo estes envolvidos por uma camada esponjosa ("pad") previamente imersa em tampão de transferência.

O sistema foi colocado na cuba de transferência vertical, com o gel mais próximo ao pólo negativo, de forma a permitir a transferência de proteínas ao filtro de nitrocelulose. Uma diferença de potencial foi aplicada para uma corrente elétrica constante de 0,65 mA/cm² (100 mA no total) durante 2 h. O gel foi corado com prata para ser confirmada a eficiência da transferência e o filtro de nitrocelulose imerso em 50 ml de solução bloqueadora (leite em pó desnatado 5%, tween 20 0,02%, PBS pH 7,4) por 2 h, sob agitação orbital a temperatura ambiente. A seguir, a solução bloqueadora foi substituída por outros 50 ml de nova preparação e acrescentados 50 µl de antissoro anti-K99 adsorvido (1:1000). O filtro foi incubado por 18 h sem agitação a 4°C e lavado 3 vezes com PBS pH 7,4 por 10 min sob agitação. A seguir, o filtro foi lavado em solução livre de fosfato (tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM) por 10 min e transferido para outra cuba com 20 ml de solução bloqueadora livre de fosfato (leite em pó desnatado 5%, tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM), adicionando-se 10 µl (concentração final de 1:2000) de anticorpo anti-IgG de coelho (Gibco-BRL) e incubando-se por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. O filtro foi então lavado 4 vezes com solução livre de fosfato por 10 min sob agitação, e transferido para 10 ml de solução substrato para peroxidase (6 mg de diaminobenzidina, tris-HCl 0,01 M pH 7,6) com a adição de 10 µl de H₂O₂. O progresso da reação foi monitorado e interrompido por lavagens com H₂O destilada, sendo o filtro, em seguida, fotografado e conservado em PBS pH 7,4 a 4°C, protegido de luz.

12. Curva de crescimento e viabilidade bacteriana

As linhagens α 3987 e α 3987-K99 foram acompanhadas quanto à curva de crescimento e viabilidade. Para isso, um inóculo inicial de 10⁶ bactérias em 200ml de meio LB foi incubado sob agitação de 150 rpm a 37°C. Aliquotas de 1ml foram analisadas em espectrofotômetro à 600 nm a cada hora. Diluições das linhagens α 3987 e α 3987-K99 foram distribuídas em placas com meio LB ágar a cada hora. As amostras foram acompanhadas até atingirem uma densidade óptica de pelo menos 1,0. A viabilidade foi inferida pela contagem das colônias nas placas.

13. Imunização de camundongos BALB/c

Para a análise da imunização foram utilizados 63 camundongos BALB/c de 24-30 dias, divididos em três grupos com 21 camundongos cada. Dois grupos foram inoculados com as linhagens *S. typhimurium* x3987 e x3987-K99 e o terceiro foi utilizado como controle.

O preparo das células foi realizado conforme descrito por Curtiss & Kelly (1987). As linhagens de *S. typhimurium* x3987 e x3987-K99 foram transferidas de um pré-inóculo estático a 37°C durante a noite, para erlenmeyers com 100 ml de meio LB suplementado com 0,1% de glicose. Os erlenmeyers foram agitados a 150 rpm a 37°C em agitador orbital até as células atingirem uma D.O. 0,7 à 600 nm. As células foram transferidas para tubos de polipropileno de 50 ml e centrifugadas a 5000 rpm por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram dispensados e os sedimentos lavados por 3 vezes com tampão PBS pH7,4 através de centrifugações nas mesmas condições descritas. Por fim, os sedimentos foram eluídos em 3,3 ml de tampão PBS 7,4. Com o auxílio de seringa e agulha de inoculação apropriados, foram inoculados 0,2 ml (aproximadamente 10⁹ UFC) via oral em uma única dose em cada camundongo, 10 min após inoculo de 0,05 ml de solução de bicarbonato de sódio 10%.

14. Coleta de soro, extração e processamento dos órgãos, e persistência das bactérias em camundongos BALB/c

De cada grupo imunizado, 4 camundongos foram sacrificados no 3^o, 6^o, 12^o e 36^o dias após a inoculação. Os 5 camundongos restantes foram utilizados para análise da resposta sérica, sendo o soro obtido antes da imunização e a cada sete dias após a imunização.

O sangue foi coletado do plexo orbital através da utilização de capilares. Foram coletados cerca de 0,5 ml de sangue de cada animal antes da imunização e semanalmente, após a imunização. Para a separação do soro, o sangue foi incubado a 37°C por 2 horas, seguido de 1 hora a 4°C ou até a formação de coágulo. Os coágulos foram descolados dos

tubos, sendo centrifugados a 1500 rpm por 10 min a 4°C. Os soros foram cuidadosamente transferidos a tubos novos e estocados a -20°C até a realização do ELISA.

As placas de Peyer e o baço dos camundongos BALB/c foram processados conforme o descrito por Curtiss & Kelly (1987). Os animais foram sacrificados por inalação de éter etílico em câmara adequada.

O baço e as placas de Peyer dos intestinos de cada animal foram retirados e transferidos a tubos individuais, contendo 5 ml de solução salina 0,85% esterilizada. Os tubos foram mantidos em gelo até serem homogeneizados com o auxílio de bastão de vidro. Os debris foram precipitados naturalmente e diluições do sobrenadante foram inoculadas em placas de Petri com meio SS (*Salmonella-Shigella* ágar, Merck), incubadas durante a noite a 37°C para a determinação das UFC totais para baço e placas de Peyer por camundongo. Colônias de *Salmonella* sp foram analisadas quanto a estabilidade plasmidial por extração de plasmídios em pequena escala.

15. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

A resposta de anticorpos IgG contra antígenos de *Salmonella* sp e da fimbria K99 de *Escherichia coli* foi avaliada por ELISA. Os antígenos foram preparados como descrito nos itens 11 e 7.3 (Smith *et al.*, 1994).

Inicialmente, as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C com 0,1 ml de K99 purificada (0,2µg) ou de antígenos de *Salmonella* sp diluídos 100 vezes em tampão carbonato pH9,6 (carbonato 0,2M, bicarbonato 0,2M com pH 9,6 ajustado por acréscimo de carbonato). As placas foram lavadas com solução de PBS pH 7,2 (acrescido de 0,05 % de Tween 20) por 3 vezes e a seguir, bloqueadas acrescentando-se 0,2 ml de solução bloqueadora (PBS pH 7,2; BSA 1%; Tween 20 0,05%) e incubando-se por 2 horas a 37°C. As lavagens com PBS pH 7,2 acrescido de 0,05 % de Tween 20 foram repetidas.

Diluições seriadas de soro de camundongos BALB/c foram adicionadas (1/64 no 1º e 1/10 nos demais), para um volume final de 0,1 ml por poço, em tampão de incubação (BSA 0,1%; Tween 20 0,05% em PBS). As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C. O

procedimento de lavagem foi repetido e adicionados respectivos antissoros secundários (IgG Fab anti-camundongo Sigma 1:5000 em todas as canaletas com exceção das de número 12, onde foi utilizado IgG anti-coelho Gibco 1:4000 como controle) e incubados a 37°C por 2 horas. As lavagens foram repetidas e, em seguida, foi feita a coloração com a aplicação de 0,1 ml por poço da seguinte preparação (1 tablete de tampão fosfato/citrato em 100 ml de H₂O, 1 tablete de OPD em 75 ml de tampão fosfato/citrato, e adicionado 16 µl de H₂O₂ 30% em 40 ml de em tampão fosfato/citrato/OPD - 0,4 mg por ml). Após 30 min, a reação de coloração foi inativada pela adição de 3M de H₂SO₄, sendo o resultado obtido pela leitura das placas em leitor de ELISA (BioRad) calibrado para uma DO 405 nm. Foram considerados positivos valores de densidade ótica 2 vezes maiores que os obtidos com o soro dos camundongos antes da imunização e maiores que 0,1. Os controles negativos foram as reações com todos os reagentes, sendo um sem o soro dos camundongos e outro com o soro obtido antes da imunização.

16. Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney U test e considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

1. Desenvolvimento da linhagem x3987-K99

Para o desenvolvimento de uma linhagem de *Salmonella typhimurium* capaz de expressar a fimbria K99 de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) patogênica para bovinos, foi utilizada uma linhagem atenuada por deleção nos genes *cya/crp* para a inserção do plasmídio pSM40 construído neste trabalho (Figura 4). Diversos estudos anteriores têm demonstrado que um dos principais problemas encontrados no desenvolvimento de linhagens vacinais que expressem proteínas heterólogas, é a dificuldade de manutenção da estabilidade plasmidial *in vivo* na ausência de pressão seletiva, obtida normalmente *in vitro* por intermédio de agentes antimicrobianos. Como o plasmídio pSM40 construído é um derivado do vetor pYA3137 (Figura 3 em materiais e métodos), possui como características uma origem de replicação para grande número de cópias, retirada do plasmídio pUC18 e, principalmente, o gene *asd* que codifica a enzima aspartato- β -semialdeído-desidrogenase. Esta enzima faz parte da via biossintética da lisina e está envolvida na formação do ácido diaminopimélico (DAP), que é um importante componente da parede celular de bactérias gram-negativas. Portanto, os plasmídios contendo o gene *asd* conseguem complementar em *trans* uma deleção do mesmo gene *asd* existente no cromossomo de algumas linhagens vacinais receptoras. A linhagem *Salmonella typhimurium* x3987 utilizada neste trabalho, além das mutações nos genes *cya/crp*, possui também a deleção do gene *asd*. Desta forma, na ausência de DAP esta linhagem torna-se incapaz de sobreviver por muitas gerações, tornando essencial a manutenção estável destes plasmídios *in vivo*, para que a viabilidade bacteriana se mantenha.

Para a construção do plasmídio pSM40 foi obtido do plasmídio pFK99 (Figura 2 em materiais e métodos) o fragmento de DNA de 7,1 Kb que contém o *operon* completo da fimbria K99, através da clivagem com a enzima de restrição *Bam*HI. Este fragmento foi ligado ao vetor pYA3137 (Figura 3 em materiais e métodos), também clivado em *Bam*HI, sendo o plasmídio resultante denominado pSM40 (Figura 4 em materiais e métodos). A estratégia utilizada no desenvolvimento deste trabalho está esquematizada na figura 5.

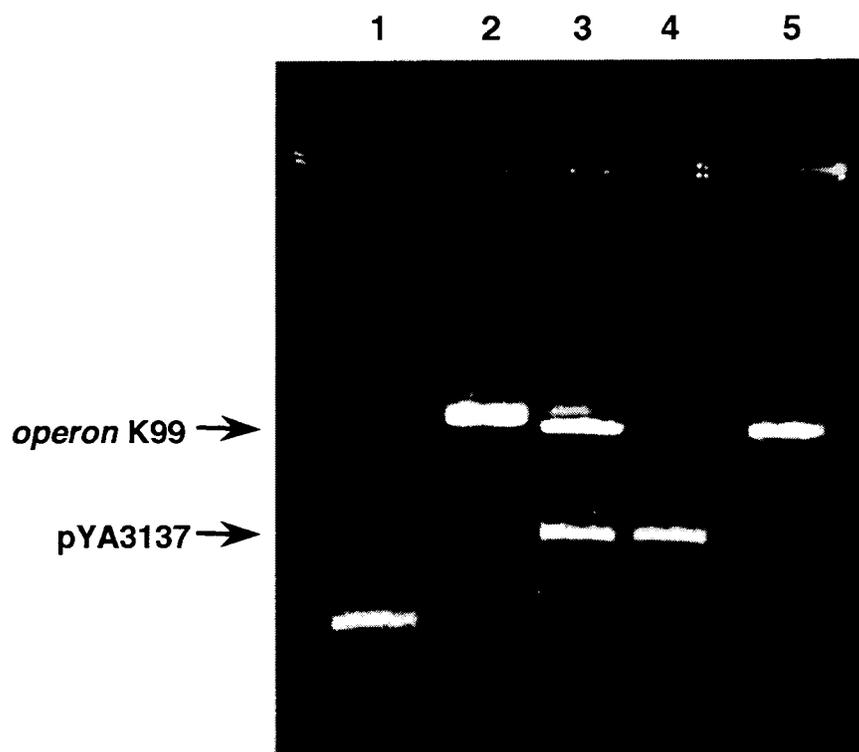


Figura 6. Perfil eletroforético em gel de agarose 0,7% dos plasmídios pYA3137 e pSM40. Os plasmídios foram clivados com a enzima de restrição *Bam*HI, para a confirmação da inserção do fragmento de DNA que contém o *operon* da fímbria K99 (7,1 Kb) ao vetor pYA3137 (3,5 Kb). **1-** plasmídio pYA3137 íntegro; **2-** plasmídio pSM40 íntegro; **3-** plasmídio pSM40 clivado com *Bam*HI; **4-** plasmídio pYA3137 clivado com *Bam*HI e **5-** fragmento que contém o *operon* da fímbria K99 de *E. coli*. As setas indicam os fragmentos correspondentes ao *operon* da fímbria K99 (maior peso molecular, linhas 3 e 5) e plasmídio pYA3137 linearizado (menor peso molecular, linhas 3 e 4).

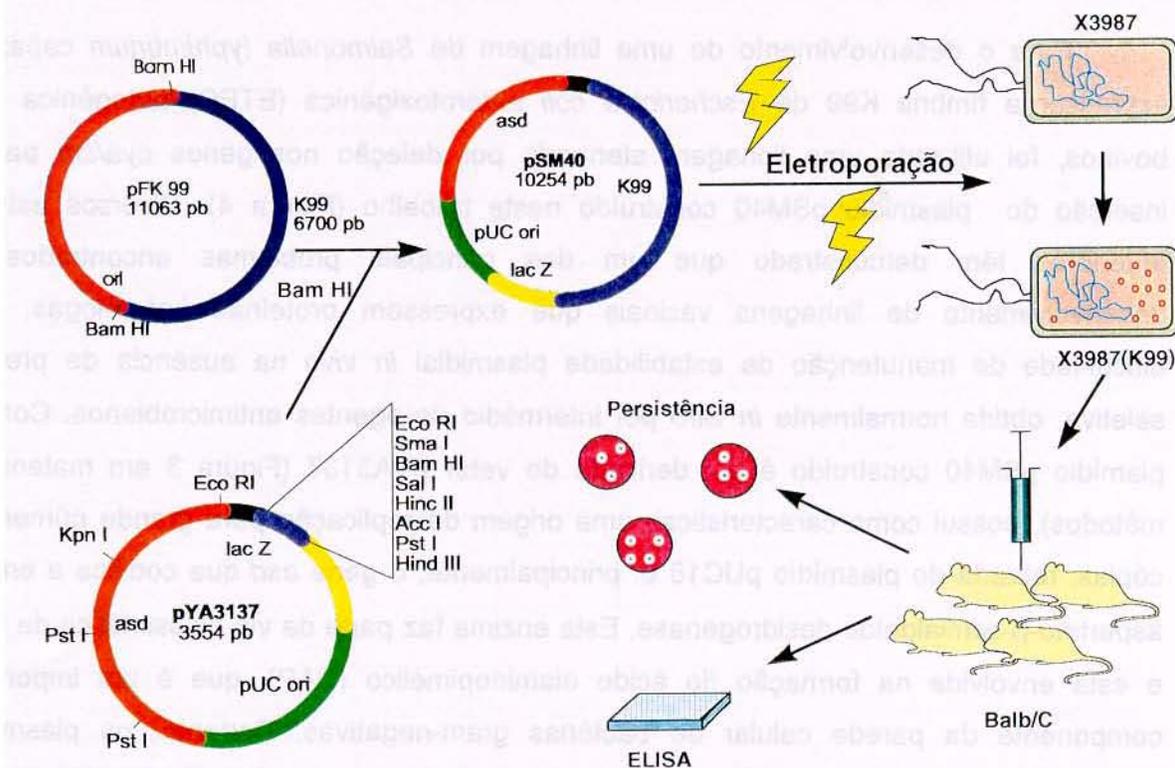


Figura 5. Esquema da estratégia utilizada para a clonagem e expressão da fímbria K99 de *Escherichia coli* em uma linhagem de *Salmonella typhimurium* atenuada *cya/crp* e análise da resposta sérica em camundongos BALB/c.

Como pode ser observado na figura 6, a clivagem do pSM40 com a enzima *Bam*HI recupera os dois fragmentos de DNA relativos ao vetor pYA3137 (3,5 Kb) e ao *operon* K99 (7,1 Kb) respectivamente. Desta forma, o resultado obtido indica que a construção esta correta, pois não foram observadas variações no tamanho dos fragmentos que possam indicar a ocorrência de quebra do DNA utilizado. O plasmídeo pSM40 foi, primeiramente, inserido por transformação em uma linhagem x6212 (Δ *asd*) de *Escherichia coli* e por eletroporação na linhagem x3987 (Δ *cya*, Δ *crp*, Δ *asd*) de *Salmonella typhimurium*. A expressão da fímbria K99 foi avaliada na linhagem x3987-K99 em diferentes condições e comparada com a obtida no controle positivo HB101-K99(pFK99).

2. Expressão da fímbria K99 na superfície bacteriana

A expressão da fímbria K99 pelas linhagens HB101-K99 (pFK99) de *Escherichia coli* e x3987-K99 de *Salmonella typhimurium*, desenvolvidas pela inserção do pSM40, foi analisada por soroaglutinação com soro policlonal de coelho anti-K99, pelo perfil eletroforético em PAGE-SDS de proteínas da superfície bacteriana e por “imunoblotting” com antissoro policlonal anti-K99 de coelho.

A linhagem HB101-K99 (pFK99) foi cultivada em meio sólido Minca, o qual é descrito como o meio ideal para se obter grandes quantidades de expressão da fímbria K99 em *Escherichia coli* (van der Woude, *et al.*, 1990). Na linhagem x3987-K99 foi avaliada a possível influência na expressão da fímbria K99 pelo cultivo em diferentes condições: meio Minca sólido, meio LB líquido sem aeração e meio LB líquido com aeração.

A soroaglutinação das linhagens HB101-K99 (pFK99) e x3987-K99, utilizando-se antissoro policlonal anti-K99 de coelhos, foi positiva, sugerindo a manutenção das características funcionais da fímbria.

A figura 7 apresenta o perfil eletroforético em PAGE-SDS das proteínas de superfície bacteriana extraídas. A linhagem HB101-K99 (pFK99) de *E. coli*, cultivada em meio Minca, apresentou elevada expressão da subunidade principal de fímbria K99. A linhagem x3987-K99 de *S. typhimurium* apresentou expressão da fímbria K99 em quantidade reduzida, quando submetida ao crescimento em meio LB líquido sem aeração. Entretanto, esta mesma linhagem obtida após cultura líquida em LB com aeração e, principalmente em meio Minca sólido, apresentou expressão da subunidade principal da fímbria K99 com intensidade semelhante no gel à obtida com a linhagem HB101-K99 (pFK99). Além disso, a utilização do cultivo em meio Minca sólido da linhagem x3987-K99 parece induzir uma expressão prioritária da fímbria, ao contrário do observado no meio LB líquido com aeração, onde as demais proteínas de *Salmonella* sp foram obtidas em quantidades também elevadas, especialmente a subunidade correspondente ao flagelo de *Salmonella* sp. Estes resultados indicam que a aeração, durante o cultivo em meio líquido rico, é um fator muito importante para a expressão da fímbria K99 na linhagem x3987-K99 de *Salmonella typhimurium*. Além disso, como não foi observada uma inibição da expressão

de K99 nesta linhagem, quando cultivada em meio LB com aeração, pode-se duvidar de uma real influência repressora da lisina nesta linhagem. A utilização do meio de cultura sólido Minca, considerado ideal para a expressão de K99 em *E. coli*, parece favorecer a expressão desta fímbria de forma prioritária na linhagem x3987-K99 de *Salmonella typhimurium* utilizada.

A figura 8 apresenta o resultado do “imunoblotting” das proteínas de superfície bacteriana extraídas das linhagens HB101-K99, x3987-K99 e x3987(pYA3137). Esta última utilizada como controle de uma possível influência do vetor pYA3137 na expressão. Foram utilizadas as extrações de proteínas de superfície das linhagens de *Salmonella* cultivadas em meio LB líquido com aeração, devido as quantidade relativas de antígenos de *Salmonella* sp e K99 obtidos e da facilidade técnica nestas condições. O resultado observado confirma com clareza a expressão da subunidade principal da fímbria K99 nas linhagens HB101-K99(pFK99) e x3987-K99.

3. Crescimento bacteriano e viabilidade celular

As linhagens de *Salmonella typhimurium* x3987 e x3987-K99 foram analisadas quanto à curva de crescimento em meio LB líquido com aeração e quanto à viabilidade celular por plaqueamento das diluições. A linhagem x3987 atingiu uma densidade ótica (D.O.) de 0,7 em aproximadamente 3,5 horas, enquanto a amostra x3987-K99 atingiu a mesm D.O. nas mesmas condições em 6,5 horas, como pode ser observado na figura 9. Isso pode ser explicado devido à presença de um plasmídio com origem de replicação que permite um grande número de cópias por bactéria, como é o caso do pSM40, induzindo assim uma elevada expressão da fímbria K99.

No ensaio para determinação da curva de crescimento foram retiradas alíquotas da cultura em meio líquido LB com aeração, que foram inoculadas em meio de cultura sólido para avaliação da viabilidade celular (UFC). A quantificação das colônias obtidas apresentou correlação com o resultado observado por densidade óptica (resultado não apresentado). A linhagem x3987-K99 de *Salmonella typhimurium* foi utilizada nos ensaios de imunogenicidade com camundongos BALB/c.

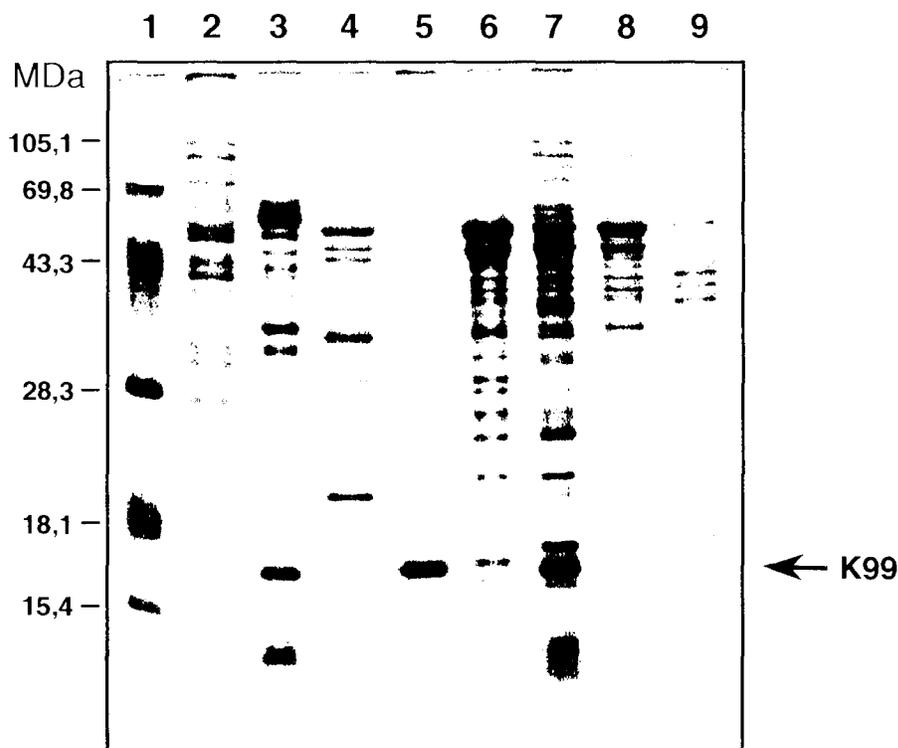


Figura 7. Perfil eletroforético por PAGE-SDS 12,5% das proteínas de superfície das linhagens de *E. coli* e *Salmonella typhimurium*, demonstrando a expressão da subunidade principal da fímbria K99 em diferentes condições de cultivo. **1-** Padrão de peso molecular; **2-** Linhagem *E. coli* HB101; **3-** Linhagem *E. coli* HB101-K99; **4-** Linhagem *S. typhimurium* x3987 em meio Minca sólido; **5-** Linhagem *S. typhimurium* x3987-K99 em meio Minca sólido; **6-** Linhagem *S. typhimurium* x3987 em meio líquido LB com aeração; **7-** Linhagem *S. typhimurium* x3987-K99 em meio líquido LB com aeração; **8-** Linhagem *S. typhimurium* x3987 em meio líquido LB sem aeração; **9-** Linhagem *S. typhimurium* x3987-K99 em meio líquido LB sem aeração. A seta indica a subunidade principal da fímbria K99 (linhas 3, 5, 7 e 9)

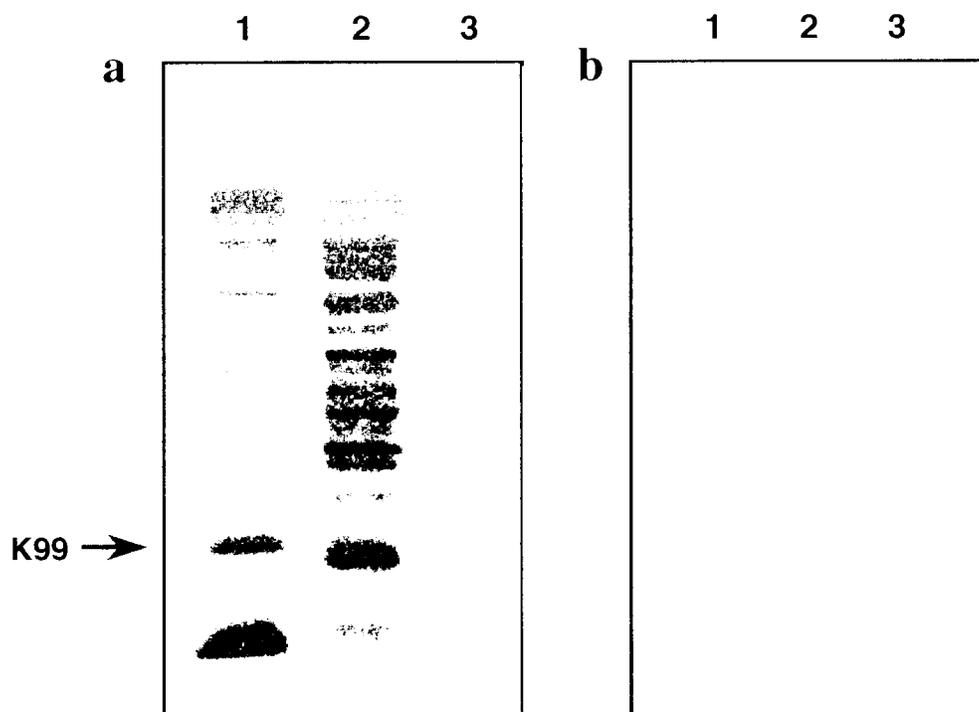


Figura 8. Perfil eletroforético por PAGE-SDS 12,5% das proteínas de superfície (a) e “imunoblotting” (b), para confirmação da expressão da fímbria K99. **1-** Linhagem *E.coli* HB101-K99 produtora de K99; **2-** Linhagem *S. typhimurium* x3987 (pYA3137); **3-** Linhagem *S. typhimurium* x3987-K99 (pSM40). A seta indica a subunidade principal da fímbria K99 (linhas 1 e 3).

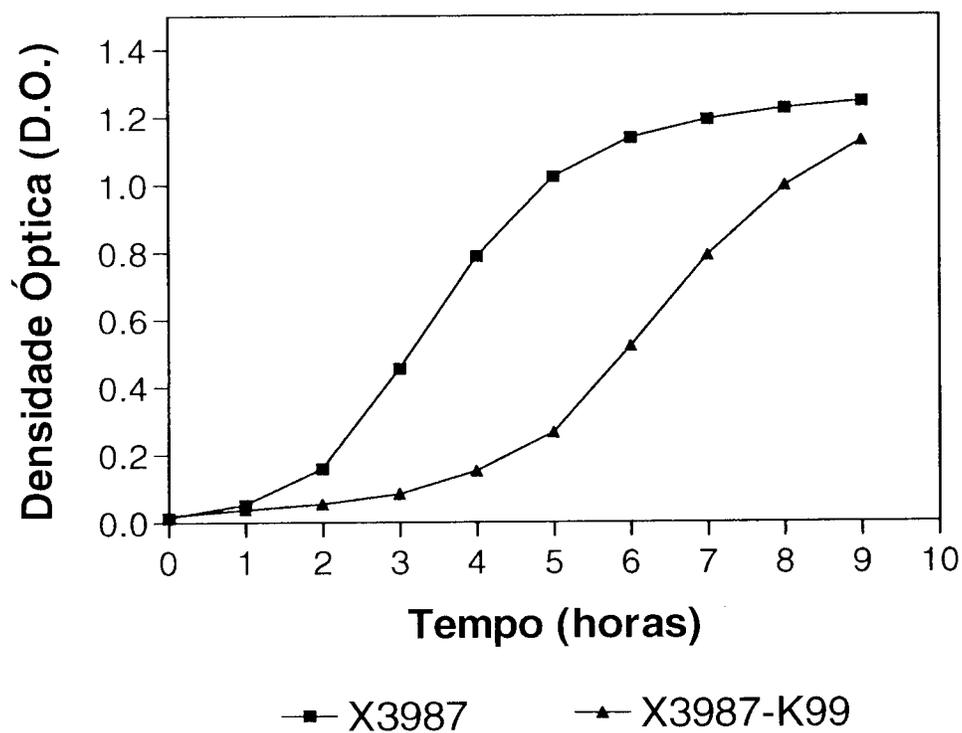


Figura 9. Curva de crescimento das linhagens de *Salmonella typhimurium* x3987 e x3987-K99 em cultura LB líquida com aeração. As alíquotas foram analisadas a cada hora quanto a densidade óptica (DO) a 600 nm.

4. Purificação da fimbria K99

A linhagem x3987-K99 foi utilizada na purificação da subunidade principal da fimbria K99 a partir do crescimento obtido com cultivo em meio LB líquido com aeração. A figura 10 apresenta o perfil eletroforético das proteínas de superfície bacteriana em PAGE-SDS, precipitadas em diferentes concentrações de sulfato de amônio. A concentração de sulfato de amônio de 10% foi aquela que apresentou maior quantidade da fimbria K99 e melhor índice de pureza protéica.

5. Persistência em placas de Peyer e baço de camundongos BALB/c

Para o desenvolvimento de uma linhagem vacinal viva, é necessária a observação da colonização e do tempo de persistência *in vivo*, bem como, no caso de expressão de proteínas heterólogas codificadas por plasmídios, avaliar a estabilidade plasmidial das bactérias recuperadas dos animais. Em uma linhagem vacinal de *Salmonella* sp é desejado que o microrganismo atenuado consiga invadir as placas de Peyer e o baço e sobreviver pelo tempo suficiente para estimular o sistema imunológico do hospedeiro. A avaliação da persistência, portanto, é uma indicação importante sobre a possibilidade de sucesso da linhagem vacinal na imunização. A linhagem x3987-K99 e o controle x3987 foram utilizados para se inocular 10^9 bactérias em uma única dose por via oral em grupos distintos de camundongos BALB/ce a persistência das bactérias foi analisada pela presença de UFC/órgão.

Durante o teste de persistência não foi observada nenhuma alteração no comportamento dos camundongos inoculados com as linhagens x3987 e x3987-K99, com relação ao grupo que recebeu placebo (PBS e bicarbonato de sódio 10%).

A figura 11 apresenta os resultados de persistência obtidos no decorrer do tempo nas placas de Peyer de camundongos BALB/c. Um grande número de bactérias foram recuperadas no tecido linfóide dos animais no 2º dia após a imunização, em ambos os grupos inoculados com as linhagens x3987 e x3987-K99. Podemos observar claramente que, embora o número de bactérias recuperadas tenha sido reduzido com o decorrer do tempo em ambos os grupos, os microrganismos foram ainda detectadas no 35º dia após a

imunização. A análise estatística indicou que as diferenças encontradas não são significativas ($p > 0,05$) entre os grupos em cada momento da amostragem. O resultado sugere que a expressão da fímbria K99 pela linhagem x3987-K99 não interfere na invasividade bacteriana e na persistência em placas de Peyer, apresentando um comportamento bastante semelhante à linhagem x3987.

A figura 12 apresenta os resultados obtidos de persistência das linhagens x3987 e x3987-K99 no baço de camundongos BALB/c no decorrer do tempo. No 2^o dia após a imunização não foi recuperada nenhuma bactéria no baço dos grupos de camundongos BALB/c inoculados. Entretanto, nos dias subsequentes, foram recuperadas bactérias nos dois grupos de camundongos, com o número máximo de recuperação sendo atingido no 12^o dia. O grupo inoculado com a linhagem x3987 apresentou uma quantidade de bactérias recuperadas estável até o 35^o dia, enquanto no grupo inoculado com a linhagem x3987-K99 foi observada uma redução do número de bactérias, porém esta redução foi considerada não significativa pela análise estatística ($p > 0,05$). As quantidades de bactérias recuperadas no baço dos camundongos no 12^o dia nos dois grupos e nas placas de Peyer no 35^o dia após o inóculo foram semelhantes.

Dentre as bactérias isoladas em placa de Peyer e baço dos grupos de camundongos inoculados, uma amostragem de 10 colônias de bactérias por ponto de coleta e por órgão foram escolhidas ao acaso e analisadas quanto a presença dos plasmídios pSM40 ou pYA3137. Todas as colônias analisadas apresentaram o plasmídio correspondente, indicando 100% de estabilidade plasmidial pelo sistema letal balanceado baseado no gene *asd*.

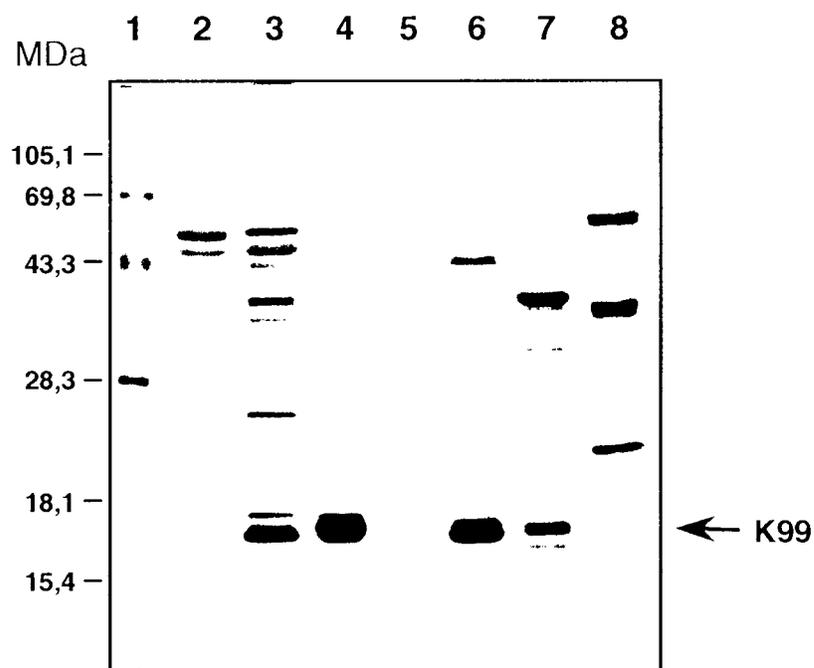


Figura 10. Perfil eletroforético por PAGE-SDS 12,5% das proteínas de superfície bacteriana da linhagem *Salmonella typhimurium x3987-K99*, precipitadas com diversas concentrações de sulfato de amônio. **1**- padrão de peso molecular; **2**- proteínas de superfície da linhagem *x3987* (pYA3137); **3**- proteínas de superfície da linhagem *x3987-K99* (pSM40); **4**- proteínas precipitadas com sulfato de amônio 10%; **5**- proteínas precipitadas com sulfato de amônio 20%; **6**- proteínas precipitadas com sulfato de amônio 40%; **7**- proteínas precipitadas com sulfato de amônio 60% e **8**- proteínas precipitadas com sulfato de amônio 80%. A seta indica a subunidade principal da fímbria K99 (linhas 3, 4 e 6).

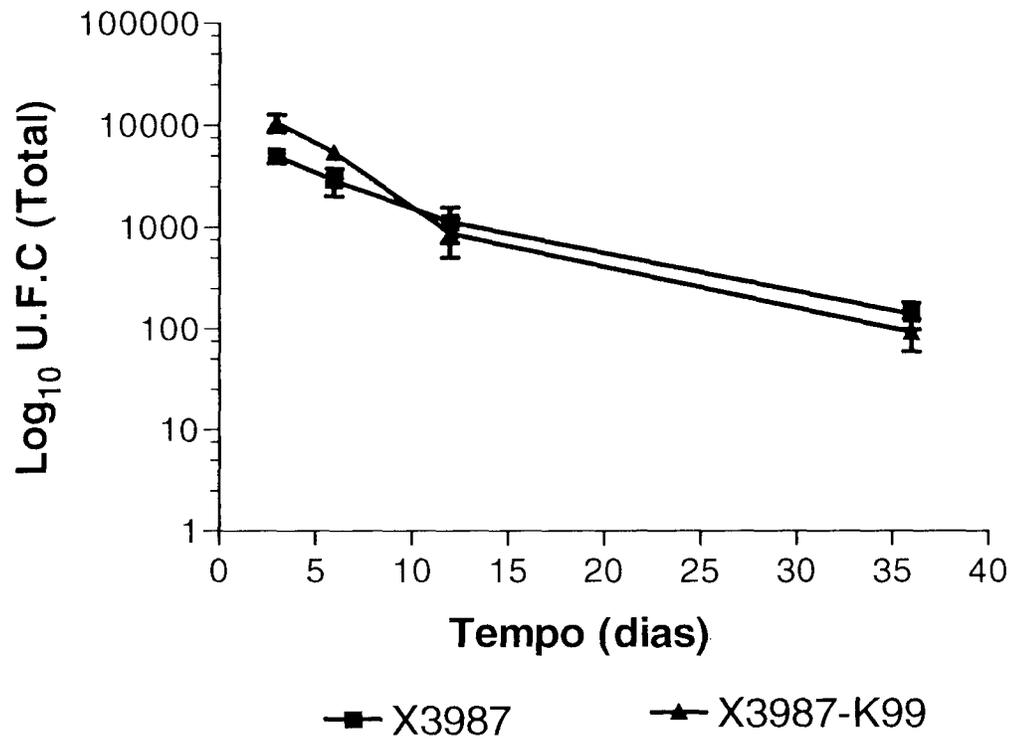


Figura 11. Análise da persistência das linhagens vacinais x3987 e x3987-K99 em placas de Peyer de camundongos BALB/c. Foram analisados 4 camundongos por grupo em cada momento da amostragem e estão representados a média e o erro padrão da média. As diferenças entre os grupos não são significativas (Mann-Whitney U test $p \leq 0,05$).

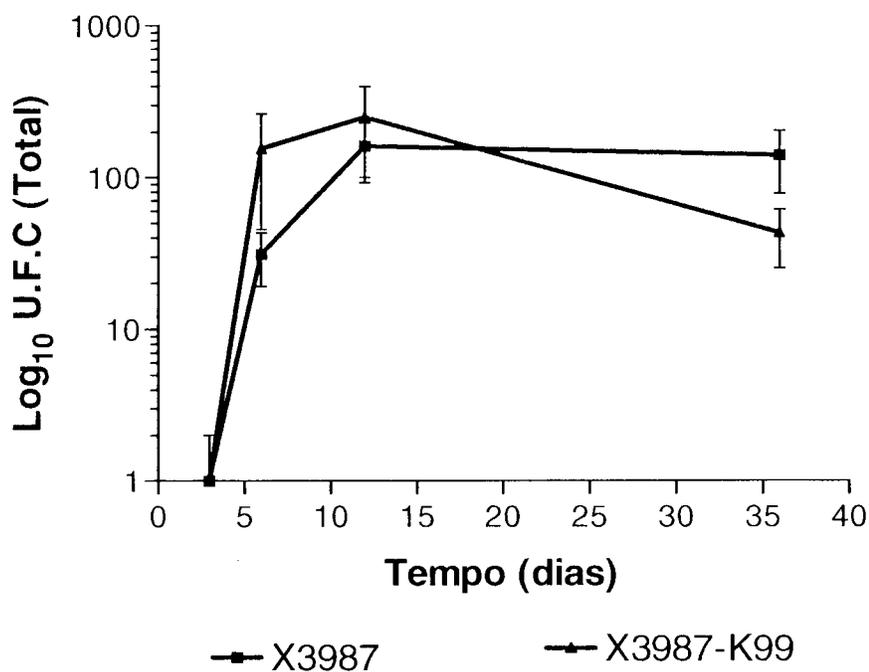


Figura 12. Análise da persistência das linhagens vacinais x3987 e x3987-K99 em baço de camundongos BALB/c. Foram analisados 4 camundongos por grupo em cada momento da amostragem e estão representados a média e o erro padrão da média. As diferenças entre os grupos não são significativas (Mann-Whitney U test $p \leq 0,05$).

6. Resposta imune de camundongos

A produção de anticorpos dirigidos contra antígenos de *Salmonella* sp e da fímbria K99 foi avaliada em soros coletados de animais imunizados com as linhagens x3987 e x3987-K99, através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Os animais de cada grupo experimental (5 camundongos) receberam uma única dose do antígeno, constituída por 10^9 células bacterianas, por via oral. Os soros imunes foram coletados semanalmente durante 6 semanas consecutivas e titulados por ELISA, conduzidos em placas sensibilizadas com lisado de *Salmonella typhimurium* ou com a fímbria K99 purificada.

A figura 13 apresenta a resposta sérica desenvolvida contra antígenos de *Salmonella* em ambos os grupos imunizados com x3987 ou x3987-K99. Ambos os grupos apresentaram elevados títulos, não sendo observadas diferenças estatísticas significativas dos títulos entre os dois grupos durante as seis semanas. Também não foi observada uma variação significativa do título dentro de cada grupo nas 5 primeiras semanas. Entretanto, quando comparamos a 6^a semana com a 1^a semana, observamos uma elevação significativa dos títulos no decorrer do tempo para os antígenos de *Salmonella* sp no grupo imunizado com x3987 ($p \leq 0,05$) e muito significativa no grupo imunizado com x3987-K99 ($p \leq 0,001$). Estes resultados sugerem fortemente que a utilização seria vantajosa para a estimulação de anticorpos anti-*Salmonella*.

A figura 14 apresenta a resposta sérica obtida em ambos os grupos de camundongos BALB/c imunizados com as linhagens x3987 e x3987-K99, com relação ao antígeno da fímbria K99 de *Escherichia coli*. O grupo de camundongos BALB/c imunizado com a linhagem de *Salmonella typhimurium* x3987-K99 apresentou elevados títulos de anticorpos para o antígeno K99, enquanto a linhagem controle x3987 não apresentou resposta imunológica detectável para este antígeno. Os títulos de anticorpos para o antígeno K99 no grupo inoculado com a linhagem x3987-K99 apresentaram diferenças estatisticamente significativas no decorrer do tempo. O aumento do título de anticorpos obtido na 6^a semana foi significativo ($p \leq 0,05$), com relação aos obtidos na 3^a, 4^a e 5^a semanas e muito significativo ($p \leq 0,01$) com relação aos obtidos nas primeiras duas semanas após a imunização. Estes resultados sugerem a utilização da linhagem vacinal x3987-K99 para a estimulação de anticorpos anti-K99.

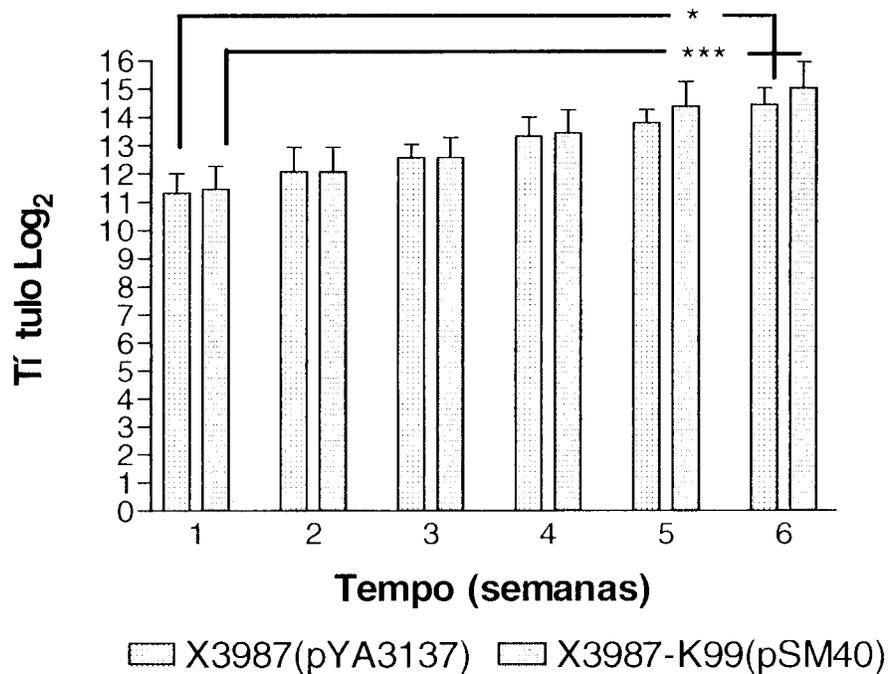


Figura 13. Análise da produção de anticorpos anti-*Salmonella* em camundongos BALB/c inoculados com linhagens *x3987* ou *x3987-K99*. Foram utilizados 5 camundongos por grupo. Foram considerados positivos valores de D.O. duas vezes superiores aos obtidos com o soro coletado dos camundongos antes da imunização e maiores que 0,1. Resultados considerados significativos em Mann-Whitney U test (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$).

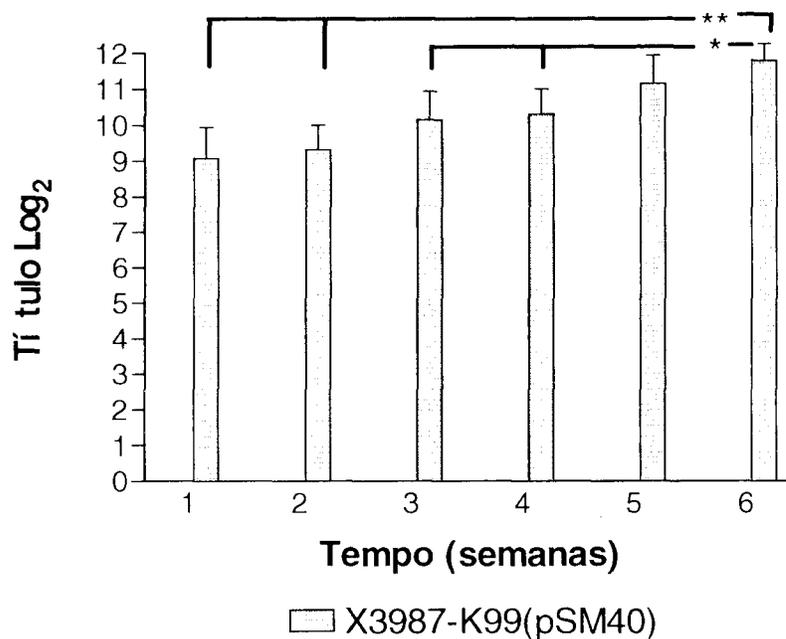


Figura 14. Análise da produção de anticorpos anti-K99 em camundongos BALB/c inoculados com linhagens χ 3987 ou χ 3987-K99. Foram utilizados 5 camundongos por grupo. Foram considerados positivos valores de D.O. duas vezes superiores aos obtidos com o soro coletado dos camundongos antes da imunização e maiores que 0,1. Os títulos obtidos nos soros dos camundongos inoculados com a linhagem χ 3987 não foram superiores ao soro pré-imune. Resultados considerados significativos em Mann-Whitney U test (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$).

DISCUSSÃO

A vacinação continua sendo a ferramenta mais efetiva na prevenção de doenças infecciosas (Robbins, A., 1990). O sucesso obtido no controle e erradicação de diversas doenças com vacinas convencionais tem estimulado o desenvolvimento de novos tipos de vacinas. Este desenvolvimento só tem sido possível graças ao acúmulo de conhecimentos sobre o mecanismo molecular da patogenicidade dos microrganismos, que tem permitido a identificação de vários genes essenciais para a virulência e o mecanismo de sua regulação. Dentre as novas abordagens para o desenvolvimento de vacinas, uma das mais estudadas atualmente é a utilização de microrganismos vivos, porém atenuados. Estas vacinas vivas conferem uma melhor proteção que as convencionais porque, apesar de avirulentas, estas linhagens mantêm algumas características que permitem estabelecer uma infecção limitada aos estágios iniciais, permitindo estimular o sistema imunológico do hospedeiro de forma muito mais eficiente (Chatfield, *et al.*, 1993).

A bactéria *Salmonella typhimurium* é patogênica para camundongos e tem sido muito utilizada como modelo no desenvolvimento de linhagens vacinais atenuadas para humanos e animais. Um vantagem especial da utilização de *Salmonella sp* como vacina viva é a rota de infecção pela qual ela invade o hospedeiro. A *Salmonella typhimurium* coloniza as placas de Peyer de camundongos após a infecção por via oral, permitindo atingir o alvo principal de defesa do sistema gastrointestinal e eventualmente outros tecidos internos, como baço e fígado. O processo de infecção age, portanto, como método de amplificação do estímulo imunológico ao prolongar a apresentação do antígeno, quando comparado com a imunização não replicativa encontrada em métodos convencionais (Jones *et al.*, 1994).

Desde os trabalhos iniciais de Bacon *et al.* (1950), demonstrando a atenuação da virulência em mutantes auxotróficos de *Salmonella sp*, muitas outras mutações que atenuam a virulência foram descritas (revisado por Chatfield, *et al.*, 1993). As linhagens de *Salmonella sp* atenuadas vêm sendo utilizadas como carreadoras de antígenos heterólogos, com diferentes graus de sucesso na ativação de resposta humoral e celular (revisado por Cárdenas & Clements, 1992; Curtiss *et al.*, 1994).

Linhagens de *Salmonella sp* com deleções nos genes da adenil ciclase (*cya*) e receptor do AMP cíclico (*crp*) foram propostas como vacinas vivas orais contra salmonelose

(Curtiss *et al.*, 1994). Linhagens recombinantes atenuadas capazes de expressar proteínas heterólogas das mais variadas origens, foram propostas como vacinas orais multifatoriais (Clements & Cárdenas, 1992; Curtiss *et al.*, 1994).

O objetivo principal deste trabalho foi o de introduzir e expressar o *operon* responsável pela síntese da fímbria K99 de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) patogênica para bovinos de forma estável em uma linhagem atenuada de *Salmonella typhimurium* por mutação nos genes da adenil ciclase (*cya*) e do receptor do AMP cíclico (*crp*).

Durante o processo de desenvolvimento, algumas questões tiveram de ser respondidas. O plasmídio que codifica o *operon* da fímbria K99 se manteve estável na linhagem receptora *in vivo*? A bactéria receptora expressou a fímbria K99? Em que condições de cultivo? Qual foi a influência desta expressão com relação ao crescimento da linhagem receptora e quanto às características invasivas *in vivo*? A linhagem vacinal persistiu nos órgãos do camundongo? A linhagem vacinal estimulou o sistema imunológico do hospedeiro?

Uma das preocupações atuais na expressão de proteínas recombinantes em linhagens atenuadas é a manutenção estável *in vivo* do plasmídio inserido, na ausência da pressão seletiva conseguida *in vitro* através de antimicrobianos. A estabilidade plasmidial é muito importante para o sucesso de vacinas multifatoriais e, assim, optamos por utilizar o sistema letal balanceado.

O sistema letal balanceado, baseado no gene *asd*, foi proposto por Curtiss *et al.* (Nakayama *et al.*, 1988; Curtiss *et al.*, 1990; Galán *et al.*, 1990) como uma possível solução para a estabilidade dos plasmídios inseridos em linhagens vacinais atenuadas de *Salmonella* sp, na ausência de antibióticos seletivos. O gene *asd* codifica a enzima aspartato- β -semialdeído-desidrogenase, que participa da via biossintética da lisina e está envolvida na formação do ácido diaminopimélico (DAP), um importante componente da parede celular de bactérias gram-negativas. Os plasmídios contendo o gene *asd* complementam a deleção letal do mesmo gene no cromossomo das linhagens vacinais receptoras, tornando inviáveis aquelas que apresentarem perda do plasmídio (Nakayama *et*

al., 1988; Curtiss *et al.*, 1990; Galán *et al.*, 1990). O plasmídio pYA3137 e seu derivado pSM40, utilizados neste trabalho, possuem o gene *asd*. Assim, como a linhagem *Salmonella typhimurium* x3987, que é uma mutante *asd* e apresenta dupla atenuação nos genes *cya/crp*, sendo por isso utilizada como receptora. O AMP cíclico e a proteína receptora do AMP cíclico (*crp*) são essenciais para a transcrição de muitos genes envolvidos com o transporte e quebra de catabólitos, tornando-a segura para ser utilizada como linhagem vacinal.

Os resultados obtidos com a linhagem x3987 quanto à estabilidade plasmidial *in vivo* foram plenamente satisfatórios. Dentre as bactérias recuperadas em placas de Peyer e baço dos camundongos utilizados no ensaio de persistência, uma amostragem foi analisada para se verificar a manutenção do plasmídio pSM40, sendo a presença do plasmídio constatada em 100% dos isolados analisados. Estes resultados confirmam a eficiência do sistema letal balanceado baseado no gene *asd*, para a estabilização de plasmídios *in vivo* na ausência de pressão por antimicrobianos. Observações semelhantes foram obtidas por Zhang *et al.* (1997), com o plasmídio recombinante que expressava a proteína ovariana ZP3 de camundongos.

A decisão em utilizar a fímbria K99 como antígeno para a estimulação imunológica, visando a uma proteção contra infecção por ETEC, se baseia em trabalhos anteriores realizados para avaliar a capacidade de indução da imunogenicidade através de fímbrias. De fato, estes estudos demonstraram que anticorpos produzidos a partir de fímbrias cumprem papel fundamental na proteção imunológica contra ETEC. Neste sentido, resultados positivos foram obtidos tanto para animais quanto para humanos (Acras, *et al.*, 1979; Nagy *et al.*, 1980; Evans, *et al.*, 1984; Levine, *et al.*, 1986; 1994; Moon, *et al.*, 1993). A fímbria K99 é normalmente encontrada em ETEC patogênica para bovinos e foi considerada altamente imunogênica (Acras *et al.*, 1979; Nagy, B., 1980; Moon, H. W., 1981; Moon, *et al.*, 1993; Osek *et al.*, 1995).

Por outro lado, diversos fatores parecem influenciar a expressão desta fímbria em *E. coli* selvagem. Dentre estes fatores, o AMP cíclico, a proteína receptora do AMP cíclico (*crp*) e a proteína *lrp* (leucine-responsive protein) são citados por vários autores e parecem estar envolvidos na regulação das 3 regiões gênicas do *operon* da fímbria K99 (van der Woude,

et al., 1990; Bertram *et al.*, 1994). Entretanto, estudos recentes com o *operon* da fímbria K99 e seu mecanismo de regulação demonstraram que a região 1 (*fanA* ao *fanD*), a região 2 (*fanE* e *fanF*) e a região 3 (*fanG* e *fanH*) são reguladas de forma independente (Inoue *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1995). Como a linhagem χ 3987 é atenuada justamente por mutação nos genes *cya* e *crp*, responsáveis pelos níveis de AMP cíclico intracelulares, existia a possibilidade da linhagem χ 3987-K99 não conseguir expressar a fímbria devido ao mecanismo de repressão catabólita.

Como se sabe, no mecanismo de repressão catabólita a proteína receptora do AMP cíclico (*crp*) se liga à região promotora de diversos genes, e assim permite uma ligação mais efetiva da RNA polimerase com seu sítio promotor, facilitando o processo de transcrição. Entretanto, a proteína *crp* se liga ao seu sítio promotor somente na presença de AMP cíclico, e este é fortemente afetado pela quebra da glicose. Deste modo, quantidades reduzidas de AMP cíclico são encontradas na presença de glicose, enquanto altas concentrações ocorrem em sua ausência (Lewin, B., 1994).

Quanto à influência da glicose na expressão da fímbria K99, entretanto, diversos autores têm encontrado resultados variáveis e algumas vezes contraditórios. Isaacson (1980) inicialmente observou uma repressão da produção de K99 mediada por glicose em linhagens crescidas em meio rico líquido (TSB), porém posteriormente verificou que isto não acontecia em meio mínimo (Isaacson, R., 1983). A utilização de um mutante para a produção da enzima adenil ciclase (*cya*) revelou que a repressão catabólita induzida por glicose afeta a síntese da subunidade da fímbria K99, porém não a sua montagem (Isaacson, R., 1983). Ainda quanto a isto, foi observado que a adição de relativamente pequenas quantidades de AMP cíclico parece reverter a ação repressora da síntese de K99 pela glicose (Isaacson, R., 1980), porém, este composto em altas concentrações parece estar relacionado com baixas produções da fímbria (Isaacson, R., 1980; Contrepolis, *et al.*, 1983).

De fato, sabe-se atualmente que a expressão da fímbria K99 é um processo que pode ser dividido em duas etapas, síntese da subunidade e montagem da fímbria. Os dois processos não ocorrem necessariamente de forma simultânea. A síntese da subunidade acontece continuamente durante o ciclo de vida da cultura, enquanto a montagem ocorre

exclusivamente durante a fase logarítmica. Portanto, a montagem da subunidade em fímbria não requer síntese ativa da subunidade (Isaacson, R., 1983). Confirmando esta afirmação, verificou-se que um mutante de *E. coli* no gene *cya* produziu uma quantidade 33 vezes menor da subunidade principal da fímbria K99, com relação ao produzido normalmente por uma linhagem selvagem, ainda que a quantidade de fímbria montada na superfície de ambas as linhagens fosse a mesma. Esta observação indica que o processo de montagem deva ser muito eficiente, uma vez que quantidade de subunidade existente na linhagem mutante é muito menor, embora não seja limitante. É importante destacar ainda que, embora tenha sido observado uma síntese reduzida da subunidade K99 na linhagem mutante *cya*, uma certa produção sempre foi detectada (Isaacson, R., 1983).

Girardeau *et al.* (1982) observaram dois grupos de linhagens produtoras de K99. Em um grupo, a produção de K99 parece ocorrer de modo constitutivo e independente da presença de glicose, enquanto em outro a produção é dependente de glicose.

Desta forma, durante o desenvolvimento da linhagem de *Salmonella typhimurium* x3987-K99, como a atenuação é provocada pelas mutações nos genes da adenil ciclase (*cya*) e da proteína receptora do AMP cíclico (*crp*), havia uma dúvida quanto à expressão da fímbria K99. Entretanto, surpreendentemente, a linhagem x3987-K99 apresentou expressão da fímbria K99 em quantidades relativamente elevadas. Deste modo, a atenuação pelos genes *cya* e *crp* nesta linhagem parece não afetar de modo significativo a expressão desta fímbria, da mesma forma que o observado em *E. coli* mutante *cya*. Assim, a síntese da subunidade deve estar ocorrendo de forma contínua, mesmo na ausência da proteína crp-AMPc, não afetando a montagem da fímbria durante a fase de crescimento logarítmico.

Assim, além da repressão catabólica, a expressão de K99 parece depender também de outros fatores, como por exemplo a presença de L-alanina no meio de cultura, o pH abaixo ou acima de 7,0, a ausência de aeração durante o cultivo e a temperatura diferente de 37°C.

Quanto à influência destes fatores, de Graaf *et al.* (1980) observaram inicialmente uma reduzida produção de fímbria K99 em condições de anaerobiose, entretanto, posteriormente o mesmo grupo de pesquisadores não detectou diferença significativa entre

cultura em anaerobiose ou aerobiose. Esta aparente contradição foi explicada pela dependência do pH para a produção da fímbria. Culturas em anaerobiose, sem regulador de pH, produzem rapidamente um pH abaixo de 7,0 devido a fermentação e nestas condições o crescimento continua sem a produção da fímbria K99 (van Verseveld, *et al.*, 1985).

van Verseveld, *et al.* (1985) determinaram a produção da fímbria K99 por diferentes linhagens cultivadas em vários meios de cultura e observaram que um meio mínimo com glicose e o meio Minca favorecem a obtenção de altas produções de K99. Além disto, o crescimento em meio rico, a incubação em temperaturas abaixo de 37°C ou em condições de anaerobiose parecem reprimir a síntese de K99 em culturas líquidas (de Graaf, *et al.*, 1980a). Foi observado também que a adição de L-alanina ao meio Minca inibe fortemente a síntese de K99 (de Graaf, *et al.*, 1980b; Girardeau, *et al.*, 1982). Este efeito, entretanto, parece ser muito menos pronunciado quando L-isoleucina e L- treonina são adicionados junto com L-alanina (Isaacson, 1983).

Como já foi dito, a produção da fímbria K99 em meio de cultura líquido está restrita à fase logarítmica de crescimento (Isaacson, 1980; van Verseveld, 1985). Isaacson (1983) demonstrou que este fenômeno não se aplica à síntese da subunidade principal da fímbria, que ainda ocorre durante outras fases do crescimento. Foi também observado que a adição de cloranfenicol impede a síntese da subunidade principal, entretanto a montagem da fímbria K99 ainda continua. Assim, aparentemente, a bactéria possui a qualquer tempo uma certo estoque de subunidades não montadas.

Com base nessas observações, o cultivo de *E. coli* com o objetivo de expressar a fímbria K99 tem utilizado prioritariamente o meio Minca. Para o desenvolvimento de uma linhagem vacinal, seria interessante que esta expressasse o antígeno recombinante, sem no entanto permitir que este interferisse excessivamente com a fisiologia da bactéria. Esta deve, também, expressar quantidades normais de seus próprios antígenos. Foi analisado então o comportamento da linhagem recombinante α 3987-K99 quanto à expressão da fímbria K99 e demais antígenos de superfície em diferentes condições de cultivo. Com este fim utilizamos o meio de cultura rico LB, comum em laboratórios de microbiologia bacteriana. Assim, as proteínas de superfície das linhagens α 3987-K99, α 3987 e *E.coli*

HB101-K99 foram extraídas e separadas por eletroforese em PAGE-SDS. Ao contrário do esperado, o resultado obtido revelou que o crescimento apresentado pela linhagem x3987-K99 em meio líquido LB com aeração favoreceu a expressão tanto da fímbria K99 quanto de antígenos de *Salmonella*. Ao compararmos estes resultados com a expressão apresentada por esta mesma linhagem em meio Minca, observamos que, de fato, este meio parece permitir a expressão da fímbria K99 de forma prioritária. Uma vez que era desejada justamente a obtenção da expressão de K99 sem contudo alterar significativamente a produção dos demais antígenos naturais da linhagem, utilizamos a partir deste momento o cultivo em meio líquido LB com aeração para a continuidade do trabalho.

A expressão da fímbria K99 pela linhagem x3987-K99 em meio LB líquido com aeração foi confirmada também através de soroaglutinação e de “imunoblotting”, utilizando-se para isso anticorpo primário policlonal anti-K99 obtido em coelhos.

Deste modo, o cultivo em meio líquido com aeração foi escolhido para os testes de imunização e persistência por apresentar maior facilidade técnica e por possibilitar a apresentação de antígenos tanto de *Salmonella* quanto da fímbria K99, favorecendo deste modo a utilização desta linhagem como vacina multifatorial.

A fímbria K99 produzida pela linhagem x3987-K99 foi purificada por precipitação com sulfato de amônio. A concentração de sulfato de amônio onde observamos uma maior concentração da fímbria e maior índice de pureza foi a de 10%. Este resultado está de acordo com o apresentado por Wevers *et al.* (1980), que obtiveram precipitação de uma fímbria associada com ETEC de humanos na mesma concentração de 10% de sulfato de amônio.

Uma vez comprovada a expressão da fímbria K99 pela linhagem recombinante x3987-K99, era necessário analisar se esta expressão, de alguma forma, afetava o crescimento da linhagem ou sua capacidade de invasão, haja visto que a eficiência da resposta imunológica depende destes fatores.

Deste modo, a curva de crescimento bacteriano foi realizada e foi observado um prolongamento da fase lag da linhagem x3987-K99, quando comparada com o obtido pela

linhagem controle $\times 3987$ (pYA3137). Assim, como a única diferença entre as duas linhagens é justamente a expressão da fímbria K99, foi deduzido que a expressão desta deve estar influenciando. De fato, como já foi discutido, embora a síntese da fímbria possa ocorrer durante qualquer etapa do crescimento, a montagem foi observada apenas durante a fase logarítmica, especialmente quando o cultivo ocorre em meio líquido e rico em nutrientes, o que pode explicar o resultado observado. Entretanto, o crescimento bacteriano com fase lag mais prolongada já havia sido observada em trabalho anterior (Srinivasan *et al.*, 1995) e, segundo o autor, ocorreu devido a presença de um plasmídeo de alto número de cópias com origem de replicação derivado do pUC. Observação semelhante foi obtido por Covone *et al.* (1998) com a linhagem de *Salmonella typhimurium* $\times 3987$. Estes autores também observaram um acréscimo de cerca de 3 horas na linhagem recombinante a qual expressava a proteína heteróloga LT, sem que houvesse alguma influência na persistência em tecidos de camundongos. Dessa forma, como este também é o caso do plasmídeo pSM40, esta possibilidade não pode ser rejeitada. Entretanto, mais importante que uma variação durante a curva de crescimento obtida *in vitro*, é analisar uma possível alteração *in vivo*, especialmente quanto à capacidade invasiva da linhagem. Quanto a isso, os mesmos autores observaram que um plasmídeo com alto número de cópias e expressando de forma contínua uma proteína recombinante parece não interferir com a colonização *in vivo* da bactéria (Covone *et al.*, 1998).

Esta observação foi confirmada pelos resultados obtidos neste trabalho. Com relação à influência da expressão da fímbria K99 na persistência da linhagem $\times 3987$ -K99, os resultados obtidos nos camundongos BALB/c em placas de Peyer e baço não revelaram diferença significativa entre os dois grupos. Deste modo, a expressão da fímbria parece não interferir com o mecanismo de invasão. Os camundongos não apresentaram comportamento diferente do grupo controle inoculado com placebo, confirmando a eficiência das mutações nos genes *cya/crp* quanto à atenuação da patogenicidade.

Desta forma, uma vez confirmada a capacidade de expressão da fímbria K99 pela linhagem $\times 3987$ -K99, e avaliada a não interferência desta na capacidade invasiva e persistência em camundongos, restava analisar a produção de anticorpos para os antígenos de *Salmonella* e K99 como modelo de estimulação da resposta imunológica. A resposta sérica pode ser induzida pelas bactérias ao infectar o baço ou através da

mediação por linfócitos ativados na placa de Peyer, migrados para a circulação sistêmica (Redman, *et al.*, 1994).

O resultado obtido demonstra que a linhagem x3987-K99 possui capacidade de estimular resposta imunológica anti-*Salmonella* de forma semelhante à linhagem controle. Desta forma, este resultado vem confirmar que a presença da fímbria K99 heteróloga na superfície bacteriana, além de não interferir com a invasividade e a persistência, não altera a resposta sérica induzida pelos antígenos naturais de *Salmonella*. Conforme o esperado, a resposta sérica anti-K99 ocorreu apenas no grupo inoculado com a linhagem x3987-K99 e não no grupo controle. Além disso, apesar da imunização ter ocorrido em apenas uma única dose, foi observada uma diferença significativa entre os títulos de anti-K99 no decorrer do tempo, com destaque para a elevação detectada depois da 2ª semana após a imunização oral. Esta diferença pode estar relacionada à recuperação de uma grande quantidade de bactérias no baço dos camundongos submetidos ao ensaio de persistência por volta do 12º dia após a imunização. Nesse sentido, estas observações reafirmam a importância da manutenção da capacidade de invasão e persistência pelos linhagens vacinais para a indução de uma resposta imunológica elevada.

Embora outros autores tenham utilizado linhagens de *Salmonella* sp com o sistema de estabilidade plasmidial baseado no gene *thyA* para expressar fímbrias de ETEC e uma boa resposta tenha sido obtida (Attridge, *et al.*, 1997; Morona, *et al.*, 1994), o sistema *thyA* não apresenta uma estabilidade de 100% como o baseado no gene *asd*. O sistema *thyA* não é uma mutação letal e possui potencial risco de reversão ao fenótipo selvagem.

Mais recentemente, foi desenvolvida uma linhagem de *Salmonella typhimurium* expressando a fímbria K99 (Ascón *et al.*, 1998). Esta linhagem foi capaz de induzir a estimulação de altos títulos de IgG e IgA anti-K99 em camundongos. Entretanto, a linhagem é atenuada decorrente de mutação auxotrófica no gene *aroA*. Embora mutantes *aroA* não possam sintetizar enteroquelina e ácido fólico, a importância da enteroquelina para a virulência de *Salmonella* sp tem sido questionada pelos resultados de Benjamin *et al.* (1985), que demonstraram a pouca importância de quelantes e transportadores de ferro para a patogenicidade. Portanto, a atenuação por *aroA* é devida principalmente à incapacidade de sintetizar pABA e, subsequentemente, ácido fólico. Bacon *et al.* (1951)

observaram que a administração de *pABA* na dieta de camundongos revertia a linhagem vacina para o fenótipo virulento (Curtiss & Kelly, 1987).

Deste modo, a linhagem vacinal *Salmonella typhimurium* com dupla atenuação nos genes *cya/crp* tem sido considerada segura quanto à reversão para o fenótipo selvagem. Neste trabalho descrevemos, portanto, o desenvolvimento de uma linhagem atenuada de *Salmonella typhimurium* nos genes *cya/crp*, expressando altas quantidades da fímbria K99 de *Escherichia coli* enterotoxigênica para bovinos. Esta linhagem persistiu em placas de Peyer e baço de camundongos BALB/c tempo suficiente para induzir elevados títulos de anticorpos séricos tanto anti-*Salmonella* quanto anti-K99. O conjunto de resultados do trabalho sugere a utilização da linhagem x3987-K99 como uma possível vacina multifatorial. Para tanto, seria interessante verificar ainda a resposta imunológica de mucosas (GALT,) com atenção particular à produção de IgA específica e à capacidade de estimular proteção imune em modelos experimentais.

CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos neste trabalho, pode ser concluído que:

1. Foi desenvolvida uma linhagem de *Salmonella typhimurium* atenuada capaz de expressar a fímbria K99 de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).
2. A linhagem conseguiu manter a estabilidade plasmidial *in vivo* através do sistema letal balanceado *asd*.
3. A condição de cultivo mais adequada para a expressão, pela linhagem x3987-K99, dos antígenos de *Salmonella typhimurium* e da fímbria K99 foi o meio LB líquido com aeração.
4. A expressão da fímbria K99 não alterou a capacidade invasiva da linhagem de *Salmonella typhimurium* x3987-K99 e a persistência em placas de Peyer de camundongos BALB/c.
5. A linhagem de *Salmonella typhimurium* x3987-K99 estimulou a produção de elevados títulos de anticorpos anti-*Salmonella* e anti-K99 em camundongos BALB/c imunizados por via oral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABSHIRE, K. Z. & NEIDHART, F. C. 1993. Analysis of proteins synthesized by *S. typhimurium* during growth within a host macrophage. **J. Bacteriol.** **175**: 3734-3743.
- ACRES, S. D., ISAACSON, R. E., BABIUK, L. A. & KAPITANY, R. A. 1979. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole-cell bacterins. **Infect. Immun.** **25**: 121-126.
- ALPUCHE-ARANDA, C. M., BERTHIAUME, E. P., MOCK, B., SWANSON, J. A. & MILLER, S. I. 1995. Spacious phagosome formation within mouse macrophages correlates with *Salmonella* serotype pathogenicity and host susceptibility. **Infect. Immun.** **63**: 4456-4462.
- Alpuche-Aranda, C. M., Racoosing, E. L., Swanson, J. A. & Miller, S. I. 1994.** *Salmonella* stimulate macrophage macropinocytosis and persist within spacious phagosomes. **J. Exp. Med.** **179**: 601-608.
- ASCÓN, M. A., HONE, D. M., WALTERS, N. & PASCUAL, D. W. 1998. Oral immunization with a *Salmonella typhimurium* vaccine vector expressing recombinant enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbriae elicits elevated antibody titers for protective immunity. **Infect. Immun.** **66**: 5470-5476.
- ATTRIDGE, S. R., DAVIES, R. & LABROOY, J. T. 1997. Oral delivery of foreign antigens by attenuated *Salmonella*: consequences of prior exposure to the vector strain. **Vaccine.** **15**: 155-162.
- BACON, G. A., BURROWS, T. W. & YATES, M. 1950. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*: the virulence mutants. **Br. J. Exp. Pathol.** **31**: 714-724.
- BACON, G. A., BURROWS, T. W. & YATES, M. 1951. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*: the loss of virulence of certain mutants. **Br. J. Exp. Pathol.** **32**: 85-96.

- BAJAJ, V., HWANG, C. & LEE, C. A. 1995. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates the expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. **Mol. Microbiol.** **18**: 715-727.
- BÄUMLER, A. J. & HEFFRON, F. 1995. Identification and sequence analysis of the *lpf*ABCDE, a putative fimbriae operon of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.** **177**: 2087-2097.
- BÄUMLER, A. J., TSOLIS, R. M. & HEFFRON, F. 1996a. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **93**: 279-283.
- BÄUMLER, A. J., TSOLIS, R. M. & HEFFRON, F. 1996b. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.** **64**: 1862-1865.
- BÄUMLER, A. J., TSOLIS, R. M., BOWE, F. A., KUSTERS, J. G. & HEFFRON, F. 1996c. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. **Infect. Immun.** **64**: 61-68.
- BEHLAU, I. & MILLER, S. I. 1993. A PhoP-repressed gene promotes *S. typhimurium* invasion of epithelial cells. **J. Bacteriol.** **175**: 4475-4484.
- BENJAMIN, W. H. JR., TURNBOUGH, C. L. JR., POSEY, B. S. & BRILES, D. E. 1985. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. **Infect. Immun.** **50**: 392-397.
- BERTRAM, E. M., ATTRIDGE, S. R. & KOTLARSKI, I. 1994. Immunogenicity of the *Escherichia coli* fimbrial antigen K99 when expressed by *Salmonella enteritidis* 11RX. **Vaccine.** **12**: 1372-1378.
- BETLEY, M. J., MILLER, V. L. & MIKELANOS, J. J. 1986. Genetic of bacterial enterotoxins. **Ann. Rev. Microbiol.** **40**: 577-608.

- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acid Res.** **7**: 1513-1523.
- BLUM, H., BIER, H. & GROSS, H.J. 1987. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. **Eletroforesis** **8**: 93-99.
- CÁRDENAS, L & CLEMENTS, J. D. 1992. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carrier of foreign antigens. **Clin. Microbiol. Rev.** **5**: 328-342.
- CARDENAS, L. & CLEMENTS, J. D. 1993. Stability, immunogenicity and expression of foreign antigens in bacterial vaccine vectors. **Vaccine.** **11**:126-135.
- CHALLACOMBE, S. J., & TOMASI, T. B. JR. 1980. Systemic tolerance and secretory immunity after oral immunization. **J. Exp. Med.** **152**: 1459-1472.
- CHAN, S. K. & GIANNELLA, R. A. 1981. Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by *E.coli* pathogenic for man. **J. Biol. Chem.** **256**: 7744-7746.
- CHATFIELD, S. N., FAIRWEATHER, N., CHARLES, I., PICKARD, D., LEVINE, M., HONE, D., POSADA, M., STRUGNELL, R. A. & DOUGAN, G., 1992. Construction of a genetically defined *Salmonella typhi* Ty2 aroA, aroC mutant for the engineering of a candidate oral typhoid-tetanus vaccine. **Vaccine.** **10**: 53-60.
- CHATFIELD, S. N., STRUGNELL, R. A. & DOUGAN, G. 1989. Live *Salmonella* as vaccines and carriers of foreign antigenic determinants. **Vaccine** **7**: 485-598.
- CHATFIELD, S., ROBERTS, M., LONDONO, P., CROPLEY, I., DOUCE, G. & DOUGAN, G. 1993. The development of oral vaccines based on live attenuated *Salmonella* strains. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.** **7**: 1-7.
- CHOPRA, A. K., PETERSON, J. W., CHARY, P. & PRASAD, R. 1994. Expression and characterization of the cloned *Salmonella typhimurium* enterotoxin. **Microbiol. Pathol.** **16**: 85-98.

- CLEGG, S. & GERLACH, G. F. 1987. Enterobacterial fimbriae. **J. Bacteriol.** 169:934-938.
- CLEMENTS, J. D., YANCEY, R. J. & FINKELSTEIN, R. A. 1980. Properties of homogenous heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 29: 91-97.
- CONTREPOIS, M. & GIRARDEAU, J. P. 1985. Additive protective effects of colostral antipili antibodies in calves experimentally infected with enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 50: 847-849.
- CONTREPOIS, M., GIRARDEAU, J. P., GOUET, P. & der VARTANIAN, M. 1983. Expression of K99 pilus of *E. coli*. **Ann. Rech. Vet.** 14: 400-407.
- COVONE, M. G., BROCCHI, M., PALLA, E., DIAS DA SILVEIRA, W., RAPPUOLI, R. & GALEOTTI, C. L. 1998. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.** 66: 224-231.
- CURTISS III, R. & KELLY, S. 1987. *Salmonella typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. **Infect. Immun.** 55: 3035-3043.
- CURTISS III, R., GALÁN, J. E., NAKAYAMA, K. & KELLY, S. M. 1990. Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains in vivo. **Res. Microbiol.** 141:797-805.
- CURTISS III, R., KELLY, S. M., TINGE, S. A., TACKET, C. O., LEVINE, M. M., SRINIVASAN, J. & KOOPMAN, M. 1994. Recombinant *Salmonella* vectors in vaccine development. In: Brown, F. (ed.) Recombinant vectors in vaccine development. **Dev. Biol. Stand.**, Basel, Karger, 82: 193-199.
- DALLAS, W. S. & FALKOW, S. 1980. Amino acid sequence homology between *cholerae* toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. **Nature** 288: 499-501.

- de GRAAF, F. K. 1990. Genetics of adhesive fimbriae of intestinal *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **151**: 29-53.
- de GRAAF, F. K., KLAASEN-BOOR, P. & van HEES, J. E. 1980a. Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. **Infect. Immun.** **30**: 125-128.
- de GRAAF, F. K., KRENN, B. E. & KLASSEN, P. 1984. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of K99 fimbriae. **Infect. Immun.** **43**: 508-514.
- de GRAAF, F. K., WIENTJES, F. B. & KLAASEN-BOOR, P. 1980b. Production of K99 antigen by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of antigen groups o8, o9, o20, and o101 grown at different conditions. **Infect. Immun.** **27**: 216-221.
- de GRAAF, F.K. & ROORDA, I. 1982. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic *Escherichia coli* strains B41M. **Infect. Immun.** **36**: 751-753.
- DEHOUX, P. & COSSART, P. 1995. Homologies between salmolyisin and some bacterial regulatory proteins. **Mol. Microbiol.** **15**: 591.
- DOGGETT, T. A., JAGUSZTYN-KRYNICKA, E. K. & CURTISS III, R. 1993. Immune responses to *Streptococcus sobrinus* surface protein antigen A expressed by recombinant *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.** **61**:1859-1866.
- DORMAN, C. J. 1995. DNA topology and global control of bacterial gene expression: implications for the regulation of virulence gene expression. **Microbiology** **141**: 1271-1280.
- DOUGAN, G., CHATFIELD, S., PICKARD, D., BESTER, J., O'CALLAGHAN, D. & MASKELL, D. 1988. Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harboring mutations in two different *aro* genes. **J. Infect. Dis.** **158**: 1329-1335.

- DRASAR, B. S. & HILL, M. J. 1974. Human intestinal flora. The distribution of bacterial flora in the intestine. London, Academic Press. pp. 36-43.
- DYKES, C. W., HALLIDAY, I. J., HOBDEN, A. N., READ, M. J. & HARFORD, S. 1985. A comparison of the nucleotide sequence of the A subunit of heat-labile enterotoxin and *cholerae* toxin. **FEMS Microbiol. Lett.** **26**: 171-174.
- EICHELBERG, K., GINOCCHIO, C. C. & GALÁN, J. E. 1994. Molecular and functional characterization of the *S. typhimurium* invasion genes *invB* and *invC*: homology of *invC* to the F₀F₁ ATPase family of proteins. **J. Bacteriol.** **176**: 4501-4510.
- ELSINGHORST, E. A., BARON, L. S. & KOPECKO, D. J., 1989. Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. **Microbiology.** **86**: 5173-5177.
- ENRST, R. K., DOMBROSKI, D. M. & MERRICK, J. M. 1990. Anaerobiosis, type 1 fimbriae, and growth phase are factors that affect invasion of HEp-2 cells by *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.** **58**: 2014-2016.
- EVANS, D. G. & EVANS, D. J. 1978. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/I) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of sorogroups O6 and O8. **Infect. Immun.** **21**: 638-647.
- EVANS, D. G., GRAHAM, D. Y. & EVANS, D. J. JR. 1984. Administration of purified colonization factor antigens (CFA/I, CFA/II) of enterotoxigenic *Escherichia coli* to volunteers. Response to challenge with virulent enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Gastroenterology.** **87**: 934-940.
- EVANS, D. G., SILVER, R. P., EVANS, D. J., CHASE, D. G. & GORBACH, S. L. 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. **Infect. Immun.** **12**: 656-667.

- FAIRBROTHER, J. M., LARIVIÈRE, S. & LALLIER, R. 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* sorogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. **Infect. Immun.** **51**: 10-15.
- FIELD, M., GRAF, L. H., LAIRD, W. J. & SMITH, P. L. 1978. Heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli* : in vitro effects on guanylate cyclase activity, cGMP concentration, and ion transport in small intestine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **75**: 2800-2804.
- FIELDS, P. I., E. A. GROISMAN & H. HEFFRON. 1989. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbial proteins from phagocytic cells. **Science** **243**: 1059-1062.
- FOSTER, J. W. & M. P. SPECTOR. 1995. How *Salmonella* survive against the odds. **Annu. Rev. Microbiol.** **49**: 145-174.
- FRANCIS, C. L., RYAN, T. A., JONES, B. D., SMITH, S. J. & FALKOW, S. 1993. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. **Nature** **364**: 639-642.
- FRANCIS, D. H. & WILLGOHS, J. A. 1991. Evaluation of a live avirulent *Escherichia coli* vaccine for K88⁺, LT⁺ enterotoxigenic colibacillosis in weaned pigs. **Am. J. Vet. Res.** **52**: 1051-1055.
- FRANTZ, F. C., JASO-FRIEDMAN, L. & ROBERTSON, D. C. 1984. Binding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin to rat intestinals cells and brush border membranes. **Infect. Immun.** **43**: 622-630.
- FRANTZ, J. C. & ROBERTSON, D. C. 1981. Immunological properties of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxins: development of radioimmunoassay specific of heat-stable enterotoxins with suckling mouse activity. **Infect. Immun.** **33**: 193-198.
- FRIEDRICH M. J., KINSEY, N. E., VILLA, J. & KADNER, J. 1993. Nucleotide sequence of a 13.9 Kb segment of the 90 Kb virulence plasmid of *S. typhimurium*: the presence of fimbrial biosynthetic genes. **Mol. Microbiol.** **8**: 543-558.

- GAASTRA, W. & de GRAAF, F.K. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiol. Rev.**, **46**: 129-161.
- GALÁN, J. E. 1994. *Salmonella* entry into mammalian cells: different yet converging signal transduction pathways? **Trend. Cell Biol.** **4**: 196-199.
- GALÁN, J. E. 1996. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. **Mol. Microbiol.** **20**: 263-271.
- GALÁN, J. E. & CURTISS III, R. 1990. Expression of *S. typhimurium* genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. **Infect. Immun.** **58**: 1879-1885.
- GALÁN, J. E., GINOCCHIO, C. & COSTEAS, P. 1992. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA* to a new family. **J. Bacteriol.** **174**: 4338-4349.
- GALÁN, J. E., NAKAYAMA, K. & CURTISS III, R. 1990. Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. **Gene** **94**: 29-35.
- GARIEPY, J. & SCHOOLNIK, G. K. 1986. Design of a photoreactive analogue of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST1b: use in identifying its receptor on rat brush border membranes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**: 483-487.
- GARIEPY, J., JUD, A. & SCHOOLNIK, G. K. 1987. Importance of disulfide bridges in the structure and activity of *Escherichia coli* enterotoxin ST-1b. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **84**: 8907-8911.
- GARIEPY, J., LANE, A., FRAYMAN, F., WILBUR, D., ROBIEN, W., SCHOOLNIK, G. K. & JARDETZKI, O. 1986. Structure of the toxin domain of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST-1. **Biochem.** **25**: 7854-7866.

- GERMANIER, R. & FUE, E. 1975. Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. **J. Infect. Dis.** **131**: 553-558.
- GERMANIER, R. & FURER, E. 1971. Immunity in experimental salmonellosis. II. Basis for the avirulence and protective capacity of gal E mutants of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **4**:663-673.
- GIANELLA, R. A., DRAKE, K. W. & LUTRELL, M. 1981. Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: comparison with the suckling mouse bioassay. **Infect. Immun.** **33**: 186-192.
- GILL, D. M., & RICHARDSON, S. H. 1980. Adenosine diphosphate-ribosylation cyclase catalysed by heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.** **33**: 677-682.
- GINOCCHIO, C. C., OLMSTED, S. B., WELLS, C. L. & GALÁN, J. E. 1994. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *S. typhimurium*. **Cell** **76**: 717-724.
- GIRARDEAU, J. P., DUBOURGUIER, H. C. & GOUET, P. 1982a. Effect of glucose and amino acids on expression of K99 antigen in *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.** **128**: 2243-2249.
- GIRARDEAU, J. P., DUBOURGUIER, H.C. & GOUET, P. 1982b. Inhibition of K99 antigen synthesis by L-alanine enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Gen. Microbiol.** **128**: 463-470.
- GOLDBERG M. B. & SANSONETTI, P. J. 1993. *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. **Infect. Immun.** **61**: 4941-4946.
- GREEN, B. A., NEILL, R. J., RUYECHAN, W. T. & HOLMES, R. U. 1983. Evidence that new enterotoxin of *Escherichia coli* which activates adenylate cyclase in eucariotic target cells is not plasmid mediated. **Infect. Immun.** **42**: 393-390.

- GROISMAN, E. A. & OCHMAN, H. 1993. Cognate gene cluster govern invasion of host epithelial cells by *S. typhimurium* and *S. flexneri*. **EMBO J.** **12**: 3779-3787.
- GROISMAN, E. A., FIELDS, P. I. & HEFFRON, F. 1990. Molecular biology of *Salmonella* pathogenesis. In: Molecular basis of bacterial pathogenesis. Ed. Barbara H. Iglewski and Virginia L. Clark, Academic Press, London, New York.
- GROISMAN, E. A., SAIER, M. H. JR., & OCHMAN, H. 1992. Horizontal transfer of a phosphatase gene as evidence for mosaic structure of the *Salmonella* genome. **EMBO J.** **11**: 1309-1316.
- GROSS, R., ARICÒ, B. & RAPPUOLI, R. 1989. Families of bacterial signal-transducing proteins. **Mol. Microbiol.** **3**: 1661-1667.
- GUERRANT, R. L., HUGHES, J. M., CHANG, B., ROBERTSON, D. C. & MURAD, F. 1980. Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of *E. coli*. Studies of tissue specificity, potential receptors, and intermediates. **J. Infect. Dis.** **142**: 220-228.
- GUINEY, D. G., FANG, F. C., KRAUSE, M. & LIBBY, S. 1994. Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid *Salmonella* serovars. **FEMS Microbiol. Lett.** **124**:1-10.
- GULIG, P. A. & CURTISS III, R. 1987. Plasmid-associated virulence of *S. typhimurium*. **Infect. Immun.** **55**: 2891-2901.
- GUTH, B. E. C., TWIDDY, E. M., TRABULSI, L. R. & HOLMES, R. K. 1986. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxin of *E. coli*. **Infect. Immun.** **54**: 529-536.
- HAFFERMAN, E. J., REED, S., HACKETT, J., FIERER, J., RAUDIER, C. & GUINEY, D. 1992. Mechanism of resistance to complement-mediated killing of bacteria encoded by the *S. typhimurium* virulence plasmid gene *rck*. **J. Clin. Invest.** **90**: 953-964.

- HERMANT D., MÉNARD, R., ARRICAU, N., PARSOT, C. & POPPOFF, M. Y. 1995. Functional conservation of the *Salmonella* and *Shigella* effectors of entry into epithelial cells. **Mol. Microbiol.** **17**: 781-789.
- HESS, J., GENTSCHEV, I., MIKO, D., WELZEL, M., LADEL, C., GOEBEL, W. & KAUFMANN, S. H. 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **93**: 1458-1463.
- HEUZENROEDER, M. W., ELLIOT, T. R., THOMAS, C. J., HALTER, R. & MANNING, P. A. 1990. A new fimbrial type (PCFO9) on enterotoxigenic *Escherichia coli* 09:H- LT+ isolated from a case of infant diarrhea in central Australia. **FEMS Microbiol. Lett.** **54**: 55-60.
- HINSON, G. & WILLIAMS, P. H. 1989. Adhesins of pathogenic *Escherichia coli*. In: Genetics of Bacterial Diversity, cap. 14, pp.287-307, Academic Press limited, London, U.K.
- HOHMANN, E. L., OLETTA, C. A., LOOMIS, W.P. & MILLER, S. I. 1995. Macrophage-inducible expression of a model antigen in *Salmonella typhimurium* enhances immunogenicity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **92**: 2904-2908.
- HOISETH, S. K. & STOCKER, B. A. D., 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. **Nature.** **291**: 238-239.
- HOLMES, R. K., TWIDDY, E. M. & PICKETT, C. L. 1986. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *E. coli*. **Infect. Immun.** **53**: 464-477.
- HOLMGREN, J. 1973. Comparison of the tissues receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholerae toxoid. **Infect. Immun.** **8**: 851-859.
- HOLMGREN, J., FREDMAN, P., LINDBALD, M., SVENNERHOLM, A. M. & SVENNERHOLM, L. 1982. Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholerae toxin. **Infect. Immun.** **38**: 424-43.

- HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H. H., SALEY, T. & STANLEY, T. W. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Willians and Wilkins, Baltimore, MD.
- HONDA, T., ARITA, M. & MIWATANI, T. 1984. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli* : a new colonization factor. **Infect. Immun.** **43**: 959-965.
- HONE, D. M., HARRIS, A. M., CHATFIELD, S., DOUGAN, G. & LEVINE, M. M., 1991. Construction of genetically defined double aro mutants of *Salmonella typhi*. **Vaccine.** **9**: 810-816.
- HONE, D., ATTRIDGE, S., VAN DEN BOSCH, L. & HACKETT, J. 1988. A chromosomal integration system for stabillization of heterologous genes in *Salmonella* based vaccine strains. **Microbial Pathog.** **5**: 407-418.
- HUECK, J. C., HANTMAN, M. J., BAJAJ, V., JOHNSTON, C., LEE, C. A. & MILLER, S. I. 1995. *Salmonella typhimurium* secreted invasion determinants are homologous to *Shigella* lpa proteins. **Mol. Microbiol.** **18**: 479-490.
- HUGHES, J.M., MURAD, F., CHANG, B. & GUERRANT, R.L. 1978. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Nature**, **271**: 755-756.
- INOUE, O. J., LEE, J. H. & ISAACSON, R. E. 1993. Transcriptional organization of the *Escherichia coli* pilus adhesin K99. **Mol. Microbiol.** **10**: 607-613.
- ISAACSON, R. E. 1980. Factors affecting expression of the *Escherichia coli* pilus K99. **Infect. Immun.** **28**: 190-194.
- ISAACSON, R. E. 1983. Regulation of expression of *Escherichia coli* pilus K99. **Infect. Immun.** **40**: 633-9.
- ISAACSON, R. E. 1985. Development of vaccines for bacterial disease using recombinant DNA technology. **Avian Dis.** **30**: 28-36.

- JACOBS, A. A., SIMONS, B. H. & de GRAAF, F. K. 1987. The role of lysine-132 and arginine-136 in the receptor-binding domain of the K99 fibrillar subunit. **EMBO J.** **6**: 1805-1808.
- JOHNSON, K., CHARLES, I., DOUGAN, G., PICKARD, D., O'GAORA, P., COSTA, G., ALI, T., MILLER, I. & HORMAECHE, C. 1991. The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. **Mol. Microbiol.** **5**: 401-407.
- JONES, B. D. & FALKOW, S. 1994. Identification and characterization of a *S. typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. **Infect. Immun.** **62**: 3745-3752.
- JONES, B. D., GHORI, N. & FALKOW, S. 1994. *S. typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **J. Exp. Med.** **180**: 15-23
- KANIGA, K., TROLLINGER, D. & GALÁN, J. E. 1995. Identification of two targets of the type III protein secretion system encoded by the *inv* and *spa* loci of *Salmonella typhimurium* that have homology to the *Shigella* IpaD and IpaA proteins. **J. Bacteriol.** **177**: 7078-7085.
- KAPER, J. B. & LEVINE, M. M. 1988. Progress towards a vaccine against enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Vaccine** **6**: 197-199.
- KAPER, J. B., MORRIS, J. G. JR. & LEVINE, M. M. 1995. Cholera. **Clin. Microbiol. Rev.** **8**: 48-86.
- KAREM, K. L., CHATFIELD, S., KUKLIN, N. & ROUSE, B. T. 1995. Differential induction of carrier antigen-specific immunity by *Salmonella typhimurium* live-vaccine strains after single mucosal or intravenous immunization of BALB/c mice. **Infect. Immun.** **63**: 4557-4563.
- KAUFMAN, P. E. 1981. Production and evaluation of antibody to the heat-stable enterotoxin from a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.** **42**: 611-614.

- KENNEDY, D. J., GREENBERG, R.N., DUNN, J. A., ALBERTHY, R., RYERSE, J. S. & GUERRANT, R. L. 1984. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on the intestine of mice, rats, rabbits and piglets. **Infect. Immun.** **46**: 639-646.
- KLEMM, P. & HEDEGAARD, L. 1990. Fimbrial of *Escherichia coli* as carrier of heterologous antigenic sequences. **Res. Microbiol.** **141**: 1013-1017.
- KLEMM, P. 1981. The complete amino acid sequence of the K88 antigen, a fimbrial protein from *Escherichia coli*. **Eur. J. Biochem.** **117**: 617-627.
- KLEMM, P. 1986. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. **EMBO J.** **5**: 1389-1393.
- KLIPSTEIN, F. A., ENGERT, R. F. & CLEMENTS, J. D., 1982. Development of a vaccine of cross-linked heat-stable and heat-labile enterotoxins that protects against *Escherichia coli* producing either enterotoxin. **Infect. Immun.** **37**: 550-557.
- KNUTTON, S., LLOYD, D. R. & MCNEISH, A. S. 1987. Identification of a new fimbrial structure in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) serotype O148:H28 which adheres to human intestinal mucosa: a potentially new human ETEC colonization factor. **Infect. Immun.** **55**: 86-92.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature** **227**: 680-685.
- Le MINOR, L. & POPPOFF, M. Y. 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. Nov. as the type and only species of the genus *Salmonella*. **Int. J. Syst. Bact.** **37**: 465-468.
- LECLERC, C., LO-MAN, R., FAYOLLE, C., CHARBIT, A., CLEMENT, J. M., MARTINEAU, P., O'CALLAGHAN, D. & HOFNUNG, M. 1994. Molecular and cellular parameters controlling the immunogenicity of foreign B- or T-cell epitopes expressed by recombinant vectors. **Dev. Biol. Stand.** **82**: 193-199.

- LEE, C. A., JONES, B. D. & FALKOW, S. 1992. Identification of a *S. typhimurium* invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:** 1847-1851.
- LEE, C. H., MOSELEY, S. L., MOON, H. W., WHIPP, S. C., GYLES, C. L. & SO, M. 1983. Characterization of the gene encoding heat-stable toxin II and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin II producers. **Infect. Immun. 42:** 264-268.
- LEE, J. H. & ISAACSON, R. E. 1995. Expression of the gene cluster associated with the *Escherichia coli* pilus adhesin K99. **Infect. Immun. 63:** 4143-4149.
- LEVINE, M. M. 1984. *Escherichia coli* infections. In: Bacterial Vaccines, cap. 7 pp. 187-235, London, Academic Press.
- LEVINE, M. M. 1986. Clinical and field trials to assess the efficacy of vaccines against bacterial enteric infections. **Ann. Sclavo. Collana Monogr. 3:** 41-50.
- LEVINE, M. M. 1987. *Escherichia coli* that causes diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **J. Infect. Dis. 155:** 377-389.
- LEVINE, M. M., KAPER, J. B., BLACK, R. E. & CLEMENTS, M. L. 1983. New Knowledge of pathogenesis of bacterial enteric infection as applied to vaccine development. **Microbiol. Rev. 47:** 510-550.
- LEWIN, B. 1994. Genes V. Oxford University Press, N.Y. p.439-444.
- LIBBY, S. J., GOEBEL, W., LUDWIG, A., BUCHMEIER, N., BOWE, F., FANG, F. C., GUINEY, D. G., SONGER, J. G. & HEFRON, F. 1994. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:** 489-493.
- MATHEWSON J. J., JOHNSON, P. C., DU PONT, H. L. SATTERWHITE, T. K. & WINDSOR, D. K. 1986. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. **J. Infect. Dis. 154:** 524-527.

- MATHEWSON, J. J., JOHNSON, P. C., DU PONT, H. L., MORGAN, D. R., THORTON, S. A., WOOD, L. V. & ERICSSON, C. D. 1985. A newly recognized cause of traveller's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.** **151**: 471-475.
- MAURELLI, A. T. 1994. Virulence protein export system in *Salmonella* and *Shigella*: a new family or lost relatives? **Trends. Cell. Biol.** **4**: 240-242.
- McCONNELL, M. M., CHART, H. & ROWE, B. 1989. Antigenic homology within human enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial colonization factor antigens: CFA/I, coli-surface-associated antigens (CS)1, CS2, CS4 and CS17. **FEMS Microbiol. Lett.** **52**: 105-108.
- McCORMICK, B. A., COLGAN, S. P., ARCHER, C. D., MILLER, S. I., & MADARA, J. L. 1993. *Salmonella typhimurium* attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signaling to subepithelial neutrophils. **J. Cell. Biol.** **123**: 895-907.
- McCORMICK, B. A., MILLER, S. I., CARNES, D. & MADARA, J. L. 1995. Transepithelial signaling to neutrophils by *Salmonella*: a novel virulence mechanism for gastroenteritis. **Infect. Immun.** **63**: 2302-2309.
- MILLER, I., MANDEL, L., MORAVEK, F., KRUML, J. & KLEPALOVA, J. 1972. Course of the post-irradiation syndrome after irradiation with lethal doses in newborn conventional, germ-free and *Escherichia coli*-monoassociated piglets. **Folia Microbiol.** **17**: 291-299.
- MILLER, S. I., LOOMIS, W. P., ALPUCHE-ARANDA, C., BEHLAU, I. & HOHMANN, E. 1993. The PhoP virulence regulon and live oral *Salmonella* vaccines. **Vaccine** **11**: 122-125.
- MILLS, D. M., BAJAJ, V. & LEE, C. A. 1995. A 40 Kb chromosomal fragment encoding *S. typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *E. coli* K12 chromosome. **Mol. Microbiol.** **15**: 749-759.
- MOOI, F. R. & de GRAAF, F.K. 1985. Molecular biology of fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **118**: 119-138.

- MOOI, F. R., WOUTERS, C., WIJFJES, A. & de GRAAF, F.K. 1982. Construction and characterization mutants impaired in the biosynthesis of the antigen. **J. Bacteriol.**, **150**: 512-521.
- MOON, H. W. & BUNN, T. O. 1993. Vaccines for preparing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. **Vaccine**. **11**: 213-219.
- MOON, H. W. 1981. Protection against enteric colibacillosis in pigs suckling orally vaccinated dams: evidence for pili as protective antigens. **Am. J. Vet. Res.** **42**: 173-177.
- MOON, H. W. 1990. Colonization factors antigens of enterotoxigenic *E.coli* in animals. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.** **151**: 147-165.
- MOON, H. W., ROGERS, D. J. & ROSE, R. 1988. Effects of an orally administered live *Escherichia coli* pillus vaccine on duration of lacteal immunity to enterotoxigenic *Escherichia coli* in swine. **Am. J. Vet. Res.** **49**: 2068-2071.
- MORGAN, R. L., ISAACSON, R. E., MOON, H. W., BRINTON, C. C. & TO, C. C. 1978. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrheal disease by vaccination dams with purified 987p or K99 pili: protection correlates with pillus homology of vaccine and challenge. **Infect. Immun.** **22**: 771-777.
- MORONA, R., MORONA, J. K., CONSIDINE, A., HACKETT, J. A., van den BOSCH, L., BEYER, L. & ATTRIDGE, S. R. 1994. Construction of K88- and K99-expressing clones of *Salmonella typhimurium* G30: immunogenicity following oral administration to pigs. **Vaccine** **12**: 513-517.
- MOSELEY, S.L., HARDY, J.W., ECHEVERRIA, P. & FALKOW, S. 1983. Isolation and nucleotide sequence determination of a gene encoding a heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **39**: 1167-1174.

- MOVVA, R. N., GREEN, P., NAKAMURA, K. & INOUE, M. 1981. Interaction of cAMP receptor protein with the ompA gene, a gene for a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. **FEBS Letters** **128**: 186-190.
- NAGY, B. 1980. Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxic colibacillosis. **Infect. Immun.** **27**: 21-24.
- NAGY, B., MOON, H. W. & ISAACSON, R. E. 1976. Colonization of porcine small intestine by *Escherichia coli* : ileal colonization and adhesion by pig enteropathogens that lack K88 antigens by some capsular mutants. **Infect. Immun.** **13**: 1214-1220.
- NAGY, B., MOON, H. W., ISAACSON, R. E., ITO, C. C. & BRINTON, C. C. 1978. Immunization of suckling pigs enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccination dams with purified pili. **Infect. Immun.** **21**: 269-274.
- NAKAYAMA, K., KELLY, S. K. & CURTISS III, R. 1988. Construction of an Asd⁺ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. **Biotechnol.** **6**: 693-697.
- NATARO, J. P. & KAPER, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.** **11**: 142-201.
- NEIDHARDT, F. C. 1987. What the bacteriologists have learned about heat shock. **Genes Dev.** **1**: 109-110.
- NORGREN, M., NORMAK, S., LARK, N., O'HANLEY, P., SCHOOLNIK, G., FALKOW, S., SVENBORG-EDEN, C., BAGA, M. & UHLIN, B. E. 1984. Mutation in *Escherichia coli* cistrons affecting adhesion to human cells do not abolish Pap pili fiber formation. **EMBO J.** **3**: 1159-1165.

- ORSKOV, I., ORSKOV, F., SMITH, H.W., & SOJKA, W.J. 1975. The establishment of K99, a termo-labile, transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains. **Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.**, **83**: 31-36.
- ORSKOV, I., ORSKOV, F., SOJKA, W. J. & WITTING, W. 1964. K antigens K88^{ab} (L) and K88^{ac} (L) in *Escherichia coli*. A new O antigen: O147 and a new K antigen: K88 (B). **Acta. Pathol. Microbiol. Scand.** **62**: 439-477.
- OSEK, J., TRUSZCZYNSKI, M., TARASIUK, K. & PEJSKAK, Z. 1995. Evaluation of different vaccines to control of pig colibacillosis under large-scale farm conditions. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** **18**: 1-8.
- OUELLETTE, A. J., HSIEH, M. M., NOSEK, M. T., CANNO-GAUCI, D. F., HUTTNER, K. M., BUICK, R. N. & SELSTED, M. E. 1994. Mouse paneth cell defensins: primary structure and antibacterial activities of numerous cryptdin isoforms. **Infect. Immun.** **62**: 5040-5047.
- PACE, J., HAYAMAN, M. J. & GALÁN, J. E. 1993. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. **Cell** **72**: 505-514.
- PARRA-LOPEZ, C., BAER, M. T. & GROISMAN, E. A. 1993. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *S. typhimurium*. **EMBO J.** **12**: 4053-4062.
- PASCOPELLA, L., RAUPACH, B., GHORI, N., MONACK, D., FALKOW, S. & C. SMALL, P. L. 1995. Host restriction phenotypes of *Salmonella typhi* and *Salmonella gallinarum*. **Infect. Immun.** **63**: 4329-4335.
- PEDERSEN, P. A., ANDERSEN, L. N. 1991. Deletion and duplication of specific sequences in the K88^{ab} fimbrial subunit protein from porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.**, **229**: 285-291.

- PEGUES, D. A., HANTMAN, M. J., BEHLAU, I. & MILLER, S. I. 1995. PhoP/PhoQ transcription repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a hole in protein secretion. **Mol. Microbiol.** **17**: 169-181.
- PICKARD, D., LI, J., ROBERTS, M., MASKELL, D., HONE, D., LEVINE, M., DOUGAN, G. & CHATFIELD, S. 1994. Characterization of defined ompR mutants of *Salmonella typhi*: ompR is involved in the regulation of Vi polysaccharide expression. **Infect. Immun.** **62**: 3984-3993.
- PICKETT, C. L., TWIDDY, E. M., BELISLE, B. W. & HOLMES, R. K. 1986. Cloning of genes that encode a new heat-labile enterotoxin of *E. coli*. **J. Bacteriol.** **165**: 348-352.
- POPPOFF, M. Y., BOCKEMÜHL, J. & HICKMAN-BRENNER, F. W. 1995. Supplement 1994 (no. 38) to the Kauffmann-White scheme. **Res. Microbiol.** **146**: 799-803.
- PORTER, P., KENWORTHY, R. & ALLEN, W. D. 1974. Effect of oral immunization with *Escherichia coli* antigens on postweaning enteric infection in the young pig. **Vet. Rec.** **95**: 99-104.
- PRASAD, R., CHOPRA, A. K., PETERSON, J. W., PERICAS, R. & HOUSTON, C. W. 1990. Biological and immunological characterization of a cloned cholera toxin-like enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. **Microb. Pathog.** **9**: 315-329.
- REDMAN, T. K., HARMON, C. C. & MICHALEK, S. M. 1994. Oral immunization with recombinant *Salmonella typhimurium* expressing surface protein antigen A of *Streptococcus sobrinus*: persistence and induction of humoral responses in rats. **Infect. Immun.** **62**: 3162-3171.
- REDMAN, T. K., HARMON, C.C., LALLONE, R. L. & MICHALEK, S. M. 1995. Oral immunization with recombinant *Salmonella typhimurium* expressing surface protein antigen A of *Streptococcus sobrinus*: dose response and induction of protective humoral responses in rats. **Infect. Immun.** **63**: 2004-2011.

- REEVES, M. W., EVINS, G. M., HEIBA, A. A., PLIKAYTIS, B. D & FARMER III, J. J. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. Nov. **J. Clin. Microbiol.** **27**: 313-320.
- RICCI, L. C., DE FARIA, F. P., PORTO, P. S., DE OLIVEIRA, E. M. & DE CASTRO, A. F. 1997. A new fimbrial putative colonization factor (PCF02) in human enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in Brazil. **Res. Microbiol.** **148**: 65-69.
- ROBBINS, A. 1990. Modern vaccines. Progress towards vaccines we need and do not have. **Lancet.** **335**: 1436-1438.
- ROSENDAL, E., JACOBS, A. A. C., RATHMAN, P., SONDERMEYER, C., STEGEHUIS, F., OUDEGA, B. & de GRAAF, F. K. 1987. Primary structure and subcellular localization of two fimbrial subunit-like proteins involved in the biosynthesis of K99 fimbriae. **Mol. Microbiol.** **1**: 211-217.
- ROSENSHINE, I., RUSCHKOWSKY, S., FOUBISTER, V. & FINLAY, B. B. 1994. *S. typhimurium* invasion of epithelial cells: role of induced host cell tyrosine protein phosphorylation. **Infect. Immun.** **62**: 4969-4974.
- ROSSOLINI, G. M., MUSCASM P., CHIESURINM A. & SATTAM G. 1993. Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Salmonella typhi* gene cluster coding for type 1 fimbriae, p. 408-412. In: NATO ASI Series Volume: The Biology of *Salmonella* (Cabello, F. et al., eds.), Plenum Publishing Co., New York.
- ROWLAND, K. L., ESTHER, C. R. & SPITZNAGEL, J. K. 1994. Isolation and characterization of a gene, *pmrD*, that confers resistance to polymyxin when expressed in multiple copies. **J. Bacteriol.** **176**: 3589-3597.
- ROWLAND, K. L., MARTIN, L. E., ESTHER, C. R. & SPITZNAGEL, J. K. 1993. Spontaneous *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 defined a new two component regulatory system with a possible role in virulence. **J. Bacteriol.** **175**: 4154-4164.

- RUNNELS, P. L., MOSELEY, S. L. & MOON, H. W. 1987. F41 pili as protective antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produce F41, K99 or both pilus antigens. **Infect. Immun.** **55**: 555-558.
- RUTTER, J. M. & JONES, G. W. 1973. protection against enteric disease caused by *Escherichia coli* - a model for vaccination with a virulence determinant? **Nature** **242**: 531-532.
- SAARILAHTI, H. T., PALVA, E. T., HOLMGREN, J. & SANCHEZ, J. 1989. Fusion of genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and outer membrane protein OmpC. **Infect. Immun.** **57**: 3663-3665.
- SALYERS, A. A. & WHITT, D. D. 1994. *Salmonella* infection. In: Bacterial Pathogenesis. A Molecular approach. (Salyers, A. A. and Whitt, D. D., eds.). ASM press, Washington, DC, pp. 229-243.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. New York, Cold Spring Harbor Press.
- SANDERSON, K. E. & ROTH, J. R., 1983. Linkage map of *Salmonella typhimurium*, Edition VI. **Microbiol. Rev.** **47**: 410-453.
- SANDERSON, K. E., HESSEL, A. & RUDD, K. E. 1995. Genetic map of *S. typhimurium*, Edition VIII. **Microbiol. Rev.** **59**: 241-303.
- SCHÖDEL, F. & WILL, H., 1989. Construction of a plasmid for expression of foreign epitopes as fusion proteins with subunit B of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.** **57**: 1347-1350.
- SCHÖDEL, F., KELLY, S. M., PETERSON, D. L., MILICH, D. R. & CURTISS III, R. 1994. Hybrid hepatitis B virus core-pre-S proteins synthesized in avirulent *Salmonella typhimurium* and *Salmonella typhi* for oral vaccination. **Infect. Immun.** **62**: 1669-1676.

- SCOTLAND, S. M. 1988. Toxins. **J. Appl. Bacteriol.** **5**: 1055-1295.
- SEARS, C. L. & KAPER, J. B. 1996. Enteric bacterial toxins: Mechanism of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.** **60**: 167-215.
- SHIMONISHI, Y., HIDAKA, Y., KOIZUMI, M., HANE, M., AIMOTO, S., TAKEDA, T., MIWATANE, T. & TAKEDA, Y. 1982. Mode of disulfide bond formation of a heat-stable enterotoxin (STh) produced by a human strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEBS Letters** **215**: 165-170.
- SMITH, H. W. & GYLES, C. L. 1970. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **J. Med. Microbiol.** **3**: 387-401.
- SMITH, N. W. & SACK, R. B. 1973. Immunologic cross-reactions of enterotoxins from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. **J. Infect. Dis.** **127**: 164-170.
- SMITH, P., ZURITA, L., CANALE, F., FERREIRA, A. & TORO, H. 1994. ELISA to determine anti-K99 pilus antibody in the sera of normal and diarrhoeic calves. **Vet. Microbiol.** **40**: 387-392.
- SÖDERLING, O. & MOLLBY, R. 1978. Studies on *Escherichia coli* in pigs. V. Determination of enterotoxicity and frequency of O group and K88 antigen in strains from 200 piglets with neonatal diarrhoea. **Zentralb. Veterinärmed. Reihe.** **25**: 719-728.
- SOJKA, W. J., WRAY, C. & MORRIS, J. A. 1978. Passive protection of lambs experimental enteric colibacillosis by colostral transfer of antibodies from K99- vaccinated ewes. **J. Med. Microbiol.** **11**: 493-499.
- SRINIVASAN, J., TINGE, S., WRIGHT, R., HERR, J. C. & CURTISS III, R. 1995. Oral immunization with attenuated *Salmonella* expressing human sperm antigen induces antibodies in serum and the reproductive tract. **Biol. Reprod.** **53**: 462-471.

- STAATS, H. F., JACKSON, R. J., MARINARO, M., TAKAHASSHI, I., KIYONO, H. & MAGHEE, J. R. 1994. Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. **Curr. Op. Immunol. 6**: 572-583.
- STONE, B. J., GARCIA, C. M., BADGER, J. L., HASSET, T., SMITH, R. I. F. & MILLER, V. L. 1992. Identification of novel loci affecting entry of *S. enteritidis* into eukaryotic cells. **J. Bacteriol. 174**: 3945-3952.
- STRUGNELL, R. A., MASKELL, D., FAIRWEATHER, N., PICKARD, D., COCKAYNE, A., PENN, C. & DOUGAN, G., 1990. Stable expression of foreign antigens from the chromosome of *Salmonella typhimurium* vaccine strains. **Gene. 88**: 57-63.
- SUKUPOLVI, S., VUORIO, R., QI, S. Y., O'CONNOR, D. & RHEN, M. 1990. Characterization of the *traT* gene and mutants that increase outer membrane permeability from the *S. typhimurium* virulence plasmid. **Mol. Microbiol. 4**: 49-57.
- TACKET, C. O., MANEVAL, D. R. & LEVINE, M. M. 1987. Purification, morphology, and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. **Infect. Immun. 55**: 1063-1069.
- THIRY, G., CLIPPE, A., SCARCEZ, T. & PETRE, J. 1989. Cloning of DNA sequences encoding foreign peptides and their expression in the K88 pili. **Appl. Environ. Microbiol. , 55**: 984-993.
- THOMAS, L. V., CRAVIOTO, A., SCOTLAND, S. M. & ROWE, B. 1982. New fimbrial antigen type (E8775) that may represent a colonization factor in *Escherichia coli* in humans. **Infect. Immun. 35**: 1119-1124.
- THOMPSON, M. R. & GIANELLA, R. A. 1985. Revised amino acid sequence for a heat-stable enterotoxin produced by an *Escherichia coli* strain (18D) that is pathogenic for humans. **Infect. Immun. 47**: 834-836.

- van der WOUDE, M. W., ARTS, P. A., BAKKER, D., van VERSEVELD, H. W. & de GRAAF, F. K. 1990. Growth-rate-dependent synthesis of K99 fimbrial subunits is regulated at the level of transcription. **J. Gen. Microbiol.** **136**: 897-903.
- van DIE, I., van MEGEN, I., HOEKSTRA, W & BERGANS, H. 1989. Molecular organization of the genes involved in the production of fimbrial, causing manose resistant hemagglutination of a uropathogenic *Escherichia coli* O6:K2:H1:F7 strains. **Mol. Gen. Genet.** **194**: 528-533.
- van EMBDEN, J. D. A., de GRAAF, F. K., SCHOOLS, L. M. & TEPPEMA, J. S. 1980. Cloning and expression of a deoxyribonucleic acid fragment that encodes for the adhesive antigen K99. **Infect. Immun.** **29**:1125-1133.
- van VERSEVELD, H. W., BAKKER, P., van der WOUDE, T., TERLETH, C. & de GRAAF, F. K. 1985. Production of fimbrial adhesins K99 and F41 by enterotoxigenic *Escherichia coli* as a function of growth-rate domain. **Infect. Immun.** **49**: 159-163.
- VÉSCOVI, E. G., SONCINI, F. C. & GROISMAN, E. A. 1994. The role of the PhoP/PhoQ regulon in *Salmonella* virulence. **Res. Microbiol.** **145**: 473-480.
- VÉSCOVI, E. G., SONCINI, F. C. & GROISMAN, E. A. 1996. Mg²⁺ as an extracellular signal: environment regulation of *Salmonella* virulence. **Cell** **84**: 165-174.
- WEIKEL, C. S., NELLANS, H. N. & GUERRANT, R. L. 1986. *In vivo* and *in vitro* effects of a novel enterotoxin STb, produced by *E. coli*. **J. Infect. Dis.** **153**: 893-901.
- WEVERS, P., PICKEN, R., SCHMIDT, G., JANN, B., JANN, K., GOLECKI, J. R. & KIST, M. 1980. Characterization of pili associated with *Escherichia coli* O18ac. **Infect. Immun.** **29**: 685-691.
- WHIPP, S., MOON, H. W. & ARGENZIO, R.A. 1981. Comparison of enterotoxic activities of a heat-stable enterotoxin from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. **Infect. Immun.** **31**: 245-251.

- WICK, M. J., HARDING, C. V., NORMARK, S. J. & PFEIFER, J. D. 1994. Parameters that influence the efficiency of processing antigenic epitopes expressed in *Salmonella typhimurium*. **Infect. Immun.** **62**: 4542-4548.
- YAMAMOTO, T., GORJOBORI, T. & YOKOTO, T. 1987. Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* 01. **J. Bacteriol.** **169**: 1352-1357.
- YANO, T., LEITE, D. S., CAMARGO, I. J. B. & PESTANA DE CASTRO, A. F. 1986. A probable new adhesive factor (F42) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs. **Microbiol. Immunol.** **30**: 495-508.
- ZHANG, X., LOU, Y. H., KOOPMAN, M., DOGGETT, T., TUNG, K. S. & CURTISS III, R. 1997. Antibody responses and infertility in mice following oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing recombinant murine ZP3. **Biol. Reprod.** **56**: 33-41.
- ZIERLER, M. K. & GALÁN, J. E. 1995. Contact with culture epithelial cells stimulates secretion of *S. typhimurium* invasion protein InvJ. **Infect Immun.** **63**: 4024-4028.