

A IMUNIDADE NA FEBRE TIFÓIDE.
II. ANTÍGENOS E RESPOSTA IMUNE NAS SALMONELOSES
SISTÊMICAS

ARLETE MOREIRA MILHOMEM*
ÍTALO SUASSUNA**

Os resultados dos trabalhos acumulados a partir do início do século permitem concluir que, apesar de numerosos progressos e estudos dos pontos de vista químico, imunoquímico, genético e biológico, o(s) antígeno(s) responsável(is) pela imunidade nas salmoneloses sistêmicas ainda não está(ão) definido(s).

As mais diversas preparações têm sido propostas como possíveis imunógenos, bem como uma ampla variedade de modelos experimentais e de métodos de avaliação da resposta imune. Em relação ao primeiro aspecto, sendo a Salmonella typhi, em condições naturais, um patógeno exclusivo do homem, os resultados obtidos em animais de laboratório freqüentemente não se correlacionaram com os obtidos em seres humanos.

Salienta-se que a pesquisa da resposta imune tem sido limitada na maioria das vezes à avaliação do título de aglutininas para os antígenos O, H e Vi; ou a testes de proteção passiva ou ativa em camundongos.

A imunidade celular tem sido definida, principalmente por testes cutâneos, com preparações de natureza protéica, de composição variável e estrutura química mal-definida.

Todos os dados revistos levam à conclusão de que até o presente, ignora-se o, ou os mecanismos de imunoproteção nas salmoneloses sistêmicas.

Até o presente, a antígeno ou antígenos implicados na proteção oferecida por vacinas antitifoídicas é objeto de discussões (Milhomem & Suassuna, 1982).

Alguns destes antígenos foram reconhecidos desde o início do século, e suas localizações na parede celular, suas propriedades sorológicas, seus efeitos biológicos e impli-

*Trabalho do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, R.J. Parte de tese para obtenção do título de Doutor, com auxílio do CNPq, CAPES e FINEP.

**Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87 - 20551 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

cações clínicas intensamente investigados. Mais recentemente, suas estruturas químicas, a biossíntese e os determinantes genéticos têm sido objeto de intensa pesquisa.

O papel dos componentes antigênicos destes microrganismos, na virulência e na imunidade para salmoneloses sistêmicas será a seguir sumariamente discutido.

Antígeno H

O antígeno H teve sua participação enfaticamente negada por Arkwright (1927), quando baseado em testes de proteção ativa em cobaias, demonstrou que vacinas preparadas a partir de amostras lisas davam igual proteção quer tivessem sido aquecidas a 100°C ou 53°C. Estes resultados foram confirmados por Schutze (1930) em camundongos e o ponto de vista de Arkwright (1927) foi reconhecido pela maioria dos investigadores (Apud Raffel, 1953).

No primeiro ensaio de campo controlado, o achado laboratorial que mais se relacionou com a efetividade das vacinas no homem foi a produção em coelhos de aglutininas anti-H (Edsall et al, 1959). Esses autores sugeriram que, ao antígeno H, não havia sido dada a devida importância como possível fator de proteção. Esta observação levou alguns investigadores a reexaminarem a influência do antígeno nos mecanismos patogênicos da febre tifóide.

Em publicações posteriores, Tully & Gaines (1961) relataram que a perda do antígeno flagelar em amostras lisas de *S. typhi* não se associava a uma diminuição da virulência para camundongos. Os mesmos investigadores (Tully, Gaines & Tigertt, 1963) repetiram as experiências em chimpanzés e reafirmaram não terem encontrado evidência de que o antígeno fosse importante quanto à virulência ou à proteção em infecções experimentais nesses animais. No mesmo ano Biozzi et al (1963) também negaram qualquer ação protetora do antígeno quando observaram que, em camundongos, anticorpos anti-H não apresentavam atividade opsonizante.

Posteriormente Benenson (1964) e Hejfec et al (1966) publicaram que nos resultados de pesquisas de aglutininas no soro dos indivíduos, particularmente em ensaios de campo, de maneira semelhante aos resultados de Edsall et al (1959), observava-se que a imunogenicidade deste antígeno parecia ser um atributo das vacinas de melhor correlação com a proteção obtida no homem. Para Benenson (1964), no entanto, as evidências apresentadas por alguns investigadores anteriormente citados, bem como a frequência de recidivas de febre tifóide em indivíduos com elevado título de aglutininas anti-H, faziam com que uma relação entre atividade imunizante destas vacinas e título de aglutininas anti-H, fosse altamente improvável.

A presença deste antígeno nas vacinas antitifoídicas cujas evidências de uma ação proterora eram muito poucas, trazia contudo problemas de diagnóstico sorológico da febre tifóide como salientado por Anderson & Gunnel (1964). Com base nestas observações os mesmos autores sugeriram que as vacinas antitifoídicas fossem preparadas a partir de uma mutante de amostra Ty2 não flagelada e denominada de TNMI.

Com esta amostra (TNMI) e a mesma metodologia empregada no preparo da vacina K, foi produzida uma vacina cuja ação foi avaliada em ensaio de campo controlado, realizado no Egito. Os resultados deste ensaio, publicados por Wahdan et al (1975), demonstraram que a vacina, teoricamente idêntica, exceto pela falta de antígeno H, à vacina K utilizada nos outros ensaios, não ofereceu proteção. O fato observado foi atribuído a outras propriedades imunogênicas que não a síntese do antígeno H, ausentes na mutante TNMI.

Para Edwards et al (1974) ou as aglutininas anti-H teriam um papel significativo na proteção ou fatores do soro ainda não identificados estariam envolvidos. Beumer

(1974), no entanto, sugeriu que a proteção para o homem seria dada por anticorpos para um ou mais antígenos bacterianos, preservados nas mesmas condições que o antígeno H.

Antígeno Vi

Um outro componente da superfície encontrado em algumas bactérias, cujo papel na virulência e imunidade continua em discussão é o antígeno Vi. Este antígeno foi descoberto por Felix & Pitt (1934 a,b) os quais tentaram correlacionar a virulência de *S. typhi*, para camundongos com a presença e a quantidade deste antígeno na amostra (1951).

Uma análise dos resultados destes investigadores sobre a importância do antígeno na virulência de *S. typhi* para camundongos e seres humanos, bem como de outros cujos resultados confirmaram ou negaram este papel, foi feita por Spaun (1957). Segundo este, as experiências até então realizadas não justificariam a conclusão de que a patogenicidade dos microrganismos fosse independente da síntese do antígeno Vi desde que amostras de bacilos típicos de elevada patogenicidade, e sem este antígeno, não foram descritas.

Posteriormente o papel do antígeno Vi na virulência foi reexaminado por alguns investigadores, que utilizando, como modelo animal, camundongos (Tully & Gaines, 1961) ou chimpanzés (Tully, Gaines & Tigertt, 1962), além do homem (Hornick et al, 1970), encontraram evidências sugestivas de sua participação na virulência.

Este antígeno foi considerado uma substância extremamente lábil à ação do calor e de vários agentes químicos (Felix, 1951; Felix & Pitt, 1934b) o que levou a modificações nos métodos de preparo das vacinas antitifoídicas.

A termolabilidade deste antígeno, principal objeção ao emprego de vacinas aquecidas, foi contestada desde os estudos iniciais de Felix. Assim é que já Smith (1938) demonstrou ser este antígeno resistente não só à fervura como à autoclavação, bem como relatou a obtenção, em coelhos, de anticorpos anti Vi com extratos aquecidos. Os resultados deste investigador foram confirmados posteriormente (Carlinfanti 1946; Webster, Landy & Freeman, 1952), e o próprio Felix (1952) admitiu ser este antígeno liberado da célula por aquecimento. Células previamente aquecidas e lavadas liberaram a mesma quantidade de antígeno Vi quando reaquecidas (Stuart, 1956). As experiências de Pelluffo (1941) demonstraram que, com células bacterianas previamente liofilizadas, as características imunológicas do antígeno Vi foram mantidas, mesmo após um aquecimento a 150°C por uma hora.

O primeiro investigador a relatar uma separação do antígeno Vi de outros componentes bacterianos, como o antígeno O, foi Ashida (1949). Este investigador purificou o antígeno, a partir de extratos alcalinos de uma preparação tipo Boivin, por precipitação ácida.

Logo após Webster, Landy & Freeman (1952) introduziram novo método de purificação baseado no fracionamento da extratos bacterianos por etanol em presença de elevada concentração de cloreto de sódio (35%). Para a remoção de contaminantes somáticos ainda presentes, estes investigadores utilizaram hidrólise por ácido acético à quente. Posteriormente, dois outros métodos foram descritos, nos quais não estiveram envolvidos o uso de álcali, ácido ou aquecimento. O primeiro destes métodos descritos por Baker et al (1959), consistiu no fracionamento de extratos bacterianos por solventes orgânicos (acetona, etanol) e detergente (Brometo de *N*-acetil-*N,N*-trimetil amônio, "Cetavlon"). O segundo método utilizou fracionamento por etanol, eletroforese e hidrólise enzimática (Jarvis, Mesenko & Kyle, 1960). Um outro método foi descrito por Wong & Feeley (1972) e consistiu em hidrólise enzimática e fracionamento com etanol e detergente ("Cetavlon").

As propriedades físico-químicas e imunológicas de antígenos purificados, a partir de amostras de *S. typhi* e *Citrobacter freundii* (amostra 5396/38) diferiram ligeiramente entre si (Baker et al, 1959; Webster et al, 1954).

De acordo com Edwards & Ewing (1972) através de imunoeletroforese foi verificado que o antígeno Vi de *S. typhi* consistia de 6 frações, das quais 2 eram termolábeis e 4 termoestáveis, enquanto que o antígeno Vi de *Citrobacter* continha as duas frações termolábeis e duas termoestáveis. Já em *S. paratyphi C* este antígeno tinha um comportamento semelhante ao de proteínas, ou seja às duas frações termolábeis de *S. typhi* e *Citrobacter*. Para estes e outros investigadores (Levin et al, 1975) não há na literatura evidências conclusivas sobre uma identidade imunológica e/ou química entre preparações obtidas de diferentes amostras.

Estudos físico-químicos definiram o antígeno como um polímero de ácido-N-acetil-galactosaminurônico e, quando derivado de *Citrobacter*, continha grupos O-acetil. Estes grupos foram removidos em preparações submetidas à hidrólise ácida (Webster, Landy & Freeman, 1952) ou hidrólise alcalina (Jarvis et al, 1967).

Uma comparação entre preparações obtidas pelo método de Webster, Landy & Freeman (1952) e o de Jarvis, Mesenko & Kyle (1960), levou Landy et al (1963) a concluir que a hidrólise ácida despolimerizava parcialmente o antígeno, levando a modificações físico-químicas e imunológicas. Para camundongos o poder imunogênico e protetor do antígeno contendo grupos O-acetil foi cerca de quarenta vezes maior que o obtido com as preparações de Webster, Landy & Freeman (1952). Posteriormente Martin, Jarvis & Milner (1967) estudando o efeito da despolimerização da molécula, por tratamento sônico, em relação às suas propriedades físico-químicas e imunológicas, concluíram que, quanto ao último aspecto, as razões das diferenças encontradas por Landy et al (1963) não puderam ser determinadas.

A importância de anticorpos anti-Vi para proteção de camundongos tem sido defendida por alguns investigadores (Gaines, Currie & Tully, 1960, 1965; Landy, 1953; Wong & Feeley, 1972; Wong et al, 1974) e negada por outros (Diena et al, 1973, 1975, 1977; Standfast, 1960).

De acordo com Wong et al (1974), a influência deste antígeno nos mecanismos celulares de defesa não foi investigada. Para Collins (1974), um dos defensores deste mecanismo na imunidade, os resultados favoráveis obtidos em camundongos foram mais influenciados pelas vias de inoculação.

No que diz respeito à proteção humana, os resultados de ensaios de campo com vacinas inativadas com etanol foram insatisfatórios, bem como a imunização de voluntários humanos com antígeno Vi purificado (Hornick et al, 1970). Os resultados insatisfatórios nos voluntários foram atribuídos ao método de purificação do antígeno utilizado (Webster, Landy & Freeman, 1952), uma vez que preparações obtidas a partir de *S. typhi* pelo método de Wong & Feeley (1972) foram muito mais efetivas para camundongos (Wong et al, 1974).

A influência do antígeno O nos resultados obtidos para o antígeno Vi, foi aceita como uma possibilidade, não só em camundongos (Archer & Whitby, 1957; Spaun, 1957), como em outros modelos experimentais. Em experiências de proteção passiva, em ovos embrionados, Grabar & Le Minor (1951) concluíram que soro de animais (coelhos) contendo anticorpos anti-O ou anti-Vi de *Citrobacter* não protegia ante o desafio por *S. typhi*. De acordo com Carter & Collins (1977) embora anticorpos para os antígenos O e Vi possam ter um papel na inativação inicial do germe, este é de pouca importância uma vez que, em experiências onde a via peritoneal foi empregada para imunização e desafio, os resultados favoráveis observados foram decorrentes de fatores inespecíficos.

Outros investigadores (Eigner et al, 1970) empregando o mesmo modelo experimental, sugeriram a existência em *S. typhi* de um antígeno X diferente do antígeno O e do Vi. Esta mesma designação, ou seja, antígeno X, fora utilizada por Topley & Ayrton (1924) para descrever um antígeno presente em certos sorotipos de salmonelas. Posteriormente um outro grupo de pesquisadores (Joyeux et al, 1974) relatou que este antígeno era facilmente removido da célula bacteriana com NaCl 0,5M e, não estava presente em preparações purificadas de antígeno Vi. Uma total separação desses antígenos não foi possível por centrifugações diferenciais (35.000 e 105.000g). Os mesmos investigadores descreveram esse antígeno como uma substância de natureza protéica, contaminada com dez por cento de antígeno Vi, o qual, quando absorvido, eliminou o poder protetor da fração, pondo em dúvida se este antígeno seria uma substância distinta do antígeno Vi ou uma parte deste, eliminada durante o processo de purificação (Joyeux et al, 1977).

Fímbrias

No que diz respeito a outros antígenos da superfície bacteriana, o conhecimento de que fímbrias eram essenciais para colonização de certas bactérias, entre elas algumas da família *Enterobacteriaceae*, abriu novos caminhos em pesquisas sobre proteção contra infecções bacterianas (Kline, 1976).

Um possível papel de fímbrias como fator de virulência em *Salmonella* foi pesquisado por Duguid, Anderson & Campbell (1966) os quais concluíram, baseados na existência de amostras genotipicamente não fimbriadas em espécies patogênicas, que as fímbrias não tinham papel importante nas infecções causadas por estes microrganismos.

Este fato foi confirmado posteriormente por Tannock, Blumershine & Savage (1975) quando observaram não haver correlação entre a presença de fímbrias em *S. typhimurium* e sua capacidade de ligar-se e invadir a mucosa do íleo de camundongos.

Um ano mais tarde, Duguid, Darekar & Wheeler (1976), utilizando o mesmo modelo experimental que os investigadores acima referidos, concluíram que, apesar de não serem essenciais para a virulência deste germe, as fímbrias facilitaram o estabelecimento da infecção e do estado de portador, em camundongos inoculados por via oral com *S. typhimurium*.

De maneira semelhante ao que ocorre com salmonelas, o papel de fímbrias na virulência de shigelas tem sido questionado. Andrade (1979), utilizando como modelo experimental a ceratoconjuntivite de cobaias, demonstrou diferenças significativas na virulência da fase fimbriada de *S. flexneri* em relação à fase não fimbriada.

Os componentes superficiais responsáveis pela aderência de salmonelas à mucosa intestinal não foram ainda definidos (Smith, 1977).

Antígeno O

Em relação ao antígeno O, apesar de numerosas investigações sob o ponto de vista químico, imunoquímico e genético (Luderitz et al, 1971; Osborn, Gander & Parisi, 1972; Osborn & Rothfield, 1971; Stocker & Makela, 1971), o seu papel real na patogenia e/ou na imunidade, das salmoneloses sistêmicas constitui até o presente motivo de discussões entre todos os investigadores.

Este antígeno constitui parte do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de enterobactérias e é responsável pela especificidade antigênica da molécula.

Para maior facilidade de discussão sobre seu papel na virulência e imunidade das salmoneloses sistêmicas faremos breve descrição de sua estrutura química, que se encontra descrita em numerosos trabalhos e revisões, entre eles, os de Luderitz, Staub & Westphal (1966) e Luderitz et al (1971).

O antígeno O e as propriedades endotóxicas do LPS estão intimamente associados, embora as estruturas responsáveis pela especificidade antigênica possam ser distinguidas da estrutura responsável pela toxicidade. Uma vez que estas propriedades se encontram em uma mesma molécula, este antígeno é, algumas vezes, denominado de endotoxina.

O primeiro passo na identificação da estrutura dos LPS de enterobactérias consistiu no seu isolamento e na identificação dos monômeros liberados por hidrólise ácida total. A análise qualitativa demonstrou que todas as salmonelas estudadas continham cinco açúcares básicos ou seja: *N*-acetil-glicosamina, galactose, glicose, heptose e ácido 2-ceto-desoxiotulônico (KDO) e que, de acordo com a composição qualitativa de seus LPS, poderiam ser classificadas em quimiotipos.

A presença destes açúcares comuns em todas as salmonelas levou ao conceito de que nestes LPS a cadeia lateral cuja composição e ligação entre os açúcares determinam sua especificidade sorológica, estava ligada a um lipídio, denominado de lipídio A, responsável pela atividade endotóxica, através destes açúcares comuns também denominados de cerne ("core"). O estudo com mutantes rugosas, bloqueadas na formação ou transferência dos vários componentes do polissacarídeo, demonstrou que este cerne apresentava pequenas variações entre as diferentes espécies, não só em relação à estrutura química como no relativo à especificidade sorológica. A análise química revelou que, baseando-se no lipopolissacarídeo R, as salmonelas poderiam ser classificadas em cinco grupos de acordo com sua composição química. Estes quimiotipos, por conveniência, receberam as denominações de Ra, Rb, Rc, Rd e Re, ou seja, aquelas contendo respectivamente 5, 4, 3, 2 e 1 açúcares em análise qualitativa. A mutante rugosa Re parece idêntica nos LPS de todas as enterobactérias estudadas até o presente.

Em relação às cadeias responsáveis pela especificidade dos antígenos O temos, na maioria dos LPS, uma cadeia lateral constituída de unidades repetidas de oligossacarídios cuja estrutura e composição diferem entre as amostras bacterianas. Em vários antígenos O esta cadeia lateral é constituída de açúcares ordinários (manose, ramnose, etc.) nas mais diversas combinações, enquanto em outros, açúcares menos comuns (3-6 didesoxi-hexoses) constituem fatores de especificidade sorológica. De acordo com a composição e ligação destes açúcares em unidades repetidas, as salmonelas foram classificadas em grupos sorológicos podendo apresentar um ou mais fatores responsáveis pela especificidade do antígeno O, cabendo a um deles uma função imunodominante. Estes grupos, de acordo com os determinantes dos antígenos O e dos antígenos H, foram subdivididos em tipos sorológicos. Uma vez que neste trabalho foram discutidos problemas ligados não só às salmoneloses sistêmicas do homem, mas ainda àquelas de outros mamíferos, apresentaremos na Tabela I alguns exemplos das salmonelas patogênicas para o homem e outros animais e os fatores que constituem seus antígenos O. As diferenças conhecidas nos antígenos O dos grupos sorológicos A, B, C e D não explicam o fenômeno da especificidade destas salmonelas por determinado hospedeiro, desde que, como exemplo, no grupo sorológico C temos a *S. paratyphi* C, que infecta quase que exclusivamente o homem e difere, antigenicamente, da *S. cholerae-suis*, patógeno primário de porco, apenas por conter antígeno Vi (Roantree, 1971). O mesmo é verdade quando se procura uma possível associação entre a presença do didesoxi-hexoses e a virulência de espécies pertencentes a estes grupos sorológicos. Nos grupos B e D estão as espécies de salmonelas mais frequentemente associadas às infecções sistêmicas (Roantree, 1971). As unidades repetidas destes dois grupos diferem principalmente nos didesoxi-açúcares ligados à manose, ou seja, no grupo B, a abequose e, no grupo D, a tivelose.

Este fato fez com que um grande número de investigadores procurasse uma possível associação qualitativa dos antígenos O destes grupos com a virulência destas salmonelas. Como pode ser visto na Tabela I, no grupo B temos a *S. paratyphi* B e a *S. typhimurium* (O: 1, 4, 5, 12) agentes de infecções sistêmicas no homem e no camundongo, respectivamente. No grupo D estão amostras com um comportamento semelhante ou seja *S. ty-*

phi (0: 9, 12, Vi), agente de infecções sistêmicas no homem e *S. enteritidis* (0: 1, 9, 12), em camundongos.

TABELA I

Alguns exemplos de salmonelas freqüentemente associados com infecções sistêmicas no homem e outros mamíferos. Dados modificados de Roantree (1967)

<i>Espécies</i>	<i>Grupos Sorológicos</i>	<i>Fatores do Antígeno 0</i>
<i>S. paratyphi A</i>	A	*(1), <u>2</u> **, 12
<i>S. paratyphi B</i>	B	(1), <u>4</u> , (5), 12
<i>S. typhimurium</i>	B	(1), <u>4</u> , (5), 12
<i>S. paratyphi C</i>	C1	<u>6</u> 7 Vi
<i>S. cholerae-suis</i>	C1	<u>6</u> 7
<i>S. typhi</i>	D	<u>9</u> 12 Vi
<i>S. enteritidis</i>	D	(1) <u>9</u> 12

* O parêntese indica que o determinante antigênico pode ser difícil de detectar.

** Os algarismos sublinhados correspondem aos antígenos "major" de cada grupo.

O conhecimento dos mecanismos genéticos que regulam a síntese deste LPS, permitiram que alguns investigadores avaliassem a influência das modificações qualitativas no antígeno 0 destes grupos sorológicos, na virulência desses germes.

Os resultados de alguns investigadores (Valtonen et al, 1975, Valtonen, 1970), obtidos por tratamento genético, indicaram que mutantes derivadas de uma amostra de *S. typhimurium* de baixa virulência foram mais patogênicas para camundongos inoculados via intraperitoneal, quando sua especificidade sorológica correspondia a 0: 4, 5, 12, do que quando a especificidade era 0:9, 12. O trabalho destes investigadores foi confirmado por Lyman, Stocker & Roantree (1977), os quais utilizaram ao invés de determinação da LD 50 (empregada pelos primeiros investigadores) a contagem bacteriana no fígado e baço de camundongos inoculados por via intraperitoneal e oral.

Contrariamente a estes resultados, Johnson et al (1974), concluíram que um híbrido de *S. typhi* e *S. typhimurium* com especificidade correspondente a 0: 9, 12, tinha virulência igual para camundongos (LD 50, inoculação intraperitoneal) à da amostra altamente virulenta de *S. typhimurium*.

Lyman, Stocker & Roantree (1977) chamam a atenção sobre que suas experiências tanto como as de Valtonen (1970), apenas mostraram variações pequenas na virulência, uma vez que ambas – *S. typhimurium* (0: 4, 5, 12) e *S. enteritidis* (0:9, 12), são altamente virulentas para estes animais. Embora Makela, Valtonen & Valtonen (1973) tenham definido a diferença na virulência destas mutantes como pequenas, porém significativas, eles não souberam explicar como o animal discriminaria essas estruturas, chegando assim à diferenciação. Os autores não conseguiram evidência de que mecanismos de defesa, tais como a fagocitose e o sistema imune, contribuíssem para este comportamento (Makela, Valtonen & Valtonen, 1973; Valtonen et al, 1971).

Em relação aos polissacarídeos de salmonelas, os gens que controlam a síntese, não só do antígeno O como do cerne, foram definidos no cromossoma bacteriano (Stocker & Makela, 1971).

Em resumo podemos ter mutantes, denominadas de rfb, nas quais ocorre bloqueio na síntese das unidades repetidas do LPS, mutantes rfc, com bloqueio na polimerização e, mutantes rfa, bloqueadas na síntese do cerne. As mutantes rfa e rfb são fenotipicamente rugosas e as rfc apresentam uma das unidades da cadeia lateral e são denominadas de SR, ou seja, intermediárias entre S e R.

Algumas mutantes rfa apresentam fragmentos de antígenos O e são chamadas de mutantes rfa vazantes ("leaky").

Na Figura 1 mostra-se uma representação esquemática do LPS de *S. typhimurium* e de algumas de suas mutantes rugosas.

Uma possível associação do antígeno O com a virulência de salmonelas vem-se discutindo a partir dos trabalhos de Lingelsheim (1913, apud Valtonen, 1970) e Arkwright (1927) os quais observaram que a mutação S → R era acompanhada de perda de virulência. Posteriormente Thjøtta & Waller (1932) demonstraram que mutantes rugosas de *Shigella flexneri*, tornam-se sensíveis à ação de anticorpos e complemento.

Seguiu-se a negação do papel deste antígeno na virulência por Pike & Mackenzie (1940) quando, trabalhando com mutantes lisas de *S. typhimurium* de virulência elevada e baixa, para camundongos, observaram que estas amostras eram indistinguíveis quanto a características culturais, sorológicas, imunogênicas e tóxicas, não diferindo significativamente quanto à invasividade e resistência à fagocitose. A única diferença significativa relacionou-se com a capacidade que tinha a amostra virulenta de multiplicar-se no hospedeiro.

As evidências de que a mutação S → R acompanhava-se de perda de virulência foram confirmadas por numerosos investigadores (Nelson & Roantree, 1967, ficando também demonstrado que, quanto menor a quantidade de polissacarídeo no componente rugoso, menos virulentas se tornaram as mutantes para camundongos (Germanier, 1970; Lyman, Steward & Roantree, 1976; Nakano & Saito, 1969).

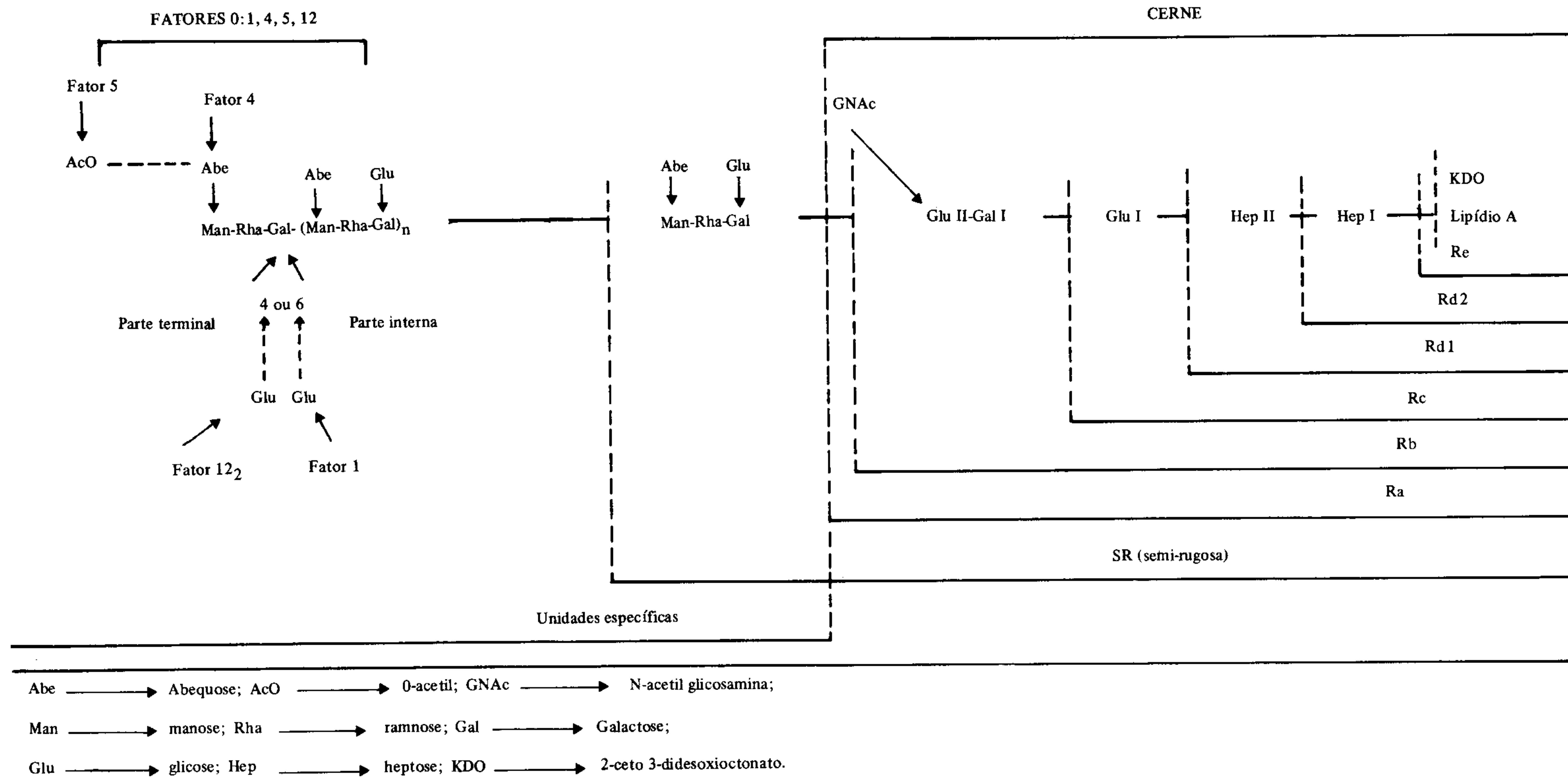
Sobre este último aspecto, a redução na virulência foi muito pequena, e o fato de que os mesmos quimiotipos rugosos, derivados de amostras diferentes, apresentaram grandes variações da virulência, levaram à suposição de que outros fatores, além da parede celular, haviam contribuído para a evidência dessa propriedade (Germanier, 1970).

Vários investigadores têm procurado correlacionar a quantidade de endotoxina de várias salmonelas com sua virulência para animais de laboratório. Alguns pesquisadores não encontraram diferença na quantidade deste antígeno quando compararam amostras lisas de *S. typhimurium* virulentas e avirulentas (Mackenzie, Pike & Swinney, 1940). Contrariamente, Archer & Rowley (1969) relataram que amostras lisas altamente virulentas de *S. typhimurium* continham os determinantes O:4, 5, 12 em concentrações duas vezes maiores que as amostras lisas avirulentas.

Os resultados inicialmente citados foram confirmados por Herzberg (1962) que demonstrou ser igual a LD 50 do LPS de amostras lisas virulentas ou avirulentas. Sobre este aspecto, Nakano & Saito (1969) concluíram que em mutantes SR e R de *S. typhimurium*, a virulência relacionava-se melhor com o número de cadeias laterais do que com a quantidade total deste antígeno, uma vez que amostras SR, virulentas, continham a mesma quantidade de antígeno que uma mutante rfa "leaky", avirulenta.

A aparente discrepância entre a composição do polissacarídeo do LPS e a sua endotoxicidade foi atribuída ao fato que, para matar o hospedeiro por intoxicação, o mi-

Fig. 1 - Representação esquemática do LPS de *S. typhimurium* e de suas mutantes rugosas (fundamentada em Germanier, 1970; Lyman, Steward & Roantree, 1976; Makela, Valtonen & Valtonen, 1973).



o organismo deve se multiplicar e produzir quantidade suficiente da endotoxina, o que não pode ocorrer com as amostras avirulentas (Cameron, Holtman & Jefferies, 1960). A toxicidade de amostras lisas e rugosas com vários tipos de LPS rugosos não se modificou, praticamente, quando usadas amostras mortas (Germanier, 1970). Assim a virulência independe da atividade endotóxica do LPS que, por sua vez, não estaria relacionada à composição do polissacarídeo no LPS.

São conhecidas outras causas de perda de virulência que não a mutação $S \rightarrow R$. Através de métodos genéticos foram obtidas mutantes, em que a perda de virulência estava ligada à incapacidade de síntese de purinas ou aminoácidos. Em relação a purinas a virulência foi readquirida pela reversão à prototrofia, enquanto no caso dos aminoácidos, observou-se que isto pode ou não ocorrer (Herzberg, 1962). No primeiro caso, a avirulência associou-se a uma limitada disponibilidade de fatores de crescimento no hospedeiro, o que impossibilitaria que os germes atingissem a doses tóxicas (Bacon, Burrows & Yates, 1951). Para Herzberg (1962) a reversão para prototrofia falha, em muitos casos em indicar uma relação direta entre nutrição e virulência.

Em híbridos de amostras avirulentas de *S. abony* e amostras virulentas de *S. typhimurium*, dois "loci" separados determinaram a avirulência de *S. abony* e, neste caso, a avirulência também não estava relacionada a fatores de crescimento ou ao antígeno O (Krishnapillai & Baron, 1964).

Pelo exposto, os mecanismos precisos subjacentes às mudanças de virulência não foram ainda elucidados e permanece a dúvida sobre se eles estão ligados à própria célula bacteriana ou a fatores de defesa do hospedeiro. Desde que a toxicidade de LPS não é alterada por modificações do polissacarídeo, a perda de virulência por mutação $S \rightarrow R$ foi atribuída a um aumento de sensibilidade das mutantes aos fatores de defesa do hospedeiro. Como já referido, as salmonelas que produzem infecções sistêmicas atingem órgãos e tecidos através do intestino delgado e pouco se sabe sobre os mecanismos bioquímicos ou anatômicos, pelos quais estes microrganismos invadem a mucosa do hospedeiro susceptível. Como antes mencionado, os fatores superficiais que foram definidos como responsáveis pela aderência das células à mucosa não contribuíram para virulência. Em termos de competição com a flora antibiótica, sugeriu-se uma participação do antígeno O como uma possível barreira à ação tóxica de ácidos graxos (Wardlaw, 1974, apud Smith, 1977).

A possibilidade de uma maior capacidade de penetração de amostras bacterianas lisas no epitélio intestinal, foi negada por Giannella et al (1973), baseados no fato de que a mutação $S \rightarrow R$ não altera o potencial invasivo de *S. typhimurium* para células cultivadas (HeLa).

A penetração do epitélio intestinal por estes microrganismos, por si só, não seria suficiente para produzir a doença, no que haveria necessidade de sua multiplicação no tecido do hospedeiro susceptível (Formal & Gemski, 1976; Roantree, 1971). Para Tanock, Blumersine & Savage (1975) o antígeno O talvez seja importante, porém não essencial, ao processo de invasão de *S. typhimurium* através do íleo de camundongos. Estes investigadores sugeriram que outras estruturas superficiais e produtos extracelulares, capazes de induzirem à ingestão dessas bactérias pelas células epiteliais, devem ser investigados.

As endotoxinas quando injetadas em animais determinam uma série de efeitos biológicos (Milner, Rudbach & Ribí, 1971), no entanto, a significação de sua ação tóxica, na patogênese das salmoneloses sistêmicas não está esclarecida (Collins, 1974).

Esta opinião é um dos poucos pontos de que participam os investigadores que discutem patogenia e/ou imunidade destas infecções. Entre outros, Neter (1976), relatou: "apesar de numerosas investigações, publicações e muitos congressos nacionais (E.U.A), internacionais e, conferências, o papel preciso das endotoxinas nas infecções humanas por Gram negativos ainda não foi elucidado".

O que representa esse tipo de antígeno, frente aos mecanismos de defesa do hospedeiro, tem sido discutido por grande número de investigadores e os resultados de alguns destes trabalhos serão a seguir resumidamente relatados.

Um dos mecanismos pelo qual este antígeno participaria na virulência, seria pela maior resistência das formas lisas à ação bactericida do soro e do complemento, como demonstrado pelos resultados já citados de Thjøtta & Waaler (1932) com amostras lisas e rugosas de *Sh. flexneri*.

A barreira oferecida pelo antígeno O à ação de anticorpos e complemento foi confirmada tanto para salmonelas quanto para outras enterobactérias (Fietta, Romero & Sicardi, 1977; Luderitz, Staub & Westphal, 1966; Maaloe, 1948; Reynolds & Pruul, 1971; Rowley, 1968).

Para explicar tal resistência Rowley (1968) e Chedid et al (1968) sugeriram que a ação estaria ligada a anticorpos contra o "cerne", envolvido pelo antígeno O nas amostras lisas. Uma vez que foram descritas amostras quimicamente lisas, virulentas para camundongos e sensíveis à ação do soro (Roantree & Steward, 1965), tal mecanismo somente seria justificado se nestas amostras houvesse um bloqueio incompleto do "cerne" (Feingold, Goldman & Kuritz, 1968). A possibilidade de que o polissacarídeo do LPS de amostras lisas bloqueiem a interação dos fatores do complemento ativado com os receptores da parede celular foi sugerido por Reynolds & Pruul (1971).

A atividade bactericida dos soros normais, para amostras lisas e sensíveis, só foi removida por absorção com amostras homólogas (Roantree, 1960).

A principal atuação dos anticorpos específicos de camundongos corresponderia a opsoninas, uma vez que no soro destes animais o sistema de complemento não apresentou atividade bactericida "in vitro" (Marcus, Esplin & Donaldson, 1954). Em camundongos com um sistema hemolítico completo e, em outros que se mostravam deficientes em um dos seus componentes, foi verificado que os primeiros tinham capacidade de matar *E. coli*, embora não tenha sido possível determinar se o evento realizou-se extracelularmente (Grynn & Medhurst, 1967).

Em experiências em que amostras lisas, sensíveis à ação de soros, foram colocadas em câmaras "Millipore" na cavidade peritoneal de camundongos, não houve efeito bactericida (Steward & Roantree, 1961). Ensaio semelhante em cobaias, demonstraram atividade bactericida específica (Steward, Collis & Roantree, 1966).

Como acima citado, em camundongos a ação de anticorpos específicos seria opsonizante e, em sua ausência, não haveria fagocitose de amostras de *S. typhimurium* pelos macrófagos, nos estudos "in vitro" (Jenkin & Banacerraf, 1960), ou na cavidade peritoneal dos camundongos (Blanden, Mackaness & Collins, 1966).

Este aspecto relacionar-se-ia a uma atividade antifagocitária do antígeno O. Tal atividade seria um dos mecanismos pelo qual ele contribuiria para a virulência desses microrganismos, uma vez que mutantes rugosas foram mais sensíveis à fagocitose, quando avaliada "in vivo", por seu rápido desaparecimento do sangue (Biozzi et al, 1963), ou "in vitro", em sistema utilizando macrófagos de camundongos (Fauve, 1964). As observações foram confirmadas utilizando células por aquecimento (60°C, 1 hora) frente a leucócitos polimorfonucleares, "in vitro" (Stendhal & Edebo, 1972) o mesmo ocorrendo com o emprego de células HeLa. No último sistema, o efeito somente foi observado quando utilizadas células bacterianas vivas (Kihlstrom & Edebo, 1976). Biozzi et al (1963) sugeriram que este fenômeno provavelmente estaria ligado a características físico-químicas do antígeno O. Posteriormente, o mesmo fato foi atribuído à natureza hidrofílica desse antígeno (Roantree, 1967), bem como à sua carga neutra, em comparação com a carga negativa e o caráter hidrofóbico de mutantes rugosas (Magnusson et al, 1977). Para o mesmo

grupo de investigadores (Stendahl et al, 1977; Stjernstrom et al, 1977) a função de anticorpos e complemento na fagocitose, seria a de diminuir o caráter hidrofílico da bactéria.

As propriedades físico-químicas do antígeno justificariam, assim, o aumento da atividade fagocitária em relação às formas rugosas. No entanto, a maior sensibilidade de amostras avirulentas à destruição intracelular ainda não foi esclarecida. Fauve (1964) verificou que as formas S de amostras pouco virulentas de *S. typhimurium* foram fagocitadas de maneira semelhante às formas S de amostras virulentas, mas que, após fagocitose, as primeiras eram destruídas tão rapidamente quanto formas rugosas, enquanto que as amostras virulentas começavam e se multiplicar no interior dos macrófagos. Resultados semelhantes foram observados com outras amostras bacterianas opsonizadas pelo soro normal (Jenkin & Benacerraf, 1960).

Esses resultados discordaram das experiências anteriores de Furness (1958), nas quais um grande número de bactérias virulentas e avirulentas foram inicialmente mortas por macrófagos normais de camundongos e, então, uma pequena percentagem das virulentas começava a se multiplicar após três horas. Houve confirmação dos resultados por outros investigadores (Blanden, Mackaness & Collins, 1966; Hsu & Radcliffe, 1968). Para os últimos, após a destruição inicial, sobreviventes de ambos os tipos (1% de avirulentas e 8% de virulentas) multiplicaram-se de maneira semelhante.

Em estudos com mutantes rugosas, de cerne completo ou incompleto, de *S. typhimurium*, foi verificado que submetidas à ação da fração lisossomal de leucócitos polimorfonucleares de cobaias, a presença do cerne completo era essencial para a resistência à ação bactericida, enquanto que a cadeia lateral não aumentava esta resistência (Friedberg & Shilo, 1970). Tagesson & Stendahl (1973) confirmaram esses resultados, mas relataram que quando utilizaram as frações lisossomais, em sistemas mais aproximados do que ocorre "in vivo", a maior resistência de formas lisas pôde ser observada.

Nos estudos de Friedberg & Shilo (1970) foi verificado que a opsonização de *S. typhimurium* com soro normal levou a um aumento de resistência destas bactérias à ação bactericida de frações lisossomais de leucócitos polimorfonucleares. Este efeito, no entanto, não se observou em sistema "in vitro" com macrófagos de camundongos (Blanden, Mackaness & Collins, 1966; Hsu & Radcliffe, 1968).

Uma avaliação da influência do antígeno O frente aos mecanismos humorais específicos no hospedeiro normal torna-se difícil, porque, mesmo com o emprego do mesmo sistema, tal como macrófagos de camundongos "in vitro", numerosas variáveis estão envolvidas em cada um dos trabalhos experimentais referidos. Entre as variáveis, podem citar-se tipos de soro, sua adição ao meio de cultura e/ou ao inóculo, tempo de observação, etc.

Outro condicionante para a virulência de *S. typhimurium*, seria a presença, no germe, de um fator termolábil que apresentaria reação cruzada com tecido do hospedeiro (Rowley & Jenkin, 1962). Posteriormente sugeriu-se ser este o fator somático O:5 (Jenkin & Rowley, 1965). Outros investigadores não encontraram evidências de uma participação do mesmo fator na virulência de *S. typhimurium* (Valtonen & Makela, 1971) nem se encontraram fatores termolábeis em *S. enteritidis* (Collins & Milne, 1966).

A "febre tifóide murina" é o modelo experimental mais utilizado pelos diferentes investigadores e, nos animais utilizados, mecanismos humorais e celulares estariam envolvidos na proteção (Ushiba, 1965).

O papel de anticorpos para o antígeno O na proteção contra a febre tifóide tem sido considerado desde os estudos iniciais. A proteção oferecida por vacinas constituídas de germes inativados por aquecimento foi considerada como evidência da ação protetora de anticorpos anti O (Arkwright, 1927).

Vacinas antibacterianas dariam proteção para germes que tivessem em comum o antígeno O, ou seja, uma vacina de *S. paratyphi* B protegeria contra infecções por *S. typhimurium* e uma de *S. typhi* contra *S. enteritidis* (Schutze, 1930). A partir dos trabalhos de Felix & Pitt (1934b) as atenções de muitos investigadores se voltaram para o papel do antígeno Vi nessas vacinas. Contrariamente aos resultados de Schutze (1930), Landy (1952) relatou que vacinas preparadas a partir de amostras com antígenos O diferentes, mas tendo em comum o antígeno Vi, conferiam proteção para *S. typhi*, tal como as vacinas preparadas com amostras homólogas. Esses resultados não foram confirmados por Archer & Whitby (1957) os quais verificaram que vacinas vivas e inativadas por etanol, de amostras de *S. cholerae-suis* (O: 6, 7), davam significativa proteção contra infecções, por desafio intraperitoneal, com *S. paratyphi* C (O: 6, 7, Vi), o mesmo não ocorrendo com vacinas vivas de *S. typhi* (O: 9, 12, Vi) embora a última protegesse camundongos contra doses tóxicas.

Nas experiências anteriormente citadas de Steward, Collins & Roantree (1966), os investigadores haviam verificado que a imunização de cobaias com *S. typhimurium*, não levava ao aparecimento de anticorpos bactericidas para *S. enteritidis* apesar de um fator somático comum (O: 12). Baseados nesses resultados, admitiram que, em *S. enteritidis*, o fator imunogênico mais importante corresponderia a O: 9.

O papel de anticorpos para este antígeno foi menos valorizado por experiências que demonstraram a capacidade de mutantes rugosas protegerem camundongos contra infecções por amostras lisas (Nakano & Saito, 1969; Saito et al, 1962).

O maior poder imunizante das vacinas vivas dividiu a opinião dos investigadores, não só quanto ao poder imunizante desta preparação, como sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na proteção.

Para o grupo que defende mecanismos mediados por células como a expressão mais significativa da imunidade, o maior poder protetor resulta do fato de que apenas vacinas vivas induzem hipersensibilidade tardia (Collins, 1970; Mackaness, Blanden & Collins, 1966). De acordo com esses investigadores (Blanden, Mackaness & Collins, 1966; Mackaness, Blanden & Collins, 1966) a imunização ativa com vacinas aquecidas, obtidas a partir de amostras virulentas, ou a transferência passiva do soro de animais imunizados, não produziram grau equivalente de proteção.

Na opinião de outros investigadores, para os quais os anticorpos constituem os fatores de defesa (Jenkin & Rowley, 1963), o menor poder imunizante de vacinas aquecidas estaria ligado à ausência de constituintes termolábeis e, no caso de *S. typhimurium*, como já referido, do fator somático O: 5. Anticorpos para este fator seriam de importância crucial na expressão da imunidade para infecções pelo mesmo sorotipo (Jenkin, Karnovsky & Rowley, 1967).

A ausência de imunidade em camundongos vacinados com *S. typhimurium* contra infecções por *S. enteritidis*, ambas contendo um fator somático comum O:12, foi interpretada como uma possível independência dos mecanismos imunológicos celulares com relação ao antígeno O (Collins & Mackaness, 1968).

Nos estudos de Germanier (1970, 1972) e Germanier & Furer (1971) a capacidade imunizante de uma série de amostras rugosas de *S. typhimurium*, bem como de amostras virulentas inativadas, foram comparadas em camundongos, considerando as diferentes variáveis, já apontadas, e vias de inoculação, bem como a avaliação baseada na contagem bacteriana no fígado e no baço e a proporção de sobreviventes nos grupos vacinado e controle. De acordo com os resultados, a via de imunização não influía significativamente quando considerado o número de bactérias no fígado e baço. No entanto, contrariamente às evidências de outros investigadores, somente mutantes rugosas com capacidade de sintetizar antígeno O "in vivo" (mutantes deficientes em uridina difosfato-4-epimerase) fo-

ram capazes de oferecer um grau de proteção igual ao desenvolvido com doses subletais de amostras virulentas (Germanier & Furer, 1971).

Germanier (1972) confirmou os resultados anteriormente citados sobre a não participação de fatores termolábeis e do fator O: 12 e sugeriu que mecanismos imunológicos celulares, dependentes da presença do antígeno O em células vivas, estariam envolvidas nesta proteção. Estudos posteriores sobre a virulência e poder imunizante da mutante, inoculado por via intraperitoneal em camundongos que receberam tratamento por agentes imunossupressores levaram, entretanto, à conclusão de que a imunidade humoral era de maior importância do que a celular (Morris, Wray & Sojka, 1976).

Antígenos Comuns do Cerne

O cerne, ou seja, a parte menos variável da cadeia polissacarídica, é idêntico em todos os sorotipos de salmonelas (Schmidt et al, 1976). Ao contrário do que ocorre com as mutantes Ra de salmonelas, em *E. coli* cinco tipos diferentes de cernes foram descritos e designados R1, R2, R3, R4 e K-12 (Schmidt, 1973; Schmidt, Jann & Jann, 1969, 1974). Os tipos R1, R3, e R4 também foram encontrados em certos sorotipos de Shigelas (Mayer & Schmidt, 1973).

A importância de anticorpos para estas estruturas foi primeiramente enfatizada por Chedid et al (1968), segundo os quais anticorpos anti-Ra de *S. typhimurium* protegiam camundongos contra infecções por microrganismos heterólogos tal a *Klebsiella pneumoniae*.

Baseado nestas informações, McCabe (1972) desenvolveu uma linha de pesquisa objetivando definir o papel de anticorpos para mutantes inativadas, em infecções experimentais humanas.

Nos estudos iniciais, McCabe (1972) utilizou camundongos como modelo experimental. Nestes animais, uma imunização passiva ou ativa com mutantes Ra, Rb, Rc, Rd1, Rd2 e Re, resultou em proteção significativa somente para antígenos comuns, ou seja Rd2 e Re, quando os animais foram desafiados por *K. pneumoniae* e *E. coli* 107. Os resultados insatisfatórios com as outras mutantes, excetuando-se o tipo Rd1, foram atribuídos às diferenças existentes entre os diversos tipos de cerne. A imunidade, quando comparada à obtida com amostras homólogas, foi menos efetiva. No entanto, para McCabe (1976) e outros investigadores (Young & Stevens, 1977) o aumento progressivo na frequência e letalidade de bacteriemias por estes germes, particularmente em pacientes com a resposta imune comprometida, bem como a impossibilidade de uma imunização específica, dada a diversidade de amostras bacterianas e tipos antigênicos, faz com que a imunização, ativa ou passiva, para antígenos comuns, seja uma tentativa lógica objetivando o controle dessas infecções.

Outros grupos de investigadores, entre eles o de Braude et al (1973) empregando imunização passiva de coelhos para mutantes J5 de *E. coli* correspondente ao quimiotipo Rc de salmonela (McCabe, 1976), encontraram uma redução significativa na frequência de reações de Shwartzman locais e sistêmicas, quando estes animais foram desafiados com LPS de amostras lisas heterólogas.

Em infecções humanas indivíduos hospitalizados foram divididos por McCabe (1972), em dois grupos: um com doenças não fatais e outros com doenças fatais. No soro destes indivíduos, em fase inicial da bacteriemia, não houve associação da incidência de choque ou morte com um baixo título de anticorpos anti O, ao contrário do que ocorreu com anticorpos para o antígeno Re. Quando identificada a natureza dos anticorpos para esses antígenos, Zinner & McCabe (1976), reafirmaram que, em indivíduos classificados dentro dos mesmos critérios antes referidos, o título de IgG para o antígeno O não estava associado com a frequência de choque ou morte. Em ambos os grupos, no entanto, inde-

pendente de anticorpos anti O, uma menor frequência de choque ou morte foi verificada em indivíduos com títulos elevados de anticorpos anti Re. Os investigadores sugeriram que o principal efeito desses anticorpos seria a opsonização, no que foram contestados por Young & Stevens (1977), que não evidenciaram "in vitro" tal atividade e sugeriram uma função antitóxica.

Lipídio A

Um outro componente comum desses LPS, e para o qual anticorpos foram produzidos quando o LPS foi administrado em condições adequadas, é o lipídio A (Galanos, Luderitz & Westphal, 1971). Anticorpos antilipídio A foram demonstrados em soros normais humanos e em títulos mais elevados, em pacientes com infecções urinárias (Galanos, 1975). Para esse investigador o significado biológico de anticorpos para este antígeno comum ainda não foi definido. Para o grupo de McCabe et al (1977) a imunização passiva ou ativa com lipídio A não protegeu coelhos contra bacteriemias fatais; como ocorreu com mutantes Re.

Antígenos comuns de natureza protéica

Outros constituintes comuns em parede celular de enterobactérias como lipoproteínas e proteínas começaram a ser estudados recentemente. Quanto à lipoproteínas, demonstraram-se ligadas à cadeia glicopeptídica e, suficientemente expostas na superfície bacteriana, como constituintes comuns a diversas amostras de enterobactérias (Braun, 1975). Em soros de coelhos — obtidos por imunização com células de escherichia, salmonela e shigela — foi demonstrada a presença de anticorpos para estes constituintes. Com mutantes rugosas (Ra e Re) o título dos anticorpos para esse antígeno foi bem mais elevado do que para o LPS, particularmente com mutantes Re (Braun et al, 1976).

O papel desses anticorpos ainda não foi estudado, mas, constituindo um determinante antigênico disponível na superfície bacteriana, para reações com anticorpos, tal como o antígeno Re e, tendo se mostrado mais imunogênico que este, teoricamente poderiam ter uma participação nos resultados obtidos com mutantes Re.

No que diz respeito a proteínas, um possível papel protetor ligado a salmoneloses sistêmicas foi sugerido por Collins & Mackaness (1968), baseados no fato de que estas, em mistura com adjuvante de Freund incompleto, tal como vacinas de germes não inativados, foram capazes de induzir, em camundongos, fenômenos de hipersensibilidade tardia.

A importância de proteínas comuns à família *Enterobacteriaceae*, na proteção, particularmente em relação a salmoneloses, tem sido defendida por Barber & Eylan (1947a, 1975b).

Contrariamente à opinião de Collins & Mackaness (1968) que defendem mecanismos celulares na imunidade contra essas infecções, esses acreditam que mecanismos humorais foram os responsáveis pela proteção obtida em seus estudos (Barber & Eylan, 1977). Ainda de acordo com os mesmos investigadores (Barber & Eylan, 1974b, 1975a), as modificações resultantes de tratamento genético, baseadas em padrões de aglutinação e atribuídas ao antígeno O (Valtonen & Makela, 1971) relacionaram-se a anticorpos para essas proteínas.

Para os mesmos pesquisadores essas proteínas são comuns às enterobactérias, embora uma proteção específica seja evidenciada com base no grau de mortalidade (DL 100) do grupo controle em relação ao vacinado. Ainda, de acordo com os autores, essas proteínas são termoestáveis e de elevada toxicidade para animais de laboratório.

Admitindo a possibilidade de uma significação clínica desses antígenos comuns, como imunógenos, um dos fatores limitantes das vacinas disponíveis no momento, ou seja, à toxicidade, estaria presente.

Constituintes ribossomais

As tentativas para encontrar uma fração não tóxica e capaz de proteger o homem com a mesma efetividade de vacinas vivas, têm levado diversos investigadores à proposição de uma série de substâncias como possíveis imunógenos. Inspirados nos trabalhos iniciais de Youmans & Youmans (1964, 1965) sobre frações ribossomais de *Mycobacterium tuberculosis* e suas atividades imunogênicas, alguns investigadores, desde então, têm utilizado frações de origem semelhante com uma série de microrganismos, entre eles, a *S. typhimurium*, as quais foram denominadas de "vacinas ribossomais" (Eisentein, 1975).

Existem controvérsias entre os investigadores sobre a identidade da(s) substância(s) protetora(s) para camundongos, presente(s) nestas vacinas. Desse modo a atividade imunogênica foi atribuída a uma proteína (Johnson, 1973), a um complexo proteína-RNA (Margolis & Bigley, 1972; Smith & Bigley, 1972a, b), a uma glicoproteína, a um complexo lipoprotéico (Houchens & Wright, 1973) e, a ácido ribonucleico (Venneman, 1972; Venneman & Berry, 1971a, b; Venneman, Bigley & Berry, 1970). Todos esses investigadores afirmaram que suas preparações conferiram um elevado grau de proteção, semelhante ao obtido com vacinas atenuadas e, capazes de estimularem mecanismo de imunidade celular. Posteriormente, alguns pesquisadores atribuíram esta, ou parte desta atividade, à contaminação das frações por endotoxina (Eisentein, 1975; Hoops et al, 1976), enquanto outros atribuíram o poder protetor de vacinas tipo "Venneman" a uma resposta inespecífica, ligada particularmente à linhagem de camundongos utilizados (Medina, Vas & Robson, 1975). Em um estudo comparativo, Angerman & Eisentein (1978) concluíram que, apesar de menos tóxicas que vacinas inativadas por acetona, as vacinas ribossomais de *S. typhimurium* não apresentaram uma atividade superior quando as primeiras foram administradas em doses adequadas. Ambas apresentaram-se quase tão efetivas quanto às vacinas vivas e, apesar da baixa eficácia de LPS, a probabilidade anteriormente citada sobre a participação deste nos resultados observados, não pôde ser afastada.

Antígeno comum de enterobactérias (ECA)

A possibilidade de profilaxia e/ou diagnóstico com um antígeno comum aos microrganismos patogênicos tem sido nos últimos anos o objetivo de muitos investigadores.

Entre estes antígenos, um componente comum apenas à família *Enterobacteriaceae* foi descrito pela primeira vez por Kunin, Beard & Halmaguy (1962).

Apesar de não conclusivas, as evidências existentes sobre sua localização na célula bacteriana, sugerem ser este um componente de superfície, e como tal, poder contribuir para a virulência do germe. Sobre esse aspecto, os trabalhos experimentais são escassos. De acordo com Valtonen et al (1976), mutantes lisas de *S. typhimurium*, ECA positivas, foram estatisticamente mais virulentas, quando inoculadas em camundongos por via intraperitoneal, que as mutantes lisas ECA negativas. Em alguma contradição com esses resultados, investigadores mexicanos (Carrilo, Hashimoto & Kumate 1966; Kumate et al, 1971) concluíram que uma das características de amostras de *E. coli* isoladas durante surtos de diarreia infantil, seria o baixo teor de ECA, quando comparadas com amostras isoladas antes e após o surto.

Em seu trabalho, Valtonen et al (1976) enfatizaram que os mecanismos pelos quais as mutantes de *S. typhimurium* ECA positivas foram mais virulentas que as ECA negativas, não puderam ser esclarecidos com os testes utilizados, ou seja, ambas apresentaram um comportamento similar em relação à velocidade de multiplicação "in vitro" e ao índice de fagocitose "in vivo".

Um outro grupo de investigadores (Gorzynski, 1976a; Gorzynski & Krasny, 1975a,c) verificou que extratos de tecidos de camundongos, particularmente de fígado, baço e rins, apresentaram antígeno de reatividade cruzada com ECA livre. A presença ou ausência dessa reatividade em determinado órgão variou com a linhagem de animal estudada. Para os autores, isto explicaria a variação e a fraca resposta humoral destes animais, para o antígeno ECA (Gorzynski, Neter & Ambrus, 1970), bem como uma susceptibilidade a infecções por enterobactérias.

Nos estudos com extrato de tecidos, uma fração solúvel em etanol foi mais efetiva em reações de inibição de hemaglutinação passiva, que extratos aquecidos não purificados. Estas preparações, no entanto, não mostraram capacidade de se ligar a hemácias ou de produzir anticorpos humorais. Quando inoculadas endovenosamente em coelhos, tiveram um comportamento semelhante ao da mistura ECA-LPS de amostras não imunogênicas, ou seja, preparavam o animal para uma resposta secundária por ECA. Dos órgãos utilizados, os extratos de cólon, embora com capacidade de preparar o animal para uma resposta secundária, não se mostraram ativos em reações de hemaglutinação passiva.

Em extratos de tecidos humanos uma atividade semelhante à descrita para camundongos foi demonstrada em órgãos como fígado e rins (Morgenstern & Gorzynski, 1977). No que diz respeito a extratos de cólon, os resultados deste grupo divergiram dos obtidos por Perlmann et al (1965, 1967) e por Lagercrantz et al (1968) os quais demonstraram a presença em ratos e seres humanos de antígeno de reatividade cruzada com *E. coli* 014. Esta reatividade cruzada foi demonstrada por testes de hemaglutinação passiva e inibição de hemaglutinação passiva. Uma reatividade ligada a linfócitos T destes pacientes foi demonstrada com a fração solúvel em etanol de *S. typhimurium* em testes de inibição de migração de macrófagos (Bull & Ignaczak, 1973). Uma vez que tanto o ECA livre (solúvel em etanol) como ECA de *E. coli* 014 (não solúvel em etanol) não apresentaram diferenças quanto ao determinante antigênico (Neter et al, 1964; Suzuki, Whang & Neter, 1966) as divergências entre estes pesquisadores provavelmente estão ligadas a diferenças tais como tipo de amostra bacteriana e métodos de purificação.

Os antígenos de cólon foram específicos e se assemelharam ao ECA quanto à sua obtenção pelos mesmos métodos, resistência ao aquecimento, capacidade de sensibilizar hemácias, etc. Posteriormente Carlsson et al (1978) definiram como glicoproteína, um componente isolado de fezes e cólon de ratos. Esta glicoproteína foi sensível à oxidação por periodato, à hidrólise ácida fraca, e reagiu com 40% dos soros de pacientes com colite ulcerativa. As relações antigênicas entre esta glicoproteína e extratos de *E. coli* 014 não foram determinadas.

Além da participação deste ECA de *E. coli* 014 na patologia de colites ulcerativas, uma possível associação com pielonefrites crônicas tem sido defendida pelo grupo de Holmgren et al (1972). Desta maneira, a participação de ECA na patogenia de afecções e infecções humanas não está definida. Ainda menos definida, sob o ponto de vista biológico, é sua importância no diagnóstico ou como imunógeno.

Na avaliação de uma possível proteção por ECA, dois modelos experimentais têm sido utilizados. Um dos modelos é o tradicionalmente utilizado em salmoneloses sistêmicas, ou seja, "a febre tifóide murina", enquanto o outro correspondeu a pielonefrites experimentais em coelhos.

Em camundongos, uma imunização ativa, com ECA, ou passiva, com soro imune de coelho, e, um desafio endovenoso por *S. typhimurium*, resultou em pequeno grau de proteção, quando avaliada a percentagem de sobreviventes entre os grupos vacinados e controle (Gorzynski, Ambrus & Neter, 1971; Gorzynski & Krasny, 1975b). Estes resultados foram atribuídos, como anteriormente mencionado, a uma falta de resposta ao estímulo antigênico, devida aos antígenos de reatividade cruzada com ECA nos tecidos desses animais.

Para o grupo de McCabe (McCabe, 1976; McCabe & Creely, 1973; McCabe et al, 1973), camundongos de linhagem CFI, diferentes das utilizadas pelos investigadores acima referidos, apresentaram uma boa resposta humoral para ECA. Nestes animais a proteção obtida por imunização ativa ou passiva com *E. coli* 014, estava relacionada a anticorpos para a porção do cerne (Re) e não para ECA. Estes resultados não foram aceitos por Makela & Meyer (1976) que os atribuíram à presença, nas preparações daquele grupo, de um outro antígeno comum, que não o de Kunin.

No relativo ao outro modelo animal, ou seja, pielonefrite experimental em coelhos, os resultados parecem mais esclarecedores. Nesses animais a imunização com a fração solúvel em etanol, ou a imunização passiva, resultaram em boa proteção, para desafios com enterobactérias (Domingue et al, 1970).

O mecanismo pelo qual anticorpos anti ECA protegeram estes animais, atribuiu-se à sua capacidade opsonizante, avaliada por testes "in vitro" com leucócitos polimorfonucleares de coelhos (Domingue & Neter, 1966a,b), uma vez que essas células não apresentaram atividade bactericida para outras amostras que não a *E. coli* 014 (Domingue & Neter, 1966a; Kunin & Beard, 1963).

Essa interpretação, no entanto, não encontrou apoio nas investigações de Whang, Yagi & Neter (1967) e McCabe & Greely (1973) para os quais a resposta desses animais (coelhos) para ECA constitui-se apenas de anticorpos tipo IgM, cuja ação protetora seria pouco provável no modelo experimental utilizado.

No homem, os dados experimentais relativos a um provável papel de anticorpos na proteção, restringiram-se às evidências de McCabe, Kreger & Johns (1972) e McCabe, Johns & DiGenio (1973) os quais negaram a significação de anticorpos circulantes para ECA em pacientes com bacteriemias.

As evidências de um possível papel protetor de anticorpos para ECA em animais de laboratório, sua inocuidade para estes animais (Kessel, Neter & Braun, 1966) e para o homem (Gorzynski et al, 1972) levaram alguns (McLaughlin & Domingue, 1974) à sugestão de que este imunógeno seria de grande importância, como vacina, na profilaxia de infecções por enterobactérias.

O fato de que este antígeno, quando inoculado em cobaios com o adjuvante de Freund completo, induziu fenômenos de hipersensibilidade tardia (Morgenstern & Gorzynski, 1973) seria mais um fator em favor de seu emprego como vacina. No entanto, como já mencionado, a suposição de uma provável participação do ECA na patogenia de certas doenças auto-imunes, fez com que fosse recomendada cautela quanto à sua aplicação clínica, até que elucidado seu papel real nas infecções por enterobactérias (Gorzynski, 1976b).

Com relação a uma possível aplicação clínica do título de anticorpos para ECA no diagnóstico, alguns resultados têm sido promissores e outros pouco satisfatórios, dependendo do tipo de infecção.

Em soros normais, a avaliação do título de anticorpos anti ECA data dos trabalhos de Kunin (1962, 1963) e Kunin & Beard (1963). De acordo com esses resultados o título dos anticorpos é extremamente baixo em soros fetais quando comparados aos soros maternos. A partir de seis meses os títulos de anti ECA se correlacionaram aos obtidos para o antígeno O.

Resultados similares foram publicados por Whang & Neter (1963), segundo os quais, o título máximo de anti ECA no soro de indivíduos normais e em preparações comerciais de gama globulina foi de um para quarenta.

Em infecções, o aumento do título de anti ECA seguiu um padrão relacionado ao tipo de infecção. Em casos de enterites, por salmonelas ou *E. coli*, infecções urinárias agudas ou, bacteriemias, anticorpos anti ECA foram demonstrados ocasionalmente, em baixos títulos (Andersen, 1966; Carter et al, 1968; Diaz & Neter, 1968; McCabe, Johns & DiGenio, 1973; McCabe, Kreger & Johns, 1972; Vosti et al, 1964).

Em outras condições, como em shigelose, peritonites (Griffiths, Yoonessi & Neter, 1977) e infecções urinárias crônicas (Andersen, 1966; Saito, 1967; Whang & Neter, 1963) um aumento significativo no título de anti ECA foi observado.

Quando os títulos de anticorpos anti ECA foram comparados ao obtido para um outro antígeno comum, ou seja, a lipoproteína, o padrão de respostas para ambos diferiu com o tipo de infecção (Griffiths, Yoonessi & Neter, 1977). Para esses investigadores, em pacientes com bacteriemias e doenças malignas um título elevado de anticorpos foi evidenciado somente em relação à lipoproteína, o que justificaria os resultados insatisfatórios de McCabe, Kreger & Johns (1972) e McCabe, Johns & DiGenio (1973) quanto a anticorpos para ECA.

No que diz respeito a pacientes com febre tifóide, foi observado que em dois, de oito casos, houve um aumento significativo no título de anti ECA (Diaz & Neter, 1968).

Destas infecções, o significado do título desses anticorpos como ajuda no diagnóstico clínico tem sido discutido particularmente em relação às infecções renais, como a pielonefrite. Para alguns pesquisadores, o título de anti ECA serviria como indicador destas infecções (Saito, 1967; Thomsen & Hjort, 1977; Whang & Neter, 1963), enquanto outros negaram tal correlação (Andersen, 1966; Carter et al, 1968; Sanford et al, 1978).

Ainda no que diz respeito a este tipo de infecções, Aoki, Merkel & McCabe (1966) e Aoki et al (1967) sugeriram que testes de imunofluorescência, com imunossoro anti ECA, poderia ser uma maneira fácil e útil de demonstrar antígenos bacterianos no tecido renal, uma vez que substituiria uma grande quantidade de soros específicos para diferentes amostras de *E. coli* e outras enterobactérias. Em pielonefrites crônicas a presença destes antígenos foi demonstrada em seis de sete casos de pielonefrites abacterianas (Aoki et al, 1969).

Tais resultados, no entanto, não foram confirmados por Schwarz & Cotran (1973) e por Thomsen & Hjort (1973) segundo os quais, somente em pielonefrites agudas foi possível a evidenciação deste antígeno no tecido renal.

As possíveis implicações do antígeno ECA na virulência, patogênese, imunidade e diagnóstico não foram ainda, como se segue da presente revisão, perfeitamente elucidadas.

Há evidências de que em seres humanos, tal como ocorreu em coelhos, a imunização com a fração ECA semipurificada (fração solúvel em etanol) produza um aumento significativo de anticorpos anti ECA (Gorzynski et al, 1972).

De nossas observações (Milhomen, 1979) a imunização de indivíduos com vacinas contendo antígeno ECA, no caso, a vacina antitifoídica, não provocou resposta humoral para este antígeno. Esse fato não exclui uma possível participação do antígeno na imunidade antitifoídica uma vez que, tal como ocorre em coelhos, esta vacina pode preparar o homem para uma rápida resposta secundária ao agente bacteriano. Resta salientar que mutantes rugosas, quando viáveis, foram imunogênicas para ECA independente da amostra bacteriana original.

Foi mencionado que estas mutantes oferecem uma maior imunidade que vacinas inativadas. Não tendo sido definido os determinantes antigênicos responsáveis por esta proteção, a participação do ECA deveria ser investigada.

SUMMARY

The results of the work done from the beginning of the century up to the present were reviewed, leading to the conclusion that the large amount of available knowledge on the chemistry, immunological, antigenic, and biological aspects of the antigens of *Salmonella*, was not sufficient to determine which antigen(s) accounted for immune protection on systemic salmonellosis.

Data accumulated on numerous and diversified preparations being used as immunogens, as well as on several experimental models and different methods of studying the immune response. In relation to *Salmonella typhi*, given that this microorganism is an exclusive natural pathogen only for man, the results of protection obtained with laboratory animal experiments, often, did not show any correlation with observed facts in the human being.

It should be mentioned, however, that the search for an immune response has been restricted, in most instances to the O, H and Vi antibodies, and to active or passive protective tests with mice. Cell mediated immunity has been evaluated mainly by using skin tests with chemically ill defined and variable protein preparations.

No definitive hypothesis is available, at present, related to the mechanism(s) of immune protection operating on systemic salmonellosis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, H.J., 1966. Studies of urinary tract infection in infancy and childhood. VII – The relation of *E. coli* antibodies in pyelonephritis as measured by homologous and common (Kunin) antigens. *J. Pediatr.*, 68 :542-550.
- ANDERSON, E.S. & GUNNELL, A., 1964. A suggestion for a new anti-typhoid vaccine. *Lancet*, 2 :1196-1200.
- ANDRADE, J.R.C., 1979. Papel da adesividade mediada por fímbrias na ceratoconjuntivite experimental por *Shigella flexneri*. Tese de Mestrado. Instituto de Microbiologia, U.F.R.J., Rio de Janeiro, 156 p.
- ANGERMAN, C.R. & EISENTEIN, T.K., 1978. Comparative efficacy and toxicity of a ribosomal vaccine, acetone-killed cell, lipopolysaccharide and a live cell vaccine prepared from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 19 :575-582.
- AOKI, S.; IMAMURA, S.; AOKI, M. & McCABE, W.R., 1969. "Abacterial" and bacterial pyelonephritis. Immunofluorescent localization of bacterial antigen. *N. Engl. J. Med.*, 281 :1375-1382.
- AOKI, S.; MERKEL, M.; AOKI, M. & McCABE, W.R., 1967. Immunofluorescent localization of bacterial antigen in pyelonephritis. I – The use of antisera against the common enterobacterial antigen in experimental renal lesions. *J. Lab. Clin. Med.* 70 :204-212.
- AOKI, S.; MERKEL, M.; McCABE, W.R., 1966. Immunofluorescent demonstration of the common enterobacterial antigen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121 :230-234.
- ARCHER, G.T.L. & WHITBY, J.L., 1957. Protection of mice by living Vi and O vaccines against death caused by *Salmonella paratyphi C*. *J. Hyg.*, 55 :513-526.
- ARCHER, J.R. & ROWLEY, D., 1969. A quantitative comparison of the antigenic structure of a virulent and an avirulent strain of *Salmonella typhimurium*. *Immunology*. 17 :551-558.
- ARKWRIGHT, J.A., 1927. The value of different kinds of antigen in prophylactic "enteric" vaccines. *J. Pathol. Bacteriol.* 30 :345-364.

- ASHIDA, T., 1949. Studies on the antigenic substances of *Eberthella typhosa*. *Jap. J. Exp. Med.*, 20 :181-209.
- BACON, G.A.; BURROWS, T.W. & YATES, V.M., 1951. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*: the loss of virulence of certain mutants. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 32 :85-96.
- BAKER, E.E.; WHITESIDE, R.E.; BASCH, R. & DEROW, M.A., 1959. The Vi antigens of *Enterobacteriaceae*. I – Purification and chemical properties. *J. Immunol.*, 83 :680-683.
- BARBER, C. & EYLAN, E., 1974a. The proteins from *Salmonella enteritidis*; their protective role in mice, and the antibodies induced during infection with the homologous strain. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A*, 226 :331-335.
- BARBER, C. & EYLAN, E., 1974b. The heat resistant antigens of *Salmonella paratyphi* A and their relationship to *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium*. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A*, 226 :324-330.
- BARBER, C. & EYLAN, E., 1975a. Unrelatedness between agglutinations of bacteria and the presence of antipolysaccharides in sera of *Salmonellae* groups B and D. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A*, 233 :180-187.
- BARBER, C. & EYLAN, E., 1975b. Confirmation of the protective role of proteins from *Salmonella typhimurium* in infection of mice with their natural pathogen. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reih A*, 230 :461-465.
- BARBER, C. & EYLAN, E., 1977. Behaviour of *Salmonellae* non pathogenic for mice. I – Neutralization of their toxicities by induced antiprotein antibodies. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A*, 237 :213-221.
- BENENSON, A.S., 1964. Serological responses of man to typhoid vaccines. *Bull. W.H.O.*, 30 :653-662.
- BEUMER, J., 1974. Les vaccins antibactériens: des microbes vivants aux antigènes purifiés. *Bull. Inst. Pasteur*, 72 :35-48.
- BIOZZI, G.; STIFFEL, C.; Le MINOR, L.; MOUTON, D. & BOUTHILLIER, Y., 1963. Étude quantitative de l'effect opsonizant des immunosérums sur la phagocytose des *Salmonella* par les cellules du système réticulo-endothélial *in vivo*. *Ann. Inst. Pasteur*, 105 :635-666.
- BLANDEN, R.V.; MACKANESS, G.B. & COLLINS, F.M., 1966. Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid. *J. Exp. Med.*, 124 :585-600.
- BRAUDE, A.L.; DOUGLAS, H. & DAVIS, C.E., 1973. Treatment and prevention of intravascular coagulation with antiserum to endotoxin. *J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 128 :157-164.
- BRAUN, V., 1975. Covalent lipoprotein from the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, 415 :335-377.
- BRAUN, V.; BOSCH, V.; KLUMPP, E.R.; NEFF, I.; MAYER, H. & SCHLECHT, S., 1976. Antigenic determinants of murein-lipoprotein and its exposure at the surface of *Enterobacteriaceae*. *Eur. J. Biochem.*, 62 :555-556.
- BULL, D.M. & IGNACZAK, T.F., 1973. Enterobacterial common antigen-induced lymphocyte reactivity in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 64 :43-50.
- CAMERON, J.A.; HOLTMAN, D.F. & JEFERIES, C.D., 1960. The association of virulence with endotoxins in *Salmonella pullorum*. *J. Infect. Dis.*, 106 :159-161.
- CARLINFANTI, E., 1946. Progrès récents dans l'étude des antigènes et des anticorps typhoidiques. *An. Inst. Pasteur*, 72 :766-782.
- CARLSSON, H.E.; SUNDBLAD, G.; HAMMARSTROM, S.; PERLMANN, P. & GUSTAFSON, B.E., 1978. Immunological studies in ulcerative colitis. Extraction, fractionation, and immunological characterization of germ-free rat colon antigen. *Arch. Biochem. Biophys.*, 187 :366-375.

- CARRILLO, J.; HASHIMOTO, B. & KUMATE, J., 1966. Content of heterogenetic antigen in *Escherichia coli* and its relationship to diarrhea in newborn infants. *J. Infect. Dis.*, 106 :285-296.
- CARTER, M.J.; EHRENKRANZ, N.J.; BURNS, J. & CASSADY, J.C., 1968. Serologic response to heterologous *Escherichia* serogroups in women with pyelonephritis. *N. Engl. J. Med.*, 279 :1407-1412.
- CARTER, P.B. & COLLINS, F.M., 1977. Assessment of typhoid vaccines by using the intraperitoneal route of challenge. *Infect. Immun.*, 17 :555-560.
- CHEDID, L.; PARANT, M.; PARANT, F. & BOYER, F., 1968. A proposed mechanism for natural immunity to enterobacterial pathogens. *J. Immunol.*, 100 :292-301.
- COLLINS, F.M., 1970. Immunity to enteric infection in mice. *Infect. Immun.*, 1 :243-250.
- COLLINS, F.M., 1974. Vaccines and cell-mediated immunity. *Bacteriol. Rev.*, 38 :371-402.
- COLLINS, F.M. & MACKANESS, G.B., 1968. Delayed hypersensitivity and Arthus reactivity in relation to host resistance in *Salmonella*-infected mice. *J. Immunol.*, 101 :830-845.
- COLLINS, F.M. & MILNE, M., 1966. Heat-labile antigens of *Salmonella enteritidis*. II – Mouse-protection studies. *J. Bacteriol.*, 92 :549-557.
- DIAZ, F. & NETER, E., 1968. Antibody response to the common enterobacterial antigen of children with shigellosis, salmonellosis, or urinary tract infection. *Amer. J. Med. Sci.*, 256 :18-24.
- DIENA, B.B.; JOHNSON, E.M.; BARON, L.S.; WALLACE, R. & GREENBERG, L., 1973. Assay of typhoid vaccines with *Salmonella typhosa*-*Salmonella typhimurium* hybrids. *Infect. Immun.*, 7 :5-8.
- DIENA, B.B.; RYAN, A.; WALLACE, R.; ASHTON, F.R.; JOHNSON, E.M. & BARON, L.S., 1975. Ineffectiveness of Vi and chemically treated endotoxins on typhoid vaccines in mice challenged with a *Salmonella typhosa*-*Salmonella typhimurium* hybrid. *Infect. Immun.*, 12 :1470-1471.
- DIENA, B.B.; RYAN, A.; WALLACE, R.; JOHNSON, E.M.; BARON, L.S.; & ASHTON, F.E., 1977. Effectiveness of parenteral and oral typhoid vaccination in mice challenged with a *Salmonella typhi*-*Salmonella typhimurium* hybrid. *Infect. Immun.*, 15 :997-998.
- DOMINGUE, G.J. & NETER, E., 1966a. Opsonizing and bactericidal activity of antibodies against common antigen of *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.*, 91 :129-133.
- DOMINGUE, G.J. & NETER, E., 1966b. Inhibition by lipopolysaccharide of immune phagocytosis of latex particles modified with common antigen of enteric bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 121 :133-137.
- DOMINGUE, G.J.; SALHI, A.; ROUNTREE, C. & LITTLE, W., 1970. Prevention of experimental hematogenous and retrograde pyelonephritis by antibodies against enterobacterial common antigen. *Infect. Immun.*, 2 :175-182.
- DUGUID, J.P.; ANDERSON, E.S. & CAMPBELL, I., 1966. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J. Pathol. Bacteriol.* 92 :107-138.
- DUGUID, J.P.; DAREKAR, M. R. & WHEATER, D.W.F., 1976. Fimbriae and infectivity in *Salmonella typhimurium*. *J. Med. Microbiol.*, 9 :459-473.
- EDSALL, G.; CARLSON, M.C.; FORMAL, S.B. & BENENSON, A.S., 1959. Laboratory tests of typhoid vaccines used in a controlled field study. *Bull. W.H.O.*, 20 :1017-1032.
- EDWARDS, E.A.; JOHNSON, D.P.; PIERCE, W.E. & PECKINPAUGH, R.O., 1974. Reaction and serologic responses to monovalent acetone-inactivated typhoid vaccine and heat-killed TAB when given by jet infection. *Bull. W.H.O.*, 51 :501-505.
- EDWARDS, P.R. & EWING, W.H., 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. 3^a ed., Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota.

- EIGUER, T.; BINSTEIN, N.; CETRANGOLO, R. & STAUB, A.M., 1970. Recherche du pouvoir protecteur pour l'embryon de poulet de divers sérums anti-*Salmonella typhi* de lapin et d'homme. *Ann. Inst. Pasteur.* 119 :646-662.
- EISENTEIN, T.K., 1975. Evidence for O antigens as the antigenic determinants in "ribosomal" vaccines prepared from *Salmonella*. *Infect. Immun.*, 12 :364-377.
- FAUVE, M.R., 1964. Résistance cellulaire a l'infection bactérienne. II – Comportement de macrophages de souris entretenus, "in vitro", dans un milieu sans sérum en présence de *Salmonella typhimurium* d'inégale virulence. *Ann. Inst. Pasteur.* 107 :472-483.
- FEINGOLD, D.S.; GOLDMAN, J.M. & KURITZ, H.M., 1968. Locus of the lethal event in the serum bactericidal reaction. *J. Bacteriol.*, 96 :2127-2131.
- FELIX, A., 1951. The preparation, testing and standardization of typhoid vaccine. *J. Hyg.*, 49 :268-287.
- FELIX, A., 1952. The properties of different *Salmonella* Vi antigens. *J. Hyg.*, 50 :515-539.
- FELIX, A. & PITT, R.M., 1934a. Virulence of *B. typhosus* and resistance to O antibody. *J. Pathol. Bacteriol.*, 38 :409-420.
- FELIX, A. & PITT, R.M., 1934b. A new antigen of *B. typhosus*. Its relation to virulence and to active and passive immunization. *Lancet*, 227 :186-191.
- FELIX, A. & PITT, R.M., 1951. The pathogenic and immunogenic activities of *Salmonella typhi* in relation to its antigenic constituents. *J. Hyg.*, 49 :92-110.
- FIETTA, A.; ROMERO, E. & SICCARDI, A.G., 1977. Effect of some R factor on the sensitivity of rough *Enterobacteriaceae* to human serum. *Infect. Immun.*, 18 :278-282.
- FORMAL, S.B. & GEMSKI, P., 1976. Studies on the pathogenesis of intestinal disease caused by invasive bacteria. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A*, 235 :9-12.
- FRIEDBERG, D. & SHILO, H., 1970. Interaction of Gram-negative bacteria with the lysosomal fraction of polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 1 :305-310.
- FURNESS, G., 1958. Interaction between *Salmonella typhimurium* and phagocytic cells in cell culture. *J. Infect. Dis.*, 103 :272-277.
- GAINES, S.; CURRIE, J.A. & TULLY, J.C., 1960. Production of incomplete Vi antibody in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 104 :602-605.
- GAINES, S.; CURRIE, J.A. & TULLY, J.C., 1965. Factors affecting formation of incomplete Vi antibody in mice. *J. Bacteriol.* 90 :635-642.
- GALANOS, C., 1975. Physical state and biological activity of lipopolysaccharides. Toxicity and immunogenicity of the lipid A component. *Z. Immunitätsforsch.*, 149 :214-229.
- GALANOS, C.; LUDERITZ, O. & WESTPHAL, O., 1971. Preparation and properties of antisera against the lipid-A component of bacterial lipopolysaccharides. *Eur. J. Biochem.* 24 :116-122.
- GERMANIER, R., 1970. Immunity in experimental salmonellosis. I – Protection induced by rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 2 :309-315.
- GERMANIER, R., 1972. Immunity in experimental salmonellosis. III – Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 5 :792-797.
- GERMANIER, R. & FURER, E., 1971. Immunity in experimental salmonellosis. II – Basis for the avirulence and protective capacity of gal E mutants of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 4 :663-673.

- GIANELLA, R.A.; WASHINGTON, O.; GEMSKI, P. & FORMAL, S., 1973. Invasion of Hela cells by *Salmonella typhimurium*: a model for study of invasiveness of *Salmonella*. *J. Infect. Dis.*, *128* :69-75.
- GLYNN, A.A. & MEDHURST, F.S., 1967. Possible extracellular and intracellular bactericidal actions of mouse complement. *Nature*, *213* :608-610.
- GORZYNSKI, E.A., 1976a. Cross-reactivity between mouse tissue and enterobacterial common antigen (CA). *Mil. Med.*, *141* :610-612.
- GORZYNSKI, E.A., 1976b. Biologic significance of enterobacterial common antigen (CA) and engendered antibodies. *Mil. Med.*, *141* :696-699.
- GORZYNSKI, E.A.; AMBRUS, J.L. & NETER, E., 1971. Effect of common enterobacterial antiserum in experimental *Salmonella typhimurium* infection of mice. *Proc. Exp. Biol. Med.*, *137* :1209-1212.
- GORZYNSKI, E.A. & KRASNY, S.A., 1975a. Immunological mimicry between mouse tissues and enterobacterial common antigen. *Immunol. Commun.*, *4* :39-49.
- GORZYNSKI, E.A. & KRASNY, S.A., 1975b. Effect of erythrocytes treated with enterobacterial common antigen of experimental *Salmonella typhimurium* infection of mice. *Med. Microbiol. Immunol.*, *161* :163-170.
- GORZYNSKI, E.A. & KRASNY, S.A., 1975c. Cross-reactivity between organ extracts of gnotobiotic mice and enterobacterial common antigen. *J. Reticuloendothel. Soc.*, *17* :346-352.
- GORZYNSKI, E.A.; NETER, E. & AMBRUS, J.L., 1970. Differences in antibody response of mouse strains to enterobacterial common antigen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *134* :776-779.
- GORZYNSKI, E.A.; OSS, C.J. Van; AMBRUS, J.L. & NETER, E., 1972. The hemagglutinin response of human subjects to common enterobacterial antigen. *Infect. Immun.*, *5* :625-626.
- GRABAR, J. & Le MINOR, S., 1951. Test de séro-protection antityphoïdique sur l'embryon de poulet. *Ann. Inst. Pasteur*, *81* :528-540.
- GRIFFITHS, E.K.; YOONESSI, S. & NETER, E., 1977. Antibody response to enterobacterial lipoprotein of patients with varied infections due to *Enterobacteriaceae*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, *154* :246-249.
- HEJFEC, L.B.; SALMIN, L.V.; LEJTMAN, M.Z.; KUZ'MINOVA, M.L.; VASIL'EVA, A.V.; LEVINA, L.A.; BENCIAANOVA, T.C.; PAVLOVA, E.A. & ANTONOVA, A.A., 1966. A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the USSR. *Bull. W. H. O.*, *34* :321-339.
- HERZBERG, M., 1962. Living organisms as immunizing agents against experimental salmonellosis in mice. I - Virulence of auxotrophic mutants. *J. Infect. Dis.*, *111* :192-203.
- HOLMGREN, J.; HAMMARSTROM, S.; HOLM, S.E.; AHLMAN, J.; ATTMAN, P.O. & JODAL, U., 1972. An antigenic relationship between human kidney, colon and the common antigen of *Enterobacteriaceae*. *Int. Arch. Allergy. Appl. Immunol.* *43* :89-97.
- HOOPS, P.; PRATHER, N.E.; BERRY, L.J. & RAVEL, J.M., 1976. Evidence for an extrinsic immunogen in effective ribosomal vaccines from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, *13* :1184-1192.
- HORNICK, R.B.; GREISMAN, S.E.; WOODWARD, T.E.; DUPONT, H.L.; DAWKINS, A.T. & SNYDER, M.J., 1970. Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control (first of two parts). *N. Engl. J. Med.*, *283* :686-691.
- HOUCHENS, D.P. & WRIGHT JR., G.L., 1973. Immunity to *Salmonella typhimurium* infection: characterization of antigens in active protection by polyacrylamide gel electrophoresis. *Infect. Immun.*, *7* :507-511.
- HSU, H.S. & RADCLIFF, A.S., 1968. Interactions between macrophages of guinea pigs and *Salmonellae*. I - Fate of *Salmonella typhimurium* within macrophages of normal guinea pigs. *J. Bacteriol.*, *96* :191-197.

- JARVIS, F.G.; MESENKO, M.T. & KYLE, J.E., 1960. Electrophoretic purification of the Vi antigen. *J. Bacteriol.*, 80 :677-682.
- JARVIS, F.G.; MESENKO, M.T.; MARTIO, D.G. & FERRINE, T.D., 1967. Physicochemical properties of the Vi antigen before and after mild alkaline hydrolysis. *J. Bacteriol.*, 94 :1406-1410.
- JENKIN, C.R. & BENACERRAF, B., 1960. *In vitro* studies on the interaction between mouse peritoneal macrophages and strains of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *J. Exp. med.* 112 :403-417.
- JENKIN, C.R.; KARNOVSKY, M.L. & ROWLEY, D., 1967. Preparation of an artificial antigen and immunity to mouse typhoid. *Immunology*, 13 :361-372.
- JENKIN, C.R. & ROWLEY, D., 1963. Basis for immunity to typhoid in mice and the question of "cellular immunity". *Bacteriol. Rev.*, 27 :391-404.
- JENKIN, C.R. & ROWLEY, D., 1965. Partial purification of the protective antigen of *Salmonella typhimurium* and its distribution among various strains of bacteria. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 43 :65-78.
- JOHNSON, E.M.; SNELLINGS, N.J.; LIFE, C.A. & BARON, L.S., 1974. Intraperitoneal mouse virulence of *Salmonella typhimurium* hybrids expressing somatic antigen 9. *Infect. Immun.*, 10 :669-671.
- JOHNSON, W., 1973. Ribosomal vaccines. II - Specificity of the immune response to ribosomal ribonucleic acid and protein isolated from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 8 :395-400.
- JOYEUX, Y.; JOUIN, H.; LELLUC, B. & STAUB, A.M., 1974. Recherches sur l'antigène X responsable de la production des anticorps anti-*Salmonella typhi*, protecteurs pour l'embryon de poulet. *C.R. Acad. Sci (sér D)*, 279 :1507-1510.
- JOYEUX, Y.; JOUIN, H.; LELUC, B. & STAUB, A.M., 1977. Recherches sur l'antigène X responsable de la production des anticorps anti-*Salmonella typhi*, protecteurs pour l'embryon de poulet. *Ann. Immunol.*, 128 :221-223.
- KESSEL, R.W.I.; NETER, E. & BRAUN, W., 1966. Biological activities of the common antigen of *Enterobacteriaceae*. *J. Bacteriol.* 91 :465-466.
- KIHLSTROM, E. & EDEBO, L., 1976. Association of viable and inactivated *Salmonella typhimurium* 395 MS and MR 10 with HeLa cells. *Infect. Immun.*, 14 :851-857.
- KLINE, B.C., 1976. Pili, plasmids, and microbial virulence. *Mayo Clin. Proc.* 51 :3-12.
- KRISHNAPILLAI, V. & BARON, L.S., 1964. Alterations in the mouse virulence of *Salmonella typhimurium* by genetic recombination. *J. Bacteriol.*, 87 :598-605.
- KUMATE, J.; CRAVIOTO, J.; HASHIMOTO, B.; VEGA, L. & CARRILLO, J., 1971. Content of common antigen of *Escherichia coli* and diarrhea of newborns and infants in a Mexican pre industrial community. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 176 :350-359.
- KUNIN, C.M., 1962. Antibody distribution against nonenteropathic *E. coli*. Relation to age, sex and breast feeding. *Arch. Intern. Med.*, 110 :676-686.
- KUNIN, C.M., 1963. Separation, characterization, and biological significance of a common antigen in *Enterobacteriaceae*. *J. Exp. Med.*, 118 :565-586.
- KUNIN, C.M. & BEARD, M.V., 1963. Serological studies of O antigens of *Escherichia coli* by means of the hemagglutination test. *J. Bacteriol.*, 85 :541-548.
- KUNIN, C.M.; BEARD, M.V.; HALMAGYI, N.E., 1962. Evidence for a common hapten associated with endotoxin fraction of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111 :160-166.

- LAGERCRANTZ, R.; HAMMARSTROM, S.; PERLMANN, P. & GUSTAFSSON, B.E., 1968. Immunological studies in ulcerative colitis. IV - Origin of autoantibodies. *J. Exp. Med.*, *128* :1339-1352.
- LANDY, M., 1952. Studies on Vi antigen. I - Relative Vi antigen content of V form cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, *80* :55-58.
- LANDY, M., 1953. Enhancement of the immunogenicity of typhoid vaccine by retention of the Vi antigen. *Amer. J. Hyg.*, *58* :148-164.
- LANDY, A.; TRAPANI, R.J.; WEBSTER, M.E. & JARVIS, F.G. 1963. Immunological properties of Vi isolated by chemical fractionation and by eletrophoresis. *Tex. Rep. Biol. Med.*, *21* :214-229.
- LEVIN, M.; WONG, K.H.; REYNOLDS, H.Y.; SUTTON, A. & NORTHRUP, R.S., 1975. Vi antigen from *Salmonella typhosa* and immunity against typhoid fever. II - Safety and antigenicity in humans. *Infect. Immun.*, *12* :1290-1294.
- LUDERITZ, O.; STAUB, A.M. & WESTPHAL, O., 1966. Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. *Bacteriol. Rev.*, *30* :192-225.
- LUDERITZ, O.; WESTPHAL, O.; STAUB, A.M. & NIKAIDO, H., 1971. Bacterial endotoxins. Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. In *Microbial Toxins*. Vol. 4, p. 145-224. WEINBAUM, G.; KADIS, S. & AJL. S., Eds. Academic Pres Inc., New York.
- LYMAN, M.B.; STEWARD, J.P. & ROANTREE, R.J., 1976. Characterization of the virulence and antigenic structure of *Salmonella typhimurium* strains wiht lipopolysaccharide core defects. *Infect. Immun.*, *13* :1539-1542.
- LYMAN, M.B.; STOCKER, B.A.D. & ROANTREE, R.J., 1977. Comparison of the virulence of 0:9, 12 and 0: 4, 5, 12 *Salmonella typhimurium* hist transductants for mice. *Infect. Immun.*, *15* :491-499.
- MAALOE, O., 1948. Pathogenic-apathogenic transformation of *Salmonella typhimurium*. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. (Sect. B)*, *25* :414-430.
- MacKANESS, G.B.; BLANDEN, R.V. & COLLINS, F.M., 1966. Hostparasite relations in mouse typhoid. *J. Exp. Med.*, *124* :573-583.
- MACKENZIE, G.M.; PIKE, R.M. & SWINNEY, R.E., 1940. Virulence of *Salmonella typhimurium*. II - Studies of the polysaccharide antigens of virulent and avirulent strains. *J. Bacteriol.*, *40* :197-214.
- MAGNUSSON, K.E.; STENDHAL, O.; TAGESSON, C.; EDEBO, L. & JOHANSSON, G., 1977. The tendency of smooth and rough *Salmonella typhimurium* bacteria and lipopolysaccharide to hydrophobic and ionic interaction, as studied in aqueous polymer two-phase systems. *Acta Pathol., Microbiol. Scand. (Sect. B)*, *85* :212-218.
- MAKELA, P.H. & MAYER, H., 1976. Enterobacterial common antigen. *Bacterial., Rev.*, *40* :591-632.
- MAKELA, P.H.; VALTONEN, V.V. & VALTONEN, M., 1973. Role of O-antigen (lipopolysaccharide) factors in the virulence of *Salmonella*. *J. Infect. Dis. (Suppl.)* *128* :81-85.
- MARCUS, S.; ESPLIN, D.W. & DONALDSON, D.M., 1954. Lack of bactericidal effect of mouse serum on a number of common microorganisms. *Science*, *119* :877.
- MARGOLIS, J.M. & BIGLEY, N.J., 1972. Cytophilic macroglobulin reactive with bacterial protein in mice immunized with ribonucleic acid-protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, *6* :390-397.
- MARTIN, D.G.; JARVIS, F.G. & MILNER, K.C., 1967. Physicochemical and biological properties of sonically treated Vi antigen. *J. Bacteriol.*, *94* :1411-1416.
- MAYER, H. & SCHMIDT, G., 1973. The occurrence of three different lipopolysaccharide cores in *Shigella* and their relationship to known enterobacterial core types. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenked. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A*, *224* :345-354.

- McCABE, W.R., 1972. Immunization with R mutants of *S. minnesota*. I - Protection against challenge with heterologous Gram-negative bacilli. *J. Immunol.*, 108 :601-610.
- McCABE, W.R., 1976. Immunoprophylaxis of Gram-negative bacillary infections. *Ann. Rev. Med.*, 27 :335-341.
- McCABE, W.R.; BRUINS, S.C.; CRAVEN, E. & JOHNS, M., 1977. Cross-reactive antigens: their potential for immunization induced immunity to Gram-negative bacteria *J. Infect. Dis.* (Suppl.), 136 :161-166.
- McCABE, W.R. & GREELY, A., 1973. Common enterobacterial antigen. II - Effect of immunization on challenge with heterologous bacilli. *Infect. Immun.*, 7 :386-392.
- McCABE, W.R.; GREELY, A.; DiGENIO, T. & JOHNS, M.A., 1973. Humoral immunity to type-specific and cross-reactive antigens of Gram-negative bacilli. *J. Infect. Dis.*, (Suppl.) 128 :284-289.
- McCABE, W.R.; JOHNS, M. & DiGENIO, T., 1973. Common enterobacterial antigen. III - Initial titers and antibody response in bacteremia caused by Gram-negative bacilli. *Infect. Immun.*, 7 :393-397.
- McCABE, W.R.; KREGGER, B.E. & JOHNS, M.A., 1972. Type-specific and cross-reactive antibodies in Gram-negative bacteremia. *N. Engl. J. Med.* 287 :261-267.
- McLAUGHLIN, J.C. & DOMINGUE, G.L., 1974. The immunologic role of the ethanol-soluble enterobacterial common antigen versus experimental renal infection. *Immunol. Commun.*, 3 :51-75.
- MEDINA, S.; VAS, S.I. & ROBSON, H.G., 1975. Effect of nonspecific stimulation on the defense mechanism of inbred mice. *J. Immunol.*, 114 :1720-1725.
- MILHOMEM, A.M., 1979. Contribuição ao estudo da imunidade na vacinação anti-tifóide. Tese. Doutor em Ciências. Instituto de Microbiologia. U.F.R.J. Rio de Janeiro, 183p.
- MILHOMEM, A.M. & SUASSUNA, I., 1982. A imunidade na febre tifóide. I. A vacinação anti-tifóide de Wright, 1896 a 1979. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 77 :93-120.
- MILNER, K.C.; RUDBACH, J.A. & RIBI, E., 1971. Bacterial endotoxins. General characteristics. In *Microbial Toxins*. Vol. 4, p. 1-65. WEIBAUM, G.; KADIS, S. & AJL, S.J., eds. Academic Press, Inc. New York.
- MORGENSTERN, M.A. & GORZYNSKI, E.A., 1973. Immune response of guinea pigs to common enterobacterial antigen. *Immunol. Commun.*, 2 :495-506.
- MORGENSTERN, M.A. & GORZYNSKI, E.A., 1977. Immunogenic cross-reactivity between human tissues and enterobacterial common antigen. *Infect. Immun.* 17 :36-42.
- MORRIS, J.A.; WRAY, C. & SOJKA, W.L., 1976. The effect of T and B lymphocyte depletion on the protection of mice vaccinated with a gal E mutant of *Salmonella typhimurium*. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 57 :345-360.
- NAKANO, M. & SAITO, K., 1969. Chemical components in the cell wall of *Salmonella typhimurium* effecting its virulence and immunogenicity in mice. *Nature*, 222 :1085-1096.
- NELSON, B.W. & ROANTREE, R.J., 1967. Analysis of lipopolysaccharides extracted from penicillin-resistant, serum-sensitive *Salmonella* mutants. *J. Gen. Microbiol.*, 48 :179-188.
- NETER, E., 1976. Factors of pathogenicity: Gram-negative bacteria. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe A*, 235 :3-8.
- NETER, E.; WHANG, H.Y.; SUZUKI, T. & GORZYNSKI, E.A., 1964. Differences in antibody response of rabbit to intravenously injected soluble and cell attached enterobacterial antigen. *Immunology*, 7 :657-664.

- OSBORN, M.J.; GANDER, J.E. & PARISI, E., 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Site of synthesis of lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.*, 247 :3973-3986.
- OSBORN, M.J. & ROTHFIELD, L.J., 1971. Bacterial endotoxins. Biosynthesis of the core region of lipopolysaccharide. In *Microbial Toxins*. Vol. 4, p. 331-350. WEINSBAUM, G.S.; KADIS, S. & AJL, S.J., eds. Academic Press Inc. New York.
- PELUFFO, C.A., 1941. Stability of Vi antigen of *Salmonella typhi*. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 48 :340-343.
- PERLMANN, P.; HAMMARSTROM, S.; LAGERCRANTZ, R. & GUSTAFSSON., B.E., 1965. Antigen from colon of germ free rats and antibodies in human ulcerative colitis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 124 :377-394.
- PERLMANN, P.; HAMMERSTROM, S.; LAGERCRANTZ, R. & CAMPBELL, D., 1967. Autoantibodies to colon in rats and human ulcerative colitis: cross reactivity with *Escherichia coli* 014 antigen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 125 :975-980.
- PIKE, R.M. & MACKENZIE, G.M., 1940. Virulence of *Salmonella typhimurium*. I - Analysis of experimental infection in mice with strains of high and low virulence. *J. Bacteriol.* 40 :171-195.
- RAFFEL, S., 1953. Immunity, hypersensitivity and serology, p. 419-426. Appleton-Century-Crofts, New York.
- REYNOLDS, B.L. & PRUUL, H., 1971. Protective role of smooth lipopolysaccharide in the serum bactericidal reaction. *Infect. Immun.*, 4 :764-771.
- ROANTREE, R.J., 1960. Specific absorption of the complement dependent bactericidal effect of normal serum. *Fed. Proc.* 19 :204.
- ROANTREE, R.J., 1967. *Salmonella* O antigens and virulence. *Ann. Rev. Microbiol.*, 21 :443-466.
- ROANTREE, R.J., 1971. Bacterial endotoxins. The relationship of lipopolysaccharide structure to bacterial virulence. In *microbial toxins*. Vol. 5, p. 1-37. WEINBAUM, G.; KADIS, S. & AJL, S.J., eds. Academic Press Inc. New York.
- ROANTREE, R.J. & STEWARD, J.P., 1965. Mutations to penicillin resistance in the *Enterobacteriaceae* that affect sensitivity to serum and virulence for mouse. *J. Bacteriol.*, 89 :630-639.
- ROWLEY, D., 1968. Sensitivity of rough Gram negative bacteria to the bactericidal action of serum. *J. Bacteriol.*, 95 :1647-1650.
- ROWLEY, D. & JENKIN, C.R., 1962. Antigenic cross-reaction between host and parasite as a possible cause of pathogenicity. *Nature*, 193 :151-154.
- SAITO, I., 1967. Sorological study of chronic pyelonephritis. Especially on the diagnostic value of the estimation of enterobacterial common antibody response. *Fukushima. J. Med. Sci.*, 14 :45-53.
- SAITO, I.; NAKANO, K.M.; AKIYAMA, T. & USHIBA, D., 1962. Passive transfer of immunity to typhoid by macrophages. *J. Bacteriol.*, 84 :500-507.
- SANFORD, B.A.; THOMAS, V.L.; FORLAND, M.; CARSON, S. & SHELOKOV, A., 1978. Immune response in urinary tract infection determined by radioimmunoassay and immunofluorescence: serum antibody levels against infecting bacterium and *Enterobacteriaceae* common antigen. *J. Clin. Microbiol.*, 8 :575-579.
- SCHMIDT, G., 1973. Genetical studies on the lipopolysaccharide structure of *Escherichia coli* K-12. *J. Gen. Microbiol.*, 77 :151-160.

- SCHMIDT, G.; JANN, B. & JANN, K., 1969. Immunochemistry of R lipopolysaccharides of *Escherichia coli*. Different core regions in the lipopolysaccharides of O grupo 8 *Eur. J. Biochem.*, 10 :501-509.
- SCHMIDT, G.; JANN, B. & JANN, K., 1974. Genetic and immunochemical studies on *Escherichia coli* 014 K7:H -. *Eur. J. Biochem.*, 42 :303-309.
- SCHMIDT, G.; MANNEL, D.; MAYER, H.; WHANG, H.Y. & NETER, E., 1976. Role of a lipopolysaccharides gene for immunogenicity of the enterobacterial common antigen. *J. Bacteriol.*, 126 :579-586.
- SCHUTZE, H., 1930. The importance of somatic antigen in the production of aertrycke and gartner immunity in mice. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 11 :34-42.
- SCHWARZ, M.M. & COTRAN, R.S., 1973. Common enterobacterial antigen in human chronic pyelonephritis and interstitial nephritis. An immunofluorescent study. *N. Engl. J. Med.* 289 :830-835.
- SMITH, E.V.D., 1938. Heat stability and serological activity of toxic extracts of the typhoid bacillus. *J. Infect. Dis.* 63 :21-24.
- SMITH, H., 1977. Microbial surfaces in relation to pathogenicity. *Bacteriol. Rev.*, 41 :475-500.
- SMITH, R.A. & BIGLEY, N.J., 1972a. Ribonucleic acid-protein fractions of virulent *Salmonella typhimurium* as protective immunogens. *Infect. Immun.*, 6 :377-383.
- SMITH, R.A. & BIGLEY, N.J., 1972b. Detection of delayed hypersensitivity in mice injected with ribonucleic acid-protein in fractions of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 6 :384-386.
- SPAUN, J., 1957. Typhoid vaccine. Vi antigen and Vi antibody. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand* (Suppl. B.) 123 :11-79.
- STANDFAST, A.F.B., 1960. A report on the laboratory assays carried out at the Lister Institute of Preventive Medicine on the typhoid vaccines used in the field study in Yugoslavia. *Bull. W.H.O.*, 23 :37-45.
- STENDAHL, C. & EDEBO, L., 1972. Phagocytosis of mutants of *Salmonella typhimurium* by rabbit polymorphonuclear cells. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.* (Sect. B.). 80 :481-488.
- STENDAHL, C.; TAGESSON, C.; MAGNUSSON, K.E. & EDEBO, L., 1977. Physicochemical consequences of opsonization of *Salmonella typhimurium* with hyperimmune IgG complement. *Immunology*, 32 :11-18.
- STEWART, J.P.; COLLINS, L.R. & ROANTREE, R.J., 1966. Effects of immunization of guinea pigs lacking bactericidal antibody against *Salmonella enteritidis*. *J. Immunol.*, 97 :224-234.
- STEWART, J.P. & ROANTREE, R.J., 1961. Effect of mouse peritoneal fluid on strains of enteric bacilli. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 108 :654-658.
- STJERNSTROM, I.; MAGNUSSON, K.E.; STENDAHL, O. & TAGESSON, C., 1977. Liability to hydrophobic and charge interaction of smooth *Salmonella typhimurium* 395 MS sensitized with anti-MS immunoglobulin G and complement. *Infect. Immun.*, 18 :261-265.
- STOCKER, B.A.D. & MAKELA, P.H., 1971. Bacterial endotoxins. Genetic aspect of biosynthesis and structure of *Salmonella* lipopolysaccharide. In *Microbial Toxins*. Vol. 4, p. 369-438. WEINBAUM, G.; KADIS, S. & AJL, S., eds. Academic Press Inc., New York.
- STUART, C.A., 1956. The unfortunate role of precedent in bacteriology. *Bacteriol. Rev.*, 20 :203-206.
- SUZUKI, T.; WHANG, H.Y. & NETER, E., 1966. Studies of common antigen of *Enterobacteriaceae* with particular reference of *Escherichia coli* 014. *Ann. Immunol Hung.*, 9 :283-292.

- TAGESSON, C. & STENDAHL, O., 1973. Influence of the surface lipopolysaccharide structure of *Salmonella typhimurium* on resistance to intracellular bactericidal systems. *Acta Path. Microbiol. Scand. (Sect. B.)*, 81 :473-480.
- TANNOCK, G.W.; BLUMERSHINE, R.V.H. & SAVAGE, D.C., 1975. Association of *Salmonella typhimurium* with, and its invasion of the ileal mucosa in mice. *Infect. Immun.*, 11 :365-370.
- THJØTTA, T.H. & WAALER, E., 1932. Dissociation and sensitiveness to normal serum in dysentery bacilli of type III. *J. Bacteriol.*, 24 :301-316.
- THOMSEN, O.F. & HJORT, T., 1973. Immunofluorescent demonstration of bacterial antigen in experimental pyelonephritis with antiserum against common enterobacterial antigen. *Acta Path. Microbiol. Scand. (Sect. A)*, 81 :474-482.
- THOMSEN, O.F. & HJORT, T., 1977. Antibodies against *E. coli* O-antigens and common enterobacterial antigen in kidneytransplant recipients. *Acta Path. Microbiol. Scand. (Sect. B.)*, 85 :455-461.
- TOPLEY, W.W.C. & AYRTON, J., 1924. Further investigations into the biological characteristics of *B. enteritidis* (Aertrycke) *J. Hyg.*, 23 :198-222.
- TULLY, J.G. & GAINES, S., 1961. H antigen of *Salmonella typhosa*. *J. Bacteriol.*, 81 :924-932.
- TULLY, J.G.; GAINES, S. & TIGERTT, W.D., 1962. Attempts to induce typhoid fever in chimpanzees with non-Vi strains of *Salmonella typhosa*. *J. Infect. Dis.*, 110 :47-54.
- TULLY, J.G.; GAINES, S. & TIGERTT, W.D., 1963. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV - Role of H antigen in protection. *J. Infect. Dis.*, 112 :118-124.
- USHIBA, D., 1965. Two types of immunity in experimental typhoid; "cellular immunity" and "humoral immunity". *Keio J. Med.*, 14 :45-61.
- VALTONEN, M.V.; LARINKARI, U.M.; PLOSILA, M.; VALTONEN, V.V. & MAKELA, P.H., 1976. Effect of enterobacterial common antigen on mouse virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 13 :1601-1605.
- VALTONEN, M.V.; PLOSILA, M.; VALTONEN, V.V. & MAKELA, P.H., 1975. The quality of the lipopolysaccharide on mouse virulence of *Salmonella enteritidis*. *Infect. Immun.*, 12 :828-832.
- VALTONEN, V.V., 1970. Mouse virulence of *Salmonella* strains: the effect of different smooth-type O side-chains. *J. Gen. Microbiol.*, 64 :255-268.
- VALTONEN, V.V.; AIRD, J.; VALTONEN, M.V.; MAKELA, O. & MAKELA, P. H., 1971. Mouse virulence of *Salmonella*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (Sect. B.)*, 79 :715-718.
- VALTONEN, V.V. & MAKELA, P.H., 1971. The effect of lipopolysaccharide modifications – antigenic factors 1, 5, 12₂ and 27 – on the virulence of *Salmonella* strains for mice. *J. Gen. Microbiol.*, 69 :107-115.
- VENNEMAN, M.R., 1972. Purification of immunogenically active ribonucleic acid preparations of *Salmonella typhimurium*: molecular-sieve and anion-exchange chromatography. *Infect. Immun.*, 5 :269-282.
- VENNEMAN, M.R. & BERRY, L.J., 1971a. Serum-mediated resistance induced with immunogenic preparations of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 4 :373-380.
- VENNEMAN, M.R. & BERRY, L.J., 1971b. Cell-mediated resistance induced with immunogenic preparations of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 4 :381-387.
- VENNEMAN, M.R.; BIGLEY, N.J. & BERRY, L.J., 1970. Immunogenicity of ribonucleic acid preparations obtained from *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 1 :574-582.

- VOSTI, K.L.; MONTO, A.S.; OLDER, J.J. & PANTZ, L.A., 1964. The serological specificity of crude and purified antigen extracts of *Escherichia coli* hemagglutination reaction with rabbit and human antisera. *J. Immunol.* 93 :199-204.
- WAHDAN, M.H.; SIPPEL, J.E.; MIKHAIL, I.A.; RAHKA, A.E.; ANDERSON, E.S.; SPARKS, H.A. & CVJETANOVIC, B., 1975. Controlled field trial of a typhoid vaccine prepared with a nonmotile mutant of *Salmonella typhi* Ty2. *Bull. W.H.O.*, 52 :69-73.
- WEBSTER, M.E.; LANDY, M. & FREEMAN, M.E., 1952. Studies on Vi antigen. II - Purification of Vi antigen from *Escherichia coli* 5396/38. *J. Immunol.*, 69 :135-142.
- WEBSTER, M.E.; SAGIN, J.F.; ANDERSON, P.R.; BREESE, S.S.; FREEMAN, M.G. & LANDY, M., 1954. Studies on Vi antigen. IV-Physicochemical characterization of Vi antigens isolated from V form *Enterobacteriaceae*. *J. Immunol.*, 73 :16-22.
- WHANG, H.Y. & NETER, E., 1963. Study of heterogenetic (Kunin) antibodies in serum of healthy subjects and children with enteric and urinary tract infections. *J. Pediat.*, 63 :412-419.
- WHANG, H.Y.; YAGI, Y. & NETER, E., 1967. Characterization of rabbit antibodies against common bacterial antigen and their presence in the fetus. *Intern. Arch. Allerg.*, 32 :353-365.
- WONG, K.H. & FEELEY, J.C., 1972. Isolation of Vi antigen and a simple method for its measurement. *Appl. Microbiol.*, 24 :629-633.
- WONG, K.H.; FEELEY, J.C.; NORTHRUP, R.S. & FORLINES, M.E., 1974. Vi antigen from *Salmonella typhosa* and immunity against typhoid fever. I - Isolation and immunologic properties in animals. *Infect. Immun.*, 9 :348-353.
- YOUMANS, A.S. & YOUMANS, G.P., 1964. Nature of labile immunogenic substance in the particulate fractions isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 88 :1030-1037.
- YOUMANS, A.S. & YOUMANS, G.P., 1965. Immunogenic activity of a ribosomal fraction obtained from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.*, 89 :1291-1298.
- YOUNG, L.S. & STEVENS, P., 1977. Cross-protective immunity to Gram-negative bacilli: studies with core glycolipid of *Salmonella minnesota* and of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* (Suppl.), 136 :174-180.
- ZINNER, S.H. & McCABE, W.R., 1976. Effects of IgM and IgG antibody in patients with bacteremia due Gram-negative bacilli. *J. Infect. Dis.*, 133 :37-45.