UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUÇÃO EM CIÊNCIAS

ÁREA: BIOQUÍMICA

Expressão de Antígenos de *Bordetella pertussis* em BCG Recombinante: Subunidade 1 da Toxina Pertussis e Fragmento A da Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

IVAN PEREIRA NASCIMENTO

SÃO PAULO

2002

Ficha catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e

Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Nascimento, Ivan Pereira

Expressão de Antígenos de *Bordetella pertussis* em BCG Recombinante: Subunidade 1 da Toxina Pertussis e Fragmento A da Hemaglutinina Filamentosa (FHA) / Ivan Pereira Nascimento. – São Paulo, 2002.

95p.

Tese (doutorado), Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Departamento de Bioquímica.

Área de concentração:Biotecnologia.

Linha de pesquisa:Vacinas.

Orientadora: Leite, Luciana Cezar de Cerqueira.

1. BCG 2. BCG recombinante 3. Pertussis 4. Toxina Pertussis 5. Hemaglutinina Filamentosa. Leite, Luciana Cezar de Cerqueira, orientador.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUÇÃO EM CIÊNCIAS
ÁREA: BIOQUÍMICA

Expressão de Antígenos de *Bordetella pertussis* em BCG Recombinante: Subunidade 1 da Toxina Pertussis e Fragmento A da Hemaglutinina Filamentosa (FHA)

IVAN PEREIRA NASCIMENTO

Tese apresentada como um dos requisitos

para obtenção do grau de Doutor em Ciências

ORIENTADORA: LUCIANA CEZAR DE CERQUEIRA LEITE

SÃO PAULO

2002

Este trabalho foi realizado no laboratório BCG recombinante do Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan e contou com o apoio do CNPq e da FAPESP

DEDICATÓRIA

A *mainha Josefa*, que me deu não apenas à luz, mas também a luz que ilumina o meu caminho. "Que a tua luz possa de alguma maneira iluminar a mente daqueles que acreditam apenas na escuridão da ciência".

À minha esposa *Carla Juliana Perrucci*.

A *painho Pedro* e aos meus irmãos *Tan*, *Véio*, *Lóren*, *Lon* e *Bi*.

Obrigado por vocês serem asssim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial

À Luciana Cezar de Cerqueira Leite pela orientação, incentivo e amizade e a Waldelly O. Dias pelo apoio profissional, moral, pessoal e pela amizade.

Aos familiares pelo carinho e confiança.

Aos amigos presentes e distantes pelo apoio moral e pessoal.

Aos colegas de laboratório pelo profissionalismo e agradável ambiente de trabalho.

Aos técnicos do laboratório pelo trabalho e amizade.

Enfim, a todos que de alguma forma direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

ÍNDICE

RESUMO.....i

ABSTRACT.....ii

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES.....iii

1.INTRODUÇÃO.....1

1.1 Micobactérias.....1

1.1.2 Bacilo de Calmette-Guérin.....3

1.1.3 Manipulação genética do BCG.....5

1.1.4 Vetores e Promotores para Expressão de Antígenos Heterólogos em BCG.....7

1.1.5 Marcadores de Seleção para Expressão em Micobactérias.....9

1.1.5.1 Utilização de BCG Auxotrófico:complementação com vetores de expressão.....10

1.1.6 Expressão de Antígenos Heterólogos em BCG.....11

1.2 *Bordetella pertussis*.....12

1.2.1 Morfologia e identificação.....12

1.2.2 Patogenia e patologia.....12

1.2.3 Aspectos clínicos.....12

1.2.4 Diagnóstico de laboratório.....13

1.2.5 Epidemiologia, controle e prevenção.....14

1.2.6 Imunidade.....14

1.2.6.1 Função de anticorpos na proteção.....16

1.2.6.2 Imunidade mediada por célula.....17

1.2.7. Tratamento.....17

1.2.8 Profilaxia.....17

1.3. Vacinas contra *B. pertussis*.....18

1.3.1 Histórico.....18

1.3.2 Vacina Celular (VC) versus Vacina Acelular (VAC).....21

1.3.3 Os Antígenos PT e FHA.....23

2. OBJETIVOS.....26

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....27

3.1 Bactérias e condições de cultura.....27

3.2 Plasmídeos.....28

3.3 Clonagem de S1PT, CRD-FHA e S1CRD nos vetores de expressão micobacteriano...31

3.4 Expressão de S1PT e CRD-FHA em BCG recombinante.....35

3.5 Localização de S1PT expressa em rBCG.....36

3.6 Animais e imunização.....37

3.7 Análise da produção de anticorpos contra PT ou FHA.....37

3.8 Obtenção de esplenócitos para o ensaio de linfocinas.....38

3.9 Ensaio de linfocinas.....39

3.10 Ensaio de proliferação.....40

3.11 Teste de estabilidade do plasmídeo em BCG in *vivo*.....40

3.12 Desafio Intracerebral contra *Bortella pertussis*.....41

4. RESULTADOS.....41

4.1 Construção dos vetores de expressão de S1PT em BCG.....41

4.2 Expressão de S1PT em BCG recombinante.....42

4.3 Localização de S1PT em BCG recombinante.....43

4.4 Estabilidade de rBCG-S1PT in *vivo*.....46

4.5 Resposta humoral de camundongos imunizados com rBCG-S1PT.....46

4.6 Resposta celular induzida pela imunização com rBCG-pNL71S1.....48

4.7 Resposta proliferativa de esplenócitos após imunização com rBCG-pNL71S1.....49

4.8 Proteção contra um desafio intracerebral com *B. pertussis*.....50

4.9 Construção de vetores de expressão de CRD e S1CRD.....52

4.10 Expressão de CRD ou S1CRD em rBCG.....53

4.11 Resposta humoral de camundongos imunizados com rBCG-CRD ou rBCG-S1CRD.54

4.12 Resposta Celular Específica Induzida por rBCG-CRD e rBCG-S1CRD.....56

4.13 Dosagem de IFN-γ no soro dos animais imunizados com rBCG expressando os antígenos de *B.pertussis*.....58

4.14 Proteção induzida pela vacina rBCG-pNL71CRD.....59

4.15 Curva de crescimento das preparações vacinais.....60

4.16 Clonagem dos antígenos de *B. pertussis* nos vetores de complementação.....63

4.17 Expressão dos antígenos de *B. pertussis* em rBCG auxotrófico.....66

5. DISCUSSÃO.....69

5.1 Expressão de S1PT em rBCG.....69

5.2 Expressão de CRD e S1CRD em rBCG.....73

5.3 Avaliação da velocidade de crescimento das preparações vacinais.....76

5.4 Expressão dos antígenos de *B. pertussis* em cepa de BCG auxotrófico.....77

6. CONCLUSÃO.....79

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....80

RESUMO

O desenvolvimento de vacinas multivalente constitui uma das prioridades na pesquisa de vacinas modernas. A utilização de vetores vivos para apresentação de antígenos heterólogos mostra-se bastante atraente, e eliminaria a necessidade de várias doses para se alcançar uma proteção máxima. Este tipo de vacina poderia ser administrado em dose única, o que poderia aumentar a cobertura vacinal. Neste trabalho foi explorado o potencial do *Mycobacterium bovis* BCG recombinante (rBCG) vivo expressando antígenos de *Bordetella pertussis*, como futuro componente de uma vacina tetravalente rBCG-DTP contra a tuberculose, tétano, difteria e pertussis. Os antígenos de pertussis utilizados foram a subunidade S1 mutada e atóxica da Toxina Pertussis (S1-PT) e o fragmento CRD, um domínio imunogênico da proteína FHA (Adesina Hemaglutinina Filamentosa). PT é o principal fator de virulência de *B. pertussis* e tanto sozinho como combinado com outros antígenos é o principal componente de todas as vacinas acelulares desenvolvidas até o momento. FHA é um importante fator de aderência da bactéria às células ciliada alvo do hospedeiro, sendo o CRD (domínio de reconhecimento a carboidrato) o responsável pelo reconhecimento de carboidratos em receptores de células do hospedeiro. Os genes detses antígenos foram clonados em vetores de expressão micobacterianos e expressos em BCG sob o controle do promotor mutado da β-lactamase de *Mycobacterium fortuitum*, pBlaF*, em fusão com o peptídeo sinal da β-lactamase. Estes vetores possuem como marcador de seleção um gene de resistência a kanamicina. Camundongos foram imunizados com rBCG expressando S1-PT e os respectivos esplenócitos mostraram elevada produção de IFN-γ e baixa produção de IL-4, caracterizando uma forte resposta celular Th1 antígeno-específica dominante. rBCG-S1PT induziu uma baixa resposta humoral contra PT. Camundongos imunizados com rBCG-S1PT mostraram elevado nível de proteção contra um desafio

intracerebral com uma cepa virulenta de *B. pertussis*. Animais imunizados com rBCG expressando CRD revelaram a presença de anticorpos anti-FHA no soro. Ensaios com camundongos imunizados com a combinação destas duas vacinas estão sendo realizados.

Uma nova abordagem para obtenção de rBCG sem o uso de genes de resistência a antibióticos como marcador de seleção, foi investigada, utilizando a complementação em BCG auxotrófico. Uma cepa de rBCG auxotrófico para lisina foi transformada com vetores de expressão contendo o gene de complementação para lisina e os antígenos de pertussis sob controle do mesmo promotor: a seleção dos recombinantes é realizada em meio sem lisina. Estas construções permitiram a expressão estável dos antígenos e serão avaliadas quanto a indução de uma resposta imunológica efetiva contra pertussis.

ABSTRACT

The development of combined vaccines constitutes one of the priorities in modern vaccine research. The use of live vectors for heterologous antigen presentation is desirable, as it could eliminate the necessity of several doses to reach a maximum protection and increase vaccine coverage. In this work, the potential of recombinant *Mycobacterium bovis* BCG (Bacillus Calmette and Guerin) (rBCG), expressing *Bordetella pertussis* antigens was investigated. The antigens used were the genetically detoxified S1 subunit of pertussis toxin (S1-PT) and the CRD fragment of FHA (Filamentous hemagglutinin. The antigen genes were cloned into mycobacterial expression vectors under control of the upregulated *M. fortuitum* β-lactamase promoter, pBlaF *, in fusion with the β- lactamase signal sequence. Mice were immunized with rBCG expressing S1-PT and the respective splenocytes induced specific production of INF-γ and low IL-4, characterizing a strong antigen-specific Th1-dominant cellular response. The rBCG-S1PT induced a low humoral response against PT. Mice immunized with rBCG-S1PT strains displayed high-level of protection against an intracerebral challenge with live *B. pertussis*. Animals immunized with rBCG expressing CRD induced anti-FHA antibodies production. Protection induced by the combination of these two strains is being evaluated. A new approach for production of rBCG without the use of antibiotic resistance markers was also investigated, using complementation in auxotrophic BCG. A lysine auxotrophic rBCG strain was transformed with expression vectors containing the complementation gene for lysine and the pertussis antigens: selection of recombinant clones was carried in media without lysine. These constructs allowed steady expression of the antigens and will be evaluated for the induction of an immunological response against pertussis. These strains would be appropriate for clinical evaluation in humans.

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

7H10	Meio sólido Middlebrook
7H9	Meio líquido Middlebrook
ADC	Albumina-dextrose-catalase
AVC	Vacina Acelular
BCG	Bacilo de Calmete-Guérin
BCG-1604	cepa de BCG Pasteur auxotrófica para Lisina
CRD	Domínio de Reconhecimento a Carboidrato
DTP	Vacina tríplice
dPT	PT detoxificada
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
FHA	Hemaglutinina Filamentosa
IC	Intracerebral
IL-4	Interleucina 4
INF-γ	Interferon gama
kDa	Quilodalton
lysA	Gene de complementação da lisina
OADC	Oléico-albumina-dextrose-catalase
pb	Pares de base
pBlaF*	Promotor mutado da β-lactamase de *M. fortutitum*
PCR	*Polimerase chain reaction*
PT	Toxina Pertussis
rBCG	BCG recombinante
S1PT	Subunidade 1 mutada e átoxica da Toxina Pertussiss
Smg-270	cepa de *M. smegmatis* auxotrófica para lisina

Th1	T helper 1
Th2	T helper 2
UFC	Unidade formadora de colônias
VC	Vacina Celular

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A vacinação é um dos meios mais efetivos e simples de se obter o controle de doenças infecciosas. Com os custos crescentes nos serviços de terapia e saúde pública o aumento da vacinação, quando disponível, pode representar a melhor opção em termo de custo-benefício no controle dessas doenças. O sucesso espetacular de vacinas contra doenças tais como varíola, poliomielite, tétano e difteria mostram a importância deste método de profilaxia (WOODROW, 1997; LEVINE, 1997). Embora dois milhões de crianças sejam salvas a cada ano por imunização, tem sido difícil estender esta proteção a mais crianças nos países em desenvolvimento com a tecnologia existente (BLOOM, 1991). Problemas significativos inerentes às vacinas existentes incluem, a necessidade de diversas campanhas de vacinação, efetividade reduzida, a necessidade de injeção, instabilidade ao calor e custo (BLOOM, 1991). Uma estratégia que resolveria algumas destas limitações é o desenvolvimento de vacinas recombinantes multivalentes. Em especial, procuram-se veículos vivos de apresentação de antígenos, uma vez que a expressão contínua desses imunógenos poderia eliminar a necessidade de várias doses para se alcançar uma proteção máxima (ADA, 1997). Veículos que têm sido particularmente investigados são: Vaccinia, Salmonella atenuada, ou BCG (Bacilo Calmette-Guerin, vacina contra tuberculose), com resultados promissores (WOODROW,1997).

1.1 Micobactérias

As micobactérias compõem o gênero *Mycobacterium* da família das *Mycobacteriacae* da ordem dos *Actinomycetales* da classe dos *Actinomycetes*. As micobactérias que compõe esse gênero possuem a forma de bastonetes ligeiramente curvos, de 1 a 10 μm de comprimento e 0,2 a 0,6 μm de diâmetro. Estas não podem ser

classificadas como Gram-positivas, nem como Gram-negativas. A característica mais marcante desse bacilo é a natureza complexa de seu envelope celular, contendo uma percentagem relativamente alta de lipídios, os quais incluem as longas cadeias de ácido micólico. Esse envelope lhe confere uma forte hidrofobicidade, tornando-o resistente à lise e relativamente impermeável a antibióticos e outros agentes químicos. Os bacilos são ditos ácido-álcool resistentes, ou seja, são resistentes às descolorações por ácidos fracos após coloração com Fucsina ou corantes similares. O DNA genômico contém um alto conteúdo de guanosina/citosina, entre 58-79%, o que prejudica o uso da bactéria *Escherichia coli* como um hospedeiro genético. Estes aspectos são considerados características básicas para a identificação do bacilo como membro do gênero *Mycobacterium* (ORME, 1995; JAWETZ, *et al*, 1998; SHINNICK, & GOOD, 1994; JAWETZ, *et al*, 1998).

As micobactérias pertencem naturalmente a dois principais grupos: bactérias de crescimento lento, que possuem um tempo de geração em torno de 13 horas e portanto, necessitam de 3 semanas a 3 meses de cultura para fornecer colônias visíveis; e as bactérias de crescimento rápido, que possuem um tempo de geração em torno de 2-5 horas. As de crescimento lento incluem muitos dos maiores patógenos animais e humanos, como *M. tuberculosis, M. bovis, M. paratuberculosis, M. avium, M. leprae, etc*, enquanto as de crescimento rápido incluem espécies não patogênicas, tais como *M. smegmatis, M. aurum, M. vaccae*, etc. Quatro das espécies patogênicas de micobactérias são agrupadas no complexo *M. tuberculosis* - um grupo de quatro espécies que pode causar a doença tuberculose (*M. tuberculosis, M. bovis, M. microft* e *M. africanum*); a quinta é a *M. leprae*, o agente causador da doença de Hansen (informalmente conhecida como lepra). (SHINNICK & GOOD, 1994; ORME, 1995; CONNEL, 2001). A tuberculose (TB) é uma das causas de morte por doenças infecciosas mais prevalentes em todo o mundo. Estima-se

que 1/3 da população mundial esteja infectada e poderá desenvolver a doença em situações de baixa resistência imunológica (KOCHI, 1991). O aumento da infecção por HIV tem levado a um aumento da incidência de tuberculose e o mal uso de antibióticos tem favorecido o surgimento de cepas multidroga-resistentes (KOCHI, 1991). A única vacina atualmente disponível contra TB é o BCG (Bacilo de Calmette-Guérin).

1.1.2 Bacilo de Calmette-Guérin

Albert Calmette e Camille Guèrin, trabalhando no Instituto Pasteur de Lille, começaram, em 1908, a atenuar uma cepa virulenta de *M. bovis*, por passagens sucessivas in vitro (BLOOM, *et al*, 1994). Após 39 passagens em meio contendo bile bovina, ocorreu uma visível modificação morfológica. Esta cepa foi então mantida por 13 anos, com 215 passagens, em que foi testada em diversas espécies de animais experimentais para demonstrar que, não só esta não revertia para a virulência, mas também conferia resistência a um desafio subseqüente com *M. bovis* virulento ou *M. tuberculosis*. Esta cepa atenuada, hoje conhecida como o Bacilo de Calmette-Guerin, ou BCG, foi utilizada oralmente pela primeira vez em 1921 e sua aplicação generalizada na vacinação contra tuberculose foi recomendada pela Liga das Nações em 1927.

No entanto, a eficiência desta vacina varia entre 0 e 80 % em diferentes populações, com uma eficiência consistentemente baixa em regiões tropicais do mundo, onde a vacina é mais necessária (FINE, 1995; BRANDT, 2002). As razões para a ineficácia do BCG em algumas populações têm sido o escopo de muitos debates desde a década de 50, e muitas diferentes hipóteses têm sido sugeridas para explicar as variações observadas. Algumas hipóteses seriam diferenças na linhagem do BCG, genótipo e resposta imunológica induzida (LAGRANDERIE, 1996), na idade da vacinação (TRIPATHY, 1983) ou diferenças metodológicas de produção. Estes seriam importantes fatores na variação obtida

para a eficácia desta vacina (CLEMENS, 1983). Porém, a hipótese mais amplamente aceita relaciona a eficácia do BCG a sua localização geográfica, com níveis de proteção contra TB pulmonar variando de não detectáveis a baixo, observados em regiões tropicais tais como África e Índia, onde a exposição a micobactérias não tuberculósicas é comum (FINE, 1989).

Diversos grupos no mundo todo investem no desenvolvimento de vacinas alternativas através de uma variedade de estratégias, desde atenuação de *M . tuberculosis* (BARDAROV, *et al*, 1997; PELICIC, *et al*, 1997), expressão de antígenos micobacterianos em diversos vetores de apresentação (HONE, *et al*, 1991), proteínas purificadas com diversos adjuvantes (BALDWIN, *et al*, 1998) e vacina de DNA (TASCON, *et al*, 1996; LOWRIE, *et al*, 1999). O aprimoramento do BCG por expressão de antígenos micobacterianos também tem sido investigado (HORWITZ, *et al*, 2000).

Apesar da variabilidade observada na proteção induzida por BCG, e do grande volume de trabalho investigando alternativas, o BCG ainda é a única alternativa para a imunização contra tuberculose.

Hoje o BCG é a vacina mais utilizada no mundo, tendo sido administrado a mais de 2,5 bilhões de indivíduos, com uma freqüência baixíssima de efeitos adversos sérios. Isto torna o BCG um bom candidato a veículo para apresentação de antígenos heterólogos, pois abreviaria significativamente uma possível validação de uma vacina recombinante baseada em BCG. Uma vacina multivalente utilizando BCG como veículo vivo apresentaria ainda vários outros fatores vantajosos (BARLETTA, *et al*,1990; GICQUEL, 1995) como: i) o BCG é a única vacina recomendada pela WHO (Organização Mundial da Saúde) para ser administrada ao nascimento; ii) requer apenas uma imunização para conferir imunidade celular duradoura, pois o BCG pode permanecer no organismo por anos (dependendo do

indivíduo) - a apresentação contínua dos antígenos eliminaria a necessidade de programas de vacinação seqüenciais, que é o caso de diversas vacinas em uso atualmente; iii) envolve uma produção de baixo custo, sendo vendida no Brasil a apenas 8 centavos de dólar; iv) o BCG é o mais efetivo adjuvante conhecido para indução de imunidade celular em animais e humanos; e v) estudos recentes têm re-analisado a possibilidade de uma vacinação oral com BCG, demonstrando a indução de respostas humoral e celular, inclusive em tecidos mucosos (BARLETTA, *et al*, 1990; LAGRANDERIE, *et al*, 1993). A administração oral elimina o risco associado à utilização de seringas e reduziria o custo das campanhas de vacinação (as seringas às vezes são mais caras que a vacina). Todas estas vantagens tornam a cepa viva atenuada de BCG um excelente candidato a veículo multivacinal para a indução de imunidade humoral e celular contra diversos patógenos (CIRILLO, *et al*, 1995; GICQUEL, 1995; STOVER, *et al*, 1992).

1.1.3 Manipulação genética do BCG

Durante muito tempo tinha-se pouca informação sobre a genética molecular de micobactérias devido à alta impermeabilidade da parede celular e conseqüente dificuldade de introdução de DNA heterólogo. Já foram utilizados fagos vetores chamados de "shuttle phasmids", os quais foram construídos por inserção de uma porção de um vetor de clonagem de um cosmídio de *E. coli* no genoma de um fago de micobactéria (JACOBS, *et al*, 1987) ou "shuttle plasmid" que integrava no genoma como uma cópia única expressando um gene de resistência a antibiótico externo. Estes vetores ponte podem ser manipulados em *E. coli* e expressos em micobactéria (SNAPPER, *et al*, 1988) (OHARA & YAMADA, 2001).

Sistemas de expressão baseados em plasmídeos aumentam a capacidade de clonagem, o número de cópias no hospedeiro micobacteriano e facilitam a manipulação.

Foram construídos "shuttle plasmids" híbridos a partir de um plasmídeo da micobactéria *M. fortuitum*, o pLA5000, em conjunção com o vetor de clonagem pBR322 de *E.coli* (LABIDI, *et al*, 1985) (OHARA & YAMADA, 2001). Estes são capazes de replicação extra-cromossomal em *E.coli* e em micobactérias de crescimento lento. Assim, foram produzidos os vetores pMV261 (STOVER, *et al*, 1991) e pRR3 (WINTER, *et al*, 1991), os quais têm sido bastante utilizados para expressão de antígenos heterólogos em BCG. Alguns plasmídeos com larga especificidade por hospedeiro também já foram demonstrados serem capazes de se replicar em micobactérias e estão sendo utilizados como vetores para inserção de genes heterólogos (BURLEIN, *et al*, 1994) (OHARA & YAMADA, 2001).

A transformação de micobactéria é mais difícil do que em outras bactérias. Já foram utilizados protoplastos com DNA de fago (10^3-10^4 PFU/μg), eletroporação (10^6 transformantes/μg) ou fago de micobactéria recombinante. Atualmente a eletroporação é o método mais utilizado. A utilização de plasmídeos ponte contendo origem de replicação de micobactéria e *E. coli* levou à formação de até 5 cópias do plasmídeo por bactéria com alta estabilidade; porém diferentes construções têm tido menor estabilidade. A utilização de seqüências específicas de micobactérias pode levar à integração de cópias únicas, com menor nível de expressão mas com maior estabilidade (BURLEIN, *et al*, 1994). Os grupos de Jacobs e Hatfull construíram um eficiente plasmídeo de integração baseado no micobacteriófago L5 (LEE, *et al*, 1991). Este plasmídeo transformou diversas micobactérias, incluindo *M. tuberculosis* e BCG, através da integração estável e sítio específica deste plasmídeo no genoma bacteriano.

1.1.4 Vetores e Promotores para Expressão de Antígenos Heterólogos em BCG

Após o estabelecimento da técnica de obtenção de transformantes de micobactérias, inclusive BCG, em 1990 foi produzido um BCG recombinante (rBCG) com expressão de um epitopo de 8 aminoácidos de gag, p17 de HIV-1, como um produto de fusão com o antígeno α de micobactéria (MATSUO, *et al*, 1990). Em seguida, em 1991 vários laboratórios conseguiram a expressão de antígenos inteiros de HIV-1, como: gag, rt, polA, gp120, gp41. Foram utilizados vetores ponte onde a expressão dos antígenos era dirigida pelos promotores das proteínas de choque térmico de BCG, Hsp60 (pMV261, replicativo ou pMV361, integrativo) (STOVER, *et al*, 1991); ou Hsp70 (pYUB12) (ALDOVINI, *et al*, 1991; STOVER, *et al*, 1991); ou a proteína Nef sob o controle do promotor de uma proteína de choque térmico de *Streptomyces*, groES/groEL (pRR3) (WINTER, *et al*, 1991). O nível de expressão dos antígenos é importante para a resposta imunológica alcançada e em grande parte são os promotores que regem esta expressão. Outros promotores que têm sido utilizados para a expressão de proteínas heterólogas, são: P_{AN}, um promotor isolado de *M. paratuberculosis* encontrado próximo a um elemento de inserção IS9000 (MURRAY, *et al*, 1992), que foi utilizado para expressar a proteína Nef de SIV (Simian Immunodeficiency Vírus) (WINTER, *et al*, 1995); o promotor da proteína de 19 KDa de *M. leprae* (citoplasmática) ou de *M. turbeculosis* (exportada), que foi utilizado para expressar o antígeno OspA de *B. burgdorfei* (LANGERMANN, *et al*, 1994a). Dellagostin e colaboradores expressaram os genes SIV, Gag e p27 em fusão com o gene codificador da proteína 18 kDa sob o controle do seu próprio promotor (DELLAGOSTIN, *et al*, 1993). A proteína CSP (circumesporóito) de *P. falciparum* foi expressa sob o controle do promotor 64 kDa-antígeno (HAESSELER, *et al*, 1993). Matsumoto e colaboradores introduziram o

gene codificador do epitopo de célula B da seqüência oligopeptídica repetida, QGPGAP, no CSP do parasita *P. yoelli*, sob o controle do promotor α-antígeno (MATSUMOTO, *et al*, 1996). O promotor da β-lactamase de *M. fortuitum*, pBlaF* (FATTORINI, *et al*, 1989), demonstrou ser extremamente forte, e quando a sua seqüência sinal foi incluída, levou á exportação da β-galactosidade (TIMM, *et al*, 1994). No entanto, a falta de informação sobre os sinais de transcrição de micobactérias tem dificultado o desenvolvimento de sistemas de expressão versáteis que permitiriam a modulação da expressão gênica em micobactérias. Há relativamente poucos estudos detalhados sobre promotores micobacteriano. Um estudo feito por BASHYAM & TYAGI (1998) descreveu uma extensão promotora abrangendo a região -10 na qual a transcrição de promotores micobacterianos era aumentada pelo domínio TGN posicionado nesta região promotora. A seqüência TGN foi encontrada em aproximadamente 20 % dos promotores estudados. Os mesmos pesquisadores encontraram que seqüências de promotores micobacterianos eram muito diferentes da seqüência consenso do fator sigma-70 de *E. coli*, sendo estes promotores muito pouco funcionais em *E. coli* (BASHYAM & TYAGI, 1998). O promotor P2hsp60 (hsp60) de *M. bovis*, o qual possui o motivo TGN na região -10, tem sido relativamente bem estudado e é considerado um promotor micobacteriano forte (TIMM, 1994). Barker *et al* (1999), caracterizaram um forte promotor de *M. murinum*, denominado G13, que é semelhante ao promotor reconhecido pelo fator sigma-70 encontrado em *E. coli* e em algumas espécies de micobactérias. Recentemente um grupo de pesquisadores relatou o isolamento de nove promotores potenciais de *M. tuberculosis*, sendo estes comparáveis ou mais potentes que o promotor pBlaF* de *M. fortuitum*. Este grupo utilizou uma biblioteca randômica de fragmentos de *M. tuberculosis* construída num vetor contendo uma

cópia do gene da proteína GFP de *Aequoria Victoria* (sem a região promotora). Após transformação de BCG com esta biblioteca, as bactérias recombinantes que mostravam forte fluorescência foram separadas pela técnica de FACS e a região caracterizada (TRICCAS, 2001).

1.1.5 Marcadores de Seleção para Expressão em Micobactéria

Um vetor para expressão em bactéria deve necessariamente conter alguns componentes como: uma origem de replicação da bactéria a ser expressa e um marcador de seleção, que é algum gene que possibilite a seleção de transformantes e coloque uma pressão de sobrevivência para que a bactéria mantenha o plasmídeo. Os marcadores de seleção mais utilizados são genes de resistência a antibióticos. A utilização de marcadores de seleção por resistência a antibióticos em micobateria é limitada a poucas drogas, devido à impermeabilidade da membrana glicolipídica. Marcadores de resistência a kanamicina, genes para aminoglicosídio fosfotransferase, têm sido os marcadores de seleção mais utilizados em micobatérias para sistemas derivados de fago ou plasmídeo. Resistência a cloramfenicol, higromicina e sulfonamidas também tem sido utilizada, com algumas desvantagens. No entanto, uma vez que vacinas baseadas em BCG recombinante são vacinas vivas, que podem permanecer no organismo por longos períodos, não seria aceitável a administração em humanos de uma bactéria carregando um gene de resistência a antibiótico, pela possibilidade de disseminação da resistência para outras micobactérias, incluindo importantes patógenos, tais como *M. tuberculosis* e *M. leprae*, desta forma aumentando o risco do surgimento de cepas resistentes. Portanto, busca-se a seleção sem o uso de antibióticos. Uma abordagem é a introdução de genes de resistência à lise por bacteriófagos, como a proteína tipo repressora, codificada pelo gene 71 de micobacteriófago L5 (BURLEIN, *et al*, 1994). Outra abordagem proposta é a utilização de

genes de resistência a metais pesados como mercúrio. Os genes de resistência a mercúrio de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Serratia marcescens* foram utilizados como marcadores de seleção em vetores ponte *E. coli*/micobactéria para transfecção estável em *M. smegmatis*, *M. bovis*, BCG e *M. tuberculosis* (BAULARD, *et al*, 1995). Antígenos de *Schistosoma* e *Toxoplasma gondii* foram expressos em BCG recombinante utilizando estes marcadores. No entanto, a utilização de mercúrio no processo de seleção e manutenção do plasmídeo na bactéria durante sua produção, poderia levar a uma concentração do metal pesado que não seria adequada para administração em humanos. Além disto, **in vivo** não existiria pressão seletiva para que o BCG mantivesse o plasmídeo.

1.1.5.1 Utilização de BCG Auxotrófico: complementação com vetores de expressão

Outra proposta para a seleção de recombinantes sem o uso de marcadores de resistência a antibióticos é a utilização de mutantes auxotróficos de BCG, que requerem para o seu crescimento, suplementação com aminoácidos essenciais não sintetizados em mamíferos. Mutantes deficientes na biossíntese de metionina, leucina ou isoleucina-leucina-valina foram criados por mutagenesis randômica com transposon Tn5367 ou por recombinação ilegítima (GULERIA, *et al*, 1996; BALASUBRAMANIAN, *et al*, 1996). Além disto, mutantes auxotróficos de diversas espécies de micobactérias têm sido amplamente obtidos através do método de mutagênese por recombinação homóloga (PAVELKA, 1999; HONDALUS, 2000; GORDHAN, 2002). Estas cepas de BCG auxotróficos não sobrevivem na ausência dos respectivos aminoácidos, mas em camundongos imunizados continuam a conferir proteção comparável à do BCG contra um desafio com *M. tuberculosis*, pelo menos a curto prazo. A transformação destes mutantes auxotróficos com um vetor de expressão contendo o gene (mutado íntegro), permitiria a seleção de transformantes que crescem em meio mínimo deficiente do respectivo

aminoácido. Este vetor de expressão conteria, além do cassete de expressão do gene mutado, que restaura a capacidade do BCG de crescer em meio mínimo, um cassete com o promotor e o gene heterólogo a ser expresso.

1.1.6 Expressão de Antígenos Heterólogos em BCG: indução de resposta imunológica

Diferentes construções de rBCG expressando proteínas heterólogas de vírus, bactérias ou parasitas têm demonstrado indução de uma resposta imunológica contra os respectivos patógenos e, em alguns casos, proteção. Os estudos com a expressão de antígenos de HIV ou SIV demonstraram que BCG recombinante provocava os 3 tipos de resposta imunológica necessários para proteção contra vários patógenos: i) produção de anticorpos IgG por células B, ii) proliferação de linfócitos T e produção de linfocinas inclusive interferon gama e iii) produção de linfócitos T- citotóxicos com restrição por classe I do complexo principal de histocompatibilidade.

A expressão da proteína OspA de *B. burgdorfei* na superfície do BCG produziu uma vacina que induziu imunidade humoral e levou à proteção contra um desafio subseqüente (LANGERMANN, *et al*, 1994a). O antígeno gp63 de *Leishmania major* expresso em BCG sob controle de dois promotores diferentes induziu resposta imunológica celular e proteção em camundongos (ABDELHAK, *et al*, 1995; CONNELL, *et al*, 1993). BCG expressando o Fragmento C, não tóxico, da toxina tetânica, induziu uma resposta humoral em camundongos e conferiu proteção parcial contra um desafio com 100 LD_{50} de toxina tetânica (CASSATT, *et al*, 1993) e outra construção desenvolvida em nossos laboratórios induziu a formação de anticorpos neutralizantes (trabalho submetido). Antígeno de *S. pneumoniae* expresso em BCG induziu proteção contra desafio com o patógeno (LANGERMANN, *et al*, 1994b) e antígeno de *P. falciparum* (HAESELEER, *et al*, 1993), também já foi expresso em BCG.

1.2. *Bordetella pertussis*

1.2.1 Morfologia e identificação

Bordetella pertussis foi isolada primeiramente a partir de cultura pura em 1906 por Bordet e por Gengou (1906). Hoje, *B. pertussis* pertence ao gênero *Bordetella* da família das Alcaligenaceae, que contem diversas espécies de bactérias relacionadas e com morfologia similar: *B. pertussis* e *B. parapertussis*, causam a coqueluche (tosse comprida) nos seres humanos. Outro membro do gênero é *B. bronchiseptica*, que causa doença respiratória em vários animais e é encontrada somente ocasionalmente em seres humanos. As adições recentes ao gênero são *B. avium* e *B. hinzii* e ambos causam doenças respiratórias em aves domésticas e são encontradas muito raramente em seres humanos (VANDAMME, *et al*, 1996; TEMPLE, *et al*, 1998).

B. pertussis é um pequeno bacilo em forma de bastonete (aproximadamente 0,8 por 0,4 μm), gram-negativo, aeróbico, não esporulado e imóvel, provido de cápsula (formas patogênicas) e de fímbrias. É uma bactéria nutricionalmente fastidiosa, sendo cultivada em meio contendo sangue.

1.2.2 Patogenia e patologia

Essa bactéria sobrevive somente por curto período de tempo quando fora do organismo humano e não há vetores. A transmissão se dá por aerossol, principalmente pela via respiratória, a partir de pacientes no período da doença e, possivelmente, por intermédio de portadores. As bactérias colonizam células ciliadas da mucosa respiratória e multiplicam-se rapidamente (RAPPUOLI, *et al*, 1991). Não ocorre bacteremia.

1.2.3 Aspectos clínicos

A coqueluche ou pertussis é marcada por episódios severos de tosses espasmódicas durante a fase paroxismal. Leucocitose com linfocitose é também comum durante esta fase

da doença. As complicações perigosas são broncopneumonia e encefalopatia aguda (RAPPUOLI, *et al*, 1991).

A coqueluche evolui em três fases sucessivas, após um período de incubação de 1 a 2 semanas:

- Fase catarral: Com duração de uma ou duas semanas, inicia-se com manifestações respiratórias e sintomas leves (febre pouco intensa, mal-estar geral, coriza e tosse seca), seguidos pela instalação gradual de surtos de tosse, cada vez mais intensos e freqüentes, até que passam a ocorrer as crises de tosses paroxísticas.
- Fase Paroxística: Com duração de duas a seis semanas, apresenta como manifestação típica os paroxismos de tosse seca (durante os quais o paciente não consegue inspirar e apresenta protusão da língua, congestão facial e, eventualmente, cianose com sensação de asfixia) finalizada por inspiração forçada, súbita e prolongada, acompanhada de um ruído característico, o guincho, seguidos de vômitos. Os episódios de tosse paroxística aumentam a freqüência e intensidade nas duas primeiras semanas e, depois, diminuem paulatinamente. Nos intervalos dos paroxismos a criança passa bem.
- Fase de Convalescença: Os paroxismos de tosse desaparecem e dão lugar a episódios de tosse comum; essa fase pode persistir durante mais algumas semanas. Infecções respiratórias de outra natureza, que se instalam durante a convalescença da coqueluche, podem provocar reaparecimento transitório dos paroxismos.

1.2.4 Diagnóstico de laboratório

A cultura é o método de excelência para identificar o agente etiológico da coqueluche. Esta pode ser cultivada no meio modificado de Bordet-Gengou ou Regan-Lowe ou em caldo de carne com o suplemento de Stainer-Scholte. O DNA de *B. pertussis* pode também ser detectado por PCR. Anticorpos circulantes aparecem na 3ª semana da

doença atingindo seu pico na 8ª e na 10ª semana. Os anticorpos podem ser detectados por ELISA. A detecção de IgA específico fornece evidência da infecção natural (FINGER, *et al*, 1985; GOODMAN, *et al*, 1981; MEADE, *et al*, 1990; MEADE, & BOLLEN, 1994).

1.2.5 Epidemiologia, controle e prevenção

Coqueluche resulta em alta morbidade e mortalidade a cada ano em muitos países. Em 1994, 206.541 casos foram relatados em todo o mundo e em 1995 apenas 80.606 casos. No entanto, os casos de pertussis são substancialmente omitidos em muitos países. Levando isto em conta, estima-se que aproximadamente 39 milhões de casos de pertussis e 355.000 mortes relacionadas ocorreram em 1995. A estimativa de mortes relacionadas com pertussis é um terço do número estimado de mortes relacionadas com sarampo e 100.000 a menos que o número de mortes causadas por tétano neonatal (OMS, 1998).

A mucosa do trato respiratório humano é o habitat natural para *B. pertussis* e para *B. parapertussis*. A transmissão se dá, principalmente, pelo contato direto de pessoa doente com pessoa susceptível, através de gotículas de secreção da orofaringe, eliminadas por tosse, espirro ou ao falar. Também pode ocorrer transmissão por objetos recentemente contaminados com secreções do doente. Os pacientes são os principais transmissores durante a fase catarral da doença e permanecem como transmissores por aproximadamente 5 semanas. Pertussis é uma doença comum e perigosa da infância em populações não vacinadas. O controle da coqueluche baseia-se principalmente, na imunização ativa adequada de todas as crianças.

1.2.6 Imunidade

A infecção induz uma substancial imunidade, a qual usualmente permanece por muitos anos, embora os antígenos protetores não sejam identificados conclusivamente. Ambas as defesas: não-especifica e específica participam na resposta imunológica à

doença. A imunidade adquirida após infecção com pertussis não protege de outras espécies de Bordetella. Acredita-se que a toxina pertussis (PT) seja um imunógeno protetor essencial, mas inúmeros estudos indicam que outros componentes, tais como hemaglutinina filamentosa, toxina lábil, aglutinógenos, proteínas de superfície externa e a toxina adenilato ciclase, também contribuem para a imunidade após infecção ou vacinação. A imunogenicidade dessas substâncias pode ser significativamente aumentada pela presença de PT. Esse sinergismo indica que PT poderia funcionar como um adjuvante para uma variedade de antígenos protetores de *B. pertussis*. Os mecanismos de defesa são não-específicos (inflamação local, aumento de macrófago ativo e produção de interferon) e específicos (proliferação de células B e T). As bases da imunidade contra pertussis não estão ainda completamente estabelecidas. Um papel de anticorpos circulantes na imunidade é indicado pela correlação entre proteção da vacina em humanos e o título de aglutinina no soro desses. No entanto, imunidade efetiva não necessariamente depende da presença de aglutininas no soro, sendo assim, a imunidade contra pertussis poderia ser mediada essencialmente por mecanismos celulares. Essa imunidade mediada por células seria considerada crucial para o desenvolvimento de uma imunidade duradoura e o título de anticorpos específicos (resposta humoral) poderia diminuir ao longo dos anos. Essa seria a razão porque crianças usualmente não são significantemente beneficiarias de anticorpos maternais (MILLS, 2001; HEWLETT & CHERRY, 1997).

1.2.6.1 Função de anticorpos na proteção

Há um amplo corpo de evidências, baseado principalmente em experimentos de imunização passiva, que anticorpos desempenham um importante papel na proteção contra *B. pertussis*. Anticorpos poderiam funcionar tanto por neutralização de toxinas bacterianas, inibição da fixação da bactéria extracelular nas células do trato mucoso, ou por captação e

detecção da bactéria e sua destruição por macrófagos e neutrófilos. A identificação de níveis de anticorpos circulantes que são críticos para a proteção induzida por certas vacinas, tais como tétano, difteria e pólio, têm levado a acreditar que poderia ser possível definir um nível de anticorpos protetores contra *B. pertussis*. Embora tenha sido observado que crianças expostas a pertussis no ambiente de suas casas tenham menor probabilidade de adquirir pertussis numa forma severa, se elas tiverem níveis elevados de anticorpos contra certos antígenos após imunização, não tem sido possível definir um nível de anticorpos contra um único antígeno ou combinação de antígenos que possa predizer uma proteção (MILLS, 2001).

Um dos principais problemas com a grande quantidade de dados sobre imunidade humoral para *B. pertussis* tem sido uma elevada ênfase nos níveis de anticorpos específicos presentes no soro medidos por ELISA. Esta técnica (ELISA) não detecta anticorpos funcionalmente relevantes e anticorpos circulantes não refletem necessariamente o que está acontecendo na superfície local no pulmão. Mais que isso, medidas dos níveis totais de IgG dão pouca informação sobre a indução de memória imunológica ou do envolvimento de distintos subtipos de células T na imunidade protetora. Medidas dos níveis de IgG por ELISA não discriminariam entre anticorpos que ligam determinantes conformacionais sobre estruturas nativas ou determinantes lineares sobre proteínas desnaturadas e não poderiam predizer se estes anticorpos funcionariam como limitantes da infecção *in vivo*. Isso é um problema particular dos antígenos que são inativados com aldeídos, os quais podem resultar em reações cruzadas e significantes alterações na estrutura e antigenicidade das proteínas (MILLS, 2001).

1.2.6.2 Imunidade mediada por célula

Cheers e col. demonstraram, a mais de 30 anos, que *B. pertussis* tinha uma fase intracelular, ao mencionar reações de hipersensibilidade tardia para antígenos de pertussis em camundongos infectados, e sugeriram que uma imunidade celular seria requerida para a eliminação da bactéria intracelular. Mais recentemente, tem sido confirmado por um número de grupos que *B. pertussis* pode invadir e sobreviver dentro de células de mamíferos, incluindo macrófagos, leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e células do epitélio respiratório. Embora estudos mencionem que *B. pertussis* intracelular é rapidamente morta em neutrófilos humanos, a sobrevivência de *B. pertussis* tem sido demonstrada em macrófagos e isso estaria ligado à inibição dos mecanismos de morte pela toxina adenilato ciclase (ACT). Além disto, casos de pertussis têm sido documentados em adultos e crianças imunizadas, infectadas com HIV, e macrófagos recuperados de fluído de lavagem broncoalveolar (BAL) de um paciente com AIDS, mostraram conter *B. pertussis* viáveis. A localização dual, intracelular e extracelular, desta bactéria é consistente com uma função para mecanismos imunológicos, tanto celular como também humoral, para a eliminação desta bactéria do trato respiratório (MILLS, 2001).

1.2.7 Tratamento

O tratamento com eritromicina não altera o curso da doença, mas reduz o período infeccioso que compreende de 5 a 10 dias. O tratamento, após o início da fase paroxismal, raramente altera o curso clínico da doença.

1.2.8 Profilaxia

Na ausência de um tratamento efetivo, a prevenção através de vacinação é de extrema importância. Durante o primeiro ano de vida, toda criança deve receber três

injeções da vacina inativada. Em geral essa vacina é administrada em associação com os toxóides da difteria e do tétano, associação esta denominada de vacina tríplice (DTP).

As vacinas inativadas a partir de células inteiras são altamente eficazes, mas causam ocasionalmente efeitos colaterais tóxicos. As vacinas acelulares com poucos efeitos colaterais foram licenciadas para a vacinação como dose de reforço e também para vacinação preliminar (RAPPUOLI, *et. al*, 1991).

1.3. Vacinas contra *B. pertussis*

1.3.1 Histórico

Uma vacina efetiva contra pertussis foi desenvolvida na década de 40. Essa vacina celular (VC) é composta de células inteiras de *B. pertussis* mortas por tratamento com formalina a 56° C por 30 min. Essa vacina é muito eficaz, faz parte da vacina tríplice em programas de vacinação recomendados pela OMS, e virtualmente eliminou a mortalidade e morbidade associada a essa bactéria nos paises onde esta vacina tem sido usada, inclusive nos EUA (RAPPUOLI, *et al*, 1991). Embora esta vacina tenha reconhecidamente contribuído para a diminuição da incidência da tosse cumprida, ela apresenta limitações que justificam o incentivo ao desenvolvimento de um produto novo e melhor definido. Primeiro, a eficácia de vacinas consistindo de células inteiras tem sido questionada (HEWLETT, *et al*, 1997). Cálculos avaliando o efeito protetor de diferentes preparações vacinais têm variado, dependendo do produto, das condições e da forma do estudo. Além disso, há indicações de que o efeito primário da vacina estaria mais concentrado no desenvolvimento dos sintomas clínicos do que no estabelecimento da infecção (HEWLETT, *et al*, 1997). O segundo problema com a VC é que a duração de proteção é claramente limitada. Estudos mostram que recipientes da vacina podem ser totalmente (>95%) susceptíveis a adquirir pertussis ao final de 12 anos após terem recebido a última

dose da vacina (HEWLETT, *et al*, 1997). A terceira razão para o desenvolvimento de uma nova vacina contra pertussis é a reatogenicidade, real e observada, dessas preparações, sendo um significante fator em reduzir a sua aceitação e uma consideração na decisão de não se administrar doses de reforço rotineiras em adultos. A reatogênicidade de vacinas de células inteiras pode ser classificada em dois grupos: (1) local - edema, eritema, brandura e infreqüentemente nódulo ou formação de abscesso estéril e (2) febre sistêmica - letargia, anorexia, sonolência e choro prolongado, convulsões e colapso, os quais ocorrem numa freqüência de 0,1-1% (SATO & SATO, 1999; HEWLETT, *et al*, 1997). Embora, essas reações não sejam específicas para a vacina pertussis, elas ocorrem significativamente e mais freqüentemente em recipientes de vacinas combinadas, tais como DPT, do que naqueles que recebem apenas DT (HEWLETT, *et al*, 1997; CHERRY, 1990).

Foram necessárias análises mais detalhadas da genética de *B. pertussis* para se identificar os antígenos responsáveis pela proteção e pelos efeitos colaterais. Weiss e colaboradores construíram inúmeros mutantes de pertussis defectivos de fatores de virulência individuais, mostrando que somente PT e Adenilato Ciclase eram estritamente requeridos para a virulência de pertussis (WEISS, *et al*, 1983; WEISS, *et al*, 1984). Estes achados implicaram que a imunidade contra um desses antígenos poderia ser suficiente para a proteção.

Y. Sato separou e purificou, pela primeira vez, as proteínas PT e FHA do sobrenadante de cultura de *B. pertussis*, inativando-as com formaldeído e desenvolvendo a primeira vacina acelular (VAC), a qual tem sido usada no Japão desde 1981 (SATO, *et al*, 1984). Vacinas acelulares (VAC) a partir de então foram desenvolvidas e licenciadas no Japão desde 1981, para crianças acima de 2 anos e também para recém-nascidos desde 1990. Estas vacinas são compostas diferentemente e contêm quantidades variáveis de

componentes estruturais da bactéria. Entre esses componentes encontram-se: dPT, FHA, 69K (pertactina) e antígenos fimbriais 2 e 3. Algumas dessas vacinas foram licenciadas nos Estados Unidos, para uso como dose de reforço desde 1991.

O grupo de Steinman desenvolveu um ensaio em camundongos mostrando que traços diminutos de PT ativa era capaz de induzir uma síndrome anafilática e sugeriu que um mecanismo similar poderia ser responsável pelos efeitos colaterais causados pela vacina celular (STEINMAN, *et al*, 1985). Esses dois achados apontaram para a possibilidade de que PT poderia ser o antígeno requerido para a proteção e também a toxina responsável pelos severos efeitos colaterais da vacina celular. Subseqüentemente, muitos outros antígenos foram purificados, detoxificados quimicamente e testados como vacina em camundongos em um ensaio de desafio intracerebral, que correlaciona com a eficácia de proteção da vacina celular em crianças (KENDRICK, *et al*, 1947). Nesse ensaio, PT foi o único antígeno capaz de induzir proteção, enquanto outras moléculas tais como FHA e a 69K, embora não fossem elas próprias protetoras, eram capazes de aumentar a potência das vacinas contendo PT detoxificada quimicamente (dPT). Com base nessas observações, diversas vacinas acelulares foram desenvolvidas e testadas quanto à sua segurança e eficácia em modelos animais. Todas as vacinas propostas continham PT detoxificada por diferentes métodos químicos, tanto sozinhos como associados com um ou mais dos outros antígenos. Duas dessas vacinas (PT e PT + FHA) foram testadas em larga escala num ensaio clínico na Suécia (*Ad hoc*, 1998). Ambas as vacinas ofereceram proteção contra infecção severa por pertussis, com uma eficácia similar àquela da vacina celular. No entanto, durante as triagens clínicas, PT mostrou sofrer alguma reversão para toxicidade. A conclusão foi que PT, tanto sozinha como combinada com outros antígenos, pode ser uma vacina efetiva contra pertussis. Todavia, para se evitar os riscos de efeitos colaterais,

métodos melhores de detoxificação foram requeridos. Alguns laboratórios investigaram métodos químicos como alternativa para o tratamento com formalina. Por outro lado, o laboratório do Dr. Rappuoli decidiu atacar o mesmo problema usando a tecnologia de DNA recombinante.

Dados recentes sugerem que após vacinação primaria de crianças, essas vacinas podem conferir níveis similares de proteção, comparáveis aqueles da vacina celular. Por isso, vacinas acelulares têm sido licenciadas em alguns paises europeus para vacinação primária.

1.3.2 Vacina Celular (VC) versus Vacina Acelular (VAC)

Tanto a infecção como as manifestações clínicas ou a indução de imunogenicidade contra coqueluche são produzidas por diversos fatores de virulência. Entre os fatores potenciais que podem contribuir para essa infecção, estão incluídos as adesinas (aglutinógenos, FHA e PT), as toxinas (toxina adenilato ciclase-hemolisina (ACT), toxina dermonecrótica, lipopolissacarídeos, PT e citoxina traqueal) e outros antígenos de funções desconhecidas (WEISS, *et* al, 1985; HEWLETT, *et al*, 1997). Acredita-se que esses componentes bacterianos, assim como outros, seriam os responsáveis pelos seguintes fatores envolvidos nesta doença infecciosa: (1) fixação e entrada nas células do hospedeiro; (2) evasão ou disrupção de células de defesa do hospedeiro; (3) desenvolvimento de danos locais e (4) estabelecimento de doença sistêmica através da disseminação do organismo ou dos produtos deles. Em geral, as vacinas produzem efeitos protetores por interferirem em um ou mais desses fatores. No entanto, é desconhecido como vacinas de células inteiras podem interferir nesses processos. Essa dificuldade leva a incertezas sobre o que se pode esperar de vacinas acelulares de pertussis. Estas protegeriam contra a infecção ou somente contra as manifestações clínicas da doença?

Os mecanismos efetores que mediam a imunidade induzida pela vacina são consideravelmente influenciados pelo tipo de vacina empregada. A vacina VC seletivamente induz células Th1, e após exposição a *B. pertussis*, um infiltrado inflamatório é observado nos pulmões com recrutamento de linfócitos, neutrófilos e macrófagos. Células Th1 também auxiliam anticorpos opsonizantes e promovem a detecção e morte celular das bactérias por mecanismos que envolvem nitrogênio reativo e intermediários de oxigênio. Em contraste, VAC induz resposta do tipo Th2 em camundongos e uma mistura de resposta Th1/Th2 em crianças. Embora haja um pequeno aumento no número de linfócitos, o influxo dramático de neutrófilos nos pulmões de camundongos imunizados com VAC não foi detectado. Na ausência de resposta celular, parece que anticorpos estão envolvidos na neutralização de toxinas e na prevenção da adesão da bactéria às células epiteliais do trato respiratório. No entanto, uma mistura de resposta Th1/Th2 é observada em crianças imunizadas com VAC e em desafio de camundongos imunizados após longo período, sugerindo que a resposta direta mediada por células também poderia ter um papel, ainda que menos significante do que aquele com VC, especialmente em proteção de longa duração induzida com a vacina acelular (VAC) (MILLS, 2001).

Ironicamente, os componentes de VC, que são largamente responsáveis pela reactogenicidade desta vacina, PT ativa residual e endotoxina, também contribuem para a eficácia dela. Embora estes componentes ativos estejam ausentes em VAC, o uso de sistemas de nova geração para apresentação de antígenos e adjuvantes não tóxicos, capazes de polarizar respostas para o tipo Th1, podem ajudar no desenvolvimento de VAC melhoradas, capazes de prevenir doenças leves e induzir a uma resposta imunológica protetora mais persistente (MILLS, 2001)

1.3.3 Os Antígenos PT e FHA

A Toxina Pertussis (PT) é uma proteína de 105 kDa que é liberada no meio extracelular e desempenha uma função muito importante na coqueluche: é o principal fator de virulência da *B. pertussis*. Esta proteína é composta de 5 diferentes subunidades, ligadas não covalentemente e denominadas de acordo com suas mobilidades eletroforéticas de S1 (26,22 kDa), S2 (21,92 kDa), S3 (21,86 kDa), S4 (12,06 kDa) e S5 (11,77 kDa) (RAPPUOLI, *et al*, 1989). Semelhante a outras proteínas tóxicas bacterianas, tais como toxina colérica e exotoxina A de pseudomonas, PT também é dividida em dois motivos funcionalmente diferentes: A, representado pela subunidade tóxica S1 e B, que compreende as subunidades S2, S3, S4 e S5, a qual está envolvida na ligação aos receptores sobre a superfície das células eucarióticas e na translocação de S1 através da membrana celular. S2, S3 e S4 estão arranjados em dois dímeros: D1 (S2 e S4) e D2 (S3 e S4), os quais são mantidos juntos por S5. Portanto, PT contém uma única cópia das subunidades S1, S2 S3 e S5 e duas cópias da subunidade S4 (RAPPUOLI, *et al*, 1986).

Como descrito para as toxinas, diftérica, colérica e de pseudomona, a subunidade tóxica A de PT é uma ADP-ribosiltransferase NAD-dependente e ela catalisa a ADP-ribosilação de proteínas G envolvidas em transdução de sinal. A ação de PT causa o desacoplamento irreversível das proteínas reguladoras que se ligam ao GTP e interferem com uma variedade de vias metabólicas que têm como mensageiro secundário o cAMP. PT também é um mitógeno e um adjuvante (NICOSIA, *et al*, 1987).

Foi desenvolvida uma forma geneticamente detoxificada de PT. Alelos dos genes de PT foram manipulados geneticamente para introduzir a substituição de dois aminoácidos (Arg 9→ Lys e Glu 29 → Gly) (PT-9K/129G) no sítio ativo da subunidade S1, e este gene

introduzido no cromossomo de uma cepa de *B. pertussis* (PIZZA, *et al,* 1989). Esta cepa produz moléculas mutantes de PT que são atóxicas e imunogênicas e que protegem camundongos de um desafio intracerebral com uma cepa virulenta de *B. pertussis*. Essa forma mutada também oferece algumas vantagens sobre a nativa. Primeiro, PT-9K/129G não exibe nenhuma das propriedades tóxicas da toxina selvagem, enquanto possui todas as outras atividades da molécula; segundo acredita-se que PT-9K/129G, manipulado geneticamente, retém a conformação correta da toxina tipo selvagem, logo, a conformação de epítopos existentes nas cinco subunidades da toxina (PIZZA, *et al*, 1989). A mutação de um único aminoácido também resultou na redução drástica da atividade enzimática (HEWLETT, *et al*, 1990).

Em 1995, um teste de campo realizado nos Estados Unidos demonstrou que vacinas acelulares eram seguras, embora não necessariamente mais eficazes que a vacina celular convencional (RAPPUOLI, *et al*, 1995). Uma destas vacinas continha PT-9K/129G. Um outro teste de campo, realizado na Itália, envolvendo 15.000 crianças, demonstrou que a PT-9K/129G, quando associada a FHA e 69K, apresentava maior proteção e menor reatogenicidade que a mesma usando PT detoxificado quimicamente ou que a vacina celular convencional (GRECO, *et al*, 1996).

Alguns grupos têm investigado a utilização da subunidade S1, mutada ou não, como antígeno de pertussis, a ser usado numa possível vacina acelular contra coqueluche, expresso em veículos vivos, tais como *Salmonella* (BARRY, *et al*, 1996), *Streptococcus gordonii* (LEE, *et al*, 1999), BCG (ABOMOELAK, *et al*, 1999).

Hemaglutinina Filamentosa (FHA), uma proteína associada à membrana externa de *B. pertussis* é a maior adesina desse organismo, tendo recebido atenção também como um determinante virulento. O gene estrutural da FHA, fhaB, foi clonado e seqüenciado e a

estrutura revelou a presença de uma grande região com uma seqüência potencial codificadora para uma proteína de 370 kDa. Essa proteína representa a forma precursora da FHA madura, a qual apresenta uma massa molecular de 220 kDa. O tamanho do ORF (fase de leitura aberta) encontrado e de um sítio polipeptídico predito para processamento nesta região, sugere uma função para processamento proteolítico na síntese de FHA madura. Um sítio tri-peptídico Arg-Gly-Asp ocorre na seqüência peptídica deduzida, a qual funcionaria como um sítio de reconhecimento a células eucarióticas que desempenharia a função dessa proteína como uma adesina (RELMAN, *et al*, 1989). O processo pós-tradução permanece ainda por ser elucidado, mas uma clivagem proteolítica carboxi-terminal e possivelmente modificações covalentes poderiam estar envolvidas, já que a forma maturada da FHA parece estar bloqueada na porção amino-terminal (JACOB, *et al*, 1988; DOMENIGHINI, *et al*, 1990).

Foi caracterizado um fragmento recombinante da FHA, denominado de Fragmento A, contendo um domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) (LIU, *et al*, 1997). O domínio CRD compreende os aminoácidos 1141 a 1279 da FHA, codificado por um fragmento de 410 pb. Os autores mostraram que este domínio seria responsável pela fixação de *B. pertussis* a células ciliadas. Tais informações indicam o potencial deste fragmento como um componente de uma futura geração de vacina acelular contra pertussis ou como antígeno a ser expresso em veículos vivos.

Como a maioria das vacinas em uso atualmente, as vacinas contra pertussis, celular ou acelular, necessitam de diversas aplicações para se atingir a eficiência máxima (LEVINE, 1990), o que pode ser um fator importante para o fato que a cobertura vacinal contra a tríplice não ultrapasse 80% e tendo diminuído nos últimos anos (WHO, 2001). A expressão de antígenos atóxicos de pertussis em vetores vivos de apresentação de

antígenos, como o BCG, que necessitaria de apenas 1 dose, apresentaria muitas vantagens sobre a vacina em uso atualmente, especialmente para países em desenvolvimento (RAPPUOLI, 1990). Logo, a subunidade S1 da PT e/ou o fragmento A da proteína FHA, poderiam ser adequados para compor uma vacina eficiente contra pertussis, baseada no BCG recombinante e que pudesse ser administrada em dose única.

2. OBJETIVOS

Devido à importância que o BCG vem adquirindo nesta última década como um promissor veículo vivo para apresentação de antígenos heterólogos e a necessidade de desenvolvimento de uma vacina mais segura contra pertussis, que requeira um menor número de doses, este trabalho tem como objetivos:

1 – Construção de vetores de expressão micobacterianos contendo a subunidade S1 mutada e atóxica da Toxina Pertussis PT9K/129G (S1PT) sob o controle do promotor pBlaF* e em fusão com fragmentos da β-lactamase;

2 – Caracterização da expressão de S1PT rm BCG e de sua localização, direcionada pela seqüência sinal de exportação da β-lactamase;

3 – Clonagem do Fragmento CRD (Domínio de Reconhecimento a Carboidrato) da proteína FHA de *Bordetella pertussis*, a partir do DNA genômico e construção da fusão com S1PT;

4 – Construção de vetores de expressão contendo CRD ou S1CRD;

5 – Caracterização da resposta imunológica humoral e celular induzida por estas preparações vacinas contra PT e FHA;

6 – Determinação da proteção induzida em camundongos contra desafio intracerebral com *B. pertusis*;

7 – Expressão de S1pT, CRD e S1CRD sem gene de resistência a antibióticos utilizando cepas de rBCG auxotróficas complementadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bactérias, condições de cultura e preparação vacinal

Todas as etapas de clonagem foram executadas em *E. coli* DH5α, transformadas pelo método padrão de $CaCl_2$ e cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) contendo, quando necessário ampicilina 100 μg/mL ou kanamicina 20 μg/mL. X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo) 0,001% foi usado para a seleção de colônias positivas em meio sólido, quando o plasmídeo transformante era pUC18. As seguintes linhagens de micobactérias foram usadas: BCG cepa Moreau (BCG-M), BCG cepa Pasteur (BCG-P), BCG-P 1604, cepa de BCG Pasteur (auxotrófico para lisina) e *M. smegmatis* 270 auxotrófico para lisina (Smg-270). As cepas auxotróficas BCG-P-1604 e Smg-270, (PAVELKA, & JACOBS, 1996), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Williams R. Jacobs Jr. (Albert Einstein College of Medicine, NY). Todas as cepas de BCG foram cultivadas a 37 °C em meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Oxford, UK) contendo albumina-dextrose-catalase (ADC) 10% mais Tween80 0,05% (MB7H9) ou meio sólido Middlebrook 7H10 (Difco) suplementado com ácido oléico-albumina-dextrose-catalase (OADC) 10% (MB7H10), contendo ou não kanamicina (20 μg/mL). As cepas auxotróficas foram cultivadas na presença de lisina (40 μg/mL) antes de serem complementadas. Para preparação de estoques de BCG competente, colônia de BCG foi cultivada em MB7H9 até a fase exponencial, sedimentada por centrifugação a 4000 rpm e lavadas duas vezes com glicerol 10% a 4 °C, sendo finalmente re-suspendida em 5% do volume original com glicerol 10% e estocada a –80 °C. Para eletroporação, uma alíquota estoque de 50-200 μl de

BCG competente foi misturada com 1-10 μg de DNA plasmidial em cuveta de eletroporação de 2 mm e submetida a pulsações de 2,5 kV, 25 μF e 1000 Ω, num eletroporador de pulsação (BioRad, Hemel Hempstead, UK). Após eletroporação, o conteúdo das cuvetas foi recuperado em 5 mL de meio MB7H9 sem antibiótico e incubado a 37 °C por 20 h antes de ser semeado sobre MB7H10 contendo kanamicina (20 μg/mL). Após 3-4 semanas colônias transformadas foram selecionadas e cultivadas em meio MB7H9/kanamicina até [A_{600}] 0,6-0,8, centrifugadas, lavadas duas vezes como descrito acima e em seguida alíquotadas com glicerol 10% e armazenadas a –70 °C, para serem então usados como vacinas. Unidades formadoras de colônias (UFC) foram determinadas preparando-se diluições adequadas das preparações vacinas a partir do estoque e plaqueando-as em duplicatas em meio MB7H10/kanamicina.

3.2 Plasmídeos

O plasmídeo pUC18 contendo o gene mutado da toxina pertussis PT 9K/129G foi gentilmente cedido pelo Dr. Rino Rappuoli do Centro de Pesquisas Sclavo (Siena, Itália). Os vetores de expressão pLA71 e pLA73 são plasmídeos-ponte, que se replicam em *E. coli* e micobactéria e foram gentilmente cedidos pela Dra. Brigitte Gicquel (Instituto Pasteur, Paris, França). Estes vetores são derivados do pRR3 (LABIDI, *et al,* 1991) e contém origem de replicação de *E. coli* e micobactéria, o gene para aminoglicosídio fosfotransferase, um marcador de seleção para kanamicina, e o promotor pBlaF*, um promotor mutado da β-lactamase de *M. fortuitum*. O promotor pBlaF* é seguido de diferentes fragmentos do gene da β-lactamase fundidos à fosfatase alcalina (phoA). pLA71 apresenta um inserto de 1384 pb contendo o promotor pBlaF* mais a região codificadora de 32 aminoácidos da seqüência sinal de exportação da β-lactamase e 5 aminoácidos da

proteína madura. pLA73 contém um inserto de 2155 pb, contendo o promotor pBlaF*e o gene completo da β-lactamase (Blam) (Figura 1) (TIMM, *et al,* 1994). Ambos contém um sítio de clonagem múltipla (MCS) após a seqüência da β-lactamase. O cassete de expressão está entre terminadores Ω para garantir que a expressão seja dirigida apenas por este promotor.

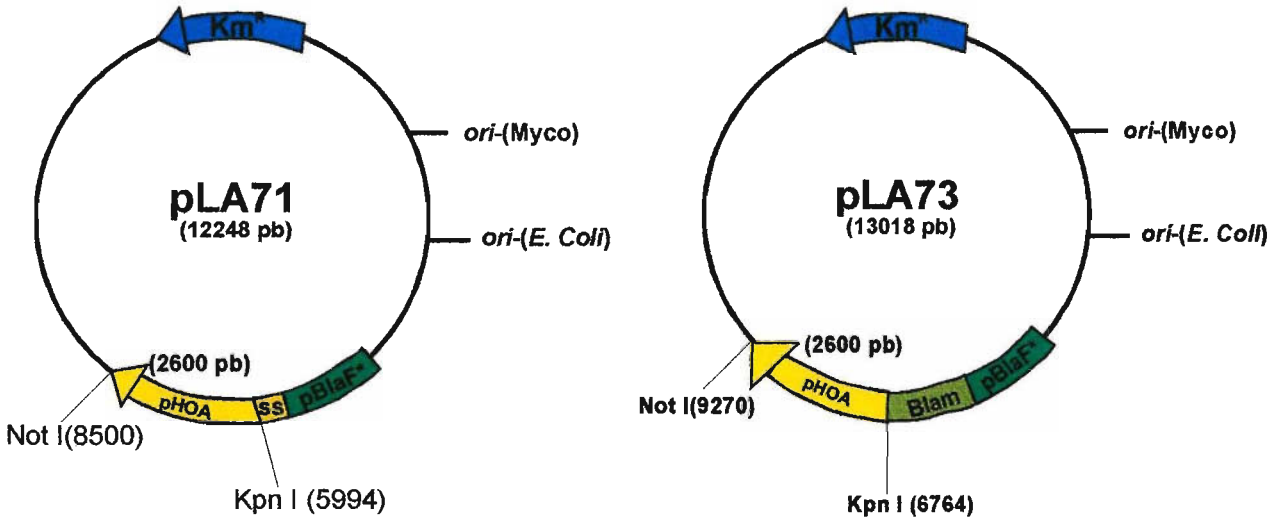


FIGURA 1. Representação esquemática dos vetores de expressão da série pLA. Os dois vetores contêm as origens de replicação, *ori-(E. coli)* e *ori-*(myco); o gene de resistência a kanamicina Km; o promotor mutado da β-lactamase pBlaF*; o códon de iniciação e a seqüência sinal da β-lactamase, ssBlam e o gene phoA que seria substituído pelo gene de interesse. O gene heterólogo ficaria em fusão com a seqüência sinal da β-lactamase em pLA71, e pLA73 em fusão com a β-lactamase inteira.

Os vetores de expressão pJH137, pJH152 e pMP3 (Figuras 2 e 3) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Williams R. Jacobs Jr. (Albert Einstein College of Medicine, NY). Estes vetores assim como os da série pLA são plasmídeos-ponte, que se replicam em *E. coli* e micobactéria. Estes plasmídeos são derivados do pMV261 e contém origem de replicação

de *E. coli* e micobactéria, o marcador de seleção para kanamicina, que é usado numa primeira seleção e posteriormente eliminado, e o gene de complementação para o aminoácido lisina (LysA⁻), sob o controle de um promotor próprio (pMP3) ou do mesmo promotor usado para a expressão do antígeno heterólogo, caracterizando um Operon sintético (pJH137 e pJH152). O vetor pJH137 possui o promotor phsp60 e expressa o antígeno heterólogo em fusão com a seqüência sinal do antígeno alfa, ssα-Ag; o gene lysA vem em seguida, separado pela seqüência consenso RBS (Figura 2). Da mesma forma o vetor pJH152 possui o promotor da proteína alfa-antígeno, pα-Ag, que expressa o antígeno heterólogo em fusão com a seqüência sinal da proteína 19kD; o gene lysA vem em seguida, separado pela seqüência consenso RBS (Figura 2).

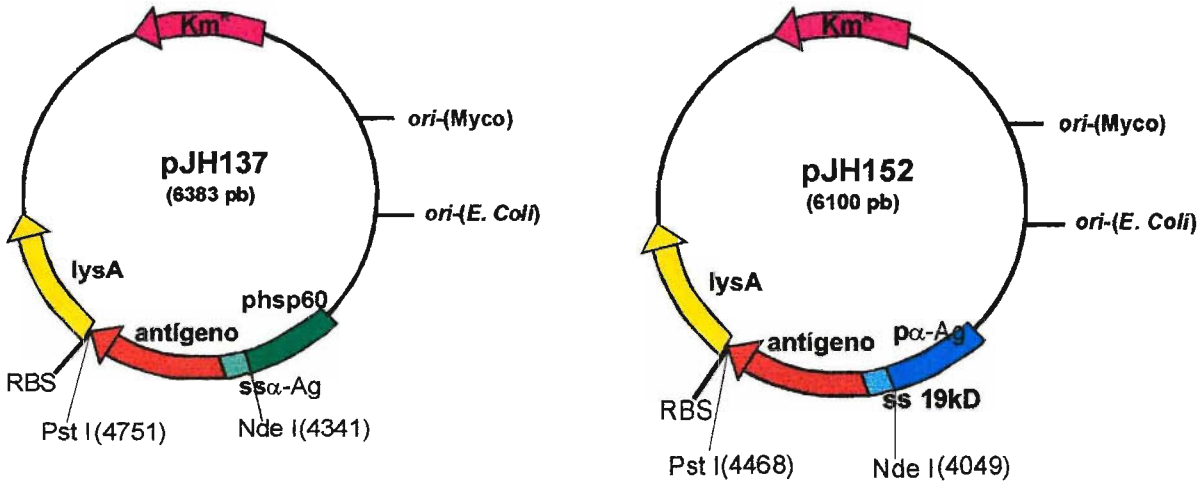


FIGURA 2. Representação esquemática dos vetores de complementação e expressão pJH137 e pJH152. Os vetores contêm as origens de replicação, *ori-(E. coli)* e *ori-*(myco); o gene de resistência a kanamicina, Km e um operon sintético formado pelo gene heterólogo e o gene lysA separados por uma seqüência consenso de ligação a ribossomo (RBS). pJH137 possui a seqüência sinal do Antígeno α, ssα-A e o promotor hsp60. pJH152 possui a seqüência sinal da proteína 19kD, ss-19kD e o promotor pα-Ag.

O vetor pMP3 contém um cassete de expressão de lysA com o promotor groEl eé usado somente para complementar cepas micobacterianas auxotróficas para lisina. O cassete de expressão do antígeno heterólogo será inserido no sítio DraI (Figura 3).

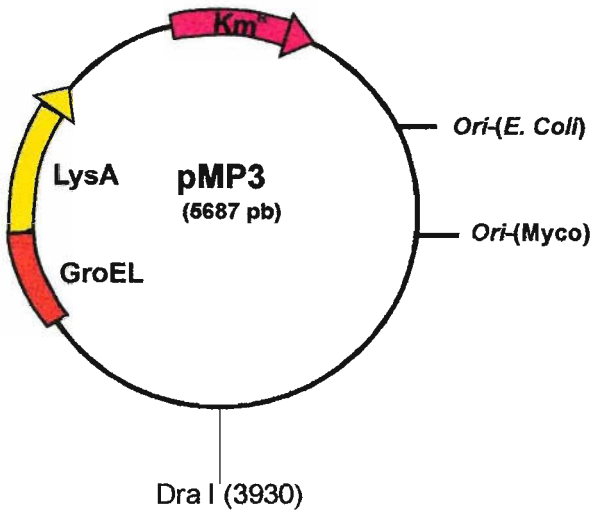


Figura 3. Representação esquemática do vetor de expressão pMP3. O vetor pMP3 contém as origens de replicação, *ori-(E. coli)* e *ori-*(myco); o gene de resistencia a kanamicina, Km e o gene de complementação para lisina, lysA, sob o controle de um promotor próprio. O cassete de expressão presente em pNL71S1 foi clonado no sítio Dra I deste vetor.

3.3 Clonagem de S1PT, CRD-FHA e S1CRD nos vetores de expressão micobacteriano

Todas as técnicas de manipulação de DNA foram feitas através de protocolos padrões de biologia molecular como descrito por SAMBROOK, *et al* (1986). O gene S1-PT geneticamente detoxificado, de ~700 pb, foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pUC18-PT9K/129G geneticamente detoxificado (Gentilmente cedido pelo Dr. Rino Rappuoli, Biocine/Citron, Siena, Italy). O fragmento CRD de FHA de ~420 pb foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *B. pertussis*. Oligonucleotídeos diretos (FP) e reversos (RP) (Tabela I) foram utilizados em uma série de PCRs para gerar os produtos S1-PT, CRD ou para construir a fusão destes dois, produzindo S1CRD. O produto

de fusão S1CRD foi obtido a partir dos fragmentos S1 e CRD clonados individualmente em pUC18, usando oligonucleotídeos que adicionaram uma pequena região de fusão, de quatro aminoácidos (Tyr, Val, Pro, Pro) entre estes dois fragmentos. Cada oligonucleotídeo senso ou anti-senso possuía um sítio Xba I em suas extremidades para facilitar a sua subclonagem em pUC18 e os sítios Kpn I e Not I nas extremidades 5′ e 3′, respectivamente, para a clonagem nos vetores micobacterianos (Tabela I). Foi usado o seguinte protocolo de PCR: 94° C/4 min.; 25 ciclos de 94° C/1 min, 50° C/1 min e 72° C/30 s; 4° C final. Os produtos de PCR amplificados foram purificados a partir de gel de agarose, digeridos com Xba I e subclonados no mesmo sítio em pUC18, previamente digeridos, e transformado em *E. coli* DH5α. O DNA plasmidial foi extraído de colônias brancas selecionadas em placa de LB contendo ampicilina e X-Gal, usando o kit Concert (Gibco). Os insertos S1-PT, CRD-FHA ou S1CRD foram removidos de pUC18 como fragmentos KpnI/NotI, os quais foram então purificados a partir de gel de agarose e clonados nos vetores de expressão micobacteriano, pLA71 ou pLA73, em que o gene da phoA foi previamente retirado com as mesmas enzimas. Os oligonucleotídeos foram desenhados para que a inserção dos fragmentos em pLA71 e pLA73 permitisse que a fase de leitura fosse mantida para a produção das proteínas de fusão. As construções obtidas foram então denominadas pNL71S1, pNL71CRD e pNL71S1CRD ou pNL73S1, pNL73CRD ou pNL73S1CRD.

Tabela I

Oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR dos genes dos antígenos de *B. pertussis*:

Oligonucleotídeos[a]	Seqüência dos oligonucleotídeos [b]
S1-FP	5'- TAGTAG*TCTAGA*GGTACCGGACGATCCTCCCGCCACC – 3'
S1-RP	5'-TAGTAG*TCTAGA*GCGGCCGCCTAGAACGAATACGCGATGCT– 3'
CRD-FP	5'- AATTAA*TCTAGA*GGTACCGCTCGAGCATTCCACCATCGAG –3'
CRD-RP	5'-ATTAA*TCTAGA*GCGGCCGCATTCTCGAGCACGCCCTGCTTGCC –3'
S1CRD-FP	5'- ATTTAA*TCTAGA*TACGTACTCGAGCATTCCACCATCGAG – 3'
S1CRD-RP	5'-TAGTAG*TCTAGA*TACGTA**AGTTCC**GAACGAATACGCGATGCT– 3'

[a] FP, oligonucleotídeo direto; RP, oligonucleotídeo reverso
[b] Os sítios de restrições Xba I estão em itálico, Kpn I e SnaB I estão sublinhados em FP, e Not I sublinhado em RP (com exceção de S1CRD-RP que tem SnaB I), a região de fusão está em negrito.

Para a clonagem dos antígenos S1PT, CRD e S1CRD de pertussis nos vetores de complementação e expressão pJH137 e pJH157 foram realizados PCRs nas mesmas condições descritas anteriormente utilizando os oligonucleotídeos descritos na Tabela II. Estes oligonucletídeos contendo os sítios Nde I e Pst I nas extremidades 5' e 3', respectivamente foram utilizados para amplificação dos genes S1PT, CRD ou S1CRD contidos nos vetores pNL71S1, pNL71CRD e pNL71S1CRD, representados na Figura 4. Os fragmentos obtidos por PCR apresentaram os tamanhos esperados de 700 bp, 420 bp e 1120 bp, respectivamente. Estes fragmentos foram purificados de gel de agarose e clonados nos vetores de expressão pJH137 e pJH152 previamente digeridos nos mesmos sítios.

Tabela II

Oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR dos genes S1-PT, CRD e S1CRD para serem clonados nos vetores de complementação pJH137 e pJH152 sob o controle dos seus respectivos promotores.

Oligonucleotídeo[a]	Seqüência[b]
X-S1-FP	5' – AAAAAA<u>CATATG</u>GACGATCCTCCCGCCACCGTATACC – 3'
X-S1-RP	5'- AAAAAA*CTGCAG*CTAGAACGAATACGCGATGCTTTCG – 3'
X-CRD-FP	5'- AAAAAA<u>CATATG</u>CTCGAGCATTCCACCATCGA –3'
X-CRD-RP	5'- AAAAAA*CTGCAG*CTACTCGAGCACGCCCTGCTTGC – 3'
X-S1CRD-FP	5'- AAAAAA<u>CATATG</u>GACGATCCTCCCGCCACCGTATACC – 3'
X-S1CRD-RP	5'- AAAAAA*CTGCAG*CTACTCGAGCACGCCCTGCTTGC – 3'

[a] X- indica que somente o gene foi amplificado por PCR; FP, oligonucleotídeo direto; RP, oligonucleotídeo reverso.
[b] Os sítios Nde I, e Pst I estão em itálicos

Para a construção do vetor de complementação pMPN3S1PT, o cassete de expressão contendo pBlaF*, a seqüência sinal de Blam e S1PT foi isolado de pNL71S1 com Pst I (que flanqueia o cassete de expressão) e tornado *blunt* com a enzima "Klenow fragment". Este fragmento foi então ligado diretamente no sítio *blunt* Dra I do vetor pMP3.

A construção do vetor pNL71S1lysA foi realizada pela excisão do gene lysA do vetor pJH137, através da digestão nos sítios Pst I e Cla I, tornado *blunt* com a enzima "Klenow fragment" e o fragmento em seguida ligado no sítio Not I de pNL71S1, que também foi tornado *blunt*.

3.4 Expressão de S1-PT e CRD-FHA em BCG recombinante

Estoques de BCG competentes foram eletroporados com os respectivos vetores de expressão e as colônias transformantes inoculadas em 10 mL de meio líquido MB7H9 /kanamicina. A cultura micobacteriana foi recuperada na fase exponencial (A_{600nm}– 0,6-0,8) por centrifugação a 4.000 rpm. As células foram então resuspendidas em 1/10 do volume original com PBS e congeladas. No dia seguinte foram sonicadas por 1,5 min sob gelo numa amplitude constante correspondente à metade do valor máximo (Soniprep 150 MSE, UK) e centrifugadas para precipitação de sólidos. Os sobrenadantes foram recuperados e a concentração de proteínas dosada usando o kit BIO-RAD Protein Assay (Bio-Rad) utilizando albumina bovina como padrão. Amostras contendo 30 μg de proteínas foram aplicadas em gel de poliacrilamida 10% em presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE 10 %). A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente a 120 V até o corante atingir o final do gel. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 μm (Protran), utilizando-se um sistema de transferência semi-seco. Os géis contendo rBCG transformado com os vetores de expressão com cada antígeno foram colados sob membranas de nitrocelulose, mergulhados em tampão de transferência (Tris 0,25 M, pH 8,3, glicina 0,129 M e metanol 20 %) e colocados entre cinco folhas de filtro também embebidas no mesmo tampão. O conjunto foi colocado entre duas placas e submetido a uma corrente de 120 mA por 1,5 h à temperatura ambiente. Ao final da eletrotransferência as membranas foram retiradas do sistema e incubadas em solução bloqueadora (PBS contendo 5% de leite desnatado - PBS-L) a 4 °C, durante toda noite. Ao término do bloqueio as membranas foram incubadas a temperatura ambiente por 2 h com soro anti-PT ou anti-FHA ambos diluídos em PBS-L (diluição 1:1000). Após este

período de incubação as membranas de nitrocelulose foram lavadas três vezes, sob leve agitação, com PBS/Tween20 0,1% (PBS-T), em intervalos de 10 min. As membranas foram então incubadas por 2 h nas mesmas condições em PBS-L contendo anticorpo anti-IgG conjugado a HRP (Sigma, Chem Co, St. Luis) e novamente lavadas 3 vezes com PBS-T. A revelação foi feita por quimiluminescência usando o kit ECL (Amersham) por exposição a filme de raios-X.

3.5 Localização de S1PT expressa em rBCG

Clones de rBCG expressando a proteína de fusão S1-PT com os diferentes fragmentos da β-lactamase foram cultivados em 30 mL de meio de cultura Ungar (REF>), contendo kanamicina (20 μg/mL). As células foram recuperadas na fase logarítmica de crescimento por centrifugação. O precipitado celular foi resuspendido em PBS e sonicado por 5 min em gelo. O material sonicado foi centrifugado a 5000 g por 10 min para remover células não rompidas e grandes pedaços de células sonicadas. Notar que grande parte do material referente à parede celular estará nessa fração. O sobrenadante foi recuperado e centrifugado a 27000 g por 10 min (essa etapa é feita para se remover restos de células que ainda permanecem no sobrenadante, restando no sobrenadante apenas proteínas solúveis e fração de membrana). A este sobrenadante foi adicionado Triton X-114 2 % (v/v) e a mistura incubada sob agitação a 4 °C por toda noite para solubilização da fração referente à membrana. Triton X-114 é um detergente não iônico que forma uma solução homogênea a 4 °C, mas que se particiona em duas fases, uma aquosa e uma de detergente, quando aquecido a 37 °C. Este material foi incubado a 37 °C até a separação das duas fases, sendo a fase superior, aquosa e a fase inferior referente ao detergente. Todas as amostra recuperadas foram submetidas à análise através de SDS-PAGE e Western blot usando anticorpo anti-

PT. As proteínas do sobrenadante do meio de cultura foram concentradas por centrifugação em membrana Centricon 03, (Amicon Corp., Danvers, MA) com poros de retenção superior a 3 kDa.

3.6 Animais e imunização

Grupos de camundongos Swiss ou Balb/c (machos) de 14-18g (Biotério Central do Instituto Butanta) foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com $1x10^6$ UFC/camundongo de BCG ou rBCG re-suspensos em 500 µl de Salina apirogênica. Animais controles foram administrados com Salina ou 1/8 da dose humana da vacina DTP convencional, diluída em Salina, todos em 500 µl. Foram usados grupos de 6-10 camundongos em média por caixa e os animais foram mantidos à temperatura de 22 °C em um biotério com nível de segurança L2 contendo ar filtrado, sendo suas caixas trocadas 3 vezes por semana. Os camundongos Balb/c foram sangrados retro-orbitalmente a cada mês, durante seis meses, sendo o sangue reunido por grupo de animais imunizados e o soro analisado quanto à presença de anticorpos anti-PT ou anti-FHA.

3.7 Análise da produção de anticorpos contra PT ou FHA

As análises de indução de anticorpos específicos contra S1-PT ou CRD-FHA nos soros dos animais imunizados foram feitas pelo método de ELISA: Numa placa de 96 poços (Nalgene Nunc International, Rochester, N. Y.) foi adsorvida a proteína, PT ou FHA, (2µg/mL) diluída em 100 µl de tampão Carbonato-bicarbonato, pH 9,6 e incubada a 4 °C por toda noite. No dia seguinte a placa foi lavada três vezes com PBS-T, bloqueada com PBS-L e lavada novamente com PBS-T. Foram aplicados nos poços os diversos soros diluídos serialmente em PBS/BSA (albumina sérica bovina) 1% e a seguir a placa foi incubada a 37 °C por 1 h. Depois da incubação a placa foi novamente lavada como descrito

acima e cada poço recebeu 100 µl de PBS/BSA 1% contendo o segundo anticorpo anti-IgG conjugado a HRP. Após incubação por 1 h a 37° C, uma nova etapa de três lavagens foi realizada e a reação de detecção desenvolvida pela adição de 100 µl da seguinte solução: o-fenilenodiamina (OPD) 0,04% em tampão fosfato-citrato, pH 5, contendo peróxido de hidrogênio 0,01%. A reação foi mantida por 15 min no escuro e interrompida pela adição de 50µL de H_2SO_4 8N em cada poço. A absorbância foi determinada a 492 nm e os valores mostrados contra uma única diluição de 1/20.

3.8 Obtenção de esplenócitos para o ensaio de indução de linfocinas.

Grupos de três camundongos Swiss, machos de 14-18g foram imunizados com as diferentes preparações vacinas de rBCG, além dos controles BCG ou Salina. Após 15 ou 30 dias o baço destes animais foi retirado assepticamente e as células separadas como segue: suspensões de células únicas foram preparadas em meio incompleto: RPMI 1640 (Sigma) (Chemical Co., St. Louis, MO, USA) contendo tampão HEPES 10mM, suplementado com L-Glutamina 2mM (Merck, Darmstadt, Germany) e sulfato de gentamicina 50 µg/mL (Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As células foram lavadas uma vez e tratadas com água destilada para remoção de eritrócitos. Em seguida, as células foram novamente lavadas por duas vezes e re-suspendidas em meio completo (meio incompleto mais soro fetal bovino (FCS) 10 % (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 2-mercaptoetanol 2mM (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden)). As células (2 x10^6/mL) foram cultivadas em placas para cultura de tecido (Corning, New York, NY, USA), num volume de 1 mL por poço, contendo 1 µg/mL de PT detoxificada (dTP) ou 2,5 µg/mL de FHA, ambos usados para estimulação antígeno-especifica, ou 5 µg/mL de Concanavalina A (ConA) (Sigma) como controle positivo da viabilidade das células. As células controles

foram cultivadas em meio sem antígeno. As culturas de células foram incubadas por até 72 h a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5 % de CO_2. Os sobrenadantes das culturas foram recuperados em 24, 48 e 72 h e armazenados a -20 °C para posterior quantificação de interferon-γ (IFN-γ) e interleucina-4 (IL-4).

3.9 Ensaio de linfocinas

Níveis de IFN-γ e IL-4 nos sobrenadantes de células estimuladas com os devidos antígenos foram estimados por ELISA. Os anticorpos de captura monoclonal anti-IFN-γ (2 μg/mL) ou anti-IL-4 (1 μg/ml) (PharMingen, San Diego, CA, USA) diluídos em 50 μl/poço de $NaHCO_3$ 0,1 M, pH 8,2 foram adsorvidos em placas de micro-titulação de fundo liso de 96 poços (Immunoplates-Maxisorp, Nunc International, Rochester, N. Y.) por incubação a 4 ° C por toda noite. As placas foram lavadas de 3 a 6 vezes com PBS/Tween-20 0,05% (Sigma), dependendo da etapa. PBS/FCS 10 % foi usada como solução de bloqueio a 4 °C por toda noite e esta lavada 3 vezes com PBS-T 0,05%. Os sobrenadantes das culturas de linfócitos foram adicionados às placas em quadruplicata e estas incubadas por 3 h à temperatura ambiente. IFN-γ e IL-4 recombinantes de camundongos (PharMingen) foram usados para se determinar a curva padrão. Os monoclonais anti-IFN-γ (1 μg/mL) e anti-IL-4 (0,5 μg/mL) biotinilados foram usados como anticorpos de detecção num volume de 50 μl de PBS-T 0,05 % para cada poço e incubados por 1 h a temperatura ambiente. A reação de detecção foi desenvolvida pela adição de 100 μl de tampão fosfato-citrato, pH 5 contendo OPD 0,04% e peróxido de hidrogênio 0,01%. A reação foi mantida por 15 min no escuro e interrompida pela adição de 50μL de H_2SO_4 4,5 M por poço. A leitura de absorbância foi feita a 492 nm em aparelho leitor de ELISA. As concentrações a partir da

curva padrão foram obtidas por análise de regressão linear (GraphPad Prism, version 2.0, 1995)

3.10 Ensaio de proliferação

Células do baço obtidas como descrito acima foram cultivadas por 72 h em meio RPMI completo. A resposta proliferativa foi determinada com base na conversão do substrato MTT (Sigma, St. Louis, MO, USA) em formazan, com pequenas modificações. Uma solução de MTT (20 μl, 5mg/mL) foi adicionada a 100 μl de meio e incubada por 3 h a 37 °C. Uma outra solução de PBS/SDS 10 % contendo 100μl de HCl 0,01M foi também adicionada ao meio e a mistura incubada por mais 18 h. A formação de cor é medida pela sua absorbância a 595 nm. Uma unidade proliferativa é equivalente a uma unidade de absorbância em 595 nm. O valor obtido para os esplenócitos de camundongos inoculados com salina foi subtraído. Análises estatísticas foram realizadas pelo Teste de Comparação Múltipla de Student-Newman-Keuls.

3.11 Teste de estabilidade do plasmídeo em BCG *in vivo*

Dois grupos de seis camundongos Swiss machos foram inoculados i.p. com $1x10^6$ UFC de BCG ou rBCG-S1PT e dois animais de cada caixa sacrificados a um e dois meses após inoculação, para a retirada do baço. Os baços foram macerados em homogeneizador Dounce com um volume de 500 μl de salina e os sobrenadantes semeados em diferentes diluições em meio sólido MB7H10 com ou sem kanamicina (20 μg/mL). O número de colônias presentes nas placas (UFC) foi determinado e a estabilidade do vetor de expressão medida como sendo a razão entre o número de colônias resistentes a kanamicina versus o número de colônias recuperadas na ausência de antibiótico.

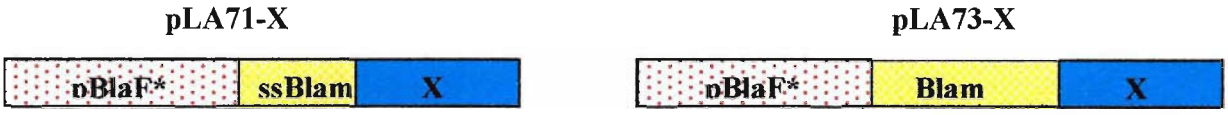
3.12 Desafio Intracerebral com *Bodertella pertussis*

Camundongos imunizados com rBCG ou os respectivos controles foram inoculados intracerebralmente com 30 μl de suspensão bacteriana contendo *B. pertussis* virulenta (18500 ou 30000 UFC, dependendo do peso). Considerou-se como morte acidental ou inoculação inapropriada da suspensão de *B. pertussis* os camundongos que não sobreviveram aos três primeiros dias após o desafio. A sobrevida dos camundongos foi acompanhada por mais 12 dias, sendo o nível de proteção expresso como a percentagem de camundongos sobreviventes.

4. RESULTADOS

4.1 Construção dos vetores de expressão de S1PT em BCG

Para a construção dos vetores de expressão de S1-PT em BCG, o gene desta subunidade foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pUC18 contendo o gene PT9K/129G. Os oligonucleotídeos usados para a obtenção do gene S1-PT geraram, em cada reação apenas o fragmento de tamanho esperado, ~700 pb. Estes oligonucleotídeos foram desenhados de modo que a inserção de S1-PT em pLA71 ou pLA73 mantivesse a fase de leitura com a seqüência sinal da β-lactamase ou com a β-lactamase inteira para a produção das proteínas de fusão. As construções obtidas foram denominadas pNL71S1 ou pNL73S1 (Figura 4). As construções foram confirmadas por análise de restrição e em seguida seqüenciadas.



X = S1PT ou CRD ou S1CRD

Figura 4. Representação esquemática dos cassetes de expressão dos vetores da série pLA contendo os antígenos de *B. pertussis* (X). O primeiro cassete é derivado do vetor pLA71, onde os genes de *B. pertussis* (X) foram clonados em fusão com a seqüência sinal de pBlaF* em substituição a phoA, originado pNL71X. O segundo cassete de expressão é derivado do vetor pLA73, onde os mesmos genes de *B. pertussis* foram clonados em fusão com o gene inteiro da β-lactamase, também em substituição a phoA, originando pNL73X.

4.2 Expressão de S1PT em BCG recombinante.

BCG competente foi transformado com pNL71S1 ou pNL73S1 e os clones de rBCG transformados foram selecionados em meio sólido MB7H10/kanamicina e expandidos em meio líquido. Extratos protéicos de rBCG transformados com os respectivos vetores de expressão foram fracionados em SDS-PAGE 10% e submetidos à análise por *Western blot* usando um anticorpo policlonal anti-PT. Os clones de rBCG transformados com pNL71S1, (rBCG-pNL71S1) apresentaram uma banda imunoreativa, correspondente a uma proteína de aproximadamente 30 kDa (Figura 5, poços 3-5), que é o peso molecular esperado da fusão de S1PT com a seqüência sinal da β-lactamase (26 + 4 kDa). Já o extrato de rBCG-pNL73S1 apresentou uma banda de 59 kDa (Figura 5, poço 6), correspondente à fusão de S1PT com a β-lactamase inteira (26 + 33 kDa). Pode-se observar em rBCG-pNL73S1, também algumas bandas de peso molecular menores, provavelmente devido a algum grau de degradação da proteína fusionada. Os controles negativos, BCG ou rBCG contendo o vetor pLA71 vazio, não apresentaram bandas (poços 1 e 2, respectivamente). Como controle positivo foi usada uma amostra de PT purificada de *B. pertussis* selvagem (Figura

5, poço 7), onde se podem observar as bandas correspondentes às cincos subunidades que formam a Toxina Pertussis (Figura 5, poço 7). A subunidade S1 livre pode ser vista como a banda de menor migração (26,2 kDa) de PT purificada. Embora a reação no ensaio de *Western blot* tenha revelado a expressão em níveis significativos de S1PT nas diferentes cepas de rBCG, não foi possível detectar essa proteína heteróloga no gel de poliacrilamida, quando corado com Coomasie-blue (possivelmente a co-migração com proteínas majoritárias de micobactérias tenha dificultado a sua detecção).

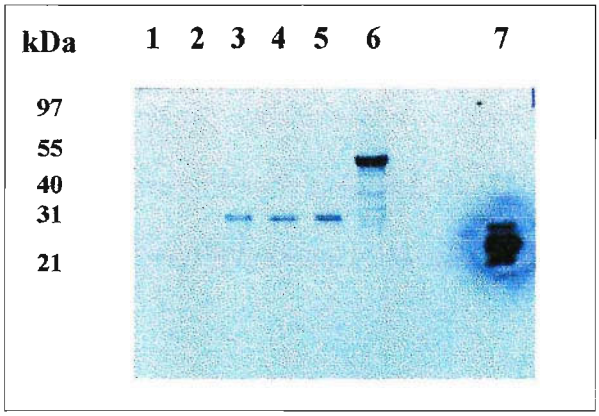


Figura 5. Expressão da subunidade S1 da Toxina Pertussis em rBCG. Extrato total de BCG ou rBCG (30 μg) foram analisados por *Western blot* usando um soro anti-PT. 1, BCG; 2, rBCG transformado com o vetor pLA71 vazio; 3-5; rBCG transformados com o vetor pNL71S1; 6, rBCG transformado com o vetor pNL73S1; 7, PT purificada de *B. pertussis* selvagem.

4.3 Localização de S1PT em BCG recombinante

Para verificar se a fusão com a seqüência sinal da β-lactamase levou à exportação da proteína S1PT expressa em rBCG-pNL71S1 e rBCG-pNL73S1, estas cepas foram cultivadas em meio Sauton e submetidas a fracionamento celular num ensaio de partição com Triton X-114. Triton X-114 é um detergente não iônico que forma uma solução

homogênea a 0 °C, mas quando aquecida a 37 °C se separa em duas fases, uma aquosa ou citosólica e uma outra hidrofóbica ou de membrana.

O método de fracionamento celular e partição utilizando o detergente Triton X-114 revelou que a proteína heteróloga produzida por ambas as construções (rBCG-pNL71S1 e rBCG-pNL73S1) estava localizada nas amostras de material insolúvel obtidas em diferentes centrifugações, 5.000 g e 27.000 g, respectivamente. São nessas amostras onde se concentra a maior parte da parede celular (Figura 6). Esta segunda centrifugação a 27.000 g elimina quaisquer restos de material insolúvel que possam permanecer na fase solúvel, porém não separa a fração de membrana da fração citosólica. Após separação das fases do extrato solúvel por detergente, nenhuma quantidade de proteína foi detectada na fração de membrana ou hidrofóbica, nem na fração citosólica ou aquosa. Uma pequena quantidade da proteína de fusão foi detectada no sobrenadante da cultura, possivelmente por lise celular.

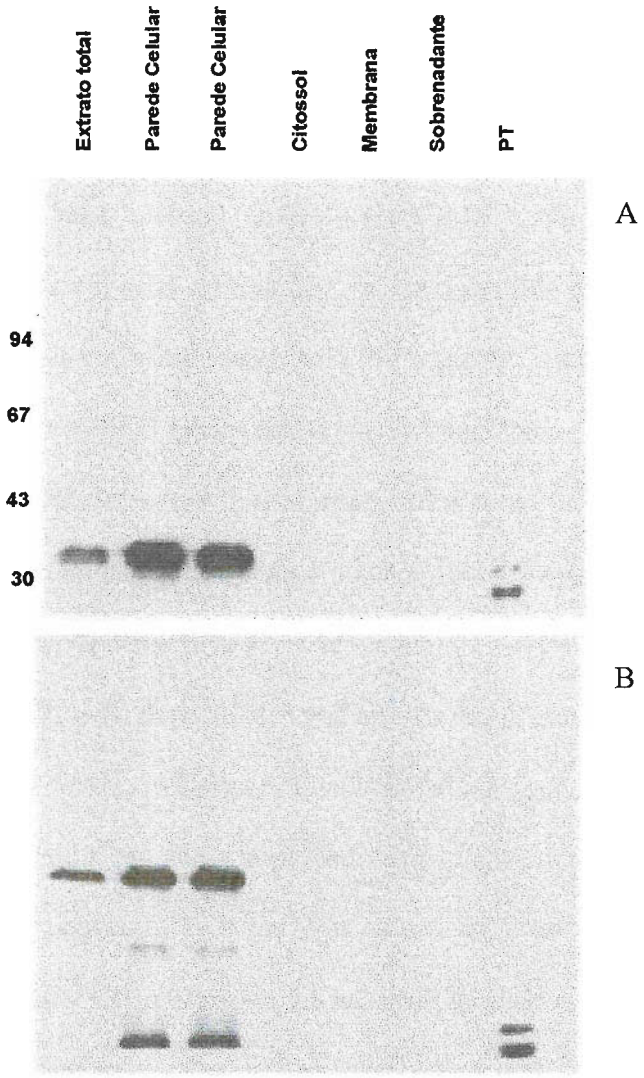


Figura 6. Localização da subunidade S1-PT em rBCG. Extrato total de rBCG-pNL71S1 (A) ou rBCG-pNL73S1 (B) foi fracionado por centrifugação e particionado por detergente Triton X-114. As amostras Extrato Total, Parede Celular, Citossol, Membrana e Sobrenadante correspondentes a cada fração ou localização foram separadas em SDS-PAGE, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e submetidas a imunoensaio utilizando um soro anti-PT nativa. PT, toxina pertussis purificada.

4.4 Estabilidade de rBCG-S1PT *in vivo*

Camundongos Swiss foram inoculados i.p. com BCG ou rBCG-pNL71S1 (10^6 UFC). Três animais de cada grupo foram sacrificados após 1 e 2 meses, os baços extraídos e homogeneizados e frações destes extratos plaqueados em MB7H10, na presença ou ausência de kanamicina. A estabilidade do vetor de expressão foi determinada como a razão entre colônias resistentes a kanamicina versus colônias recuperadas na ausência de antibiótico. Em um mês, a razão diminuiu para 0,86 e em dois meses permaneceu no mesmo valor. O número total de colônias recuperadas dos baços de animais inoculados após 2 meses foi 530 em média, tanto para BCG quanto para rBCG-pNL71S1, indicando que o vetor não torna o rBCG menos estável no camundongo.

4.5 Resposta humoral de camundongos imunizados com rBCG-S1PT

Grupos de 5 camundongos Balb/c machos foram imunizados i.p. com 10^6 UFC de rBCG-pNL71S1 ou rBCG-pNL73S1. Camundongos controles foram imunizados com Salina, BCG ou DTP. Uma dose reforço sob as mesmas condições foi administrada após 10 semanas. Os soros foram coletados individualmente a cada 4 semanas após a primeira imunização, reunidos em um único pool para cada grupo e analisados por ELISA quanto à presença de anticorpos anti-PT. Após dois meses da imunização, os camundongos que receberam rBCG-pNL71S1 mostraram um aumento de duas vezes nos níveis de anticorpos anti-PT, quando comparados com os controles Salina e BCG (Figura 7). No entanto, os níveis diminuíram prontamente em cinco meses, atingindo patamares comparáveis aos dos controles, voltando a subir novamente aos 6 meses. Nem rBCG-pNL73S1 nem DTP induziram níveis significativos de anticorpos anti-PT (Figura 7).

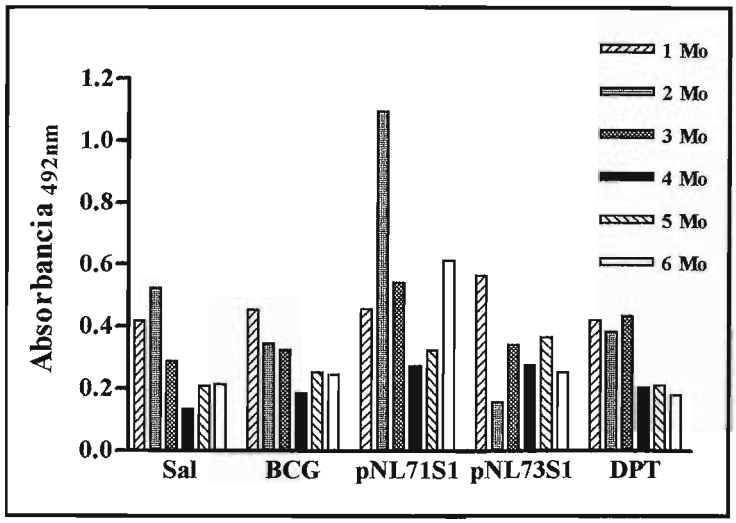


Figura 7. Resposta humoral após imunização com rBCG-S1PT. Camundongos Swiss foram imunizados i.p. com rBCG-pNL71S1 e rBCG-pNL73S1 (10^6 UFC/0,5 mL) ou os controles positivo (DPT) e negativos (Salina, BCG), recebendo uma dose reforço com 10 semanas sob as mesmas condições, como descrito em Materiais e Métodos. Os soros foram coletados nos tempos indicados, agrupados e analisados por ELISA quanto a presença de anticorpos anti-PT. Os dados de absorbância mostrados correspondem a uma única diluição de 1/20. Mo= Mês.

Ao final de seis meses, esses animais foram submetidos a um desafio intracerebral (IC) com uma cepa virulenta de *B. pertussis*. A sobrevivência dos animais foi observada ao longo de 12 dias e somente os grupos vacinados com rBCG-pNL71S1 ou rBCG-pNL73S1 apresentavam animais ainda vivos, 2/5 e 1/5, respectivamente. O último animal sobrevivente, pertencente ao grupo DTP, morreu no último dia do experimento. Esse experimento demonstrou que o desafio IC não é apropriado para avaliar a proteção em camundongos mais velhos e indicou que a vacina rBCG-S1PT poderia induzir algum nível de proteção.

4.6 Resposta celular induzida pela imunização com rBCG-pNL71S1

Grupos de 4 camundongos Swiss foram inoculados com rBCG-pNL71S1 ou com os controles, Salina e BCG. Após duas semanas, as células dos baços desses animais foram isoladas, cultivadas sob o estímulo de dPT e o sobrenadante destas culturas utilizado para determinação da concentração de IFN-γ e IL-4 por ELISA. A secreção de linfocinas pelas células estimuladas com dPT revelou diferenças marcantes entre os grupos. Esplenócitos de camundongos imunizados com rBCG-pNL71S1 produziram elevados níveis de IFN-γ após estímulo com dPT (Figura 8). Células derivadas dos camundongos imunizados com BCG mostraram um aumento na produção de IFN-γ, embora em um menor grau, que pode ser atribuído às suas propriedades adjuvantes inespecíficas. A secreção de IL-4 também foi aumentada nos esplenócitos dos camundongos imunizados com BCG, mas a expressão de S1PT em rBCG reduziu a secreção de IL-4 aos níveis basais. De uma maneira geral, os níveis de IFN-γ foram mais altos que os níveis de IL-4.

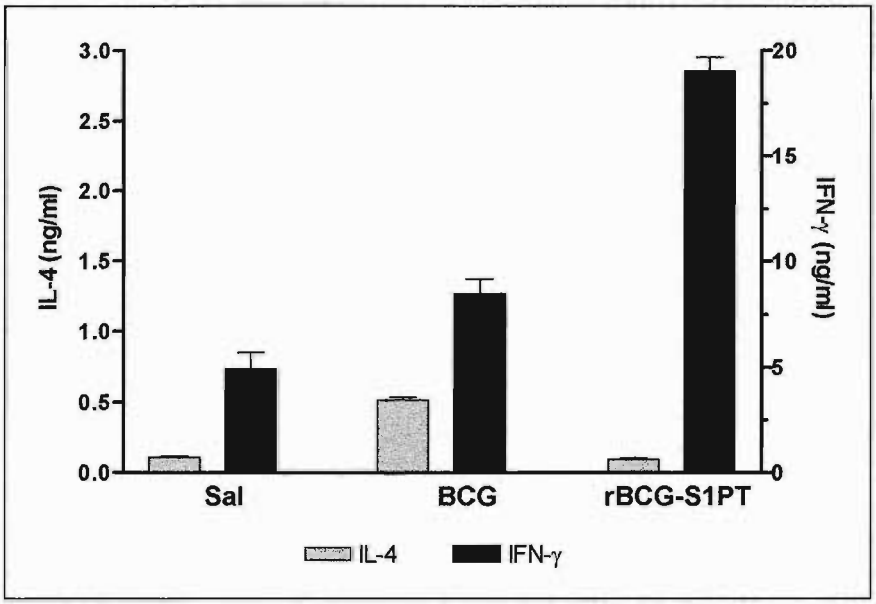


Figura 8. Produção antígeno-específica de IFN-γ e IL-4 de esplenócitos de camundongos imunizados com BCG ou rBCG-pNL71S1. A concentração de citocinas nos sobrenadantes de esplenócitos isolados de camundongos imunizados com BCG ou rBCG-pNL71S1 (rBCG-S1PT) foi estimada por ELISA como descrito em Materiais e Métodos, após estímulo com dPT, Sal, salina. As barras de erro indicam o desvio padrão.

4.7 Resposta proliferativa de esplenócitos induzida pela imunização com rBCG-pNL71S1

Linfócitos de baços isolados de camundongos imunizados com rBCG-pNL71S1 mostraram 50 % de aumento de proliferação em resposta ao estimulo com dPT quando comparados à salina ($p < 0,001$) ou 25 % em relação aos controles imunizados com BCG ($p < 0,05$) (Figura 9). Essa resposta proliferativa se correlacionou com a resposta celular. BCG sozinho também induziu algum grau de proliferação em resposta ao estímulo com dPT.

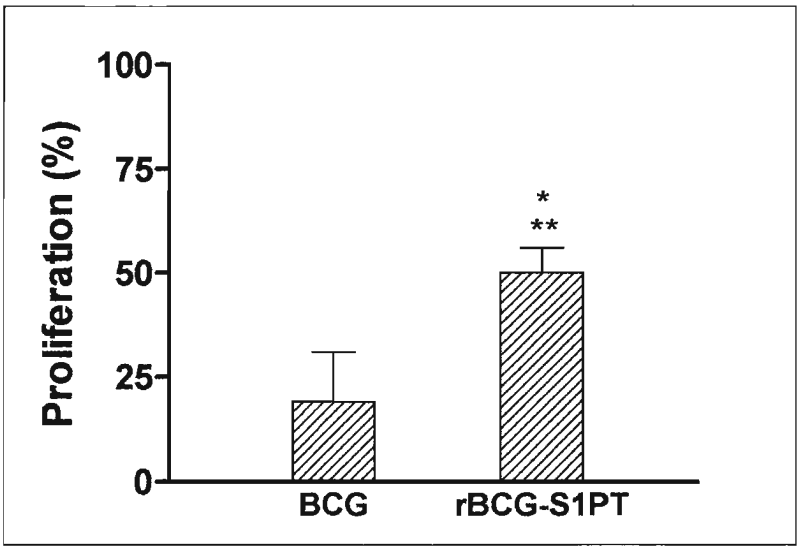


Figura 9. Proliferação de células de baço derivado de camundongos imunizados com BCG e rBCG-pNL71S1 sob estimulação com dPT. A proliferação após 72 h de estimulação com dPT foi medida pela conversão de MTT em formazan, como descrito em Materiais e Métodos. Os valores obtidos para salina (0,88 ± 0,10) foram subtraídos daqueles obtidos do BCG e rBCG-pNL71S1. As barras de erro indicam o desvio padrão. Teste de Students *, P<0,01 quando comparado com BCG; **, P<0,001 quando comparado com salina. Este experimento foi realizado pela Dra. Diva F. Cardoso (Imunopatologia – Instituto Butantan)

4.8 Proteção contra um desafio intracerebral com *B. pertussis*

Grupos de 5 camundongos Swiss machos foram imunizados i.p. com as seguintes preparações: Salina, BCG, rBCG-pNL71S1, rBCG-pNL73S1 ou DTP. Após 15 dias, todos os grupos foram submetidos a um desafio intracerebral com uma mínima dose letal (MDL), previamente determinada de *B. pertussis* virulenta, sob as mesmas condições usadas na certificação da potência da vacina comercial. Tanto rBCG-pNL73S1, expressando S1PT em fusão com a proteína β-lactamase, como rBCG-pNL71S1, expressando S1PT em fusão com a seqüência sinal da β-lactamase, induziram um alto nível de proteção, quando comparado com aquele obtido com a vacina DTP comercial (Tabela III). Camundongos imunizados com BCG mostraram níveis de sobrevivência um pouco maior que o grupo controle de

Salina ou um retardo maior em seu tempo de óbito, confirmando as propriedades imuno-estimulatórias desta vacina.

Tabela III - Desafio Intracerebral com *B. pertussis* em camundongos imunizados com rBCG-S1PT[a]

Grupos	Dia da morte após o desafio
Salina	7, 8, 8, 8, >13
BCG	6, 8, 10, >13, >13
rBCG-pNL71S1	8, >13, >13, >13, >13
rBCG-pNL73S1	>13, >13, >13, >13, >13
DPT	>13, >13, >13, >13, >13

[a] Grupos de cinco camundongos Swiss machos, previamente imunizados com 10^6 UFC/0,5 mL de BCG ou rBCG-pNL71S1, rBCG-pNL73S1, ou os controles Salina e DTP, foram desafiados IC com 18500 UFC de *B. pertussis* viva em 30 μl de salina e a sobrevida deles acompanhada por 12 dias.

Para confirmar estes resultados foi realizado um outro ensaio, composto de grupos de 10 animais. Os animais de cada grupo foram imunizados com 10^6 UFC de rBCG-pNL71S1 ou os controles positivo e negativo, DTP e Salina, respectivamente. Após 15 dias, estes camundongos foram submetidos a um desafio intracerebral com uma cepa virulenta de *B. pertussis* e a taxa de sobrevida dos animais imunizados acompanhada ao longo de duas semanas. rBCG-pNL71S1 induziu uma proteção de 78% contra 90 % nos animais imunizados com DTP (Figura 10). Embora alguma variabilidade no grau de proteção possa ser observada nos diferentes experimentos de desafio, de maneira geral, esses resultados demonstram que BCG expressando a subunidade S1 mutada e atóxica de PT, em fusão com diferentes fragmentos da β-lactamase, induziu um alto nível de proteção contra um desafio intracerebral com *B. pertussis*.

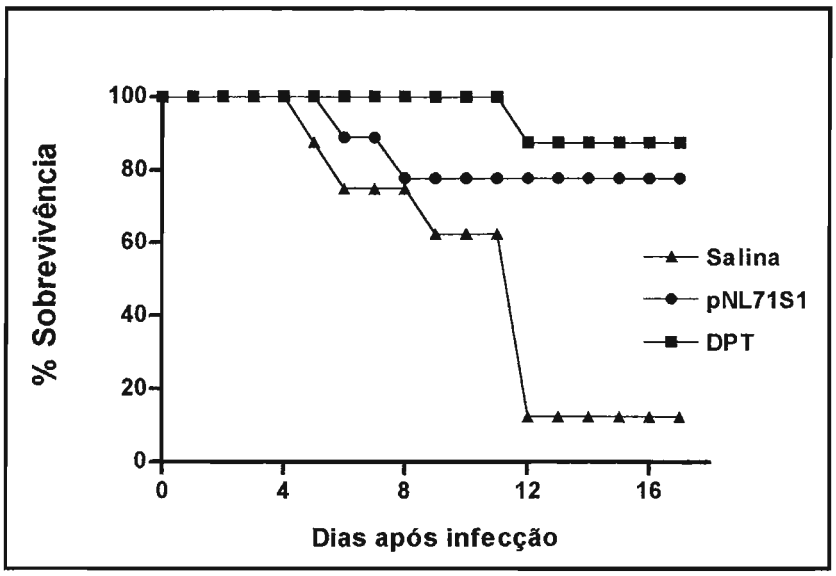


Figura 10. Desafio intracerebral com *B. pertussis* de camundongos imunizados com rBCG-pNL71S1. Grupos de 10 camundongos Swiss machos foram imunizados i.p. com 10^6 UFC/0.5 ml de rBCG-pNL71S1(círculos) ou 500 µl de Salina como controle negativo (triângulos) ou 1/8 da dose humana de DPT, como controle positivo (quadrados). Duas semanas após a imunização os animais foram submetidos a um desafio intracerebral com 18500 UFC de uma cepa virulenta de *B. pertussis*. Os animais foram monitorados por 17 dias.

4.9 Construção de vetores de expressão de CRD e S1CRD

O fragmento CRD foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico de *B. pertussis*. Os ologonucleotídeos usados para a obtenção de CRD geraram apenas o fragmento de tamanho esperado de 420 bp. Ao mesmo tempo, foi realizada a construção do vetor de expressão de S1PT em fusão com CRD (S1CRD). O códon de terminação de S1-PT foi substituído por uma tirosina e uma valina em adição a duas prolinas e fusionado ao fragmento de 420 pb de CRD, gerando uma pequena região de fusão de quatro aminoácidos. Estes fragmentos foram então clonados em pLA71 e pLA73, em fusão com os fragmentos da β-lactamase dando origem aos seguintes vetores de expressão: pNL71CRD e pNL73CRD ou pNL71S1CRD e pNL73S1CRD (Figura 4). No entanto,

devido à sobrecarga de trabalho da máquina de seqüenciamento naquele momento, estes vetores foram usados para transformar BCG competentes antes da confirmação de suas seqüências.

4.10 Expressão de CRD ou S1CRD em rBCG

Alíquotas de BCG competente foram transformados com os vetores de expressão pNL71CRD e pNL73CRD ou pNL71S1CRD e pNL73S1CRD. Os transformantes foram então selecionados em meio sólido contendo kanamicina e expandidos posteriormente em meio liquido, gerando rBCG-pNL71CRD, rBCG-pNL73CRD, rBCG-pNL71S1CRD e rBCG-pNL73S1CRD, respectivamente. Extrato total dos diferentes clones de rBCG-CRD e rBCG-S1CRD foram submetidos a SDS-PAGE seguido de *Western blot* usando anticorpo policlonal anti-FHA. Não foi possível observar a expressão do fragmento CRD no ensaio de *Western blot* em nenhuma das construções. Por outro lado, meses depois da obtenção e transformação destas construções em BCG competente, foi determinado por sequenciamento, que o códon de terminação das construções contendo o fragmento CRD (pNL71CRD, pNL71S1CRD, pNL73CRD e pNL73S1CRD) estava errado. Contudo, se a leitura além da seqüência do CRD fosse estendida, era obtido um códon de terminação que geraria fragmentos maiores que os esperados e com um pedaço do gene lac Z presente nos vetores da série pLA após o sítio de clonagem.

Entretanto, utilizando anticorpo anti-PT foi observada uma banda um pouco maior que a proteína de fusão S1PT com os fragmentos da β-lactamase nas amostras de rBCG-pNL71S1CRD e rBCG-pNL73S1CRD (Figura 11, 2-4, 8). Estes resultados indicaram que a proteína de fusão S1CRD, mesmo com um códon de terminação errado ou além do esperado, estaria sendo expressa, mas que esta proteína de fusão não se manteve estável. A

porção N-terminal da proteína de fusão, correspondente a S1PT, ainda carregaria um pequeno fragmento de CRD.

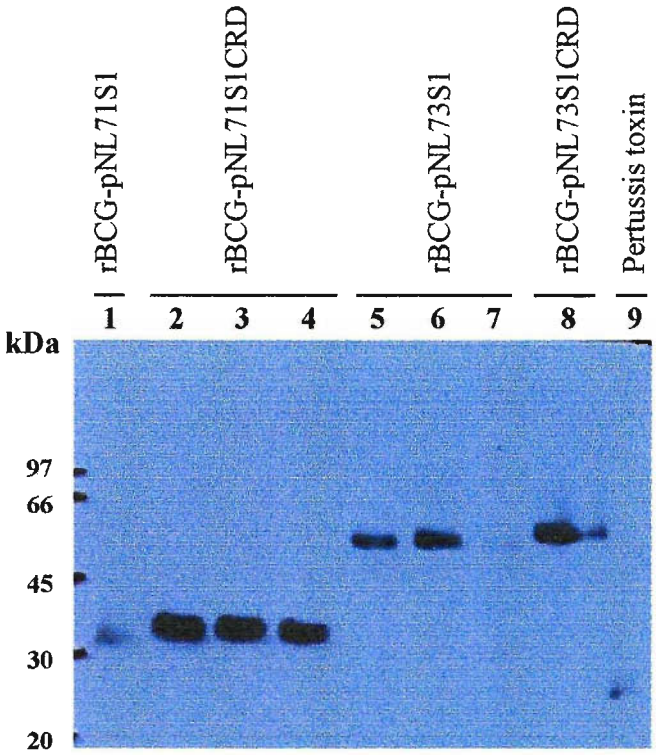


FIGURA 11. Western blot das amostras de rBCG transformados com pNL71S1, pNL73S1, pNL71S1CRD e pNL73S1CRD. Amostras de extrato total de rBCG foram separadas em SDS-PAGE, transferidos para uma membrana de nitro-celulose e analisados com um soro anti-PT. 2-4 e 5-7 representam amostras de diferentes clones. 9 contém uma amostra de PT purificada.

4.11 Resposta humoral de camundongos imunizados com rBCG-CRD ou rBCG-S1CRD

Grupos de 6 camundongos Swiss foram imunizados i.p. com diferentes concentrações das preparações vacinais de rBCG-pNL71CRD, rBCG-pNL71S1CRD e os controles Salina e BCG. Os soros foram coletados após 14 dias e analisados quanto à presença de anticorpos anti-FHA por ELISA. Foi observada uma formação dose-dependente de anticorpos anti-FHA nos soros dos animais imunizados com rBCG-

pNL71CRD ou rBCG-pNL71S1CRD (Figura 12), confirmando resultados obtidos inicialmente. Na concentração mais elevada ($1x10^7$ UFC) houve a formação do maior nível de anticorpos.

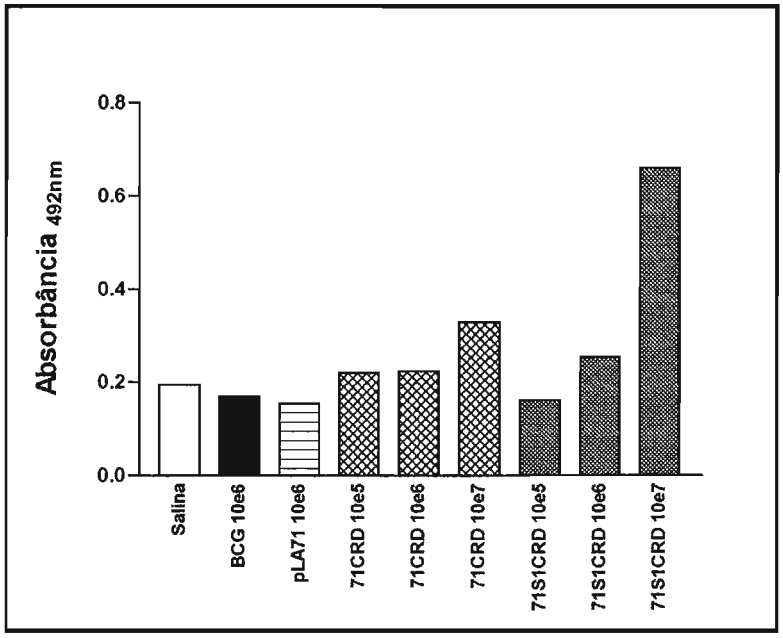


Figura 12. Resposta humoral anti-FHA após imunização com rBCG-pNL71CRD ou rBCG-pNL71S1CRD. Grupos de 6 camundongos Swiss machos foram imunizados i.p. com rBCG nas diferentes concentrações indicadas e os controles Salina, BCG ou rBCG-pLA71. Os soros foram coletados após 14 dias e analisados por ELISA para a presença de anticorpos anti-FHA. As leituras correspondem a uma única diluição (1:20) feita a 492 nm de absorbância. pLA71, rBCG-pLA71; 71CRD, rBCG-pNL71CRD e pNL71S1CRD, rBCG-pNL71S1CRD.

Os resultados de ELISA apontaram para a expressão do fragmento CRD, dado que a produção de anticorpos específicos contra FHA foi detectada no soro dos animais imunizados com rBCG-pNL71CRD ou rBCG-pNL71S1CRD e foi caracterizada como dose dependente. Os resultados mostram que a proteína de fusão de CRD a S1PT aumentou a resposta humoral contra FHA.

4.12 Resposta Celular Específica Induzida por rBCG-CRD e rBCG-S1CRD

Uma vez que os dados de resposta imunológica induzida pela vacina rBCG-pNL71S1PT indicaram uma resposta celular predominantemente do tipo Th1, e que esta vacina alcançou elevados níveis de proteção contra um desafio intracerebral, os mesmos ensaios foram realizados com as vacinas rBCG-pNL71CRD, rBCG-pNL71S1CRD ou a combinação de rBCG-pNL71S1 com rBCG-pNL71CRD. Grupos de 4 camundongos Swiss foram inoculados com estas preparações vacinais, em diferentes concentrações, ou com os controles Salina ou BCG. Quinze dias após a imunização, esplenócitos isolados do baço desses animais foram cultivados sob o estímulo de dPT ou FHA e a quantidade de IFN-γ ou IL-4 presentes no sobrenadante dessas culturas quantificada por ELISA. Pôde-se observar que uma dose mais elevada de rBCG-pNL71S1 (10^7 UFC) reduziu a produção de IFN-γ (Figura 13.A). Foi detectada baixa concentração de IL-4 em todas as amostras (não apresentado). rBCG-pNL71S1CRD induziu menores níveis de INF-γ do que rBCG-pNL71S1 ou a combinação de rBCG-pNL71S1 + rBCG-pLN71CRD, indicando que a fusão pode induzir uma modificação na estrutura de S1, que reduziria seu potencial de indução de resposta Th1 contra PT. Já a combinação de rBCG-pNL71S1 com rBCG-pNL71CRD induziu níveis de IFN-γ comparáveis aos da vacina rBCG-pNL71S1 sozinha, revelando que a presença de rBCG-pNL71CRD associada a rBCG-pNL71S1 não se soma aos valores de rBCG-71S1 sozinho, mas também não interfere em seu efeito.

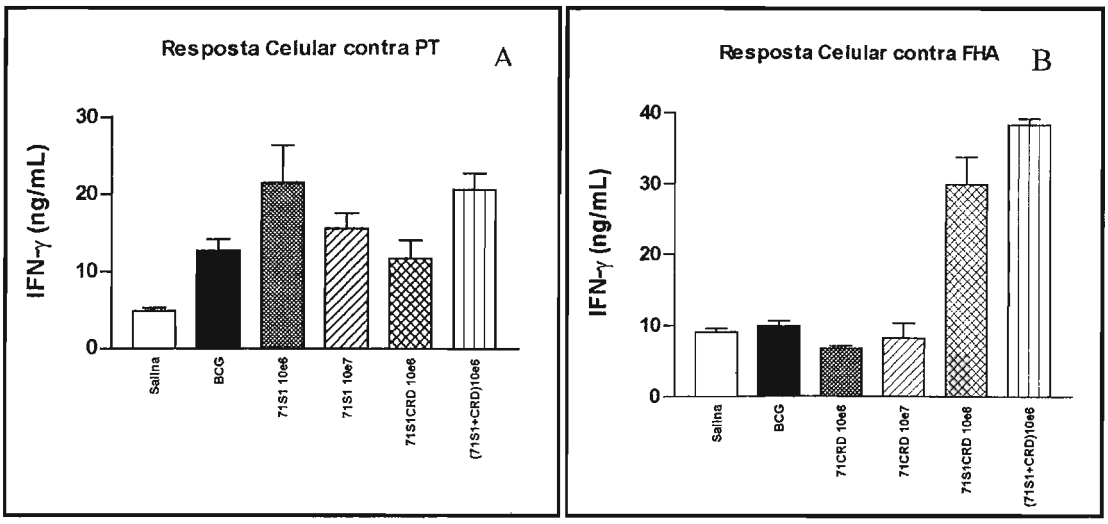


Figura 13. Produção de IFN-γ PT-específica (A) ou FHA-específica (B) nos sobrenadantes de culturas de esplenócitos derivados de baços de camundongos imunizados com rBCG. Grupos de 4 camundongos foram imunizados com as preparações vacinais e concentrações indicadas. As concentrações de citocinas foram estimadas como descrito em Materiais e Métodos após estimulação com dTP ou FHA. As barras de erro indicam o desvio padrão. 71S1, rBCG-pNL71S1; 71CRD, rBCG-pNL71CRD e 71S1CRD, rBCG-pLN71S1CRD.

Quanto à resposta celular específica contra FHA, pôde-se observar que a expressão de CRD em fusão com S1PT (rBCG-pNL71S1CRD) ou as vacinas combinadas (rBCG-pNL71S1 + rBCG-pNL71CRD) aumentou a formação de IFN-γ (Figura 13.B). No entanto, não foi detectada a formação de IFN-γ nas culturas de esplenócitos derivados dos animais imunizados apenas com rBCG-pNL71CRD. Sob o estímulo de FHA houve um aumento significativo na produção de IFN-γ nas células derivadas dos camundongos imunizados com rBCG-pNL71S1CRD ou com a combinação rBCG-pNL71S1+rBCG-pNL71CRD, quando comparadas com as mesmas amostras sob o estímulo de dPT. Outro dado interessante foi que células derivadas de animais imunizados com rBCG-pNL71CRD, não responderam ao estímulo com FHA e a produção de IFN-γ somente ocorreu quando o

fragmento CRD estava em combinação ou em fusão com S1PT. Talvez a presença de S1PT seja importante para modular uma resposta celular contra FHA.

4.13 Dosagem de IFN-γ no soro dos animais imunizados com rBCG expressando os antígenos de *B.pertussis*

Foi realizada também a dosagem de IFN-γ no soro dos mesmos animais utilizados no ensaio de resposta celular do item **4.12**. Estes animais foram sangrados um dia antes da coleta dos baços. A quantificação de IFN-γ no soro dos animais imunizados com rBCG não representa uma resposta tão específica quanto aquela feita no sobrenadante de cultura de esplenócitos isolados destes mesmos animais. Neste último, os animais são imunizados previamente e as células dos baços destes animais sofrem um estímulo específico. Por outro lado, a produção de IFN-γ presente no soro destes animais imunizados, seria devida ao o estímulo produzido apenas pela administração da vacina, sem nenhum estímulo posterior. Todavia, os dois métodos se complementam e a observação de semelhanças no padrão da resposta celular nos dois casos é uma forte indicação da legitimidade dos resultados.

A concentração de IFN-γ no soro dos animais imunizados com as diferentes concentrações de rBCG-pNL71S1 mostrou que a dose de $1x10^6$ UFC/animal produziu o maior nível de IFN-γ (Figura 14). Este dado confirmou os resultados obtidos no ensaio de resposta celular específica e mais uma vez indicou ser esta a melhor dose para se atingir uma imunização mais efetiva. Novamente verificou-se que rBCG-pNL71CRD isoladamente não induziu a formação de IFN-γ.

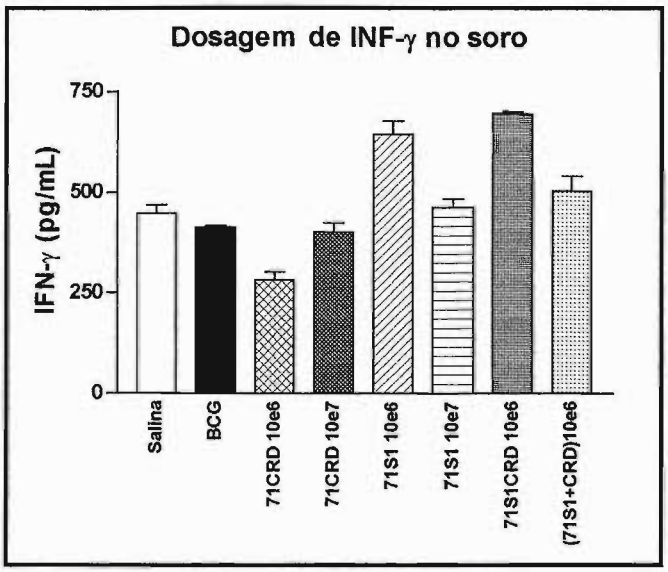


Figura 14. Detecção de IFN-γ no soro de camundongos imunizados com rBCG. Animais foram imunizados com amostras de rBCG em diferentes concentrações ou combinações indicadas no gráfico e 14 dias após a imunização o soro desses animais foi coletado e as quantidades de citocina determinada de acordo com Materiais e Métodos. As barras de erro indicam o desvio padrão. 71CRD, rBCG-pNL71CRD; 71S1, rBCG-pNL71S1 e 71S1CRD, rBCG-pNL71S1CRD.

Foi observado um aumento na concentração de IFN-γ no soro dos animais imunizados com rBCG-pNL71S1CRD, mas não com a combinação de rBCGpNL71S1 e rBCG-pNL71CRD. Embora no ensaio com estímulo de dPT, rBCG-pNL71S1CRD não tenha elevado a formação de IFN-γ (Figura 13.A), esta mesma, sob o estímulo com FHA elevou e isto provavelmente se refletiu nos níveis de INF-γ no soro. Os camundongos imunizados com a combinação rBCG-pNL71S1 e rBCG-pLN71CRD não revelaram aumentos significativos dos níveis IFN-γ no soro.

4.14 Proteção induzida pela vacina rBCG-pNL71CRD

Animais Balb/c machos imunizados com rBCG-pLN71CRD foram submetidos a um desafio IC com uma cepa virulenta de *B. pertussis*, 6 meses após serem imunizados, e mostraram um tempo de sobrevida maior que os controles, indicando uma possível

proteção nestes animais contra *B. pertussis*. Para se confirmar o resultado de proteção, camundongos Swiss machos imunizados com rBCG-pNL71CRD e os respectivos controles positivos e negativos receberam uma MDL de *B. pertussis* virtulenta e a sobrevida acompanhada por 12 dias. Neste experimento inicial a vacina mostrou-se também eficaz (Tabela IV), comparável a vacina convencional DPT.

Tabela IV - Desafio Intracerebral com *B. pertussis* em camundongos imunizados com rBCG-pNL71CRD[a]

Grupos	Dia da morte após o desafio
Salina	7, 8, 8, 8, >13
BCG	6, 8, 10, >13, >13
rBCG-pNL71CRD	>13, >13, >13, >13, >13
DPT	>13, >13, >13, >13, >13

[a] Grupos de cinco camundongos machos Swiss, foram imunizados com de BCG ou rBCG-CRD (10^6 UFC/0,5 mL) ou os controles Salina e DTP e 15 dias após a imunização foram desafiados IC com 1 MDL de uma cepa patogênica de *B. pertussis*. A sobrevida dos animais foi acompanhada ao longo de 12 dias.

4.15 Curva de crescimento das preparações vacinais

Após vários ensaios que confirmaram os resultados de proteção da vacina rBCG-S1PT contra um desafio IC com uma cepa virulenta de *B. pertussis*, novas preparações vacinais foram feitas para ensaios futuros. Estas preparações foram feitas a partir da vacina estoque, portanto, fez-se necessário descongelar uma preparação vacinal armazenada e passá-la para um meio de cultura novo, sendo posteriormente armazenada como vacina da mesma forma que as primeiras. Todavia, os resultados obtidos em alguns ensaios de desafio IC feitos com estes lotes vacinais indicaram uma redução na eficácia da imunização ou proteção destas preparações, embora a viabilidade destas preparações quando avaliada pelo número de UFC e pela expressão dos antígenos conservarem-se inalteradas. Diante disso, procurou-se analisar um outro parâmetro que pudesse distinguir ou apontar alterações entre

as diversas preparações. Foi feito então curvas de crescimento de diversas preparações vacinais em meio líquido e observado sua velocidade de crescimento (Figura 15). Apenas as vacinas sem passagens em meio líquido e/ou descongelamento (BCG nativo ou rBCG) apresentaram curvas de crescimento rápido e uniformes entre si. As demais vacinas, que correspondem aos lotes vacinais preparados a partir do primeiro, mas que sofreram 3 passagens, começaram a crescer e pararam muito antes de atingirem a fase exponencial. Este fato levantou a hipótese de que a redução na eficácia das imunizações destas preparações vacinais poderia está associada às sucessivas passagens sofridas por tais preparações em meio líquido. Estes resultados apontaram para a necessidade de se trabalhar com preparações com baixo número de passagens. Para examinar esta hipótese, curvas de crescimento em meio líquido dessas amostras e de amostras recém-preparadas foram feitas usando como parâmetro a velocidade de crescimento dessas preparações vacinais.

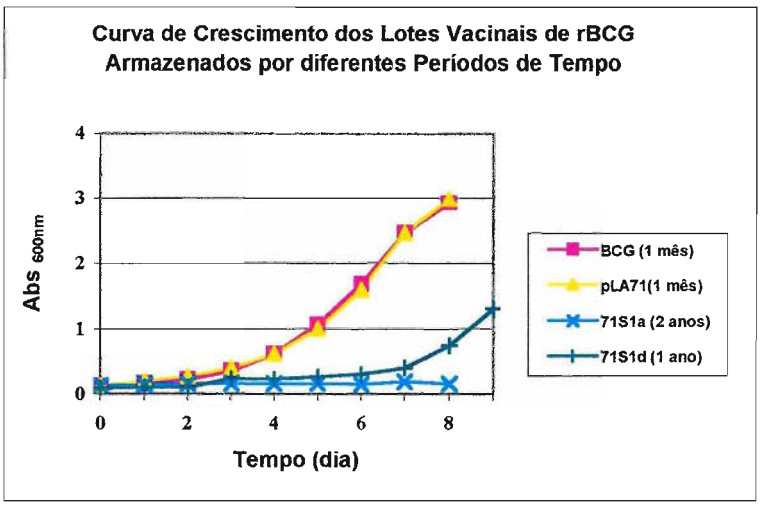


Figura 15. Curva de crescimento dos lotes vacinais de rBCG- congelados por longos períodos de tempo. BCG e pLA71 (rBCG-pLA71) representam lotes vacinais recém preparados e armazenados por um mês, antes de serem descongelados para a curva de crescimento (Materiais e Métodos). As demais amostras foram descongeladas após os períodos de tempo indicados e suas curvas de crescimento comparadas em relação aos lotes

novos. 71S1a, rBCG-pNL71S1 armazenado por 2 anos; 71S1d, rBCG-pNL71S1 armazenado por 1 ano.

Pensou-se então num ensaio que mimetizasse as condições que estariam levando a perda da eficácia ou velocidade de crescimento dessas preparações vacinais. Este ensaio consistiu em: (i) descongelar um lote vacinal recém-preparado, ou seja, feito a partir de uma colônia retirada da placa, expandida em meio líquido e armazenado a –70 °C; (ii) expandi-lo novamente em meio líquido e (iii) novamente armazená-lo a – 70 °C, para em seguida começar um novo ciclo, a partir desta vacina previamente congelada. Esse ciclo foi repetido três vezes, possibilitando assim se obter amostras de lotes vacinais com 3 passagens em meio líquido (Figura 16.A-C). Os resultados com as duas primeiras passagens não revelaram diferenças significativas no padrão das curvas de crescimento das diferentes amostras (Figura 16.A-B), apenas na 3ª passagem (Figura 16.C) pôde-se observar alguma alteração, porém muito diferente dos lotes antigos (Figura 15).

Todavia, deve-se ressaltar que os lotes vacinais antigos (Figura 15) e apresentados com perda de sua eficácia imunizadora ou velocidade de crescimento, se encontravam armazenadas a –70 °C por períodos de tempo que variavam entre 1 a 2 anos, contrastando enormemente com as amostras apresentadas na Figura 16 (A-C), que não levaram mais que uma semana para serem descongeladas e se iniciar um novo ciclo. Logo, é possível que o tempo de armazenamento também tenha seu papel na redução da velocidade de crescimento das preparações vacinais.

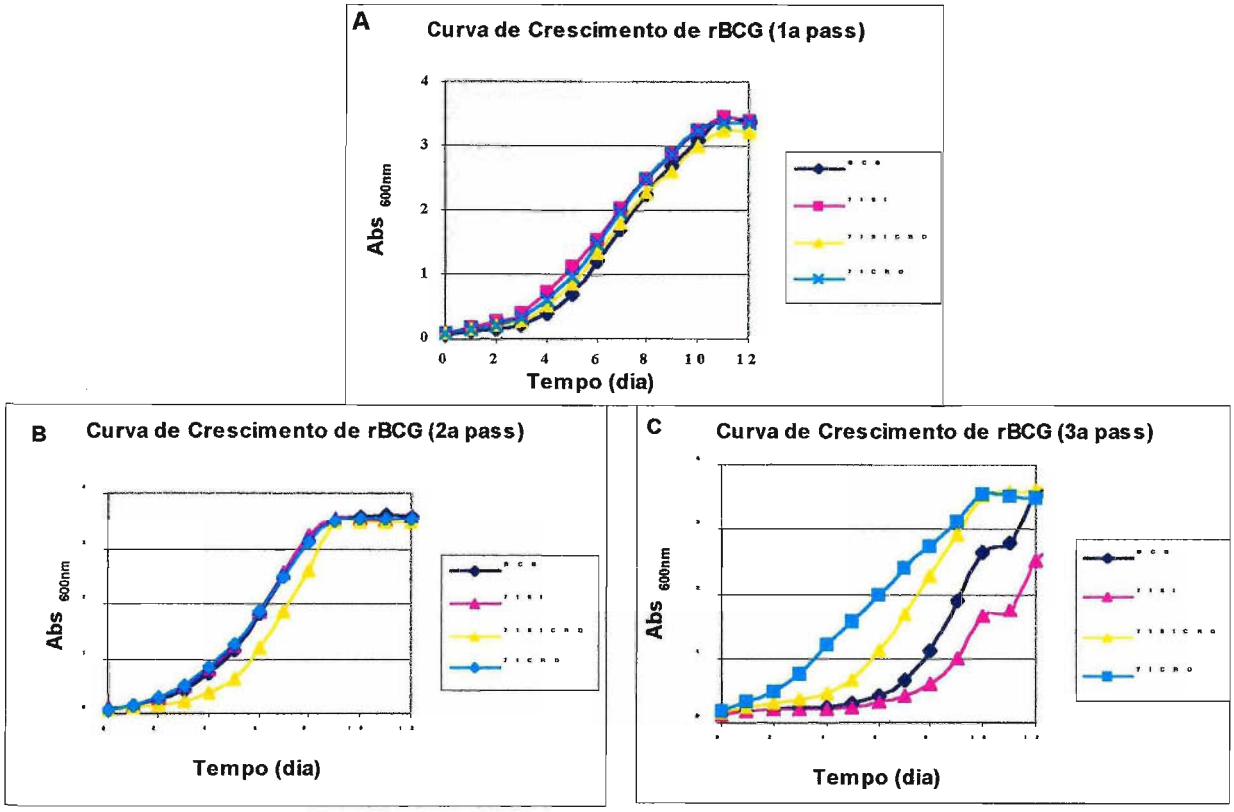


Figura 16. Curva de Crescimento dos lotes vacinais de BCG ou rBCG com baixo número de passagens. Preparações vacinais foram submetidas a 3 ciclos de descongelamento e expansão em cultura liquida. A, 1° descongelamento; B, 2 passagens, A recongeladas, 2 ° descongelado; C, 3 passagens, preparações vacinais feitas a partir de B. BCG, vacina não recombinante; 71S1, rBCG-pNL71S1; 71S1CRD, rBCG-pNL71S1CRD; 71CRD, rBCG-pNL71CRD.

4.16 Clonagem dos antígenos de *B. pertussis* nos vetores de complementação

Para co-expressar os antígenos de Pertussis S1PT ou CRD e o gene de complementação para lisina (lysA) no mesmo rBCG, estes genes foram organizados como um operon sintético sob o controle dos promotores pBlaF*, phsp60 ou pα-Ag, originando os plasmídeos pNL71S1lysA (Figura 17), pJHN137CRD e pJHN152CRD (Figura 18). A

tradução do gene lysA nos Operons sintéticos foi otimizada através da clonagem de uma seqüência consenso Shine-Dalgarno (RBS) anterior ao códon de iniciação ATG deste gene. Estas construções foram então introduzidas nas cepas auxotróficas para lisina, Smg-270 ou rBCG-P-1604, e as colônias transformadas foram selecionadas quanto à capacidade de crescerem em meio não suplementado com lisina.

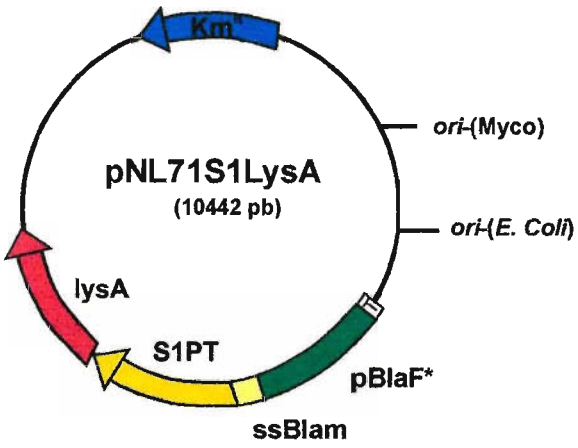


Figura 17. Representação esquemática do vetor de complementação pNL71S1LysA contendo o gene S1-PT. Este vetor contem as origens de replicação, *ori*-(*E. coli*) e *ori*-(myco) e o gene de resistência a kanamicina, Km. pNL71S1lysA é derivado de pNL71S1, onde o gene lysA mais a seqüência de ligação a ribossomo (RBS) foi excisado de pJH137 e clonado naquele vetor sob a forma de um Operon sintético

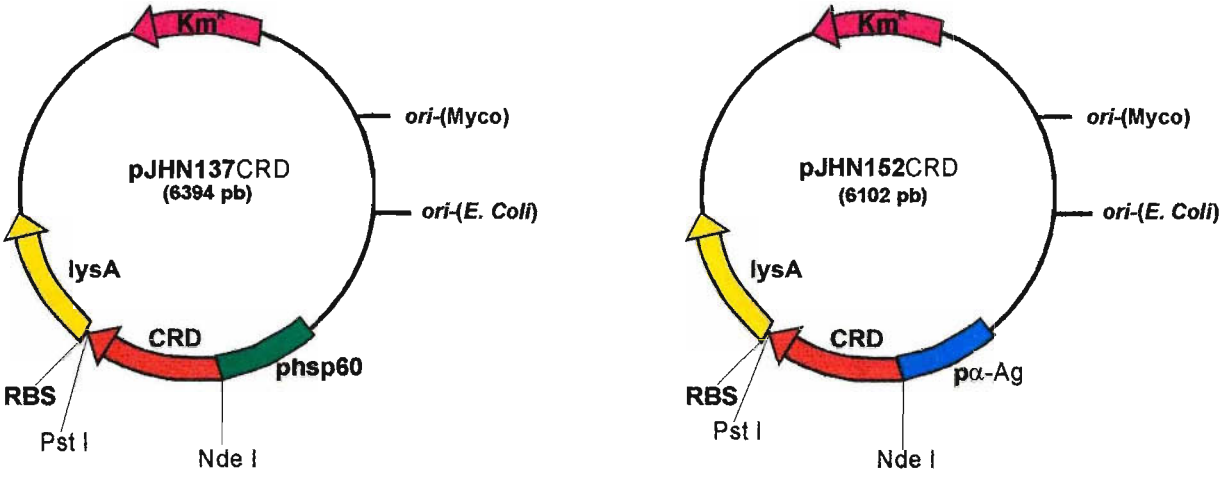


Figura 18. Representação esquemática dos vetores de complementação pJHN137CRD e pJHN152CRD. Os vetores pJHN137CRD e pJHN152 possuem as origens de replicação, *ori-(E. coli)* e *ori-*(myco) e o gene de resistência a kanamicina, Km. Estes vetores são derivados de pJH137 e pJH152, onde o antígeno original destes vetores mais a seqüência sinal foram substituídos pela seqüência CRD.

O plasmídeo pMPN3S1 possui o gene lysA sob o controle de um promotor próprio, GroEL (Figura 19).

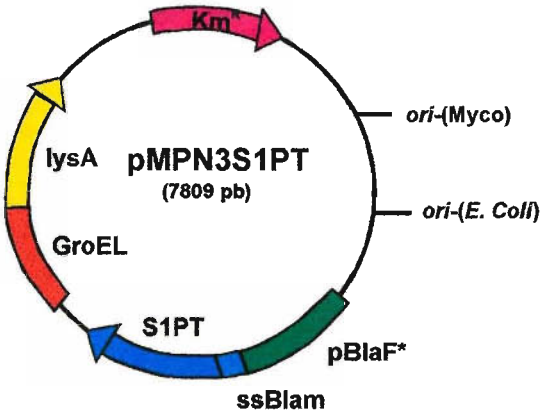


Figura 19. Representação esquemática do vetor de complementação pMPN3S1. O vetor pPMPN3S1PT possui as origens de replicação, *ori-(E. coli)* e *ori-*(myco) e o gene de resistência a kanamicina, Km. pPMPN3S1PT é derivado de pMP3, onde o cassete de expressão de pNL71S1 foi excisado e clonado em pMP3 separado do gene lysA, que possui promotor próprio, GroEl.

As cepas auxotróficas rSmg-270 e rBCG-P-1604 foram transformadas com as construções citadas anteriormente e mostraram complementação. O número de colônias obtidas nas placas contendo lisina foi o mesmo para as placas não suplementadas com lisina. O nível de expressão de S1PT sob o controle do promotor pBlaF* em rBCG-P-1604 transformados com pNL71S1lysA ou pMPN3S1 foi igual àquele obtido para rBCG não auxotrófico transformado com pNL71S1 (Figura 20).

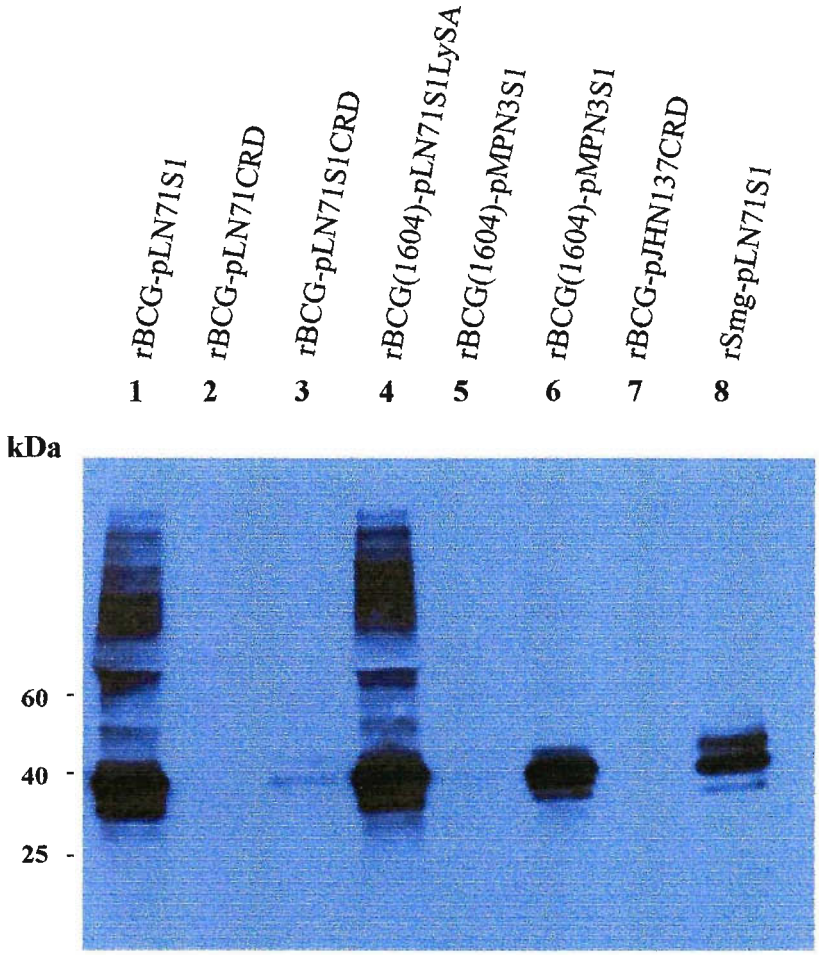


Figura 20. Amostras de rBCG e rBCG-P-1604 transformados com os vetores de complementação contendo S1-PT: 1-3, rBCG transformados com os vetores pNL71S1, pNL71CRD e pNL71S1CRD, respectivamente. 4; rBCG-P-1604 transformado com o vetor de complementação pNL71S1lysA; 5 e 6, rBCG-P-1604 transformados com o vetor de complementação pMPN3 e 7, rBCG transformado com o vetor de complementação pJHN137CRD. 8, representa uma amostra de rSmg transformada também com o vetor pNL71S1. Foi usado um soro anti-PT para a análise das amostras.

As cepas auxotróficas foram transformadas com os vetores contendo CRD. Extratos protéicos dos clones obtidos de rSmg-270 foram expandidos e em meio liquido

apresentaram expressão do fragmento CRD com peso molecular esperado (15 kDa) sob o controle dos promotores phsp60 e pα-Ag, usando um soro anti-FHA (Figura 21).

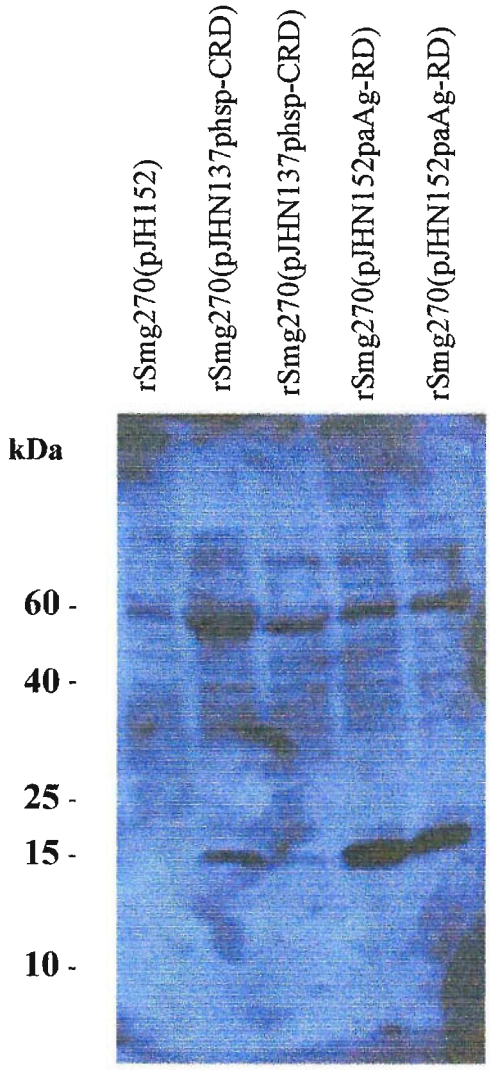


Figura 21. Amostras de rSmg-270 transformados com os vetores de complementação contendo o fragmento CRD. rSmg transformados com o vetor pJH137CRD. Neste vetor CRD está sob o controle do promotor Hsp60, sem seqüência sinal. Poços 10 e 11, rSmg-270 transformados com o vetor pJH152CRD. Neste vetor o CRD está sob o controle do promotor α-Ag, sem seqüência sinal. Como controle negativo foram usadas as amostras contidas nos poços 1-7. Usou-se um soro anti-FHA para a análise das amostras.

5. DISCUSSÃO

5.1 Expressão de S1PT em rBCG

Algumas tentativas têm sido feitas para se desenvolver vacinas melhores contra *B. pertussis*. Desde que PT é considerado o mais importante imunógeno de *B. pertussis*, muitos sistemas testados são baseados nesta proteína, seja esta geneticamente detoxificada ou não (EDWARDS, *et al*; 1995; NENCIONI, *et* al, 1991; SATO, *et al*, 1984). Mutantes de *B. pertussis* expressando PT inativo mostraram imunogenicidade equivalente a da vacina convencional que é detoxificada quimicamente (PIZZA, *et al*, 1989) e PT-9K/129G purificada mostrou propriedades comparáveis à vacina PT acelular (NENCIONI, *et* al, 1990). Tentativas de se expressar as cinco subunidades de PT em *E. coli* só tiveram êxito a partir da fusão dessas cinco subunidades a outras proteínas (NICOSIA, *et al*, 1987). Uma cepa recombinante de *S. typhimurium aroA* expressando as cinco subunidades de PT, falhou em proteger camundongos contra um desafio com *B. pertussis* virulento, provavelmente devido a um processamento incompleto das subunidades (DALLA, *et al*, 1998). Das cinco subunidades que compõe a holotoxina PT, a subunidade S1 tem sido caracterizada como o motivo mais imunogênico (DE MAGISTRIS, *et al*, 1989) e imunização passiva com um anticorpo monoclonal anti-S1PT protegeu camundongos contra um desafio com *B.pertussis* virulento (SATO & SATO, 1990). S1PT tem sido expressa em fusão ou não em bactérias recombinantes como *E. coli* e *B. subtilis*, e a proteína purificada mantém a atividade e suas propriedades imunogênicas (LOCHT, *et al*, 1987; BARBIERI, , *et al*, 1987; RUNEBERG, *et al*, 1987; OLANDER, *et al*, 1991). A fusão de S1PT, detoxificado geneticamente, ao fragmento C da toxina tetânica (FC) aumenta a expressão da proteína de fusão em *E. coli* (BOUCHER, *et al*, 1994). Com as crescentes evidências sobre as vantagens de vacinas recombinantes baseadas em vetores

vivos, S1PT tem sido expressa sozinha ou em fusão com FC em vacinas de diferentes cepas de Salmonella, *E. coli* invasiva, *Streptococcus gordonii* e BCG, induzindo uma proteção por anticorpos ou resposta celular contra PT (ABOMOELAK, *et al*, 1999; BARRY, *et al*, 1996; LEE, *et al*, 1999). Proteínas híbridas de S1PT em fusão com regiões N-terminal ou C-terminal de FC foram expressas em elevados níveis em Salmonella, no entanto, a configuração dos antígenos constituindo a fusão mostrou-se crítica, uma vez que S1PT em fusão com a região amino-terminal do FC foi menos efetivo em gerar anticorpos anti-FC do que S1PT fusionada a sua região carboxi-terminal (BARRY, *et al*, 1996). Uma construção similar a esta também foi obtida em rBCG (ABOMOELAK, *et al*, 1999). Neste trabalho foi realizada a expressão de S1PT em fusão com o FC sob o controle de dois diferentes promotores, p*hsp*60 e o promotor do antígeno 85A mais a sua seqüência sinal. Embora a expressão do antígeno híbrido tenha sido obtida nas duas construções, somente o sistema sob o controle do promotor p*hsp*60 rendeu uma linhagem de rBCG capaz de induzir uma resposta imunológica humoral e celular específica. Porém os anticorpos gerados foram dirigidos especificamente contra a parte do FC demonstrando atividade neutralizante da toxina tetânica em um modelo de desafio *in vivo*, enquanto a produção de interleucina-2 por esplenócitos dos animais imunizados foi estimulada pelas duas partes da molécula.

Em nosso trabalho foi construído um BCG recombinante expressando S1PT, em fusão com a seqüência sinal de exportação da β-lactamase (rBCG-pNL71S1) ou com a β-lactamase inteira (rBCG-pNL73S1), sob o controle do promotor pBlaF*. As proteínas em fusão são relativamente estáveis, mostrando poucos produtos de degradação em rBCG-pNL73S1. Embora a intensidade da banda de S1PT tenha sido significativa nas diferentes construções, não foi possível visualizá-las diretamente em SDS-PAGE, quando coradas

com Coomassie blue, talvez porque proteínas majoritárias de BCG co-migraram com a proteína recombinante. As duas construções direcionaram a proteína de fusão para a parede celular, e uma pequeníssima parte para o meio extracelular, indicando que a exportação foi iniciada, mas provavelmente bloqueada pelos densos componentes da parede celular. A expressão de S1PT em fusão com FC em rBCG, citado anteriormente, mostrou que a fusão de S1PT com a seqüência sinal de 85A não levou a exportação da proteína heteróloga, o que foi atribuído ao longo tamanho desta. Embora outros estudos tenham mostrado que a seqüência sinal da β-lactamase pôde exportar outras proteínas heterólogas expressas em BCG e que a proteína de fusão em rBCG-pNL71S1 apresentada aqui tenha um reduzido tamanho, a completa exportação não foi atingida, indicando que o tamanho não é o único fator no transporte desta proteína através da parede celular micobacteriana.

Além do nível de expressão e localização de um antígeno heterólogo num vetor vivo, um outro fator que influência a indução de uma resposta imunológica efetiva neste tipo de vacinas é a estabilidade do sistema de expressão. Vetores integrativos são conhecidos por mostrarem menor nível de expressão, mas uma maior estabilidade. Por outro lado, plasmídeos possibilitam um nível de expressão maior, pelo fato de haver até 5 cópias por bactéria, porém apresentam menor estabilidade *in vivo*. Embora muitos sistemas de expressão micobacterianos compreendendo antígenos diferentes tenham sido investigados, pouco tem sido feito para caracterizar a estabilidade destes sistemas baseados em plasmídeos. Neste trabalho, camundongos foram inoculados com rBCG-pNL71S1 e o crescimento de rBCG coletado do baço monitorado por dois meses. Após um mês, o número de colônias resistentes a kanamicina foi de 86 % do número de colônias crescidas na ausência de antibióticos. Em dois meses, 85 % das colônias de rBCG recuperadas do

baço ainda eram resistentes a kanamicina, indicando que esse vetor de expressão é relativamente estável. O número total de clones rBCG recuperados do baço é comparável àquele obtido de BCG não recombinante inoculado em camundongos, mostrando que o vetor de expressão transfectado não alterou a persistência do BCG em camundongos. O baço dos animais remanescentes, 4 meses após a primeira imunização, continuaram apresentado rBCG expressando S1PT.

Camundongos Balb/c imunizados com rBCG-pNL71S1 produziram baixos níveis de anticorpos anti-PT, ocorrendo o mesmo para a vacina DTP, quando acompanhadas por seis meses (Figura 7). Em 15 dias de imunização com rBCG-pNL71S1, camundongos Swiss não apresentaram presença de anticorpos anti-PT em seus soros (dado não mostrado). Esse experimento está de acordo com resultados prévios, sugerindo que a resposta humoral contra PT não é o componente mais importante para indução de proteção (PEPPOLONI, *et al*, 1991), já que a vacina convencional DTP é considerada muito eficiente. Por outro lado, tem aumentado as evidências que sugerem a importância da indução de uma resposta celular contra PT para proteção contra *B. pertussis*. (PEPPOLONI, *et al*, 1991; MILLS, *et al*, 1993; MILLS, 2001). Estudos recentes têm mostrado que rBCG expressando a proteína de fusão S1-FC sob o controle do promotor p*hsp*60 induz uma fraca, mas significante, resposta celular contra PT, o que foi determinado pela produção de IL-2, uma linfocina antígeno-específica (SATO, *et al*, 1984). Em nosso estudo, células do baço obtido de camundongos imunizados 2 semanas antes com rBCG-pNL71S1, mostraram um significante aumento na produção de IFN-γ e na resposta proliferativa sob o estimulo de PT detoxificado. De maneira geral, os níveis de IFN-γ foram mais altos do que os de IL-4, sugerindo que houve a indução de uma resposta do tipo Th1 dominante. Este padrão de

citocinas correlaciona-se positivamente com aqueles observados em infecções por *B. pertussis* ou em pacientes convalescentes de coqueluche (PEPPOLONI, *et al,* 1991) nos quais há a indução de uma proteção mais eficaz do que a vacinação.

Camundongos imunizados com rBCG-S1PT apresentaram alto nível de proteção contra um desafio IC com *B. pertussis* viva, que se correlacionou com a indução de uma resposta imunológica celular específica contra PT (produção de IFN-γ) e proliferação (Figuras 8 e 9). Estes resultados reforçam a importância da indução de imunidade celular na proteção contra infecção causada por *B. pertussis*. Nossos resultados também demonstraram que o promotor pBlaF* dirigindo a expressão de um antígeno em fusão com a seqüência sinal da β-lactamase pode levar à expressão em BCG e à apresentação adequada de antígenos heterólogos ao sistema imunológico. Uma vacina mais efetiva contra *B. pertussis* também deveria incluir antígenos envolvidos na colonização, e rBCG expressando CRD poderia complementar com rBCG-S1PT para a indução de uma resposta imunológica mais eficiente.

5.2 Expressão de CRD e S1CRD em rBCG

Uma vez que FHA media a adesão da bactéria nas células epiteliais da traquéia e do pulmão, tem-se postulado que uma resposta de anticorpo efetiva contra FHA poderia evitar a infecção (CAHILL, *et al,* 1995). Embora a presença de FHA inteira nas vacinas acelulares desempenhe um papel importante, vários grupos têm proposto um desenho mais racional de FHA, buscando determinantes antigênicos nesta molécula que possam ser usados como subcomponentes em futuras vacinas (DI TOMMASO, *et al,* 1991; LEININGER, *et al,* 1997; WILSON, *et al,* 1998; PIATTI, *et al*, 1999; ALONSO, *et al,* 2002).

Esta proteína possui diversos domínios com especificidades diferentes para os receptores na célula do hospedeiro. Destes domínios, três têm sido bem definidos e mapeados em toda a extensão da proteína: um sítio de ligação glicosaminoglicano N-terminal (HANNAH, *et al,* 1994; MENOZZI, *et al*, 1994), uma seqüência arginina-glicina-aspartato (RGD) (RELMAN, *et al,* 1990) e o domínio de reconhecimento a carboidratos (CRD) (PRASAD, *et al,* 1993). Este último tem sido estudado pelo grupo da Dra. Tuomanem como um possível subcomponente de uma vacina acelular, uma vez que anticorpos feitos contra essa região poderiam evitar a colonização da bactéria no trato respiratório (LIU, 1997). Portanto, decidimos usar o CRD como fragmento antigênico com potencial para inibir a colonização por *B. pertussis*.

Foram construídos diversos vetores de expressão contendo o fragmento CRD ou a fusão S1CRD. No entanto, os genes de CRD foram amplificados sem um códon de terminação, devido a um erro no desenho dos oligonucleotídeos, o que produziu uma proteína com uma fusão com 400 pb da região C-Terminal do gene lacZ que codifica para a β-galactosidase. Além disto, devido a um atraso no seqüenciamento, esta mutação foi detectada somente quando o trabalho estava bastante adiantado.

Não foi possível observar a expressão de CRD ou a fusão S1CRD em extrato de rBCG transformados com estes vetores, usando anticorpo anti-FHA ou monoclonal anti-CRD. No entanto, foi possível observar uma banda de peso molecular pouco maior que S1PT, em extratos de rBCG-pNL71S1CRD revelados com anticorpos anti-PT, indicando que a banda observada seria de S1PT carregando uma pequena porção da fusão.

Estes resultados indicaram que a proteína de fusão é expressa, mas não é estável. Além da possibilidade da fusão S1-CRD não ser estável, outra possível explicação seria que a fusão com o fragmento da β-galactosidase poderia estar desestabilizando a molécula.

No entanto, camundongos imunizados com estas construções (rBCG-pNL71CRD ou rBCG-pNL71S1CRD), apresentaram formação de anticorpos anti-FHA de forma dose dependente. Estes resultados sugerem que embora as proteínas recombinantes expressas não sejam estáveis o suficiente para serem detectadas por *Western blot*, elas são produzidas e estáveis o suficiente para induzir uma resposta imunológica *in vivo*.

Visando obter a expressão de CRD em BCG através de um sistema que não contivesse genes de resistência a antibióticos, foram utilizadas cepas de BCG e *M. smegmatis* auxotróficas para lisina pela deleição do gene lysA, as quais seriam complementadas com vetores de expressão contendo cassetes dos antígenos e de lysA. Foram construídos os vetores de expressão pJH137CRD e pJH152CRD, nos quais os promotores p*hsp*60 e pα-Ag, respectivamente, dirigem a expressão de CRD e lysA, desta vez contendo a seqüência do CRD com códon de terminação correto. A cepa auxotrófica rSmg-270 foi transformada com ambas as construções e os extratos totais apresentaram uma banda de tamanho esperado (15 kDa) usando um soro anti-FHA. Estes resultados demonstram que possivelmente foi a fusão com o fragmento da β-galactosidase que esteve desestabilizou o CRD nas construções.

Os resultados aqui apresentados sobre a resposta humoral induzida por rBCG-CRD revelaram a formação de anticorpos específicos contra a proteína FHA. A presença de anticorpos anti-FHA no soro dos animais vacinados com rBCG-CRD poderia explicar os resultados preliminares de proteção verificado no ensaio de desafio IC. Por outro lado,

SATO & SATO (1999) mostraram que a proteína FHA e anticorpos anti-FHA sozinhos não protegem camundongos contra um desafio intracerebral. No entanto, anti-FHA poderia proteger camundongos contra um desafio intranasal numa extensão em torno de 60%. Neste mesmo trabalho eles revelam que a combinação de dPT e FHA ou anticorpos anti-PT e anti-FHA dão proteção completa nos dois sistemas de desafio, enquanto que dPT e anticorpo anti-PT sozinho é menos eficiente. O fato de rBCG-CRD ter mostrado, preliminarmente, resultados de proteção e, portanto, contrários aos encontrados por SATO & SATO (1999) para a proteína FHA poderia ser atribuído ao sistema de apresentação diferente.

Embora se acredite que, a participação de FHA seja efetivamente humoral, os resultados de resposta celular com CRD revelaram dados interessantes. Parece que a presença única de CRD não induz a resposta celular, quando os esplenócitos são estimulados com FHA, o que seria esperado. No entanto, esplenócitos de camundongos imunizados com preparações vacinais contendo CRD na presença de S1PT, seja na forma combinada das preparações rBCG-pNL71S1 + rBCG-pNL71CRD ou em fusão rBCG-pNL71S1CRD, apresentam produção de IFN-γ quando estimulados com FHA, indicando que talvez S1PT seja importante para modular uma resposta celular contra FHA.

5.3 Avaliação da velocidade de crescimento das preparações vacinais

Com o objetivo principal de determinar um parâmetro para se avaliar preparações vacinais de BCG ou rBCG quanto a sua velocidade de crescimento após terem sido armazenadas a -70 °C, ensaios de curva de crescimento foram realizados na expectativa de que este tipo de ensaio pudesse servir como controle das preparações vacinais. A curva de crescimento das preparações vacinais armazenadas por longos períodos de tempo e que

haviam sofrido descongelamentos e passagens em meio liquido, apresentaram nitidamente perda em sua velocidade de crescimento em meio liquido. Amostras de 3ª passagens foram obtidas a partir dos primeiros lotes vacinais que haviam sido testados como vacinas e revelaram um alto índice de proteção contra um desafio IC com *B pertussis* virulenta. Infelizmente não havia mais lotes vacinais estoques vindos do primeiro congelamento para se fazer uma análise comparativa. Os ensaios com novas preparações de rBCG indicaram que após 3 passagens em meio líquido, em que as preparações foram congeladas e descongeladas, algumas cepas começaram a sofrer redução em sua velocidade de crescimento em meio líquido. Todavia, deve ser ressaltado que o período de congelamento destas preparações foi de uma semana, contrariando a observação feita para as preparações antigas, em que este período variou de 1 a 2 anos. A investigação do efeito do tempo de congelamento e os ensaios de proteção com estas preparações vacinais novas ainda estão em andamento.

5.4 Expressão dos antígenos de *B. pertussis* em cepa de BCG auxotrófico

Com o objetivo de expressar os genes S1PT ou CRD por meio de um sistema que não empregasse genes de resistência a antibióticos, cepas de BCG e Smg auxotróficas para lisina foram transformadas com diversos vetores de complementação e expressão contendo estes genes sob o controle de diferentes promotores. As amostras de BCG transformadas com os vetores contendo S1PT apresentaram complementação e expressão somente quando se utilizou o cassete de expressão do vetor original pNL71S1, onde o gene lysA permaneceu na forma de um Operon sintético, sob o controle do mesmo promotor pBlaF* (rBCG-pNL71S1lysA), ou sob o controle de um promotor próprio em rBCG-pMPN3S1PT. O nível de expressão não se mostrou diferente entre as cepas contendo o mesmo cassete de expressão, mesmo quando este estava presente em vetores diferentes, mostrando a

estabilidade e eficiência deste promotor para este antígeno. Estas amostras estão sendo testadas no momento, adotando o mesmo protocolo usado nos ensaios de rBCG-pNL71S1, através do qual estas serão comparadas quanto à resposta imunológica e nível de proteção. Todavia, os extratos de rBCG-1604 ou rSmg-270 transformados com os vetores pJH137 e pJH152 contendo S1PT, sob o controle dos promotores phsp60 ou pα-Ag não apresentaram expressão de S1PT. Por outro lado, foram obtidos dados interessantes com o gene CRD sob o controle destes promotores. Extratos de rSmg-270 transformados com estes vetores (rSmg-pJHN137CRD e rSmg-pJH152CRD) apresentaram expressão do mesmo com o peso molecular esperado. Estes resultados contrastam com os obtidos para as construções anteriores, rBCG-pLN71CRD e rBCG-pNL71S1CRD, onde não foi detectada expressão empregando-se *Western blot*. Foi mencionado também que houve um erro no códon de terminação destas construções e que isso estaria influenciando de alguma forma a detecção deste fragmento no *Western blot*, uma vez que havia anticorpo anti-FHA no soro dos animais imunizados com estas amostras. Agora que foi possível mostrar que este fragmento pode ser expresso em rSmg através de *Western blot* será mais fácil avaliarmos se de fato CRD também está sendo expresso nestas construções. As construções pJHN137CRD e pJH152CRD serão eletroporadas em rBCG-1604, onde se espera obter resultados de expressão semelhantes aos de rSmg-270 e em seguida usadas em ensaios de imunização. Assim será possível comparar o padrão de resposta humoral contra FHA nos animais imunizados com rBCG-pJH137CRD e rBCG-pJH152CRD com os animais imunizados com rBCG-pNL71CRD e pNL71S1CRD.

6. Conclusão

Os resultados mostram que foi possível expressar S1PT em BCG recombinante, sob o controle do promotor pBlaF* e que S1PT está localizada provavelmente na parede celular. O vetor de expressão pNL71S1 é relativamente estável in vivo. A preparação vacinal de rBCG-pNL71S1 induz uma resposta celular em 15 dias e uma resposta humoral mais tardia. A produção de IFN-γ em níveis superiores aos de IL-4 por esplenócitos de animais imunizados com esta preparação, assim como um aumento de proliferação, sob estímulo com dPT, caracteriza uma resposta celular antígeno–específica predominantemente do tipo Th1. rBCG-pNL71S1 induz um elevado nível de proteção contra um desafio intracerebral com uma cepa virulenta de *B. pertussis*, o qual correlaciona positivamente com a indução de uma resposta celular PT-específica, apoiando a importância da imunidade celular na proteção contra a infecção por *B. pertussis*.

rBCG-CRD induz a formação de anticorpo anti-FHA e a produção de IFN-γ, sob estímulo de FHA, quando na presença de S1PT. Ensaios de proteção estão em andamento usando as diferentes combinações de rBCG-S1PT, rBCG-CRD e rBCG-S1CRD.

É possível expressar S1PT e CRD em cepa de BCG auxotrófico, utilizando um meio seguro de seleção, representando assim um passo importante para a utilização desta vacina em humanos. Nossos resultados apontam ainda para a possibilidade de se usar o BCG expressando antígenos de *B. pertussis* como vacina bivalente contra tuberculose e pertussis (rBCG-Pertussis), com a vantagem desta poder ser administrada em dose única.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAK, S., LOUZIR, H., TIMM, J., BLEL, L., BENLASFAR, Z., LAGRANDERIE, M., GHEORGHIU, M., DELLAGI, K. & GICQUEL, B. (1995) Recombinant BCG expressing the leishmania surface antigen Gp63 induces protective immunity against *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Microbiology* **141,** 1584-1592.

ABOMOELAK, B., HUYGEN, K., KREMER, L., TURNEER, M. & LOCHT, C. (1999) Humoral and cellular immune responses in mice immunized with recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin producing a pertussis toxin-tetanus toxin hybrid protein. *Infect Immun.* **67,** 5100-5105.

ADA, G. L. (1997). The traditional vaccines: an overview. In New generation vaccines, pp. 13-24. Edited by L. M. M. Woodrow G C, N Y: .

Ad hoc group for study of pertussis vaccine (1998) *Lancet* **i,** 955-960.

ALDOVINI, A. & YOUNG, R.A. (1991) Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines [see comments]. *Nature* **351,** 479-482.

ALONSO, S., REVENEAU, N., PETHE, K. & LOCHT, C. (2002) Eighty-Kilodalton N-Terminal Moiety of *Bordetella pertussis* Filamentous Hemagglutinin: Adherence, Immunogenicity, and Protective Role. *Infect Immun.* **70,** 4142-4147.

BALASUBRAMANIAN, V., PAVELKA, M.S. JR., BARDAROV, S.S., MARTIN, J., WEISBROD, T.R., McADAM, R.A., BLOOM, B.R. & JACOBS, W.R. JR. (1996) Allelic exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear recombination substrates. *J Bacteriol* **178,** 273-279.

BALDWIN, S.L., D'SOUZA, C., ROBERTS, A.D., KELLY, B.P., FRANK, A.A., LUI, M.A., ULMER, J.B., HUYGEN, K., MCMURRAY, D.M. & ORME, I.M. (1998)

Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infect Immun.* **66,** 2951-2959.

BARDAROV S, KRIAKOV J, CARRIERE C, YU S, VAAMONDE C, MCADAM RA, BLOOM BR, HATFULL GF, JACOBS WR JR. (1997) Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94,** 10961-10966.

BARLETTA, R.G., SNAPPER, B., CIRILLO, J.D., CONNELL, N.D., KIM, D.D., JACOBS, W.R. & BLOOM, B.R. (1990) Recombinant BCG as a candidate oral vaccine vector. *Res Microbiol* **141,** 931-939.

BARRY, E.M., GOMEZ-DUARTE, O., CHATFIELD, S., RAPPUOLI, R., PIZZA, M., LOSONSKY, G., GALEN, J. & LEVINE, M.M. (1996) Expressão and Immunogenicity of Pertussis Toxin S1 Subunit-Tetanus toxin Fragment C Fusion in *Salmonella typhi* Vaccine Strain CVD 908. *Infect. Immun.* **64,** 4172-4181.

BASHYAM, M.D. & TYAGI, A.K. (1998) Identification and analysis of `extended 310 promoters' from mycobacteria. *J. Bacteriol.* **180,** 2568-2573.

BASHYAM, M.D., KAUSHAL, D., DASGUPTA, S.K. & TYAGI, A.K. (1996) A study of the mycobacterial transcriptional apparatus: Identification of novel features in promoter elements. *J. Bacteriol.* **178,** 4847-4853.

BAULARD, A., ESCUYER, V., HADDAD, N., KREMER, L., LOCHT, C. & BERCHE, P. (1995) Mercury resistance as a selective marker for recombinant mycobacteria. *Microbiology* **141,** 1045-50.

BLOOM, B.A. & FINE, P.E.M. (1994) The BCG experience: Implications for future vaccines against tubérculosis. In Tubérculosis: pathogenesis, protection and control, pp. 531-558. Edited by B. A. Bloom, Washington, DC: .

BORDET, J. & GENGOU, U. (1906) Le microbe de la coqueluche. *Ann Inst Pasteur* **20,** 731.

BOUCHER P, SATO H, SATO Y, LOCHT C. (1994) Neutralizing antibodies and immunoprotection against pertussis and tetanus obtained by use of a recombinant pertussis toxin-tetanus toxin fusion protein. *Infect Immun.* **62,** 449-456.

BRANDT, L., FEINO J.C., WEINREICH, A.O., CHILIMA, B., HIRSCH, P., APPELBERG, R. & ANDERSEN, P. (2002) Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect. Immun.* **70,** 672-678.

BURLEIN, J.E., STOVER, C.K., OFFUTT, S. & HANSON, M.S. (1994) Expression of foreign genes in mycobacteria. In Tubérculosis: pathogenesis, protection and control, pp. 239-252. Edited by B. A. Bloom, Washington, DC: .

CAHILL, E. S., D. T. O'HAGAN, L. ILLUM, A. BARNARD, K. H. G. MILLS, AND K. REDHEAD. (1995) Immune responses and protection against *Bordetella pertussis* infection after intranasal immunization of mice with filamentous haemagglutinin in solution or incorporated in biodegradable microparticles. *Vaccine* **13,** 455-462.

CASSATT, D.R., DE LA CRUZ, V. F., BURLEIN, J. E., KOENIG, S. & STOVER, C. K. (1993) Protection of mice against tetanus challenge using an experimental tetanus vaccine based on recombinant BCG. In Vaccines 93, pp. 385-389. Edited by H. S. Gingsberg, F. Brown, R. M. Channock &R. A. Lerner, Plainview, N Y: .

CHERRY, J.D. (1990) 'Pertussis vaccine encephalopathy': it is time to recognize it as the myth that it is.*J. Am. Med. Assoc.* **263,** 1679-1680.

CIRILLO, J.D., STOVER, C.K., BLOOM, B.R., JACOBS, W.J. & BARLETTA, R. G. (1995) Bacterial vaccine vectors and bacillus Calmette-Guerin. *Clin Infect Dis* **20,** 1001-1019.

CLEMENS, J.D., CHUONG, J.J., & FEINSTEIN, A.R. (1983). The BCG controversy. A methodological and statistical reappraisal. *JAMA* **249,** 2362–2369.

CONNELL, N.D. (2001) Expression systems for use in actinomycetes and related organisms. *Current Opinion in Biotechnology* **12,** 446–449.

CONNELL, N.D., MEDINA, A.E., MCMASTER, W.R., BLOOM, B.R. & RUSSELL, D.G. (1993) Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the Leishmania surface proteinase gp63. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90,** 11473-11477.

DALLA POZZA, T., YAN, H., MEEK, D., GUZMAN, C.A. & WALKER, M.J. (1989) Construction and characterisation of *Salmonella typhimurium* aroA simultaneously expressing the five pertussis toxin subunits. *Vaccine.***16,** 522-529.

DELISSE-GATHOYE, A.-M., LOCHT, C., JACOB, F., RAASCHOU-NIELSE, M., HERON, I., RUELLE, J.-L., DE WILD, M. & CABEZON, T. (1990) Cloning, partial sequence, expression, and antigenic analysis of the filamentous hemagglutinin gene of *Bordetella pertussis. Infect. Immun.* **58,** 2895-2905.

DELLAGOSTIN, O.A., WALL, S., NORMAN, E., O'SHAUGHNESSY, T., DALE, J.W. &, MCFADDEN, J. (1993) Construction and use of integrative vectors to express foreign genes in mycobacteria. *Mol Microbiol.* **10,** 983-9893.

DE MAGISTRIS, M.T., ROMANO, M., BARTOLONI, A., RAPPUOLI, R. & TAGLIABUE, A. (1989) Human T cell clones define S1 subunit as the most

immunogenic moiety of pertussis toxin and determine its epitope map. *J Exp Med.* **5,** 1519-1532.

DI TOMMASO A, DOMENIGHINI M, BUGNOLI M, TAGLIABUE A, RAPPUOLI R, DE MAGISTRIS MT. (1991) Identification of subregions of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin that stimulate human T-cell responses. *Infect Immun.* **59,** 3313-3315.

DOMENIGHINI, M., REALMAN, D., CAPIAU, C., FALKOW, S., PRUGNOLA, A., SCARLATO, V. & RAPPUOLI, R. (1990) Genetic characterization of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: a protein processed from an unusually large precursor. *Mol. Microbiol.* **4,** 787-800.

EDWARDS, K.M. (1993) Acellular pertussis vaccines-a solution to the pertussis problem? J. *Infect Dis.* **168,** 15-20.

FATTORINI, L., FIORENTINO, D., AMICOSANTE, G., FRANCESCHINI, N., ORATORE, A. & OREFICI, G. (1989) Beta-lactamase production and biological characteristics in nitrosoguanidine induced *Mycobacterium fortuitum* mutants. *Acta Leprol* **1,** 44-47.

FINE, F.P. (1995) Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet* **346,** 1339–1345.

FINE, P.E. (1989) The BCG story: lessons from the past and implications for the future. *Rev. Infect. Dis.* **11,** S353–S359.

FINGER, H & WIRSING VON KOENIG, C.H. (1985) Serological diagnosis of whooping cough. *Dev Biol Stand* **61,** 331.

GICQUEL, B. (1995) BCG as a vector for the construction of multivalent recombinant vaccines. *Biologicals* **23,** 113-118.

GOODMAN, Y.E, WORT, A.J, JACKSON, F.L (1981) Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pertussis immunoglobulin A in nasopharyngeal secretions as an indicator of recent infection. *J Clin Microbiol* **13,** 286.

GORDHAN, B.G., SMITH, D.A., ALDERTON, H., MCADAM, R.A., BANCROFT, G.J. & MIZRAHI, V. (2002) Construction and phenotypic characterization of an auxotrophic mutant of *Mycobacterium tuberculosis* defective in L-arginine biosynthesis. *Infect Immun* **70,** 3080-3084.

GRECO, D., SALMASO, S., MASTRANTONIO, P., GIULIANO, M., TOZZI, A. E., ANEMONA, A., CIOFI, D.A.M., GIAMMANCO, A., PANEI, P., BLACKWELDER, W.C., KLEIN, D.L. & WASSILAK, S.G. (1996) A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group *N Engl J Med* **334,** 341-348.

GULERIA, I., TEITELBAUM, R., McADAM, R.A., KALPANA, G., JACOBS, W.R. Jr & BLOOM, B.R. (1996) Auxotrophic vaccines for tuberculosis. *Nat Med* **2,** 334-337.

HAESELEER, F., POLLET, J.F., HAUMONT, M., BOLLEN, A. & JACOBS, P. (1993) Stable integration and expression of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein coding sequence in mycobacteria. *Mol Biochem Parasitol* **57,** 117-126.

HANNAH, J. H., F. D. MENOZZI, G. RENAULD, C. LOCHT, AND M. J. BRENNAN. (1994) Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. Infect. Immun. **62,** 5010-5019.

HEWLETT, E.L. & CHERRY, J.D. (1997) New and improved vaccines against pertussis. In New generation vaccines, pp. 387-416. Edited by L. M. M. Woodrow G C, N Y:

.

HEWLETT, E.L. (1997) New and Improve Vaccines Against Pertussis.: in New Generation Vaccines. p, 387-416. 2nd Edition.

HONDALUS, M.K., BARDAROV, S., RUSSELL, R., CHAN, J., JACOBS, W.R. JR. & BLOOM, B.R. (2000) Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. **68,** 2888-2898.

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.

HORWITZ, M.A., HARTH, G., DILLON, B.J. & MASLESA-GALIC', S. (2000) Recombinant bacillus calmette-guerin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Proc Natl Acad Sci* U S A. **97,** 13853-13858.

JACOB, F., CAPIAU, C., GATHOYE, A. M., LOCHT, C. & CABEZON, T. (1988) Molecular cloning of the filamentous hemagglutinin structural gene from *Bordetella pertussis* in *Escherichia coli*, p. 62-68. *In* S. Mebel, H. Stompe, M. Drescher, and S. Rustenbach (ed.), FEMS Symposium on Pertussis. Federation of European Microbiological Societies. Berlin.

JACOBS, W.J., TUCKMAN, M. & BLOOM, B.R. (1987) Introduction of foreign DNA into mycobacteria using a shuttle phasmid. *Nature* **327,** 532-535.

JAWETZ, E., MELNICK, J.L. & ADELBERG, E.A. (1998) Medical Microbiology. 21st Ed. Appleton & Lange, Stamford, Connecticut.

KENDRICK, P.L., ELDERING, G, DIXON, M.K. (1947) Mouse protection tests in the study of pertussis vaccines: A comparative series using intracerebral route for challenge. *Am. J. Public Health* **37,** 803-810.

KIMURA, A., MOUNTZOUROS, K.T., RELMAN, D.A., FALKOW, S. & COWELL, J.L. (1990) *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin: evaluation as a protective antigen and colonization factor in a mouse respiratory infection model. *Infect. Immun.* **58,** 7-16.

KOCHI, A. (1991) The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization.*Tubercle* **72,** 1-6.

LABIDI, A., DAVID, H.L. & ROULLAND-DUSSOIX, D. (1985) Cloning qnd expression of mycobacterial plasmid DNA in E. coli. *FEMS Microbiology Lett.* **30,** 221-225.

LAGRANDERIE, M., MURRAY, A., GICQUEL, B., LECLERC, C. & GHEORGHIU, M. (1993) Oral immunization with recombinant BCG induces cellular and humoral immune responses against the foreign antigen. *Vaccine* **11,** 1283-90.

LAGRANDERIE, M.R., BALAZUC, A.M., DERIAUD, E., LECLERC, C.D. & GHEORGHIU, M. (1996) Comparison of immune responses of mice immunized with five different *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *Infect. Immun.* **64,** 1–9.

LANGERMANN, S., PALASZYNSKI, S.R., BURLEIN, J.E., KOENIG, S., HANSON, M.S., BRILES, D.E. & STOVER, C.K. (1994b) Protective humoral response against pneumococcal infection in mice elicited by recombinant bacille Calmette-Guerin vaccines expressing pneumococcal surface protein A. *J Exp Med* **180,** 2277-2286.

LANGERMANN, S., PALASZYNSKI, S., SADZIENE, A., STOVER, C. K. & KOENIG, S. (1994a) Systemic and mucosal immunity induced by BCG vector expressing outer-surface protein A of *Borrelia burgdorferi*. *Nature* **372,** 552-555.

LEE, M.H., PASCOPELLA, L., JACOBS, W.R. JR. & HATFULL, G.F. (1991) Site-specific integration of mycobacteriophage L5: integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. *Proc Natl Acad Sci* U S A. **88,** 3111-3115.

LEININGER, E., BOWEN, S., RENAULD-MONGENIE, G., ROUSE, J.H., MENOZZI, F.D., LOCHT, C., HERON, I. & BRENNAN, M.J. (1997) Immunodominant domains present on the *Bordetella pertussis* vaccine component filamentous hemagglutinin. *J Infect Dis*. **175,** 1423-1431.

LEVINE, M.M. (1997) Vaccines and vaccination in the historical perspective. In New generation vaccines, pp. 1-12. Edited by L. M. M. Woodrow G C, N Y: .

LOCHT, C., CIEPLAK, W., MARCHITTO, K.S., SATO, H. & KEITH, J.M. (1987) Activities of complete and truncated forms of pertussis toxin subunits S1 and S2 synthesized by *Escherichia coli*. *Infect Immun*. **55,** 2546-2553.

LOWRIE, D.B, TASCON, R.E., BONATO, V.L., LIMA, V.M., FACCIOLI, L.H., STAVROPOULOS, E., COLSTON, M.J., HEWINSON, R.G., MOELLING, K. & SILVA C.L. (1999) Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature*. **400,** 269-271.

LIU, DAÍ-FANG., PHILLIPS, E., WIZEMANN, T. M., SIEGEL, M. M., TABEI, K., COWELL, J.L. & TUOMANEN, E. (1997) Characterization of a Recombinant Fragment That Contains a Carbohydrate Recognition Domain of the Filamentous Hemagglutinin. *Infect. and Immnu.* **65,** 3465-3468.

MATSUMOTO, S., YANAGI, T., OHARA, N., WADA, N., KANBARA, H. & YAMADA, T. (1996) Stable expression and secretion of the B-cell epitope of rodent malaria from *Mycobacterium bovis* BCG and induction of long-lasting humoral response in mouse.*Vaccine*. **14,** 54-60.

MATSUO, K., YAMAGUCHI, R., YAMAZAKI, A., TASAKA, H., TERASAKA, K., TOTSUKA, M., KOBAYASHI, K., YUKITAKE, H. & YAMADA, T. (1990) Establishment of a foreign antigen secretion system in mycobacteria. *Infect Immun* **58,** 4049-4054.

MEADE, B.D. & BOLLEN, A. (1994) Recommendations for use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of *Bordetella pertussis* infections. *J Med Microbiol* **41,** 51-55.

MEADE, B.D., MINK, C.M. & MANCLARK, C.R. (1990) Serodiagnosis of pertussis, p. 322. In: Manclark CR: Proc. 6th Intl Symp Pertussis, DHHS (FDA) Publication No. 90-1164, Bethesda, MD, 1990

MENOZZI, F.D., MUTOMBO, R., RENAULD, G., GANTIEZ, C., HANNAH, J.H., LEININGER, E., BRENNAN, M.J. & LOCHT, C. (1994) Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. Infect. Immun. **62,** 769-778.

MILLS, K.H.G. (2001) Immunity to *Boertella pertussis*. *Microbes and Infection* **3,** 655-677.

MURRAY, A., WINTER, N., LAGRANDERIE, M., HILL, D.F., RAUZIER, J., TIMM, J., LECLERC, C., MORIARTY, K.M., GHEORGHIU, M. & GICQUEL, B. (1992) Expression of *Escherichia coli* beta-galactosidase in *Mycobacterium bovis* BCG

using an expression system isolated from *Mycobacterium paratuberculosis* which induced humoral and cellular immune responses. *Mol Microbiol.* **6,** 3331-3342.

NENCIONI, L., PIZZA, M.G., VOLPINI, G., DE MAGISTRIS, M.T., GIOVANNONI, F. & RAPPUOLI, R. (1991) Properties of the B oligomer of pertussis toxin *Infect Immun.* **59,** 4732-4734.

NENCIONI, L., PIZZA, M., BUGNOLI, M., DE MAGISTRIS, T., DI TOMMASO, A., GIOVANNONI, F., MANETTI, R., MARSILI, I., MATTEUCCI, G., NUCCI, D., *et al.* (Characterization of genetically inactivated pertussis toxin mutants: candidates for a new vaccine against whooping cough. *Infect Immun.* **58,** 1308-1315.

NICOSIA, A., BARTOLONI, A., PERUGINI, M. & RAPPUOLI, R. (1987) Expression and immunological properties of the five subunits of pertussis toxin. *Infect Immun.* **55,** 963-967.

OLANDER, R.M., MUOTIALA, A., HIMANEN, J.P., KARVONEN, M., AIRAKSINEN, U. & RUNEBERG-NYMAN, K. (1991) Immunogenicity and protective efficacy of pertussis toxin subunit S1 produced by *Bacillus subtilis*. *Microb Pathog.* **10,** 159-164.

OHARA, N. & YAMADA, T. (2001) Recombinant BCG vaccines. *Vaccine* **19,** 4089-4098.

OMS – BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION, March 1998 v76 i2 pS137.

ORME, I. (1995) Medical Intelligent Unit: Immunity to Mycobacteria. Austin: R.G. Lands Company, p. 5.

PAVELKA, M.S.JR. & JACOBS, W.R.JR. (1999) Comparison of the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis*

bacillus Calmette-Guerin, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. *J Bacteriol.* **181,** 4780-4789.

PELICIC, V., JACKSON, M., REYRAT, J.M., JACOBS, W.R.JR., GICQUEL, B. & GUILHOT, C. (1997) Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis. Proc Natl Acad Sci* U S A. **94,** 10955-10960.

PEPPOLONI, S., NENCIONI, L., DI TOMMASO, A., TAGLIABUE, A., PARRONCHI, P., ROMAGNANI, S., RAPPUOLI, R. & DE MAGISTRIS, M.T. (1991) Lymphokine secretion and cytotoxic activity of human CD4+ T-cell clones against *Bordetella pertussis. Infect Immun.* **59,** 3768-3773.

PIATTI, G. (1999) Identification of immunodominant epitopes in the filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis.* FEMS *Immunol Med Microbiol.* **23,** 235-241.

PIZZA, M., COVACCI, A., BARTOLONI, A., PERUGINI, M., NENCIONI, L., DE, M. M., VILLA, L., NUCCI, D., MANETTI, R., BUGNOLI, M. & *et al.* (1989) Mutants of pertussis toxin suitable for vaccine development. *Science* **246,** 497-500.

PRASAD, S.M., YIN, Y., RODZINSKI, E., TUOMANEN, E.I. & MASURE, H.R. (1993) Identification of a carbohydrate recognition domain in filamentous hemagglutinin from *Bordetella pertussis. Infect. Immun.* **61,** 2780-2785.

RANES, M.G., RAUZIER, J., LAGRANDERIE, M., GHEORGHIU, M. & GICQUEL, B. (1990) Functional analysis of pAL5000, a plasmid from Mycobacterium fortuitum: construction of a "mini" mycobacterium-Escherichia coli shuttle vector. *J Bacteriol* **172,** 2793-2797.

RAPPUOLI, R. (1990) New and improved vaccines against diphteria and tetanus. In New generation vaccines, pp. 251-268. Edited by L. M. M. Woodrow G C, N Y: .

RAPPUOLI, R., DOUCE, G., DOUGAN, G. & PIZZA, M. (1995) Genetic detoxification of bacterial toxins: a new approach to vaccine development. *Int Arch Allergy Immunol* **108,** 327-333.

RAPPUOLI, R., PIZZA, M., PODDA, A., DE MAGISTRIS, M.T. & NENCIONI, L. (1991) Towards third-generation whooping cough vaccines. *TIBTECH* **9,** 232-238.

RAPPUOLI, R., PODDA, A., PIZZA, M., COVACCI, A., BARTOLINI, A., DE MAGISTRIS, M.T. & NENCIONI, L. (1992) Progress towards the development of new vaccines againts whooping cough. *Vaccine* **10,** 1027-1032.

RELMAN, D., TUOMANEN, E.I., FALKOW, S., GOLENBOCK, D.T., SAUKKONEN, K. & WRIGHT, S.D. (1990) Recognition of a bacterial adhesin by an integrin: macrophage CR3 ($\alpha_M\beta_2$, CD11b/CD18) binds filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. *Cell* **61,** 1375-1382.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. (1986) Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, v 3., p.545.

SATO, Y. & SATO, H. (1999) Development of acelular Pertussis Vaccines. *Biologicals* **27,** 61-69.

SATO, Y., KIMURA, M. & FUKUMI, H. (1984) Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet* **i,** 122-126.

SAUTON, B. (1912) Sur la nutrition minerale du bacille tuberculeux. *Comptes rendus Lebdomadaires des Sciences de L'Academie des SciencesI* **92,** 844-853.

SHINNICK, T.M. & GOOD, R.C. (1994) Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **11,** 884-901.

SNAPPER, S.B., LUGOSI, L., JEKKEL, A., MELTON, R.E., KIESER, T., BLOOM, B.R. & JACOBS, W.J. (1988) Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85,** 6987-6991.

STEINMAN, L., WEISS, A., ADELMAN, N., LIM, M., ZUNIGA, R., OCHLERT, J., HEWLETT, E. & FALKOW, S. (1985) Pertussis toxin is required for pertussis vaccine encephalopathy. *Proc. Natl. Acad. USA* **82,** 8733-8736.

STOVER, C. K., DE, L.C.V., BANSAL, G. P., HANSON, M.S., FUERST, T.R., JACOBS, W.J. & BLOOM, B.R. (1992) Use of recombinant BCG as a vaccine delivery vehicle. *Adv Exp Med Biol* **327,** 175-182.

STOVER, C.K., DE, L.C.V., FUERST, T.R., BURLEIN, J.E., BENSON, L.A., BENNETT, L.T., BANSAL, G.P., YOUNG, J.F., LEE, M.H., HATFULL, G. F. & *et. al* (1991) New use of BCG for recombinant vaccines *Nature* **351,** 456-460.

TASCON, R.E., COLSTON, M.J., RAGNO, S., STAVROPOULOS, E., GREGORY, D. & LOWRIE, D.B. (1996) Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat Med.* **2,** 888-892.

TEMPLE, L.M., WEISS, A.A., WALKER, K.E., BARNES, H.J., CHRISTENSEN, V.L., MIYAMOTO, D.M., SHELTON, C.B. & ORNDORFF, P.E. (1998) *Bordetella avium* virulence measured in vivo and in vitro. *Infect Immun.* **66,** 5244-5251.

TIMM, J., PERILLI, M.G., DUEZ, C., TRIAS, J., OREFICI, G., FATTORINI, L., AMICOSANTE, G., ORATORE, A., JORIS, B., FRERE, J. M. & *et, al* (1994) Transcription and expression analysis, using lacZ and phoA gene fusions, of Mycobacterium fortuitum beta-lactamase genes cloned from a natural isolate and a high-level beta-lactamase producer. *Mol Microbiol* **12,** 491-504.

TRICCAS, J.A., BRITTON, W.J. & GICQUEL, B. (2001) Isolation of strong expression signals of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology* **147,** 1253–1258.

TRIPATHY, S.P. (1983) The case for BCG. Ann. N. Y. Acad. Med. Sci. **19,** 11–21..

TUOMANEN, E.I., & WEISS A.A. (1985) Characterization of two adhesins of *Bordetella pertussis* for human ciliated respiratory epithelial cells. *J. Infect. Dis.* **152,** 118-125.

VANDAMME, P., HEYNDRICKX, M., VANCANNEYT, M., HOSTE, B., DE VOS, P., FALSEN, E., KERSTERS, K. & HINZ, K.H. (1996) *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of Alcaligenes denitrificans Ruger and Tan . *Int J Syst Bacteriol.* **46,** 849-858.

WEISS, A.A., HEWLETT, E., MYERS, G. & FALKOW, S. (1983) *Infect. Immun.* **42,** 33-41.

WEISS, A.A., HEWLETT, E., MYERS, G. & FALKOW, S. (1984) *J. Infect. Dis.* **150,** 219-222.

WEISS, A.A., HEWLETT, E.L., MYERS, G.A. & FALKOW, S. (1985) Genetic studies of the molecular basis of whooping cough. *Dev Biol Stand.* **61,** 11-9.

WILSON, D.R., SIEBERS, A. & FINLAY, B.B. (1998) Antigenic analysis of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with phage display libraries and rabbit anti-filamentous hemagglutinin polyclonal antibodies. *Infect Immun* **66,** 4884-4894.

WINTER, N., LAGRANDERIE, M., GANGLOFF, S., LECLERC, C., GHEORGHIU, M. & GICQUEL, B. (1995) Recombinant BCG strains expressing the SIVmac251nef gene induce proliferative and CTL responses against nef synthetic peptides in mice. *Vaccine* **13,** 471-478.

WINTER, N., LAGRANDERIE, M., RAUZIER, J., TIMM, J., LECLERC, C., GUY, B., KIENY, M. P., GHEORGHIU, M. & GICQUEL, B. (1991) Expression of

heterologous genes in *Mycobacterium bovis* BCG: induction of a cellular response against HIV-1 Nef protein. *Gene* **109,** 47-54.

WOODROW, G. C. (1997). An overview of biotechnology as applied to vaccine development. In New generation vaccines, pp. 25-34. Edited by L. M. M. Woodrow G C, N Y: .