



Bactérias Lácticas PRODUTORAS DE ANTÍGENOS

Desenvolvimento de uma vacina oral contra a brucelose

1. Introdução

Brucella abortus é uma bactéria patogênica intracelular facultativa que infecta homens e animais domésticos. A *Brucella* é o agente etiológico da brucelose, doença que afeta aproximadamente 10% do rebanho bovino brasileiro. As manifestações patológicas da brucelose são diversas e incluem febre ondulante, artrite, endocardite e meningite em humanos, aborto e infertilidade em bovinos. O homem pode ser infectado pelo contato com animais infectados ou por ingestão de produtos lácteos contaminados. Desta forma, o controle da brucelose em animais domésticos é primordial para o seu controle em humanos.

Atualmente não existe uma vacina eficaz para o controle da brucelose humana. Entretanto para o controle da brucelose animal existe uma vacina comercial constituída de uma linhagem viva atenuada da bactéria, *B. abortus* (B19), que apresenta três grandes desvantagens: 1) pode causar aborto quando administrada em fêmeas gestantes; 2) é patogênica para humanos; 3) induz anticorpos em animais imunizados, interferindo no diagnóstico de populações infectadas. Uma outra linhagem atenuada da *B. abortus* (RB51), desprovida da cadeia "O" do lipopolissacarídeo, tem sido utilizada nos Estados Unidos e também pode causar aborto em fêmeas gestantes. Desta forma, o desenvolvimento de vacinas mais eficazes e seguras constitui prioridade para uma diminuição significativa, ou mesmo erradicação, desta doença.

No caso da *Brucella abortus*, cuja infecção ocorre por via oral, o desenvolvimento de vacinas que induzem uma imunidade de mucosa é de grande interesse, uma vez que este tipo de

imunização pode levar à produção de imunoglobulinas IgA secretoras antígeno-específicas (sIgA) diretamente na principal via de entrada deste patógeno. A produção local de sIgA pode prevenir uma interação inicial do patógeno com a superfície da mucosa bloqueando a colonização e/ou invasão de células do hospedeiro, o que facilita a destruição das bactérias.

A estimulação da resposta imunológica de mucosa através da administração oral de antígenos solúveis é relativamente ineficiente. Isto se deve a vários fatores, como degradação rápida dos antígenos no estômago e/ou intestino, uma limitada absorção destes antígenos pelo organismo e o estabelecimento da tolerância imunológica, que bloqueia a ativação da resposta imunológica contra os antígenos ingeridos. Desta forma, várias estratégias visando uma eficiente apresentação de antígenos na mucosa têm sido desenvolvidas com o objetivo de minimizar estes problemas (Wells & Pozzi, 1997). Dentre elas, a utilização de bactérias patogênicas atenuadas pela engenharia genética como *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium bovis* (BCG), *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (Onate *et al.*, 1999; Guillobel *et al.*, 2000; Gentschev *et al.*, 2001), têm sido testadas exaustivamente. Entretanto, os riscos apresentados na utilização destes patógenos em crianças e particularmente em indivíduos imunodeficientes, têm estimulado o desenvolvimento de novas vacinas utilizando bactérias não patogênicas, comensais ou não, como veículos de liberação de antígenos.

Dentre as bactérias Gram-positivas, que estão sendo utilizadas como sistemas de liberação de antígenos, estão incluídas espécies não patogênicas de *Staphylococcus*, *Listeria* e bactérias

Luciana Ribeiro

Laboratoire de Génétique Appliquée, Unité de Recherches Laitières et de Génétique Appliquée, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas Cedex, France; Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte – MG, Brasil

Daniela Pontes

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte – MG, Brasil

Fernanda Dorella

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte – MG, Brasil

Philippe Langella

Laboratoire de Génétique Appliquée, Unité de Recherches Laitières et de Génétique Appliquée, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas Cedex, France

Yves Le Loir

Laboratoire de Génétique Appliquée, Unité de Recherches Laitières et de Génétique Appliquée, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas Cedex, France

Sérgio Costa Oliveira

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte – MG, Brasil

Vasco Azevedo

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte – MG, Brasil - vasco@mono.icb.ufmg.br

Foto cedida pelos autores

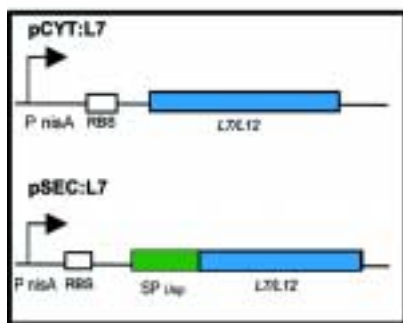
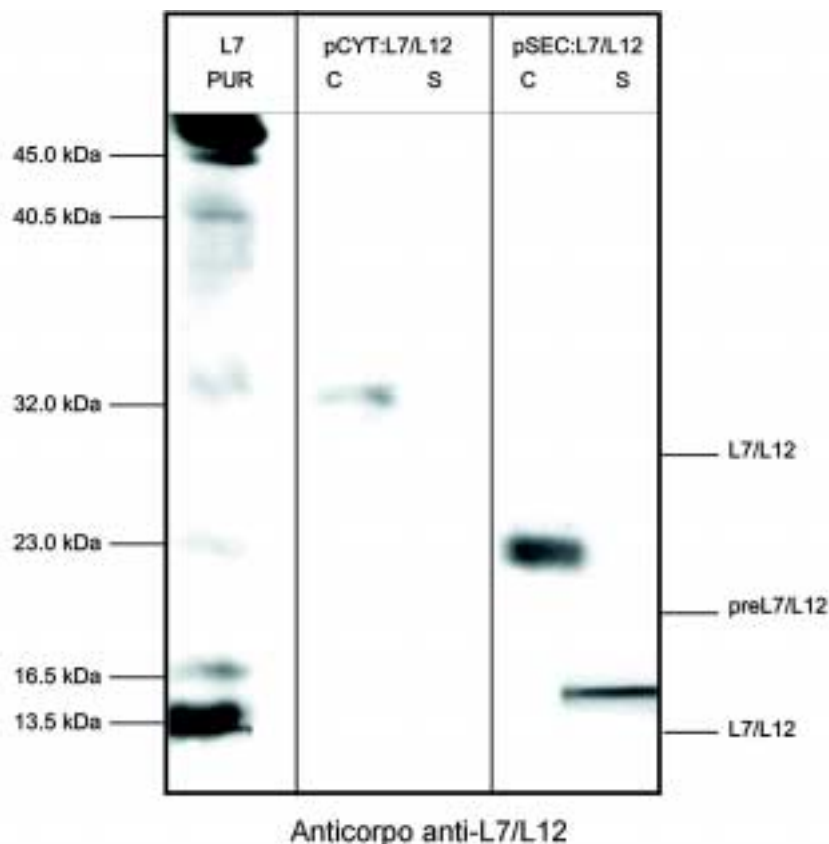


Figura 1. Produção intra e extracelular da proteína L7/L12 em *L. lactis*. Na fase exponencial, as culturas foram induzidas com nisina durante uma hora. Em seguida, foi realizada a extração de proteínas do citoplasma bacteriano (C) e do sobrenadante (S). A proteína purificada L7/L12 foi adicionada como padrão. Após SDS-PAGE, imunodeteção foi realizada com anticorpos anti-L7/L12. P_{nisA}: promotor nisina; RBS: sítio de ligação ao ribossomo; SP_{usp}: peptídeo sinal do gene *Usp45*



Anticorpo anti-L7/L12

láticas (BL) como *Lactococcus lactis*, *Streptococcus gordonii* e *Lactobacillus fermentum*. A utilização das BL é uma alternativa aos problemas acarretados pelo uso de bactérias patogênicas atenuadas, como: virulência residual, risco de reversão e reação cruzada no teste de diagnóstico.

As BL são utilizadas pela indústria nos processos fermentativos de produtos agro-alimentares, são inócuas (consideradas como GRAS – Generally Regarded As Safe), são ingeridas vivas em grandes quantidades e algumas espécies sobrevivem dentro do intestino do hospedeiro, onde elas podem exercer várias atividades probióticas. A partir do início dos anos 90, novas idéias de como utilizar as bactérias lácticas surgiram, como, por exemplo, a possibilidade de produzir proteínas de interesse vacinal (antígenos e citocinas). Elas podem ser utilizadas como vacinas vivas, pois possuem os pré-requisitos preconizados pela OMS (Organização Mundial da Saúde) tais como: facilidade de administração (oral), baixo custo e possibilidade de serem administradas em forma de coquetéis para o controle de diferentes

enfermidades.

Vários antígenos bacterianos e virais já foram produzidos em *Lactococcus lactis*, o organismo modelo para as BL (Wells *et al.*, 1995; Langella & Le Loir, 1999; Gilbert *et al.*, 2000). Em alguns casos, a imunogenicidade e proteção foram observadas nos diferentes sistemas utilizados (Enouf *et al.*, 2001; Norton *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1997). O primeiro trabalho demonstrando imunidade protetora foi feito em 1997, quando administrou-se oralmente linhagens recombinantes de *L. lactis*, produtoras do fragmento C da toxina do tétano (TTFC), em camundongos C57BL/6 (Robinson *et al.*, 1997). Estes resultados sugerem a viabilidade do uso das BL como veículo de apresentação de antígenos. Entretanto, uma resposta imune protetora depende não somente do veículo e do antígeno mas também da localização na bactéria onde estas moléculas serão produzidas. Em alguns casos, a secreção do antígeno pode ser de interesse biológico, pois permite o contato direto entre o antígeno e a superfície da mucosa o que facilitaria a indução de uma resposta imune.

Nossa equipe, composta de pesquisadores brasileiros (UFMG – Departamento de Biologia Geral e de Bioquímica e Imunologia) e franceses (INRA – Institut National de la Recherche Agronomique), tem como objetivo expressar antígenos da *Brucella abortus* e de outros patógenos utilizando linhagens de *Lactococcus lactis*. Vários antígenos da *Brucella* já foram descritos e caracterizados mas, até o momento a proteína ribossômica L7/L12 (Oliveira & Splitter, 1996a) é o antígeno mais bem caracterizado imunologicamente. A proteína ribossômica L7/L12 possui a capacidade de induzir, quando injetada por via intraperitoneal em camundongos, uma resposta imune celular (essencial contra infecções causadas por patógenos intracelulares, como a *B. abortus*) e proteção (Oliveira & Splitter, 1996a; Oliveira *et al.*, 1996b; Kurar & Splitter, 1997).

2. Produção do antígeno L7/L12 em *Lactococcus lactis*

A utilização do promotor indutível P_{nisA} tem resultado em níveis altos de

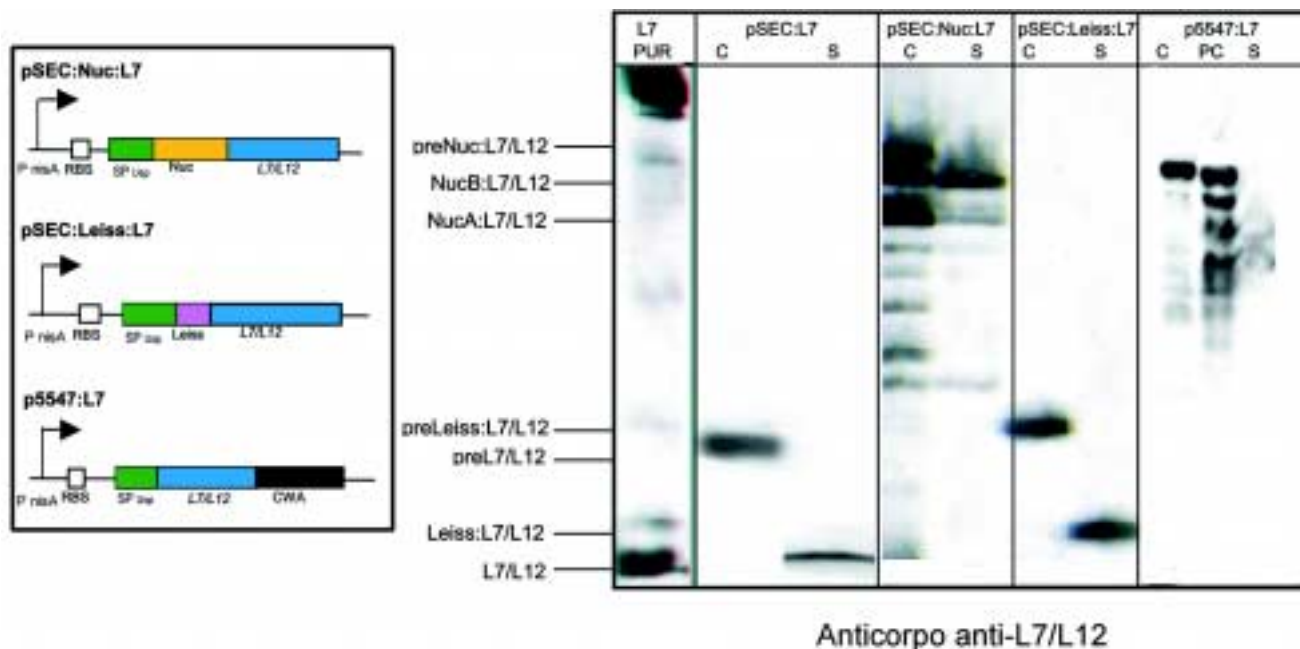


Figura 2. Aumento da produção da proteína L7/L12 em *L. lactis*. Immunodetecção da proteína produzida com anticorpos anti-L7/L12. Para a linhagem contendo a forma ancorada da proteína L7/L12 (p5547:L7), a extração de proteínas foi realizada nas frações celular (C), parede celular (PC) e sobrenadante (S). A proteína purificada L7/L12 foi adicionada como padrão. P_{nisA}: promotor nisina; RBS: sítio de ligação ao ribossomo; SP_{usp}: peptídeo sinal do gene *Usp45*; Nuc: nuclease de *S. aureus*; Leiss: pro-peptídeo sintético LEISSTCDA; CWA: região de ancoramento da proteína M6 de *S. pyogenes*

produção de proteínas heterólogas em *L. lactis*. Além disso a utilização de promotor constitutivo pode gerar problemas na expressão de antígenos. Portanto, o promotor P_{nisA} foi o escolhido para a produção da proteína L7/L12. Decidimos expressar esta proteína em três diferentes localizações celulares: citoplasma, meio extracelular e parede celular. Apesar de já ter sido demonstrado que *L. lactis* é capaz de produzir precisamente antígenos nestas três localizações, é necessário a determinação de qual forma de exposição seria mais eficiente para a vacinação oral com L7/L12 (Chamberlain et al., 1997; Wells et al., 1995).

O interesse em produzir a proteína L7/L12 no citoplasma da *L. lactis* deve-se ao fato de que esta forma é a que tem mais relatos, na literatura científica, de indução de resposta imune e proteção contra diferentes patógenos. A hipótese levantada é que o antígeno estaria protegido contra a ação de proteases existentes no trato digestivo superior e somente no momento da lise da bactéria, durante a sua passagem pelo intestino, este seria liberado e apresentado ao sistema imune. Através da análise por *immunoblotting* utilizando anticorpos anti-L7/L12, verificamos uma produ-

ção citoplasmática desta proteína (0,5 mg/l) com a formação de dímeros (24 KDa ao invés de 12 kDa) (Fig 1).

Em seguida construímos, através da engenharia genética, linhagens de *L. lactis* para exportar L7/L12 para o meio extracelular. Nossos resultados mostraram um aumento de 6 vezes na produção total da proteína em comparação à produção intracelular (de 0,5 para 3,0 mg/l) e uma eficiência de secreção de 35% (Fig. 1). Uma possível explicação para este aumento na produção é que o reconhecimento do precursor preL7/L12 pela maquinaria de secreção de *L. lactis* ajudaria a evitar proteólise intracelular.

Com o objetivo de aumentar a eficiência de secreção da proteína L7/L12 duas estratégias foram testadas. A primeira foi a de fusionar o nosso antígeno com a nuclease (Nuc) de *Staphylococcus aureus*. Nuc, é altamente estável, naturalmente secretada e tem sido utilizada em fusão traducional para melhorar à exportação de proteínas heterólogas em *L. lactis* (Piard et al., 1997; Poquet et al., 1998; Langella & Le Loir, 1999; Bermudez-Humarán et al., 2001). Entretanto, nossos resultados mostraram que a eficiência de secreção foi similar

entre Nuc:L7/L12 e L7/L12 (38% e 35%, respectivamente, Fig. 2) e que o principal efeito desta fusão foi o aumento de 2,5 vezes na produção total da proteína (de 3,0 para 8,0 mg/l).

A segunda estratégia foi a fusão de L7/L12 com o propeptídeo LEISSTCDA (Leiss), que já foi demonstrado que é capaz de induzir um aumento da secreção de proteínas heterólogas em *L. lactis* (Le Loir et al., 1998, 2001). Leiss altera a carga da extremidade N-terminal da proteína de fusão introduzindo duas cargas negativas nas posições +2 e +8. Esta modificação na região N-terminal de proteínas maduras pode favorecer a eficiência de secreção destas proteínas por meio de dois possíveis mecanismos: facilitando o processamento das proteínas por meio de chaperoninas citoplasmáticas, devido à uma melhor conformação do precursor; ou promovendo um balanço de cargas no sítio de clivagem das proteínas, facilitando a sua translocação (Le Loir et al., 1998). Este último mecanismo deve-se ao fato de que a presença de cargas positivas na extremidade N-terminal de proteínas maduras pode associar-se com os ácidos teitóicos aniônicos presentes na superfície celular das bactérias Gram-positivas, via

interações eletrostáticas, interferindo na translocação e, portanto, na secreção destas proteínas.

Observamos dois fenômenos, o primeiro, não esperado, aumento da produção total da proteína L7/L12 de 3 mg/l, para 8 mg/l de L7/L12 fusionada com Leiss. O segundo, esperado, o aumento de 4 vezes da eficiência de secreção de Leiss:L7/L12 quando comparada a sua forma não fusionada (4 mg/l vs. 1 mg/l) (Fig. 2). Em resumo, a produção e a secreção da proteína L7/L12 em *L. lactis* foi otimizada através de fusões na região N-terminal com uma proteína heteróloga naturalmente secretada (Nuc) ou com um propeptídeo sintético (Leiss).

Em relação as construções onde os antígenos são apresentados na parede celular, estas podem apresentar duas possíveis vantagens em ensaios de imunização: 1) a parede celular bacteriana pode apresentar uma atividade adjuvante, podendo aumentar a resposta imune (Vitini et al., 2000), 2) a proteína uma vez ancorada na parede celular pode ser menos exposta à agentes degradantes ou desnaturantes presentes no estômago dos homens e animais (Dieye et al., 2001).

Para conseguirmos ancorar a proteína L7/L12 na parede celular de *L. lactis* o gene codificador desta foi fusionado a região de ancoramento (Cell Wall Anchor - CWA) da proteína M6 de *Streptococcus pyogenes*. A produção de L7/L12:CWA_{M6} foi analisada por *immunoblotting* nas três localizações celulares: citoplasma, parede celular e sobrenadante (Fig. 2). Cerca de 40% da proteína de fusão L7/L12:CWA_{M6} foi encontrada na parede celular e os outros 60% permaneceram não processadas no citoplasma, correspondendo ao precursor preL7/L12:CWA_{M6}. Duas bandas fracas foram detectadas no sobrenadante, correspondendo à L7/L12:CWA_{M6} que se liberaram da parede celular. Este resultado é semelhante ao de outros grupos que conseguiram ancorar proteínas em *L. lactis*.

3. Primeiros ensaios de imunização em camundongos

Nos primeiros ensaios de imunização foram testadas todas as construções citadas acima. Os protocolos e o esquema de vacinação foram adaptados a partir do artigo de Robinson *et al* (1997) e são apresentados na figura 3.

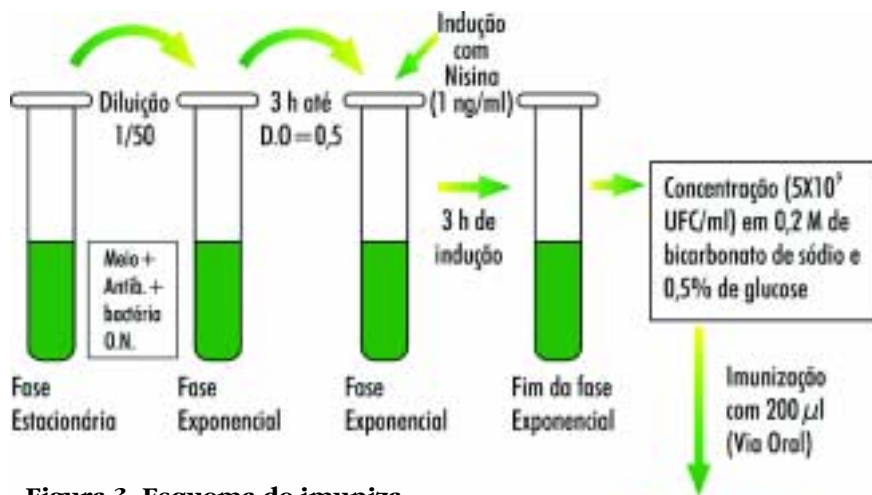


Figura 3. Esquema de imunização utilizando *L. lactis* expressando a proteína L7/L12 administrada em camundongos pela via oral.

Cultura de *L. lactis* produzindo a proteína L7/L12, foram crescidas em meio de cultura M17 adicionado de 0,5% de glicose mais antibiótico adequado. Após 16 horas de cultura, estas foram diluídas (proporção 1:50) e crescidas em meio de cultura até atingir uma absorbância de 0,5 (600 nm) onde foi adicionado 1 ng/ml de nisina. Após 3 horas de indução, as bactérias foram centrifugadas e resuspendidas em 0,2 M de



bicarbonato de sódio e 0,5% de glicose. Camundongos foram imunizados via oral com uma concentração de 5×10^9 UFC/ml. Os animais foram imunizados em três períodos diferentes durante três dias consecutivos (dias 0, 1, 2; 14,15,16; 28,29,30)

Amostras de fezes de camundongos BALB-c foram coletadas e testes de ELISA foram realizados para avaliação dos níveis de IgA nas fezes o que nos permitiu determinar quais das linhagens eram capazes de induzir uma resposta imune específica nos animais imunizados. O grupo vacinado com a linhagem pCYT:L7/L12 foi o que apresentou níveis significativos de IgA nas fezes, ao contrário dos demais grupos. Desta forma, selecionamos a linhagem pCYT:L7/L12 para novos experimentos de imunização onde utilizamos adjuvantes de mucosa para potencializar a resposta imune. Testamos três tipos de adjuvantes. O primeiro um derivado atóxico da toxina termo-lábil (LT), denominada LT_(R192G) produzida por uma linhagem mutante de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC). A utilização de LT em preparações vacinais contra diferentes patógenos foi capaz de induzir uma resposta humoral sistêmica

e de mucosa contra os antígenos co-administrados. Ao lado da toxina colérica (CT) da *Vibrio cholerae*, o LT é o composto que mais se destaca na indução de resposta imune de mucosa. O segundo, uma linhagem de *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus* UFV-H2b20) que é um forte candidato a ser usado como probiótico, pois além de conseguir sobreviver as condições estressantes do trato gastrointestinal, esta bactéria também estimula o sistema fagocítico do hospedeiro através da produção de altos níveis de IL-12. O terceiro uma linhagem de *L. lactis* recombinante que secreta IL-12 murina ativa. IL-12 vem sendo co-administrada com vacinas de segunda (proteína recombinante) e terceira geração (vacinas de DNA) e foi demonstrado que a utilização desta citocina induz um aumento da resposta antígeno-específica. Obtivemos, neste primeiro ensaio

usando estes adjuvantes, resultados marcantes. Sendo a *L. lactis* secretora de IL-12 f a que induziu a maior resposta de anticorpos secretores (sIgA) (resultados não apresentados). Um novo experimento com L7/L12 com estes adjuvantes esta sendo feito neste momento.

4. Conclusões

Esta é a primeira vez que o antígeno ribossômico L7/L12 da *B. abortus*, é expresso e produzido em *L. lactis*, bactéria láctica amplamente utilizada em processos de fermentação de produtos agro-alimentar.

Nossos resultados confirmaram a capacidade de *L. lactis* de dirigir a expressão de proteínas heterólogas, de forma estável, em diferentes compartimentos celulares (ou seja, citoplasma, parede celular e no meio externo). Os vetores construídos permitiram otimizar a produção da proteína L7/L12, assim como, aumentar sua eficiência de secreção. Determinamos que a localização citoplasmática do antígeno L7/L12 é a que deve ser utilizada como veículo de apresentação desta proteína em uma estratégia de vacinação oral, que adjuvantes potencializam a resposta imune contra este antígeno e iremos começar testes de proteção para demonstrar que este novo tipo de vacina é eficaz contra a brucelose experimental.

Agradecimentos:

Este projeto é apoiado pelo programa CAPES/COFECUB do Ministério da Educação. Luciana Ribeiro e Daniela Pontes contribuíram equitativamente neste trabalho.

REFERÊNCIAS

Bermúdez-Humarán, L. G., P. Langella, A. Gruss, R. Montes de Oca-Luna, and Y. Le Loir. 2001. Production of Human Papillomavirus Type 16E7 Protein in *Lactococcus lactis*. Submetido para publicação.

Chamberlain, L., J. M. Wells, R. Robinson, K. Schofield, and R. Le Page. 1997. Mucosal immunization with recombinant *Lactococcus lactis*, p. 83-106. In G. Pozzi and J. M. Wells (ed.), Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. Springer-Verlag and Landes Bioscience,

Austin, Tex.

Dieye, Y., S. Usai, F. Clier, A. Gruss, and J.-C. Piard. 2001. Design of a protein targeting system for lactic acid bacteria. J. bacteriol. **183**: 4157-4166.

Enouf, V., P. Langella, J. Commissaire, J. Cohen, and G. Corthier. 2001. Bovine rotavirus non-structural protein 4 (NSP4) produced by *Lactococcus lactis* is antigenic and immunogenic. Appl. Environ. Microbiol. **67**: 1423-1428.

Gentschev, I., Dietrich, G., Spreng, S., Kolb-Maurer, A., Binkmann, V., Grode, L., Hess, J., Kaufmann, S. H., Goebel, W. 2001. Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunits vaccines. Vaccine. **21**: 19(17-19):2621-8.

Gilbert, C., K. Robinson, R. W. Le Page, and J. M. Wells. 2000. Heterologous expression of an immunogenic pneumococcal type 3 capsular polysaccharide in *Lactococcus lactis*. Infect. Immun. **68**:3251-3260.

Guillobel H. C., J. I. Carinhanha, L. Cardenas, J. D. Clements, D. F. de Almeida, and L. C. Ferreira. 2000. Adjuvant activity of a nontoxic mutant of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin on systemic and mucosal immune responses elicited against a heterologous antigen carried by a live *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain. Infect. Immun. **68**:4349-4353.

Kurar, E., and G. A. Splitter. 1997. Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicit immune response. Vaccine **15**: 1851-1857.

Langella, P. and Y. Le Loir. 1999. Heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*: a novel antigen delivery system. Braz. J. Med. Biol. Res. **32**:191-198.

Le Loir, Y., A. Gruss, S. D. Ehrlich, and P. Langella. 1998. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. **180**:1895-1903.

Le Loir, Y., S. Nouaille, J. Commissaire, L. Brétigny, A. Gruss et P. Langella. 2001. Signal peptide and propeptide optimisation for protein secretion in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. **67**, n. 9.

Norton, P. M., J. M. Wells, H. W. Brown, A. M. Macpherson, and R. W. Le Page. 1997. Protection against

tetanus toxin in mice nasally immunized with recombinant *Lactococcus lactis* expressing tetanus toxin fragment C. Vaccine **15**:616-619.

Oliveira, S. C., and G. A. Splitter. 1996a. Immunization of mice with recombinant L7/L12 ribosomal protein confers protection against *Brucella abortus* infection. Vaccine **14**:959-962.

Oliveira, S. C., J. S. Harms, M. Banai, and G. A. Splitter. 1996b. Recombinant *Brucella abortus* proteins that induce proliferation and gamma-interferon secretion by CD4+ T cells from *Brucella*-vaccinated mice and delayed-type hypersensitivity in sensitized guinea pigs. Cell. Immunol. **172**:262-268.

Onate, A. A., R. Vemulapalli, E. Andrews, G. G. Schurig, S. Boyle, and H. Folch. 1999. Vaccination with live *Escherichia coli* expressing *Brucella abortus* Cu/Zn superoxide dismutase protects mice against virulent *B. abortus*. Infect Immun. **67**:986-988.

Piard, J.-C., R. Jimenez-Diaz, V. A. Fischetti, S. D. Ehrlich, and A. Gruss. 1997. The M6 protein of *Streptococcus pyogenes* and its potential as a tool to anchor biologically active molecules at the surface of lactic acid bacteria. Adv. Exp. Med. Biol. **418**:545-550.

Poquet I., S. D. Ehrlich, and A. Gruss. 1998. An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. **180**:1904-1912.

Robinson, K., L. M. Chamberlain, K. M. Schofield, J. M. Wells, and R. W. Le Page. 1997. Oral vaccination of mice against tetanus with recombinant *Lactococcus lactis*. Nat. Biotechnol. **15**:653-657.

Vitini, E., S. Alvarez, M. Medina, M. Medici, M.V. de Budeguer, and G. Perdigon. 2000. Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. Biocell **24**:223-232.

Wells, J. M., P. M. Norton, and R. W. F. Le Page. 1995. Progress in the development of mucosal vaccines based on *Lactococcus lactis*. Int. Dairy Journal **5**:1071-1079.

Wells, J. M., and G. Pozzi. 1997. An overview of gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization, p. 1-8. In G. Pozzi and J. M. Wells (ed.), Gram-positive bacteria as vaccine vehicles for mucosal immunization. Springer-Verlag and Landes Bioscience, Austin, Tex.