



Caracterização de Linhagens Atenuadas de *Salmonella enterica* Typhimurium $\Delta himA$ ou $\Delta himD$

UNICAMP

Stefania Kreitlon Carolino¹, Gerson Nakazato^{1*}, Marcelo Brocchi¹

¹Curso de Farmácia, Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes, Instituto de Biologia/UNICAMP

* Endereço atual: Universidade Federal de Londrina

Agência Financiadora: SAE/UNICAMP, CNPq e FAPESP

Palavras-chave: *Salmonella enterica* – linhagens - imunização

INTRODUÇÃO

Linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* vêm sendo utilizadas como vacinas na indução de imunidade contra a salmonelose. A construção dessas linhagens é alcançada pela introdução de mutações em genes associados à patogenicidade, a vias biossintéticas ou em genes reguladores globais, cujo resultado é a atenuação da virulência sem, no entanto, comprometer a capacidade de colonização in vivo e, conseqüentemente, de indução do sistema imune de forma efetiva.

O presente projeto se propõe a analisar a resposta à infecção de camundongos por linhagens mutantes atenuadas de *S. enterica* Typhimurium. Neste trabalho, caracterizou-se linhagens mutantes de *S. enterica* Typhimurium $\Delta himA$ e $\Delta himD$ tanto em termos de DL₅₀, colonização, quanto de imunidade no modelo murino de infecção, buscando incrementar as pesquisas já desenvolvidas quanto à criação de linhagens vacinais recombinantes de *S. enterica*. As linhagens para estudo e estabelecimento de comparações são ST662 $\Delta himA$, ST662 $\Delta himD$ e χ 3985.

METODOLOGIA

Meios de Cultura, Condições de Cultivo e Estocagem das Amostras

O meio de rotina foi o LB ou LB-Ágar. A pureza das culturas bacterianas foi verificada em meio MacConkey. As linhagens bacterianas foram estocadas a 70°C em LB com 15% de glicerol.

Determinação da Dose Letal Média (DL50)

Para o cálculo da DL₅₀, as amostras foram cultivadas em LB e diluições seriadas foram inoculadas oralmente em camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 10 semanas de idade. A sobrevivência dos camundongos foi avaliada ao longo de 30 dias.

Persistência in vivo

A quantidade de 10⁸ a 10⁹ células bacterianas de *S. enterica* Typhimurium $\Delta himA$ e $\Delta himD$ foi inoculada por via oral em camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 10 semanas de idade. Os animais foram sacrificados 3, 10 e 30 dias após o tratamento e a Unidade Formadora de Colônias (UFC) presentes nas placas de Peyer e no baço foi determinada.

Imunogenicidade

Camundongos BALB/c fêmeas de 6 a 10 semanas de idade foram imunizados com duas doses de aproximadamente 10⁷-10⁹ células bacterianas nos dias 0 e 14 e em intervalos semanais, soro foi coletado para a determinação do título de IgG sérica e fezes foram coletadas e processadas para a determinação do título de IgA.

ELISA

A quantificação do título de anticorpos no soro de animais imunizados com as linhagens recombinantes de *S. enterica* foi avaliado por ELISA.

CONCLUSÃO

O resultados obtidos para os testes de persistência in vivo indicaram que as três linhagens foram capazes de disseminação sistêmica em camundongos BALB/c. No entanto, a cinética de infecção foi diferente, uma vez que os mutantes Δhim foram detectados no baço 3 dias após o inóculo, mas foram rapidamente eliminados, uma vez que estes mutantes não foram detectados neste órgão 10 e 15 dias pós-inoculação. Nas placas de Peyer, por outro lado, os mutantes Δhim foram detectados até 10 dias após o inóculo.

Quanto aos resultados do experimento da DL₅₀, estes indicam que um valor superior a 10⁹ células bacterianas teria que ser inoculado para promover a morte de 50% dos camundongos, provavelmente na faixa entre 10¹⁰ ou 10¹¹. A determinação do título de anticorpos pelo método ELISA irá determinar quão eficaz foi a resposta de camundongos BALB/c à infecção e uma análise quantitativa destes resultados é de extrema importância para dar seguimento ao projeto de desenvolvimento de linhagens vacinais de *S. enterica*. Contudo, os dados preliminares indicam que as linhagens são imunogênicas

RESULTADOS

Tabela 1. Resultados do experimento para determinação de DL₅₀ para a linhagem $\Delta himA$

$\Delta himA$		
Inóculo	N (amostragem)	Mortos (até 30 dias)
5,6 x 10 ⁹ /camundongo	4	1
5,6 x 10 ⁸ /camundongo	3	0
5,6 x 10 ⁷ /camundongo	3	0
5,6 x 10 ⁶ /camundongo	3	0
DL50 acima de 5,6 x 10 ⁹		

Tabela 2. Resultados do experimento para determinação de DL₅₀ para a linhagem $\Delta himD$

$\Delta himD$		
Inóculo	N (amostragem)	Mortos (até 30 dias)
7,2 x 10 ⁹ /camundongo	3	0
7,2 x 10 ⁸ /camundongo	3	0
7,2 x 10 ⁷ /camundongo	3	0
7,2 x 10 ⁶ /camundongo	3	0
DL50 acima de 7,2 x 10 ⁹		

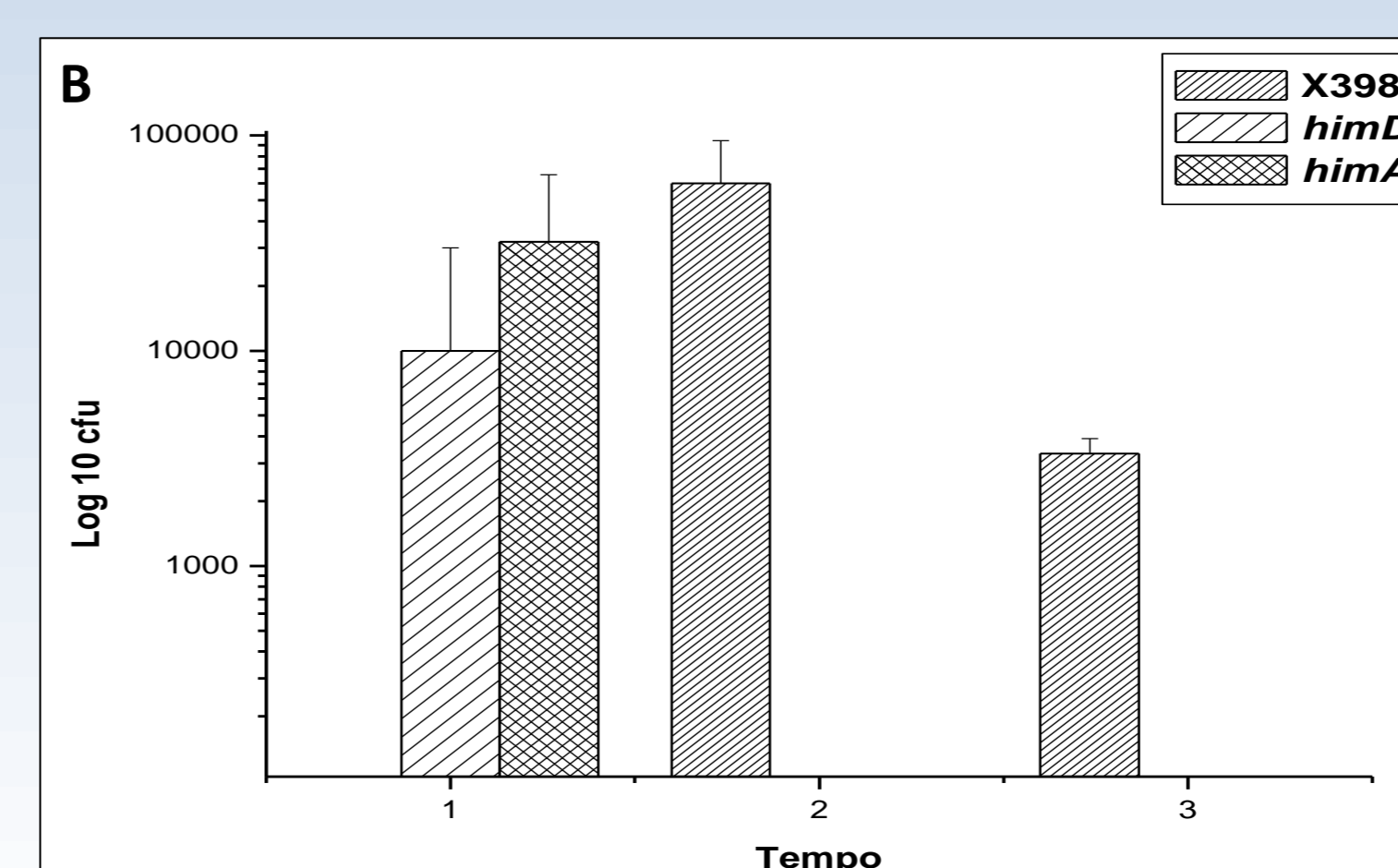
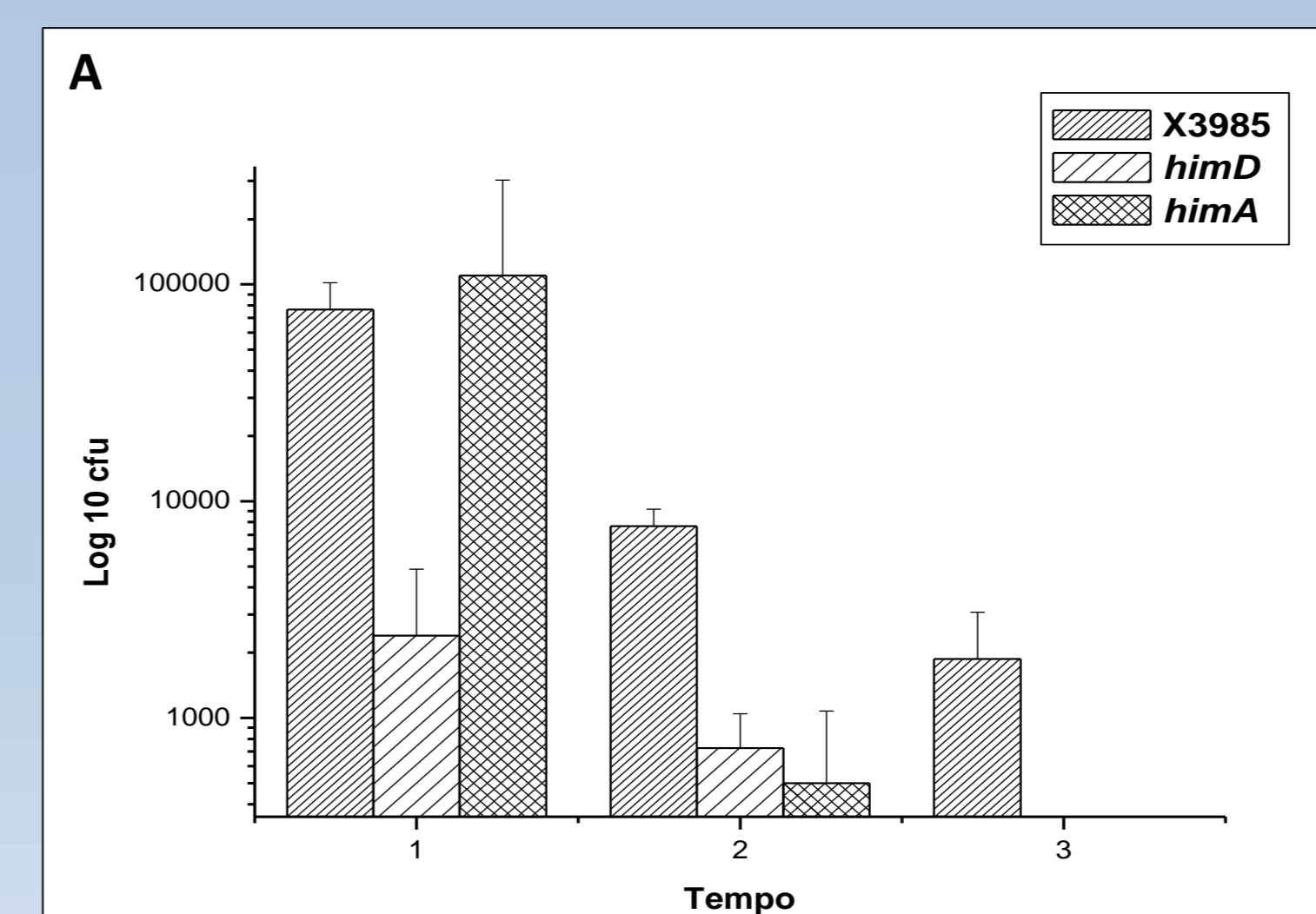


Figura 1. Persistência de *S. enterica* Typhimurium χ 3985, 662ST $\Delta himA$ e 662ST $\Delta himD$ nas placas de Peyer (A) e no baço (B) de camundongos BALB/c/AnUnib. Grupos de três camundongos foram inoculados com aproximadamente 10⁹ cfu das linhagens atenuadas e a infecção acompanhada 3 (tempo 1), 10 (tempo 2) e 30 (tempo 3) dias após o inóculo.

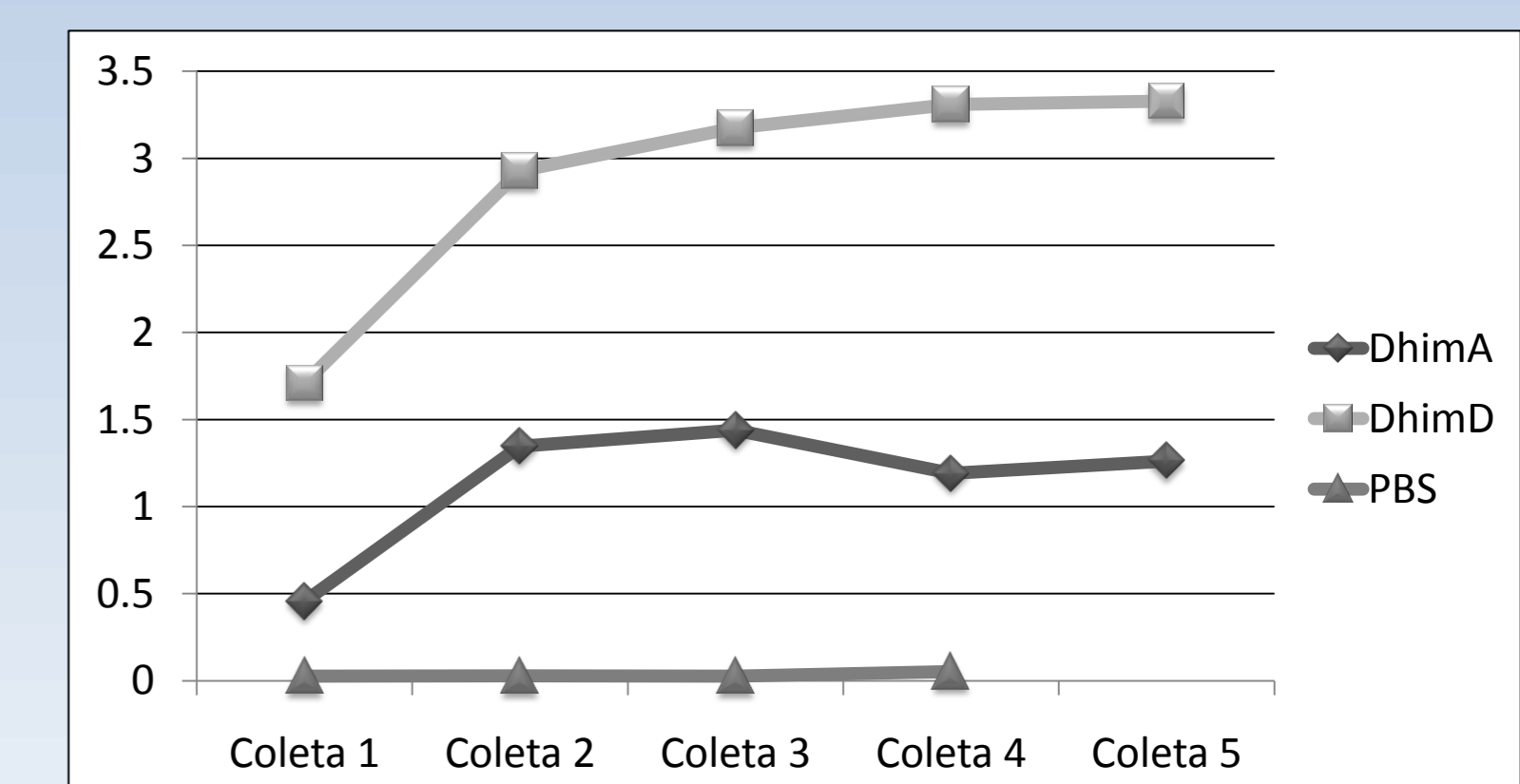


Figura 2. Cinética da resposta imune dos três camundongos selecionados: um inoculado com a linhagem mutada em $\Delta himA$, outro com a linhagem mutada em $\Delta himD$ e o último tratado com PBS.

Agradecimentos: À equipe do Laboratório de Imunologia Aplicada da UNICAMP, em especial à Patrícia Abrahão e ao José Raimundo, pelos ensinamentos na segunda etapa do projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Mastroeni P, Maskell D. 2006. *Salmonella* infections: Clinical, immunological and molecular aspects. 1^o ed, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Guzman CA, Borsutzky S, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Pearman J, Collioud A, Favre D, Dietrich G. 2006. Vaccines against typhoid fever. *Vaccine*. 24: 3804-11.