



Construção de *Salmonella* sorovar Enteritidis Atenuada para Imunização de Mamíferos

Ronnie F.M. Sousa*, Marcelo Brocchi

Resumo

Salmonella enterica é uma bactéria patogênica para diversos animais, causando infecções intestinais e extra-intestinais. *S. enterica* contém genes codificadores de Sistemas de Secreção Tipo Três (SSTTs), essenciais para a capacidade de invasão e sobrevivência intracelular. Muitos genes de SSTT são regulados pela proteína IHF: uma histone-like heterodimérica codificada pelos genes *ihfA* e *ihfB*. Com isso, temos como objetivo construir *S. Enteritidis* $\Delta ihfA$, $\Delta ihfB$ e $\Delta ihfA\Delta ihfB$, confirmar que os mutantes são atenuados e avaliar a resposta imunológica em murino com o duplo mutante. Até o momento, os mutantes simples e o duplo mutante foram construídos. Os próximos passos serão a caracterização do duplo mutante, ratificar o potencial atenuante do duplo mutante e testar a sua imunogenicidade.

Palavras-chave:

IHF; *S. enterica*; Pathogenicity.

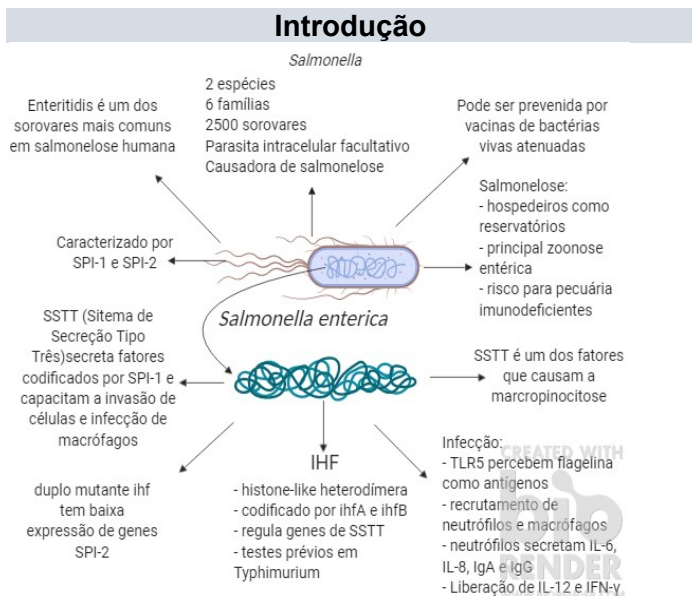


Figura 1. Mapa mental ilustrando as informações essenciais para a compreensão do trabalho.

Com base em resultados preliminares de nosso lab., o presente trabalho tem como objetivo construir linhagens *S. Enteritidis* $\Delta ihfA$, *S. Enteritidis* $\Delta ihfB$ e *S. Enteritidis* $\Delta ihfA\Delta ihfB$, confirmar se o duplo mutante é atenuado e capaz de induzir resposta imunológica.

Resultados e Discussão

A deleção dos genes *ihfA* e *ihfB* foi feita pelo sistema λ Red utilizando os plasmídeos pKD3, pKD46 e pCP20. Foram isoladas colônias de *S. Enteritidis* $\Delta ihfA$:Cm e de *S. Enteritidis* $\Delta ihfB$:Cm. Para evitar a seleção de recombinações secundárias, as marcas de deleção foram transferidas por transdução utilizando o fago P22Hint (Figura 2A). A resistência ao claranfenicol foi eliminada com o uso do sistema de recombinação do pCP20 (Figura 2B).

Atualmente estamos retirando as resistências do duplo mutante para prosseguimento nos testes em murinos.

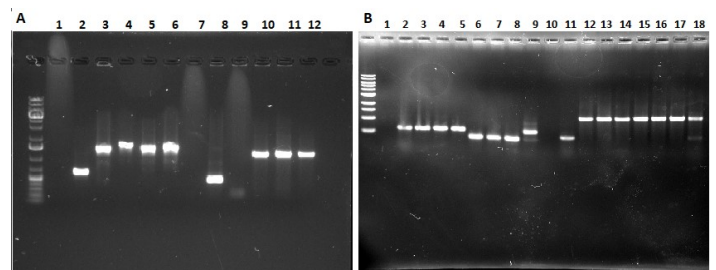


Figura 2. Construção dos mutantes simples (A) e duplo (B). A) Detecção genes íntegros *ihfA* (2) e *ihfB* (8) na linhagem selvagem e linhagens $\Delta ihfA$ (3 à 6) e $\Delta ihfB$ (9 à 12). Observa-se que todas as colônias $\Delta ihfA$ apresentaram a deleção, contudo apenas 1 colônia $\Delta ihfB$ apresentou a mutação (amostra 9). B) Detecção dos genes *ihfA* (amostras 1 à 9) e *ihfB* (amostras 10 à 18) no duplo-mutante por PCR. Temos o controle selvagem do gene *ihfA* (2) e *ihfB* (11) e as amostras 3 à 9 são respectivas às 12 à 18. Observa-se que 3 colônias apresentaram a cicatriz em *ihfA* (6,7,8) e a deleção do gene *ihfB* (15,16 e 17).

Conclusões

Até o momento obtivemos o duplo mutante *Salmonella enterica* Enteritidis $\Delta ihfA\Delta ihfB$:Cm. Esta aparenta ser viável e acreditamos que seu crescimento é igual a linhagem selvagem por dados previamente obtidos pelo nosso grupo. Atualmente, nos empenhamos em retirar as resistências do duplo-mutante para que possamos dar prosseguimento aos testes *in vivo*.

- BRENNER, F.W.; Villar R.G.; Ângulo F.J.; Tauxe R. e Swaminathan B. *Salmonella* nomenclature. J Clin Microbiol. 2000, 38, 2465.
- COTTER, P.A. e DIRITA, V.J. Bacterial virulence gene regulation: an evolutionary perspective. Annu Rev Microbiol. 2000, 54, 519.
- DATSENKO, K.A. e WANNER, B.L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. National Academy of Science. 2000, 97, 6640.
- GOOSEN, N. e VAN DE PUTTE, P. The regulation of transcription initiation by integration host factor. Mol Microbiol. 1995, 16, 1.
- GUZMAN C.A.; Borsutzky S.; Griot-Wenk M.; Metcalfe I.C.; Pearman J.; Collioud A.; Favre D. e Dietrich G. Vaccines against typhoid fever. Vaccine. 2006, 24, 3804.
- MANGAN, M.W.; Lucchini, S.; Danini V.; Ó Cróinín, T.; Hilton, J.C.D. e Dorman, C.H. Integration Host Factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol. 2006, 59, 1831.