ANDRESSA CARAVELLI

Anticorpo recombinante anti-intimina: uma ferramenta para o diagnóstico rápido de *Escherichia coli* enteropatogênica e de *Escherichia coli* enterohemorrágica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

CARAVELLI, A. **Anticorpo recombinante anti-intimina:** uma ferramenta para o diagnóstico rápido de *Escherichia coli* enteropatogênica e de *Escherichia coli* enterohemorrágica. 2013. 147 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Intimina é o principal fator de virulência envolvido na lesão *attaching/effacing* em *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que são responsáveis pela diarreia infantil e colite hemorrágica/síndrome hemolítico-urêmica, respectivamente. Nos países em desenvolvimento, o diagnóstico desses patógenos ou é demorado e caro, ou não é realizado em laboratórios de rotina. No entanto, a detecção é essencial para definição do tratamento da infecção. O objetivo do presente trabalho foi definir o vetor de expressão mais apropriado e avaliar a sensibilidade e especificidade do scFv-intimina obtido. O gene scFv-intimina anteriormente obtido foi clonado nos vetores de expressão pAE e pSMT3, transformados em uma *E. coli* BL21 (DE3). A expressão foi induzida com 1 mM de IPTG. Em ambos os vetores, a proteína expressa foi direcionada para o citoplasma bacteriano, dessa forma a construção pAE-scFv-intimina foi utilizada na obtenção do anticorpo recombinante. Após cromatografia de afinidade ao níquel o scFv-intimina foi empregado no ensaio de imunofluorescência indireta para definir um teste de ensaio rápido e confiável, analisando-se 199 isolados de *E. coli* e isolados de outras Enterobactérias, dos quais 132 resultaram em isolados *eae*-positivos e 67 isolados *eae*-negativos. O teste de imunofluorescência mostrou a detecção de 132 isolados *eae*-positivos (100% de sensibilidade) e a não detecção de 67 isolados *eae*-negativos (100% especificidade). Assim, o ensaio de imunofluorescência é um método eficaz e rápido, e o scFv-intimina é uma excelente ferramenta para o imunodiagnóstico de EPEC e EHEC.

Palavras-chave: Diarreia. *Escherichia coli* diarreiogênica. Anticorpos recombinantes. scFv-intimina. Diagnóstico.

ABSTRACT

CARAVELLI, A. **Anti-intimin recombinant antibody:** a tool for a rapid diagnosis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 2013. 147 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Intimin is the main virulence factor involved in the *attaching/effacing* lesion of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), which are responsible for infantile diarrhea and hemorrhagic colitis/hemolytic uremic syndrome, respectively. In developing countries, their diagnosis is either time-consuming and expensive or is not done in the routine laboratory. Nevertheless, their detection is essential in defining the infection treatment. The aim of the study was to define the most suitable expression vector and evaluate the sensitivity and specificity of the scFv-intimin obtained. The scFv-intimin gene previously obtained was cloned into pAE and pSMT3 expression vectors and transformed into an *E. coli* BL21 (DE3) strain. Expression was induced with 1 mM IPTG. In both vectors, recombinant protein was expressed as inclusion bodies, so pAE was chosen as the expression vector for nickel affinity chromatography. Once purified, scFv-intimin was employed in an indirect immunofluorescence assay to define a rapid and reliable assay testing 199 *E. coli* strains and other Enterobacteriaceae isolates, of which 132 isolates were *eae*-positive and 67 isolates were *eae*-negative. The immunofluorescence assay showed the detection of 132 *eae*-positive isolates (100% sensitive) and no detection in the 67 *eae*-negative isolates (100% specific). Thus, immunofluorescence is an effective and rapid method and scFv-intimin an excellent tool for the immunodiagnosis of EPEC and EHEC.

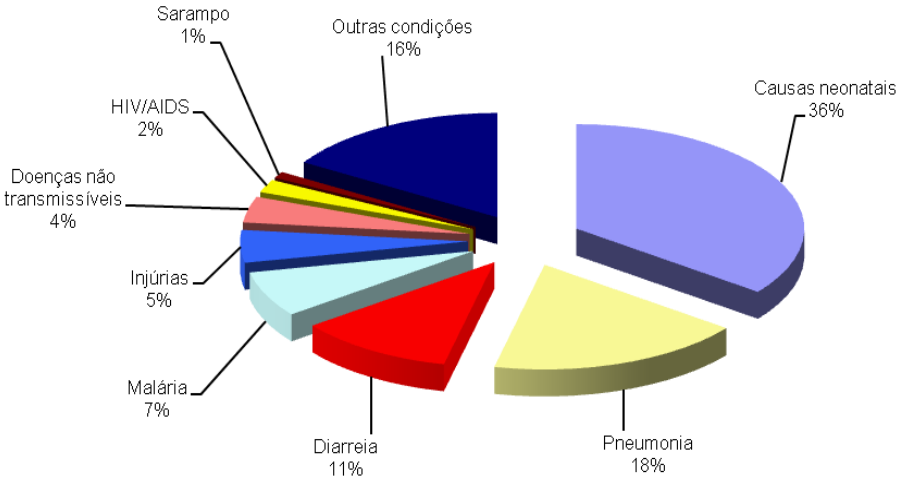
Keywords: Diarrhea. Diarrheagenic *E. coli*. Recombinant antibody. scFv-intimin. Diagnosis.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Diarreia

Aproximadamente oito milhões de crianças menores de cinco anos morrem anualmente no mundo todo. A maioria dessas mortes (85%) ocorre principalmente nas áreas rurais dos países da África e Sudeste Asiático (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND, UNICEF, 2012). Dentre as principais causas desta mortalidade, a diarreia é responsável por 800.000 mortes (11%), sendo superada apenas pela pneumonia (18%) (WORLD HEALTH ORGANIZAION, WHO, 2012; WORLD HEALTH STATISTICS, 2011; WHO, UNICEF, 2009) (**Gráfico 1**).

Gráfico 1 - Distribuição global de causas de morte em crianças abaixo de 5 anos de idade, 2010.



Fonte: WHO (2012).

A diarreia é uma manifestação comum de doenças infecciosas intestinais, que pode ser causada por vírus, bactérias e parasitas, de forma aguda e/ou persistente. Os agentes infecciosos bacterianos frequentemente isolados em surtos de diarreia

são *Escherichia coli*, *Shigella* spp.,*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* e *Vibrio cholerae*.

O modo de transmissão da maioria desses patógenos ocorre via fecal-oral, e a alta incidência de surtos diarreicos está diretamente associada a fatores sócio-ambientais, como a falta de saneamento básico, condições sanitárias precárias, além da contaminação de água e a higiene inadequada dos alimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2009).

Além da melhora nas condições de higiene, a terapia de reidratação oral tem levado à diminuição da morbidade e mortalidade de crianças com diarreia aguda, relacionada à perda de fluídos e eletrólitos. Entretanto, a diarreia persistente emergiu como causa comum de morte. Por ser prolongada, persiste por mais de 14 dias, podendo resultar em várias infecções consecutivas ou mal resolvidas, má absorção ou gastroenterite (OCHOA et al., 2008).

No Brasil, as políticas de saneamento básico, implantadas a partir de 1970, aliadas a medidas como terapias de reidratação oral, diminuição da desnutrição infantil e melhora no acesso a serviços de saúde levaram a uma queda significativa da mortalidade infantil por diarreia. As doenças infecciosas intestinais representavam 6% da mortalidade em 1996 e 3% em 2004 (TABNET.DATASUS, 2010).

Todavia, em algumas partes do país há grandes diferenças na proporção entre os índices de declínio. Por exemplo, em 2004, na Região Nordeste a taxa de mortalidade por doenças infecciosas intestinais foi de 5,4% enquanto na Região Sudeste foi de 1,7%. O que mostra que, apesar do decréscimo, a diarreia ainda representa um relevante problema de saúde pública (TABNET.DATASUS, 2010).

Oliveira e Latorre (2010), estudando as tendências de internação e mortalidade infantil por diarreia em crianças menores de um ano, no período de 1995 a 2005 no Brasil, verificaram uma redução desses índices em 13 capitais, porém oito capitais apresentaram redução da mortalidade, enquanto três tiveram queda apenas nas taxas de internação. A análise combinada desses indicadores mostrou queda no Brasil como um todo e em quatro capitais.

Recentemente (2011), os maiores índices de internações por diarreia nas unidades hospitalares participantes do Sistema Único de Saúde (SUS) (públicas ou

particulares conveniadas) ocorreram na região nordeste e norte, principalmente nos meses de clima quente (DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS, DATASUS, 2012). Apesar das regiões norte e sudeste possuirem números de internações semelhantes, estes representam 0,21% da população da região norte, contra 0,04% da população da região sudeste, indicando que proporcionalmente, as populações das regiões norte e nordeste (0,17%) ainda carecem de ações de promoção à saúde (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, 2012).

1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) foi descrita em 1885, pelo pediatra alemão Theodor Escherich, que notou sua alta prevalência na microbiota intestinal de crianças após 24 h do nascimento e a denominou *Bacterium coli commune* (ESCHERICH, 1885).

E. coli é componente da microbiota do trato gastrointestinal, considerada benéfica e não patogênica, porém pode assumir características patogênicas. É um bacilo Gram-negativo, anaeróbico facultativo, componente da família *Enterobacteriaceae,* que coloniza a mucosa intestinal de humanos e outros animais poucas horas após o nascimento (KAPER et al., 2004; LEVINE, 1987; NATARO; KAPER, 1998; ØRSKOV; ØRSKOV,1992).

Alguns estudos demonstram que a composição de *E. coli* no intestino humano geralmente consiste de três ou quatro linhagens, sendo que uma delas é denominada residente, permanecendo no organismo do hospedeiro por meses, e as outras são transitórias, e duram algumas semanas (SEARS; BROWNLEE; UCHIYAMA, 1950).

E. coli normalmente permanece inofensiva confinada ao lúmen intestinal, entretanto, mesmo as cepas de *E. coli* não patogênicas podem causar infecção quando o hospedeiro encontra-se debilitado, imunodeprimido ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas. Ao longo do tempo, cepas de *E. coli* patogênicas vêm adquirindo fatores de virulência específicos, conferindo um aumento na habilidade de se adaptar a novos nichos causando um amplo espectro de doenças em indivíduos saudáveis (KAPER et al., 2004). Três síndromes clínicas podem resultar da infecção

por estes patotipos: meningite neonatal, sepse e infecções do trato urinário. Além desses, há os patotipos associados a doenças entéricas conhecidos como *E. coli* diarreiogênica (DEC) (KAPER et al., 2004).

1.3 *Escherichia coli* diarreiogênica

Isolados de *E. coli* diarreiogênicas (DEC) têm grande importância médica e epidemiológica, pois representam o patógeno bacteriano mais comumente associado às formas endêmicas de diarreia (CLARK et al., 2003).

Isolados de DEC são classificadas de acordo com mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam e os aspectos epidemiológicos em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* que apresenta padrão de adesão difusa (DAEC), (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

EPEC tem sido identificada como o principal agente de diarreia aguda em crianças menores de dois anos de idade nos países em desenvolvimento (NATARO; KAPER, 1998). Isolados de EPEC causam um efeito histopatológico característico em biópsias intestinais, bem como em culturas celulares, conhecido como lesão *attachment and effacement* (A/E) (MOON et al.,1983).

STEC compreende todas as amostras de *Escherichia coli* que produzem as toxinas de Shiga Stx, e estão associadas à colite hemorrágica e à síndrome hemolítica urêmica (AGBODAZE, 1999). Este patógeno representa o mais importante agente etiológico de surtos diarréicos causados por alimentos, sendo prevalente principalmente em países desenvolvidos (PATON; PATON, 1998). Dentro deste patotipo está o subgrupo das EHEC que além da expressão das toxinas de Shiga, causa a lesão A/E, como as EPEC.

ETEC é um importante patógeno causador da diarreia aguda, sendo o primeiro em que os fatores de virulência foram descritos (TORRES et al., 2005). É principal causa de morbidade e mortalidade entre crianças de um a cinco anos de idade em países em desenvolvimento (QADRI et al., 2005). Além disso, está associado à

diarreia dos viajantes que acomete turistas e militares oriundos de países desenvolvidos em visita à regiões tropicais e subtropicais endêmicas. Estes organismos produzem a toxina termo estável (ST) e/ou a toxina termo lábil (LT) (SEARS; KAPER, 1996).

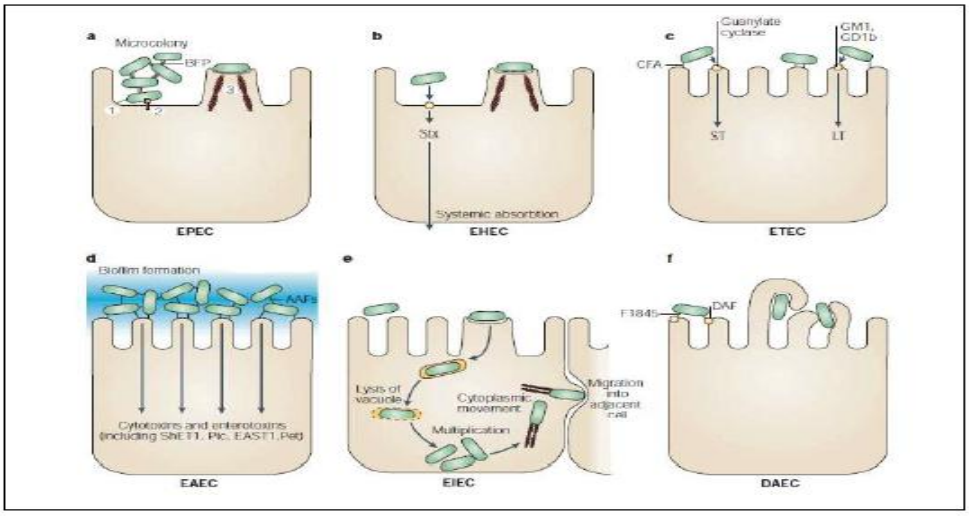
EAEC é caracterizada por aderir às células epiteliais cultivadas no padrão denominado de adesão agregativa (NATARO et al., 1987). Este patotipo está associado à diarreia aguda e persistente tanto em países em desenvolvimento, quanto em países industrializazdos (KAPER et al., 2004; TORRES et al., 2005).

EIEC apresenta a capacidade de invadir e de se multiplicar em células epiteliais, causando diarreia aquosa e disenteria no homem (TORRES et al., 2005). Quando a infecção é severa pode causar colite inflamatória, assim como a *Shigella* spp. (LEVINE, 1987; NATARO; KAPER, 1998).

DAEC é a categoria de *E. coli* diarreiogênica que apresenta um padrão de adesão difusa em células epiteliais em cultura. Neste padrão de adesão as bactérias encontram-se aderidas de forma difusa sobre toda a superfície celular (ELLIOTT; NATARO, 1995). Sua patogenicidade ainda é desconhecida, uma vez que amostras de DAEC são isoladas tanto de amostras diarréicas como de fezes não diarréicas, sendo mais brandas do que as diarréias causadas pelas categorias anteriores (KAPER et al., 2004; TORRES et al., 2005).

Os principais mecanismos de ação, os tipos de interação com células epiteliais *in vitro*, assim como os fatores de virulência específicos de cada uma da seis categorias de DEC, encontram-se esquematizados na **figura 1**.

Figura 1 - Esquema ilustrativo dos principais fatores de virulência das categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas.



Fonte: Kaper, Nataro e Mobley (2004).

1.3.1 E. coli enteropatogênica (EPEC)

O termo *E. coli* enteropatogênica foi criado em 1955 por Erwin Neter para designar um grupo de cepas de *E. coli* associados à diarreia infantil, distinguindo-se assim das demais cepas encontradas em indivíduos normais ou em pacientes com processo de infecção extraintestinal (NETER et al., 1955).

O patotipo EPEC é subdividido em dois grupos distintos, EPEC típicas (tEPEC) e EPEC atípicas (aEPEC). Diferentemente das tEPEC, que têm como hospedeiro somente o homem, as aEPEC podem ter como hospedeiros tanto homens como animais. Por muitos anos tEPEC foram consideradas a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento sendo raras nos países industrializados. No entanto, os dados atuais sugerem que aEPEC são mais frequentes que as tEPEC tanto em países industrializados como em países em desenvolvimento tendo surgido como patógeno emergente, relacionado à diarreia prolongada em crianças de até cinco anos de idade (BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; MORENO et al., 2010; OCHOA et al., 2008; SCALETSKY et al., 1999; SMITH et al., 1996; TRABULSI et al., 2002). As tEPEC distinguem-se das aEPEC pela presença do plasmídio EAF

(EPEC *adherence factor*) e expressão da fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*) (ABE et al., 2009; NARA et al., 2010; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

Durante décadas, os mecanismos pelos quais as EPEC causavam diarreia ainda eram desconhecidos, e este patotipo só era identificado com base no sorotipo O:H. Em 1987, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu doze sorogrupos de EPEC, denominados O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O148 (WHO, 1987), os quais também são conhecidos como sorogrupos clássicos de EPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

1.3.2 Escherichia coli produtora da toxina de shiga (STEC) e sua subcategoria Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC)

STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*) ou VTEC (*Verotoxin-producing E. coli*) foi primeiramente descrita por Konowalchuk, Speirs e Stavric (1977) por sua atividade citotóxica em células Vero (célula epitelial renal de macaco verde africano) surgindo então o termo verotoxina ou verocitotoxina (KONOWALCHUK et al., 1977).

Na década de 1980, foi descrito o primeiro isolamento de STEC do sorotipo O157:H7 em um surto de diarreia sanguinolenta, o qual foi associado à ingestão de carne de hambúrguer contaminada e mal-cozida (RILEY et al., 1983).

A ingestão de STEC pode causar um espectro de doenças agudas, que vão desde diarreias não complicadas, a diarreias sanguinolentas (colite hemorrágica) e até a síndrome hemolítico-urêmica (SHU) (CHINEN et al., 2009; KARMALI, 1985, 1989). SHU é caracterizada pelo aparecimento de trombocitopenia, anemia hemolítica e nefropatia aguda, deficiências do sistema nervoso e até morte. Aproximadamente até 15% dos pacientes desenvolvem SHU, especialmente crianças menores de 10 anos infectadas por *E. coli* O157:H7, que é o sorotipo predominante (GRIFFIN; TAUXE, 1991).

As Stx incluem dois subgrupos principais, Stx1 e Stx2, que possuem aproximadamente 55% de homologia de aminoácidos. Linhagens de STEC podem produzir Stx1 ou Stx2 ou ambas toxinas, ou ainda variantes dessas toxinas (GYLES et al., 2007). Essas toxinas são do tipo A_1B_5, apresentando uma subunidade A com

35 kDa e 5 subunidades B com 7,5 kDa (GYLES, 2007; NATARO; KAPER, 1998). Linhagens isoladas de pacientes com SHU produzem principalmente Stx2 (FRIEDRICH et al., 2002).

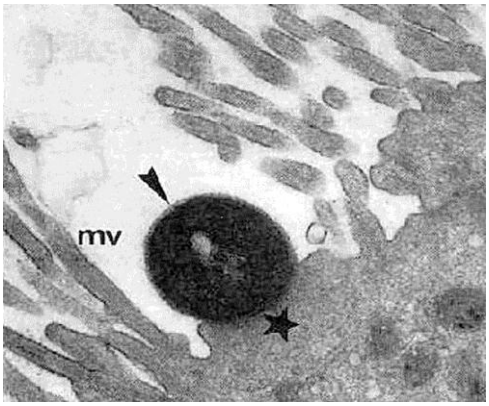
Além das toxinas de Shiga, existem outros fatores capazes de aumentar ou colaborar na patogenicidade de STEC, como a adesina intimina, produto do gene *eae* presente em EPEC e EHEC, a enterohemolisina (Ehly) e uma protease (EspP/PssA) de codificação plasmidial como fatores de virulência (GOOSNEY et al., 2000; NATARO; KAPER, 1998).

1.3.3 Mecanismo de Patogenicidade de E. coli enteropatogênica (EPEC) e E. coli enterohemorrágica (EHEC)

O mecanismo central da patogênese de EPEC, assim como nas EHEC, é a lesão histopatológica denominada *attaching and effacing* (lesão A/E), a qual é caracterizada pela adesão da bactéria ao epitélio intestinal, desencadeando uma cascata de sinais transmembrânicos e intracelulares que levam à destruição das microvilosidades locais e ao acúmulo de actina polimerizada e componentes do citoesqueleto no local de contato entre a célula epitelial e a bactéria, formando então uma estrutura semelhante à um pedestal com a bactéria em sua superfície (MOON et al., 1983) (**Figura 2**).

Esse mecanismo está dividido didaticamente em três estágios: (1) aderência inicial à célula hospedeira, (2) produção e translocação das proteínas bacterianas por uma agulha formada pelo complexo de secreção do tipo III (SSTT) e (3) ligação da intimina ao receptor Tir (*translocated intimin receptor*) com a formação do pedestal (GARMENDIA et al., 2005; GIRARD, 2005; NATARO; KAPER, 1998; VALLANCE; FINLAY, 2000).

Figura 2 - Lesão *attaching and effacing* (A/E).



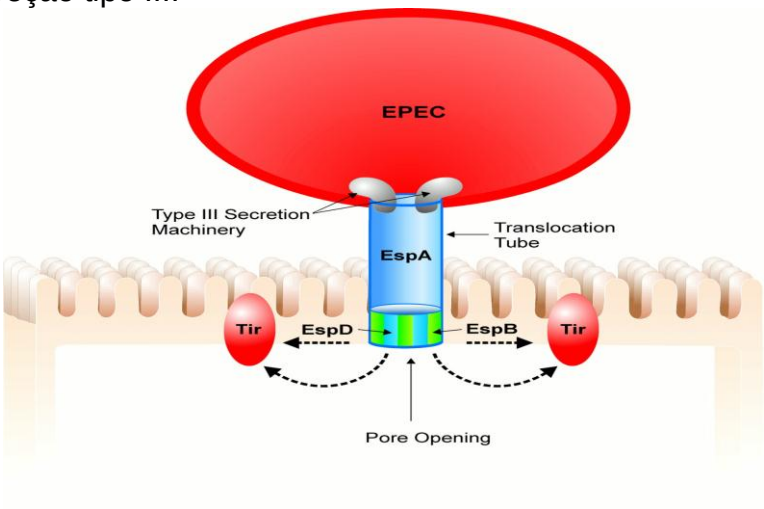
Apagamento das microvilosidades (mv) e pedestal (estrela) com adesão de EPEC (seta).
Fonte: Pedroso et al. (1993).

A primeira fase da infecção é superficial e não íntima e os fatores de virulência responsáveis pela adesão podem ser as fímbrias BFP (HYLAND et al., 2008) e *E. coli common pilus* (ECP) (RENDON et al., 2007), filamentos EspA (*E. coli secreted protein A*) (CLEARY et al., 2004) e também o flagelo (RAMOS et al., 2004). No entanto, sabe-se que esta fase é multifatorial e dependente de uma variedade de condições (HUMPHRIES; ARMSTRONG, 2010).

Após a adesão inicial, o complexo transportador SSTT é montado. Essa estrutura se assemelha à uma seringa e se estende desde a membrana interna da bactéria até o meio extracelular, formando um canal transmembrânico, através do qual, várias proteínas são secretadas (GARMENDIA et al., 2005). Os filamentos de EspA promovem o contato inicial ao enterócito (KNUTTON et al., 1998), possibilitando a translocação das proteínas estruturais EspB (*E. coli secreted protein B*) e EspD (*E. coli secreted protein D*), responsáveis por direcionar EspA e formar um poro na membrana da célula hospedeira (**Figura 3**) (DANIEL et al., 2001). O SSTT formado injeta para o interior da célula um número indeterminado de moléculas efetoras, como Tir, Esps (*EPEC secreted proteins*) e Map (*mitocondrial associated protein*); essas transmitem sinais causando alterações no citoplasma do hospedeiro. Após ser translocado, nas EPEC, Tir é fosforilado no resíduo de tirosina-474 por quinases específicas do enterócito e inserido na membrana da célula epitelial, com suas extremidades orientadas para o citoplasma e sua porção média localizada externamente à membrana, assumindo um formato de grampo e atuando

como receptor para a intimina; já nas EHEC, a proteína Tir não apresenta o resíduo de tirosina-474 e, portanto, não é fosforilada (LUO et al., 2000).

Figura 3 - Translocação de proteínas secretadas pela EPEC através do sistema de secreção tipo III.



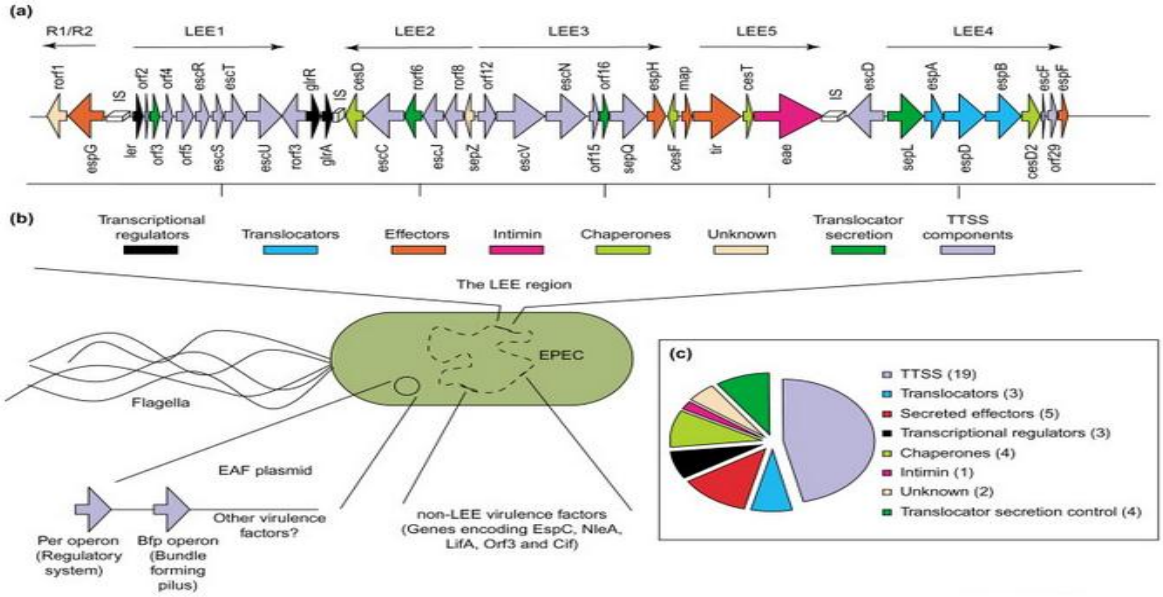
Uma vez translocada para fora da bactéria, as EspA formam um filamento, EspB e EspD são inseridas na membrana celular do hospedeiro, formando a estrutura do poro, para a passagem de proteínas efetoras, como Tir.
Fonte: Adaptado de Vallance e Finlay (2000).

Finalmente, a adesina intimina liga-se à porção central, extracelular, de Tir resultando na adesão íntima entre a bactéria e o enterócito. A interação entre intimina e Tir induz uma cascata de sinalização intracelular (DEAN et al., 2005), com o recrutamento da proteína adaptadora Nck (CAMPELLONE et al., 2002; GRUENHEID et al., 2001), a qual se liga diretamente ao domínio SH2 da proteína N-WASP (*neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein*). O complexo Nck/N-WASP recruta e ativa diretamente as proteínas Arp2/3 (*actin-related protein 2/3*) culminando na mobilização de diferentes proteínas do citoesqueleto e dos microfilamentos de actina que se condensam logo abaixo do sítio de adesão da bactéria, resultando na formação de pedestal característica da lesão A/E (KALMAN et al., 1999; LOMMEL et al., 2001).

O fenótipo da lesão A/E é codificado por genes contidos em uma ilha de patogenicidade cromossomal de 35,5 Kb, denominada *locus of enterocyte effacement* (região LEE) (McDANIEL et al., 1995). Conforme mostrado na **figura 4**, os genes que fazem parte da região LEE estão organizados em cinco principais

operons LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5 (MELLIES et al., 1999; SANCHES-SANMARTIN et al., 2001).

Figura 4 - Representação esquemática dos fatores de virulência de EPEC, codificados em LEE e no plasmídeo EAF.



Fonte: Dean, Maresca e Kenny (2005).

Os operons LEE1, LEE2 e LEE3 contêm os genes *esc* e *sep* que codificam componentes do SSTT além do gene *ler*, que regula positivamente os genes localizados em LEE (ELLIOTT et al., 2000). LEE4 é a região codificadora das proteínas Esps, secretadas pelo SSTT como: EspA, EspB, EspD e EspF (SANCHES-SANMARTIN et al., 2001). O operon LEE5 contém o gene *eae* (*E. coli attachment effacement)*, o gene *tir* (*translocated intimin receptor*) e *cesT*, os quais codificam respectivamente, a intimina, uma adesina de membrana externa de 94 kDa responsável pela adesão íntima da bactéria à célula epitelial (FRANKEL et al., 1994; JERSE et al., 1990); o seu receptor Tir, o qual é translocado para o interior da célula epitelial através do SSTT (KENNY; WARAWA, 2001) e CesT a chaperonina das proteínas Tir e Map (SANCHES-SANMARTIN et al., 2001).

Muitas linhagens de EPEC produzem um padrão de aderência característico, em cultura de células epiteliais chamado adesão localizada (AL). Neste padrão, as bactérias ligam-se em áreas localizadas da superfície celular, formando

microcolônias compactas (grupos bacterianos), que podem ser visualizadas após o contato da bactéria com as células epiteliais por 3 horas. Esse fenômeno está associado à presença do plasmídeo EAF (pEAF), que carrega a sequência chamada EAF (fator de aderência de EPEC). Esse plasmídeo é o fator de virulência extra LEE mais bem estudado, presente apenas nas EPEC típicas, e ausentes, nas amostras de EPEC atípicas. Em EAF encontra–se o operon *bfp* (*bundle forming pilus*) que codifica a fímbria BFP, cujo fenótipo é evidenciado pelo padrão AL em células epiteliais cultivadas *in vitro* (GIRON et al., 1991; TRABULSI et al., 2002).

A fímbria BFP, além de possibilitar a agregação bacteriana em microcolônias, também está envolvida no evento de dispersão (KNUTTON et al., 1999), auxiliando na infecção de outros sítios e tornando a colonização mais eficiente. Além disso, EAF possui três ORF`s denominadas *perA*, *perB* e *perC* (*plasmid-encoded regulator*), cujas proteínas codificadas formam um complexo regulador capaz de ativar a transcrição de alguns genes de LEE, através do gene *ler* (*LEE-encoded regulator*), bem como do operon *bfp* no próprio plasmídeo EAF.

1.3.4 Epidemiologia de EPEC e EHEC

E. coli é responsável por até 30% do número total de patógenos diarréicos em alguns países, com elevado índice de morbidade e mortalidade em crianças menores de cinco anos de idade (BAKHSHI et al., 2012).

As vias de transmissão destes patógenos estão associadas à ingestão de água e alimentos contaminados e ao contato com pessoas ou animais infectados (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

Embora EPEC tenha sido a primeira categoria de *E. coli* diarreiogênica a ser identificada, seu potencial patogênico só foi confirmado e amplamente aceito após estudos realizados com voluntários, onde cepas de EPEC foram ingeridas, confirmando-se os sintomas evidentes de diarreia (LEVINE et al., 1978).

Até meados da década de 90, tEPEC era considerada o principal agente etiológico da diarreia infantil no Brasil (GOMES et al., 1991; ROSA et al., 1998; SCALETSKY et al., 1999; TOLEDO et al., 1983; TRABULSI et al., 1961, 1985) e em

outros países em desenvolvimento, embora fosse rara em países desenvolvidos (NATARO; KAPER, 1998).

A categoria das EPEC é a principal causa de diarreia aguda em crianças menores de dois anos nos países em desenvolvimento onde este patotipo é endêmico (OCHOA et al., 2008). Em uma revisão sistemática de 266 estudos publicados entre 1990 e 2002 sobre causas de diarreia em crianças de até quatro anos de idade, EPEC foi identificada como responsável por uma média de 15,6% das internações por diarreia (LANATA et al., 2002).

Estudos mostraram que houve uma aparente diminuição de tEPEC e uma emergência da aEPEC tanto em países em desenvolvimento como em países industrializados (CLEMENTS et al., 2012; HERNANDES et al., 2009; TRABULSI et al., 2002). Em países desenvolvidos, como a Austrália, aEPEC representou 71% dentre as DEC isoladas em crianças abaixo de 14 anos com diarreia persistente (NGUYEN et al., 2006). Assim, também na Noruega, em um estudo realizado em crianças menores de dois anos de idade, EPEC foi isolada em 44 de um total de 440 pacientes, sendo apenas em um deles identificada como tEPEC (AFSET; BERGH; BEVANGER, 2003).

Embora alguns estudos mostrem que pacientes infectados com aEPEC têm uma diarreia suave, não desidratante e não inflamatória (NGUYEN et al., 2006), a duração da enfermidade é significativamente mais longa e duradoura do que aquelas causadas por outros patógenos, sendo um indicativo de que aEPEC tem a característica de persistir no intestino por um maior período do que outras *E. coli* diarreiogênicas (OCHOA et al., 2008).

No Brasil pesquisas relataram a preseça de EPEC em: 15,7% em Teresina (NUNES et al., 2012); 10% em crianças saudáveis de Campinas (SP) (de MOURA et al., 2012); 12,9% do grupo controle e 8% dos pacientes com diarreia no Rio de Janeiro (REGUA-MANGIA et al., 2004); 9,4% de aEPEC em Salvador (BUERIS et al., 2007); 9,3% de aEPEC e 1,7% de tEPEC em João Pessoa (MORENO et al., 2010); 5,4% de aEPEC em São Paulo (ARAÚJO et al., 2007); 4% de aEPEC e 2,1% de tEPEC em Porto Velho (ORLANDI et al., 2006).

No período de um ano, amostras de crianças pré-escolares de uma tribo na Índia com diarreia aguda foram analisadas, e as DEC representaram 41% de todos os patógenos isolados. Dentre as DEC, as EPEC tiveram uma prevalência de 26,2% e as EHEC de 1,9% (ANVIKAR et al., 2008). Em outra investigação, em amostras de crianças com diarreia aguda no Irã foi encontrada 12,6% de prevalência de EPEC (JAFARI et al., 2009).

Atualmente, STEC representam um dos mais importantes grupos de patógenos alimentares do mundo. O consumo de alimentos como salsichas, leites não pasteurizados, alface, melão cantaloupe, suco de maçã, brotos de rabanete, espinafre tem sido associado a surtos, sendo a dose infectante estimada como inferior a 100 células (KAPER et al., 2004). O principal reservatório de STEC é o trato intestinal bovino e a existência de grandes rebanhos bovinos é um fator que favorece a disseminação dessas bactérias. A taxa de isolamento de STEC em bovinos nas diferentes regiões do Brasil variou de 10 a 83% (CERQUEIRA, 1999; FARAH et al., 2007; IRINO et al., 2005; LEOMIL et al., 2003; TIMM et al., 2007). Dados recentes mostram que o gado brasileiro não é somente um reservatório de STEC incluindo as EHEC, mas também uma fonte de infecção para humanos já que alguns sorotipos associados com doenças severas foram isolados destes (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; KÜHNE, 2004).

Guth et al. (2002) e Irino et al. (2002) descreveram diversos casos de infecções por STEC no Brasil principalmente em crianças. Ainda, Vaz et al. (2004), realizaram um estudo retrospectivo em 2607 amostras isoladas de casos diarréicos entre 1976 e 1999 de crianças menores de cinco anos e adultos imunocomprometidos, no estado de São Paulo, em que foi isolado 1,1% de STEC. Aidar-Ugrinovich et al. (2007) relataram a ocorrência de STEC em 10% de 546 amostras fecais de gado em São Paulo, não sendo encontrado o sorotipo O157:H7.

O sorotipo mais estudado das EHEC é o O157:H7, sendo considerado o mais virulento e frequente (RILEY et al., 1983). No entanto, o grupo das STEC compreende quase 250 sorotipos diferentes e aproximadamente 100 destes, são associados a doenças (JOHNSON et al., 2006). Alguns como O157:NM, O26:H11, O111:NM, O121:H19, O145:NM, O111:H8 e O113:H21 possuem potencial

patogênico similar à O157:H7. Outros sorogrupos também associados são O55, O91, O103 e O119 (CAPRIOLI et al., 2005; PATON; PATON, 1998; VAZ et al., 2004;).

EHEC constitui-se hoje como um dos principais problemas de saúde pública em vários países, dentre eles Argentina, Estados Unidos, Canadá e Japão, além de vários países da Europa, e existem vários relatos de casos na América Latina, principalmente Uruguai e Chile (BEUTIN, 2006; KAPER; O´BRIEN, 1998). Na Argentina, por exemplo, o índice de SHU é extremamente elevado, em torno de 12,2 casos a cada 100.000 crianças menores de cinco anos em 2002 (OGURA et al., 2007), sendo *E. coli* O157:H7 o principal sorotipo causador dessa síndrome.

1.4 Detecção de intimina

Em 1985, uma proteína de membrana externa (OMP) presente em EPEC e não em ETEC, foi descrita como uma adesina de 94 kDa. Achava-se que essa proteína era produto do plasmídeo EAF, pois era consistentemente observada em isolados de EPEC que continham o plasmídeo, e não em isolados curados do plasmídeo (LEVINE et al., 1985).

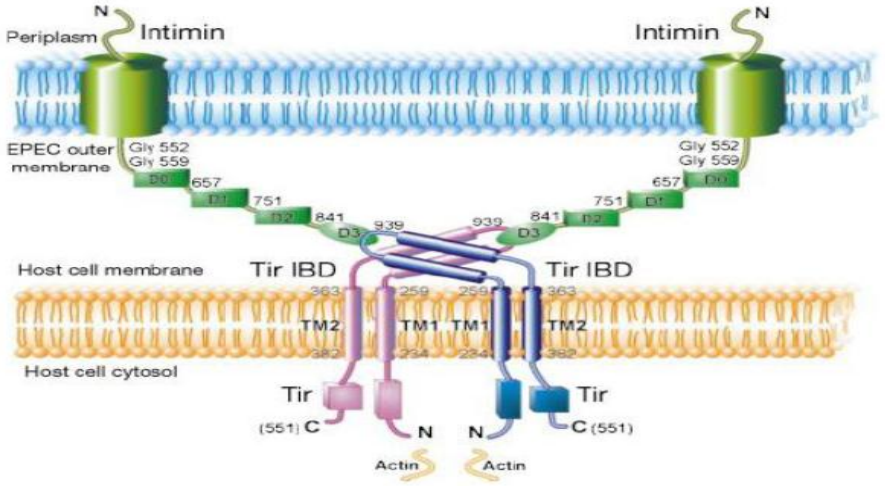
Em 1990, o gene *eae* foi identificado, e havia a hipótese de seu envolvimento na lesão A/E, pois mutantes desse gene perderam a capacidade de produzir a lesão em cultivo celular (JERSE et al., 1990). Em 1991, Jerse e Kaper identificaram uma proteína de 94 kDa como produto do gene *eae* utilizando um antissoro que reconheceu essa proteína nos isolados E2348/69 [cepa protótipo de tEPEC (O127:H6)] e JPN15 (E2348/69 curado do plasmídeo EAF) e não em mutantes do gene *eae*.

Um grande locus cromossomal chamado LEE que codifica as proteínas envolvidas na lesão A/E foi descrito (McDANIEL et al., 1995), e mostrou que esta região é conservada em patógenos intestinais, que produzem esta lesão (EPEC, EHEC, *E. coli* diarreiogênica de coelhos (RDEC-1), *Escherichia albertii* e *Citrobacter freundii* biotipo 4280).

Por conseguinte, Agin e Wolf (1997) obtiveram um antissoro em coelhos imunizados com a porção C-terminal da intimina de RDEC-1 clonada e expressa em *E. coli*, utilizando iniciadores específicos descritos por Frankel et al. (1994). O antissoro mostrou reatividade por *immunoblotting* contra extratos totais de isolados de EPEC (O111) e EHEC (O26), menos para E2348/69 e O157:H7, que mostrou baixa identidade com a porção C-terminal da intimina de RDEC-1. Este estudo sugeriu que poderia existir diferentes famílias de intimina e que essas diferenças não estariam correlacionadas com sorogrupo nem hospedeiro.

Assim, o gene *eae* de diversos isolados de EPEC e STEC já foi clonado, seqüenciado e apresenta uma região 5'-terminal altamente conservada, que compreende os aminoácidos 388-667 (Int $_{388\text{-}667}$). Entretanto, a região 3'-terminal desta proteína apresenta uma composição variável, o que define os tipos e subtipos de intimina conhecidos pelas letras do alfabeto grego como α, α2, β1 a –3, γ1, γ2, δ, ε, ε2 a–4, ζ, η, η2, θ, ι, ι2, κ, λ, ν, ξ, ο, π, ρ e σ (ADU-BOBIE et al., 1998; AGIN; WOLF, 1997; BATCHELOR et al., 1999; BEUTIN et al., 2004; BLANCO et al., 2004, 2006; CHINA et al., 1999; FRANKEL et al., 1994; OSWALD et al., 2000; RAMACHANDRAN et al., 2003; REID et al., 1999; ZHANG et al., 2002;), (**Figura 5**).

Figura 5 - Interação entre intimina e seu receptor Tir presente na membrana da célula hospedeira.



Intimina está representada em verde com os resíduos da porção C-terminal numerados. Os domínios tipo imunoglobulina (D0, D1 e D2) estão representados em retângulos, e o domínio tipo lecitina (D3) responsável pela ligação ao Tir em oval. Tir está representado como dímero (em azul escuro e rosa), com o domínio de ligação a intimina (IBD) extracelular e as porções N e C-terminais intracelulares. Fonte: adaptado de Luo et al. (2000).

1.5 Anticorpos

Historicamente, imunidade significava proteção contra doenças, em particular contra doenças infecciosas. As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imunológico, e a sua resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de resposta imunológica (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O sistema imune é um sistema de defesa versátil, responsável pela proteção contra a invasão de micro-organismos patogênicos. Pode ser dividido em imunidade inata e adquirida, componente menos específico e mais específico, respectivamente. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra os micro-organismos e consiste de peptídeos antimicrobianos, fagócitos, células *killer* e sistema complemento, o qual age rapidamente frente a uma determinada infecção; enquanto a imunidade adquirida consiste na resposta humoral e celular, mediadas por linfócitos B e T, respectivamente e é caracterizada pela grande especificidade frente as distintas moléculas, além da capacidade de responder vigorosamente a repetidas exposições ao mesmo antígeno (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Considerando-se a imunidade humoral, essa especificidade se deve à interação dos antígenos com os receptores presentes nas membranas dos linfócitos B, que inicia uma cascata de sinalização culminando com o desenvolvimento destas células em plasmócitos, células produtoras de anticorpos, moléculas chaves do reconhecimento antigênico (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Anticorpos são moléculas protéicas produzidas por linfócitos B que reconhecem substâncias estranhas ao organismo. A estrutura geral de um anticorpo consiste em uma molécula bifuncional, que compreende dois sítios de ligação ao antígeno (Fab), e um sítio efetor (Fc) no outro lado da molécula (ALZARI et al., 1988). Enquanto o sítio efetor é altamente constante, o sítio de ligação ao antígeno é bastante diverso, devido à recombinação somática e mutagênese, constituindo, portanto, as regiões variáveis (AMIT et al., 1986). As regiões constantes são necessárias para a oligomerização nos sítios de ligação ao antígeno, aumentando a avidez do anticorpo pelo antígeno (BURTON; WOOF, 1992).

Analisando o DNA, estima-se que um organismo humano utilize cerca de 150 mil proteínas diferentes em sua constituição; em comparação, calcula-se que entre 10 a 100 milhões de anticorpos diferentes possam ser produzidos por um só indivíduo (ABBAS et al., 1994). Há, portanto, cerca de 100 mil vezes mais variedades de anticorpos do que os outros componentes protéicos juntos.

Todas as imunoglobulinas têm uma estrutura de quatro cadeias como unidade básica. Elas são compostas de duas cadeias leves idênticas (24 kDa) e duas cadeias pesadas idênticas (55-70 kDa) (ABBAS; LICHTEMAN, 2005). As cadeias são unidas por pontes dissulfeto e por uma extensa rede de interações moleculares intra e inter-cadeias (ROITT, 1987).

Depois que as sequências de aminoácidos de muitas cadeias pesadas e leves diferentes foram comparadas, ficou claro que ambas as cadeias pesadas e leves poderiam ser divididas em duas regiões baseando-se na variabilidade da sequência de aminoácidos (**Figura 6).**

Tanto as cadeias leves quanto as cadeias pesadas das imunoglobulinas possuem regiões aminoterminais variáveis e carboxiterminais constantes. As cadeias leves são compostas por uma região variável (V_L) e uma região constante (C_L), enquanto as cadeias pesadas são compostas por uma região variável (V_H) e três ou quatro regiões constantes (C_H) (GOLDSBY et al., 2000). A justaposição das regiões variáveis de ambas as cadeias formam dois sítios de ligação ao antígeno (região Fab), enquanto as regiões constantes são separadas do local de ligação ao antígeno e não participam do seu reconhecimento. Apesar dos domínios constantes das cadeias leves não participarem das funções efetoras dos anticorpos e não se ligarem às membranas celulares, os domínios constantes das cadeias pesadas (porção Fc) interagem com outras moléculas efetoras e células do sistema imune, participando como mediadores da maioria das funções biológicas dos anticorpos.

A região da dobradiça é a região com a qual os braços da molécula de anticorpo formam um Y. É chamada de região da dobradiça porque há uma flexibilidade na molécula nesse ponto, fazendo a junção das porções Fab com a porção Fc da molécula de anticorpo (ABBAS; LICHTMAN, 2005; ROITT et al, 2001).

Figura 6 - Estrutura de uma molécula de anticorpo.

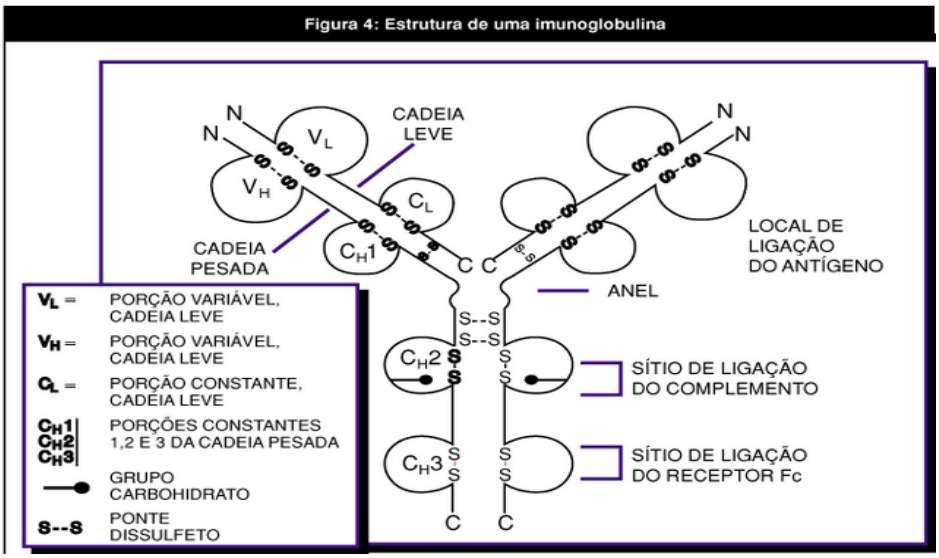


Diagrama de uma molécula de IgG. As regiões de ligação de antígenos são formadas pela justaposição dos domínios variáveis das cadeias leve (VL) e pesada (VH). As regiões C das cadeias pesadas terminam em uma cauda. A localização das regiões de ligação do complemento e do receptor Fc nas regiões constantes das cadeias pesadas é uma estimativa.
Fonte: Abbas et al., (1994).

A maior parte das diferenças nas sequências entre os diversos anticorpos está confinada a três pequenas extensões nas regiões variáveis (V) das cadeias pesadas e leves, chamadas de segmentos hipervariáveis. Estas regiões contêm aproximadamente 10 aminoácidos e são mantidas no lugar por uma estrutura de sequências mais conservadas que forma o domínio Ig da região variável. Na molécula de anticorpo, as três regiões hipervariáveis do domínio V_L e do domínio V_H se aproximam, na sua estrutura tridimensional, para formar uma superfície de ligação a antígenos. Como essa sequência é complementar à estrutura tridimensional do antígeno que é ligado, estas regiões também são conhecidas como regiões determinantes de complementariedade (CDRs) (**Figura 7**). As regiões entre os CDRs que exibem menos variabilidade na região variável são chamadas de regiões *frameworks* (FRs), ou regiões do arcabouço, e atuam como se fossem andaimes que suportam as três voltas que constituem as CDRs (ABBAS; LICHTMAN, 2005; GOLDSBY et al., 2000; MAK; SAUNDERS, 2008).

Figura 7 - Regiões hipervariável e *framework* nas moléculas de Ig.

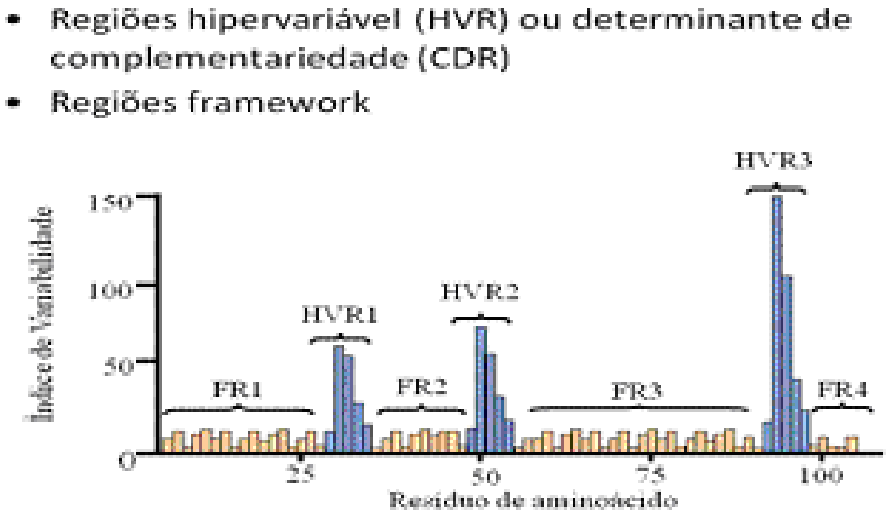


Gráfico da variabilidade de aminoácidos nas moléculas de Ig. Os histogramas demonstram a extensão da variabilidade definida como o número de diferenças em cada aminoácido em várias cadeias leves sequenciadas de forma independente em relação ao número do aminoácido medido a partir da porção aminoterminal.
Fonte: Mayer (2000).

A região constante apresenta pequenas variações na sua sequência de aminoácidos, diferentemente da região variável. Essas variações são responsáveis pela determinação das classes ou isotipos dos anticorpos, interferindo no tamanho, carga, além da solubilidade, na distribuição e funções que desempenham. As cadeias pesadas são classificadas em cinco tipos, designadas por letras gregas: *gamma (γ), mu (μ) , delta (δ), alpha (α) e epsilon (ε)*, podendo ser combinadas com qualquer um dos dois tipos de cadeias leves *kappa (k)* ou *l amda* (λ) (ABBAS; LICHTMAN , 2005; MAK; SAUNDERS, 2008).

As moléculas de anticorpos podem ser divididas em classes e subclasses distintas com base nas diferenças na estrutura das regiões C das cadeias pesadas (ABBAS; LICHTMAN , 2005; MURPHY; TRAVERS; WALPORT, 2008).

As classes de anticorpos também são chamadas de isótipos e são denominadas IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Nos seres humanos os isótipos IgA e IgG podem ainda ser subdivididos em subclasses, ou subtipos, intimamente relacionados, o que não ocorre com as classes IgM, IgD e IgE.

Fragmentos de anticorpos produzidos por digestão proteolítica têm-se mostrado úteis na elucidação das relações de estrutura e função em imunoglobulinas (ELGERT, 2009).

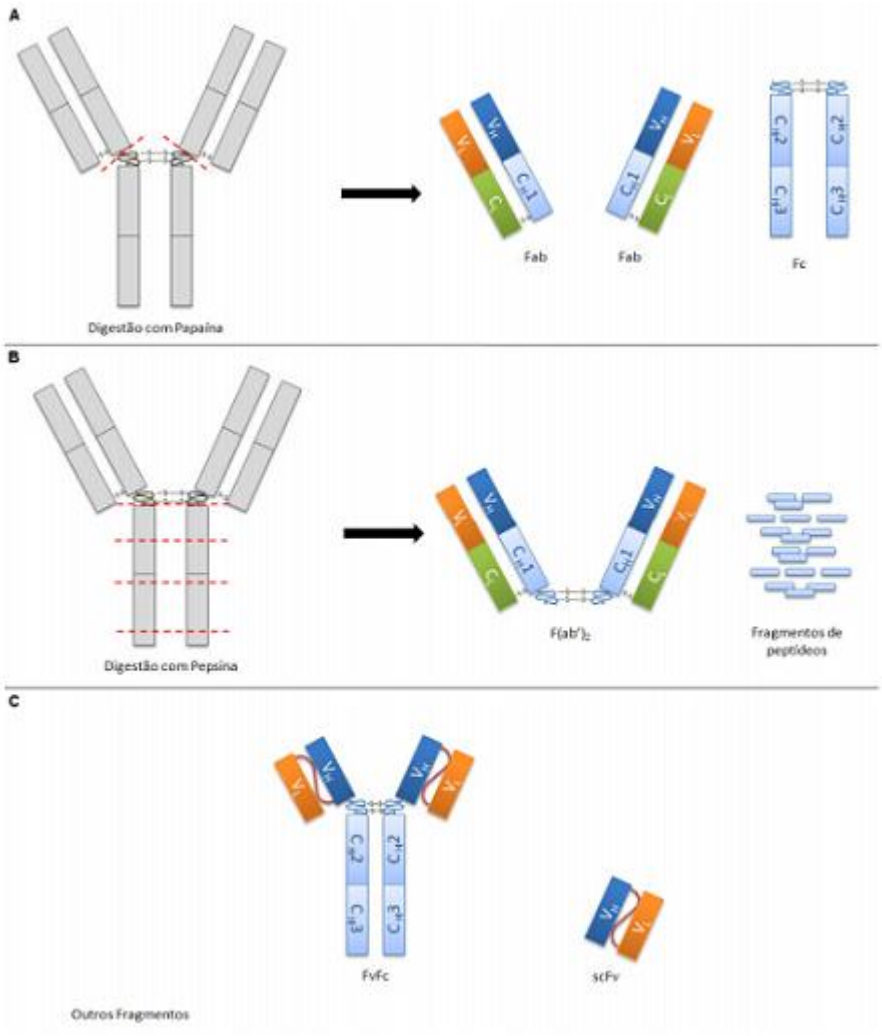
A molécula de anticorpo pode ser fragmentada proteoliticamente. Nas moléculas de IgG, a dobradiça entre C_H1 e C_H2 das cadeias pesadas é a região mais suscetível à clivagem proteolítica. Quando a IgG é tratada com a enzima papaína, a enzima age na região de dobradiça e cliva a IgG em três pedaços separados: dois Fabs inteiros, e a região Fc (**Figura 8a**). Quando se usa a pepsina para clivar a IgG, a proteólise é restrita à porção carboxi-terminal da região de dobradiça, gerando um fragmento que liga ao antígeno (Fab) e que contém a dobradiça e as pontes de dissulfeto entre as cadeias instactas. Fragmentos Fab que retêm a região da dobradiça são chamados de Fab', quando as pontes de dissulfeto entre as cadeias são preservadas, os dois fragmentos Fab' permanecem ligados em uma forma conhecida como $F(ab')_2$ (**Figura 8b**).

Os fragmentos Fab' e $F(ab')_2$ são ferramentas experimentais úteis, uma vez que podem se ligar ao antígeno sem ativar os mecanismos efetores dependentes do fragmento Fc (HAYDEN et al, 1997; HOLLIGER; HUDSON, 2005; VAZ; FARIA, 1993).

Outros fragmentos de anticorpos podem ser obtidos sem perder sua função biológica. O fragmento scFv (*single chain variable fragment)* composto pelas cadeias variáveis leve e pesada pode ser obtido na forma recombinante (**Figura 8c).** Esse fragmento, assim como os dois tipos de Fab retêm a atividade ligante ao antígeno e não tem função efetora. Esses fragmentos têm sido a forma mais corrente e podem ser expressos em bactérias e em eucariotos inferiores (CHOI et al., 2004; CUNHA et al., 2004).

Outras variações de fragmentos também podem ser expressas em sistemas microbianos, como por exemplo o FvFc, que constitui-se em um scFv unido aos domínios C_H2 e C_H3 de IgG (**Figura 8c),** retendo a capacidade de ligação ao antígeno e a atividade efetora. A afinidade desse fragmento é comparável com o anticorpo monoclonal parental (ANDRADE et al., 2000, 2005; MARANHÃO; BRÍGIDO, 2000).

Figura 8 - Fragmentos proteolíticos de uma molécula de IgG.



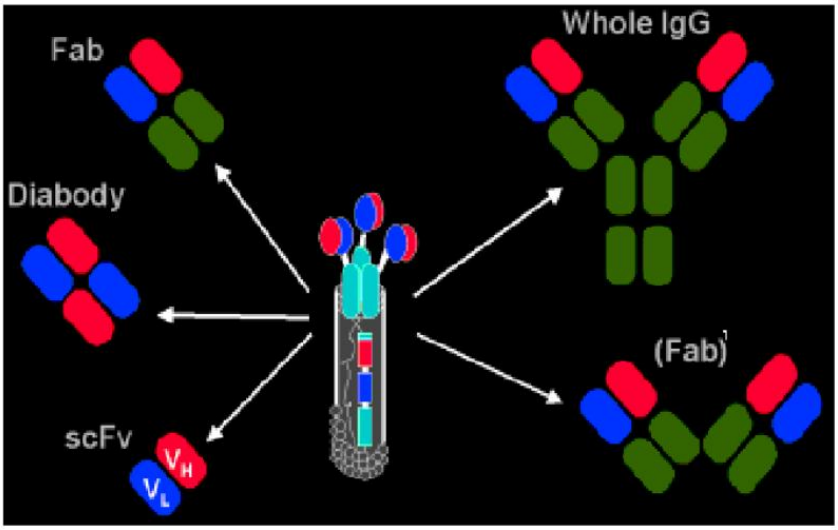
Molécula de IgG é clivada pelas enzimas papaína (A) e pepsina (B) no local indicado pelas linhas tracejadas. A digestão pela papaína permite a sepração de duas regiões que ligam antígenos (fragmentos Fab) da porção da molécula de IgG que liga o complemento e os receptores Fc (fragmento Fc). A pepsina gera um único fragmento bivalente que liga antígenos, $F(ab')_2$. Em (C) está representado outros fragmentos que podem ser obtidos por engenharia de anticorpos. Um fragmentos FvFc que possui a região de ligação ao antígeno e a e a efetora, e o scFv de ligação ao antígeno. O fragmento scFv possui um peptídeo conector ou *linker* (vermelho) que liga as cadeias variáveis leve e pesada.
Fonte: Adaptado de Lipman et al. (2005).

A estrutura dos domínios da molécula de um anticorpo é particularmente acessível à engenharia de proteínas. Uma vez que anticorpos completos são moléculas grandes (150 kDa), pequenos fragmentos derivados de IgG podem ser construídos para reter a atividade de ligação ao antígeno (Fab, Fv) ou a função efetora (Fc). Estes anticorpos pequenos (12-50 kDa) podem ser acoplados a

radioisótopos ou outros marcadores e podem ser usados para localizar o antígeno alvo ou usados em terapia. Estes fragmentos são de grande importância farmacêutica para o uso *"in vivo"*, pois apresentam alta capacidade de difusão e penetração em tecidos. A **figura 9** exemplifica a fragmentação da molécula de IgG em pedaços menores que podem ser usados em diferentes abordagens.

Técnicas de biologia molecular, como a utilização da PCR (Polymerase Chain Reaction), propocionaram a amplificação de genes de imunoglobulinas (BORREBAECK, 1995; BRUNT, 1990; LARRICK et al., 1989; MALMBORG;) visando-se substituir o uso de animais na produção de anticorpos por uma nova metodologia de produção *in vitro.*

Figura 9 - Fragmentação da molécula de IgG em menores pedaços.



Fonte: Nery (2006).

Os métodos atualmente usados para clonagem de genes que codificam as regiões variáveis das cadeias leve e pesada, baseiam-se na tecnologia de anticorpos monoclonais, onde uma população de células idênticas produz anticorpos homogêneos e específicos (LAGERKVIST et al., 1995), ou de anticorpos policlonais, obtidos por tipos diferentes de células produtoras de anticorpos em animais, ou de pacientes imunizados (BARBAS et al., 1991) ou até mesmo de anticorpos recombinantes que será descrito adiante (HAGEMEYER et al., 2009).

1.6 Tecnologia de anticorpos recombinantes

Anticorpos gerados a partir da resposta imune natural ou através de imunização (policlonais) apresentam-se como uma mistura de moléculas com diferentes afinidades e especificidades, sendo produzidos em quantidades limitadas (MURPHY et al., 2008). Em contraste aos anticorpos policlonais, os monoclonais apresentam homogeneidade, alta especificidade e são produzidos ilimitadamente, através da cultura de células especializadas e um extensivo envolvimento de tempo e trabalho (SVENNERHOLM et al., 1986).

A tecnologia do DNA recombinante permite o desenvolvimento de construções que mantenham ou aperfeiçoem as propriedades funcionais de um anticorpo. Atualmente é possível a produção de fragmentos de anticorpos, como proteínas recombinantes, utilizando diferentes sistemas de expressão (HAGEMEYER et al., 2009).

Diversas técnicas para a aplicação de anticorpos recombinantes e seus fragmentos foram introduzidas, dentre elas alguns refinamentos na estrutura das moléculas como a conversão de anticorpos murinos em humanos por meio da humanização de anticorpos (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002); geração de anticorpos quiméricos (metade humano e metade murino) substituindo a porção Fc do anticorpo por um Fc humano apresentando um certo grau de imunogenicidade e a apresentação de anticorpos na superfície de fagos filamentosos, técnica comumente conhecida como *Phage Display*, permitindo a geração de milhões de diferentes variantes de peptídeos ou proteínas, sendo sua principal aplicação no isolamento de anticorpos monoclonais usando uma biblioteca de anticorpos bem representativa apresentada em fagos (BRÍGIDO; MARANHÃO, 2002).

Dentre as diferentes construções baseadas na estrutura do anticorpo, podemos citar os fragmentos variáveis em cadeia única (*single chain Fragments variable* ou scFv). O scFv é o menor fragmento de anticorpo que ainda retém a capacidade de se combinar com o antígeno. Esses fragmentos são constituídos dos domínios variáveis (V), mas não dos domínios constantes (C) da molécula de anticorpo (GIVOL, 1991).

1.6.1 Anticorpos de cadeia única (scFv)

Pequenos fragmentos de anticorpos recombinantes estão na vanguarda de diagnóstico in vivo e terapia. Essas unidades possuem uma melhor distribuição e depuração mais rápida do que as moléculas maiores. Entre estes, os fragmentos de anticorpos de cadeia única (scFv) estão emergindo como alternativas credíveis. Estas proteínas mostraram que têm as mesmas especificidades e afinidades para os seus antígenos, como o anticorpo monoclonal (MAb) (RAJAWAT et al., 2011).

Os fragmentos Fv (Fração variável) não são covalentemente ligados, desta forma os heterodímeros dos domínios V_H e V_L podem dissociar facilmente (BRINKMANN et al., 1997). No entanto, fragmentos Fv podem ser construídos de forma a não se dissociarem. Isto porque fragmentos Fv podem ter seus domínios variáveis (V_H e V_L) unidos por um pequeno peptídio hidrofílico e flexível, criando um fragmento Fv de cadeia única- scFv (ABRAHAM et al., 1995; GOCHSHUBER et al., 1990).

Os genes que codificam para esses domínios podem ser especificamente amplificados, clonados individualmente, e posteriormente sub-clonados para a formação deste segmento único de DNA, constituído de cerca de 740 pares de bases (HUSTON et al., 1988).

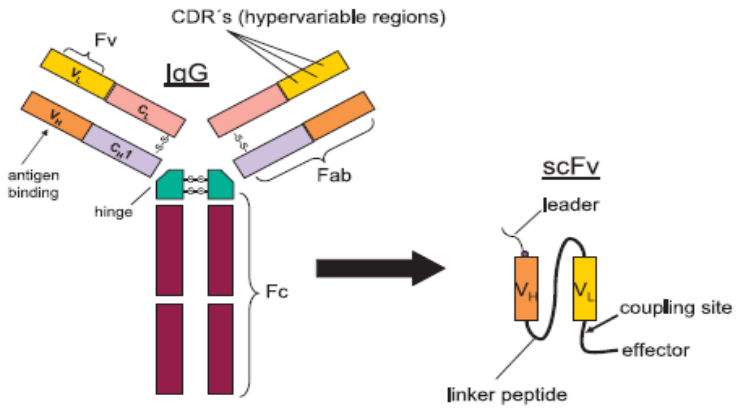
Para formar o segmento único de DNA, o domínio variável da cadeia pesada (V_H) é ligado ao domínio variável da cadeia leve (V_L), através de uma sequência que codifica para um polipeptídeo de ligação flexível (*linker*). Esse polipeptídeo pode apresentar tamanho e composição variável, prevenindo a dissociação entre os domínios, além de influenciar na estrutura e valência do scFv. A inserção do polipeptídeo ligante permite o distanciamento entre a porção C-terminal de um domínio e a porção N-terminal do outro domínio (HOLLIGER; HUDSON, 2005; LEONG; CHEN, 2008)

Dessa forma, o "linker" proporciona estabilidade conformacional à proteína, garantindo afinidade, normalmente sendo formado por aminoácidos que garantem flexibilidade, como glicinas e serinas.

Entretanto, estudos demonstraram que ao modificar o linker, tornando-se seus aminoácidos centrais distribuídos ao acaso, obteve-se um anticorpo na população gerada, com significativo aumento na produção do mesmo, sem alterar sua afinidade pelo antígeno ou aumentar a toxicidade para a bactéria (TURNER et al., 1997).

Na **Figura 10** observar-se a ilustração de uma molécula de IgG e seu derivado, um fragmento variável em cadeia única (scFv).

Figura 10 - Ilustração de uma molécula de IgG e seu derivado, scFv.



Fonte: Adaptado de Hagemeyer et al. (2009).

Diferentes sistemas de expressão estão disponíveis para a produção de scFv, podendo-se optar entre células procarióticas ou eucarióticas, desde que seja mantida a funcionalidade dessa molécula. Verma e colaboradores (1998) analisaram comparativamente os sistemas de expressão em bactérias, leveduras, células de inseto e células de mamíferos e concluíram que o sistema de expressão de anticorpos (ou seus fragmentos) deve ser escolhido caso a caso, levando em consideração alguns fatores como: a infra-estrutura e experiência do laboratório; a variante do anticorpo a ser explorada e sua citotoxicidade; a necessidade de modificações pós-traducionais, bem como seu grau de complexidade; o rendimento e o grau de purezas desejados; aspectos regulatórios e de segurança; os custos esperados e, por fim os resultados de ensaios preliminares. Além disso, diversos fatores como solubilidade, estabilidade, tamanho e a sequência primária dos

aminoácidos também podem influenciar diretamente no rendimento e na atividade biológica da proteína.

Dentre as bactérias utilizadas como sistema de expressão, a *Escherichia coli* é o sistema de escolha para expressão de proteínas recombinantes, devido a facilidade de seu manuseio, baixo custo e rápido crescimento. Diversos trabalhos têm descrito alto rendimento da expressão de fragmentos de anticorpos nesta espécie bacteriana, chegando a 2 g/L (CARTER et al., 1992; RODRIGUES et al., 1992). A principal indicação da utilização deste sistema é para expressão de fragmentos de anticorpos desprovidos de modificações pós-traducionais. Duas estratégias são utilizadas para obtenção de scFv em *E. coli*: (i) Produção do fragmento no citoplasma bacteriano, na forma de corpúsculos de inclusão, seguida de *refolding* para recuperação de moléculas biologicamente ativas; (ii) Expressão da proteína recombinante fusionada a um peptídeo sinal, que propiciaria a sua secreção para o espaço periplasmático da célula bacteriana, no qual seria processada na conformação correta e na forma solúvel. Entretanto, a utilização de peptídeos sinais não garante a solubilidade da proteína, já que esta tende a se acumular no espaço periplasmático na forma de corpúsculos de inclusão, quando expressa em grandes quantidades. O sucesso para o processamento correto do fragmento do anticorpo no espaço periplasmático parece estar relacionado com a sequência primária dos aminoácidos nos domínios variáveis (KIPRIYANOV; LE GALL, 2004).

Os scFvs podem ser expressos em fusão a outras proteínas como a GST (*Glutathione S-Transferase*), a MBP (*Maltose-binding protein)* e a SUMO (*small ubiquitin-related modifier),* sem a intenção de beneficiar a atividade biológia destas para terapia, mas simplesmente para experimentos de imunoensaio (KERSCHBAUMER et al., 1997) ou então, para facilitar a metodologia de purificação (CHOUMET et al., 1999). Essas proteínas de fusão parecem apresentar atividade de chaperoninas, protegendo a proteína de interesse a elas fusionadas da degradação proteolítica, aumentando a solubilidade e o dobramento, e diminuindo significativamente a formação de corpos de inclusão. Em contraste, uma limitação desta metodologia, é a clivagem destas proteínas de fusão que pode ser ineficiente (ARBABI-GHAHROUDI; MACKENZIE, 2005).

Os scFvs têm sido usados em terapias (CARTER et al., 1992; CHESTER; HAWKIM, 1995) e diagnósticos, apresentando vantagens sobre anticorpos convencionais e anticorpos monoclonais, como biofármacos, atribuídas ao tamanho reduzido e a ausência da porção Fc (LEONG; CHEN, 2008; LORIMER et al., 1996; MILENIC et al, 1991; TURNER et al., 1997).

Constatou-se que estas moléculas possuem rápida circulação sanguínea, pois pacientes tratados com scFv apresentaram boa localização destes em apenas uma hora após a injeção (GEORGE et al., 1996). Também apresentam boa penetração em tecidos, teoricamente baixa imunogenicidade, baixa retenção nos rins e outros órgãos não-alvos, melhor penetração em tumores e são construídos facilmente. Possuem baixo custo comercial em larga escala, existindo a possibilidade reestruturá-los em função de melhorar sua atividade e produção (MILENIC et al, 1991). Além disso, devido a seu curto tempo de circulação e rápida eliminação do organismo, pode ser administrada em radioimunoterapias e desintoxicação de drogas (LEONG; CHEN, 2008; TURNER et al., 1997).

Diversas abordagens vem sendo utilizadas para a produção de moléculas de scFv, bem como a possibilidade de interação destas moléculas com outras proteínas para tratamento e diagnóstico de doenças como o câncer, podem eficientemente localizar tumores e diminuir massas tumorais por bloquear estes antígenos para qual sua especificidade foi desenhada (BATRA et al., 1992; KETTELEBOROUGH et al., 1994; LEONG; CHEN, 2008; LORIMER et al., 1996; MAHGOUB et al., 2012; WEISSER; HALL, 2009).

Moléculas de scFvs também foram desenvolvidas para a detecção de antígenos de diversas categorias de *Escherichia coli* diarreiogênicas.

Ozaki (2011), obteve o scFvLT, o qual foi capaz de reconhecer a toxina LT através de ensaios imunossorológicos, mas incapaz de neutralizar a atividade citotóxica da toxina, provando ser uma ferramenta com potencial para o diagnóstico de ETEC. Já Chung et al. (2008) produziram scFvs obtidos de uma biblioteca de fagos selecionados pela subunidade B de LT de ETEC. A subunidade B foi utilizada na forma monomérica e na forma pentamérica. Os anticorpos recombinantes

mostraram diferentes especificidades na reatividade com as diferentes formas da subunidade B de LT.

Bhaskaran et al. (2005) produziram scFv contra fímbria F5 de ETEC, que é um dos fatores de virulência para adesão no enterócito animal, utilizando o sistema pCANTAB obtendo scFv solúvel em *E coli* HB2151.

A partir de um anticorpo monoclonal anti-Stx2, Ma et al. (2008) construíram um scFv, que foi clonado em pCANTAB modificado (contendo 6 resíduos de histidina) sendo sugeridos pelos autores que este scFv anti-Stx2 poderá ser usado na prevenção e terapia de doenças causadas por EHEC.

Anticorpos recombinantes que reconhecem EspA e intimina de EHEC O157:H7 foram produzidos e selecionados a partir de células do baço de coelhos imunizados com a porção C-Terminal de intimina de O157:H7 e a molécula integral de EspA (KÜHNE et al., 2004), que reconheceu fracamente isolados dos sorogrupos O157 e O111 testados.

Menezes et al. (2011) obtiveram o scFv-intimina, o qual reconhece a proteína intimina presente no isolado protótipo de tEPEC e a proteína recombinante intimina purificada.

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho a partir de um gene sintético otimizado da sequência de fragmentos de anticorpos recombinantes anti-intimina, obteve-se um scFv-intimina, uma ferramenta para o diagnóstico rápido de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) por imunofluorescência indireta.

REFERÊNCIAS*

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1994.

ABE, C. M. et al. Virulence feasures of atypical enteropathogenic Escherichia coli identified by the eae (+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.

ABRAHAM, S. R. et al. The human antibody repertoire: heavy and light chain variable region gene usage in six alloantibodies specific for human HLA class I and class II alloantigens. **Mol. Immunol.**, v. 32, n. 14-15, p. 1105-1122, 1995.

ADU-BOBIE, J. et al. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin α and intimin β from enteropathogenic *Escherichia coli.* **Infect. Immun.**, v. 66, n. 12, p. 5643-5649, 1998.

AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia col* (EPEC) in Norwegian children with diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 11, p. 1015-1019, 2003.

AGBODAZE, D. Verocytotoxins (Shiga-like toxins) produced by Escherichia coli: a minireview of their classification, clinical presentations and management of a heterogeneous family of cytotoxins. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 22, n. 4, p. 221-230, 1999.

AGIN, T. S.; WOLF, M. K. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine. **Infect. Immun.**, v. 65, p. 320-326, 1997.

AIDAR-UGRINOVICH**,** L. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao Paulo, Brazil. Int. **J. Food. Microbiol.**, v. 115, p. 297-306, 2007.

ALZARI, P. M. ; LASCOMBE, M. B.; POLJAK, R. J. Three-dimensional structure of antibodies. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 555-580, 1988.

AMIT, R. et al. Acute, severe, central and peripheral nervous system combined demyelination. **Pediatr. Neurol.**, v. 2, p. 47–50, 1986.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ANDRADE, E. V. et al. Single-chain Fv with fragment oh the human iGg1 tag: construction, *Pichia pastoris,* expression and antigen binding characterization. **J. Biochem.**, v. 128, p. 891-895, 2000.

ANDRADE, E. V. et al. Thermodynamic basis for antibody binding to Z-DNA: comparison of a monoclonal antibody and its recombinant derivatives. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1726, n. 3, p. 293-301, 2005.

ANVIKAR A. R. et al. Role of *Escherichia coli* in acute diarrhoea in tribal preschool children of central India. **Pediatr. Perinat. Epidemiol.**, v. 22, p. 40-46, 2008.

AOKI V. et al. Imunofluorescência direta e indireta. **An. Bras. Dermatol.**, v. 85, n. 4, p. 490-500, 2010.

ARANDA, K. R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I. C. Avaliação dos PCRs multiplex para diagnóstico de infecção por Escherichia coli diarreiogênicas e Shigella spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 12, p. 5849-5853, 2004.

ARANDA, K. R. S. et. al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 267, n. 2, p.145-150, 2007.

ARAÚJO, J. M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007.

ARBABI-GHAHROUDI, M.; TANHA, J.; MACKENZIE, G. Prokaryotic expression of antibody. **Cancer and metastasis Rev.**, v. 24, p. 501-519, 2005.

BAKHSHI, B.; FALLAHZAD, S.; POURSHAFIE, M. R. The occurrence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains among children with diarrhea in Iran. **J. Infect. Chemother**. DOI 10.1007/s10156-012-0526-0, 2012.

BARBAS, C. F. et al. Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA,** v. 88, p. 7978-7982, 1991.

BATCH and spin cup methods for affinity purification of proteins. **Pierce Biotechnology**, Inc., 10/2002.

BATCHELOR, M. et al. Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. **J. Clin. Microbiol.,** v. 37, n. 12, p. 3822-3827, 1999.

BATRA, S. K. et al. Expression of the human MUC1 mucin cDNA in a hamster pancreatic tumor cell line HP-1. **Int. J. Pancreatol.**, v. 12, n. 3, p. 271-283, 1992.

BEUTIN L. et al. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1099-1108, 2004.

BEUTIN, L. et al. Comparative evaluation of the Ridascreen® Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. **J. Appl. Microbiol.**, v. 102, p. 630-639, 2006.

BHASKARAN, S. et al. A single-chain fragment variable recombinant antibody against F5 fimbria of enterotoxigenic Escherichia coli inhibits agglutination of horse red blood cells induced by F5 protein. **Vet. Res. Commun.**, v. 29, n. 6, p. 463-476, 2005.

BLANCO, J. E. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 311-319, 2004.

BLANCO J. E. et al. Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Int. Microbiol.**, v. 9, p. 103-110, 2006.

BRIGIDO, M. M. et al. Role of Mouse VHIO and VL Gene Segments in the Specific Binding of Antibody to Z-DNA, Analyzed with Recombinant Single Chain Fv Molecules. **J. Immunol.**, v. 150, n. 2, p. 469-479, 1993.

BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q. Bibliotecas Apresentadas em Fagos. **Tecnol. Ciência Desenvol.**, v. 26, p. 44-51, 2002.

BRINKMANN, U. et al. Stabilization of a recombinant Fv fragment by base-loop interconnection and V(H)-V(L) permutation. **J. Mol. Biol.**, v. 268, p. 107-117, 1997.

BRUNT, V. J. Amplifying genes: PCR and its alternatives. **Biotechnology (NY)**, v. 8, n. 4, p. 291-294, 1990.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador in Salvador – Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 6, p. 839-844, 2007.

BURGESS, R. R. Refolging solubilized inclusion body proteins. **Methods Enzimol.**, v. 463, p. 259-282, 2009.

BURTON, D. R. et al. Human monoclonal Fab fragments derived from a combinatorial library bind to respiratory syncytial virus F glycoprotein and neutralize infectivity. **Proc. Natl. Acad. Sci.** USA., v. 89, n. 21, p. 10164–10168, 1992.

BUTT, T. R. et al. Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO. **Protein Sci.**, v. 1, p. 182-189, 2005.

CAMPELLONE, K. G. et al. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. **Molec. Microbiol.**, v. 43, p. 1227-1241, 2002.

CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups – A **Review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 99, p. 545-552 B, 2004.

CAPRIOLI, A. et al. E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.**, v. 36, p. 289-311, 2005.

CARBAJAL, D.; MORANO, K. A.; MORANO, L. D. Indirect immunofluorescence microscopy for direct detection of *Xylella fastidiosa* in xylem sap. **Cur. Microbiol.**, v. 49, p. 372-375, 2004.

CARTER, P. et al. High level *Escherichia coli* expression and production of a bivalent humanized antibody fragment. **Biotechnology (N.Y.)**, v. 10, n. 2, p. 163-167, 1992.

CERQUEIRA, A. M. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 70, p. 111-121, 1999.

CHESTER, K. A.; HAWKIN, R. E. Clinical issues in antibody design. **Trends Biotechnol.**, v. 13, n. 8, p. 294-300, 1995.

CHINA, B. et al. Heterogenicity of the eae genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with humans strains. **Research Microbiol.**, v. 150, p. 323-332, 1999.

CHINEN, I. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken burger, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 132, p. 167-171, 2009.

CHOI, G. H. et al. Cloning, expression, and characterization of single-chain variable fragment antibody against mycotoxin deoxynivalenol in recombinant *Escherichia coli.* **Protein Expr. Purif.**, v. 35, p. 84-92. 2004.

CHOUMET, V. et al. Biologically active human anti-crotoxin scFv isolated from a semi-synthetic phage library. **Immunotechnology.**, v. 3, n. 2, p. 117-125, 1997.

CHUNG, W. Y. et al. Phage-display derived single-chain fragment variable (scFv) antibodies recognizing conformational epitopes of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B-subunit. **J. Immunol. Methods.**, v. 339, p. 115-123, 2008.

CLACKSON, T. et al. Making antibody fragments using phage display libraries. **Nature,** v. 352, p. 624-628, 1991.

CLARKE, S. C. et al. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 365-378, 2003.

CLEARY, J. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 527-538, 2004.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Landes Bioscience**, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.

COCOLIN, L. et al. A multiplex-PCR method to detect enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in artificially contaminated foods. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 203, p. 159-164, 2000.

COONS, A. H. et al. The Demonstration of Pneumococcal Antigen in Tissues by the Use of Fluorescent Antibody. **J. Immunol.**, v. 45, p. 159-170, 1942.

CUNHA, A. E. et al. Methanol induction optimization for scFv antibody fragment production in Pichia pastoris. **Biotechnol Bioeng.**, v. 86, n. 4, p. 458-67, 2004.

DANIELL, S. J. et al. The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 3, n. 12, p. 865-871, 2001.

DE MOURA, C. et al. Prevalence of enteropathogens in normal feces from healthy children at an infant day care in Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 6, n. 2, p. 176-180, 2012.

DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS (DATASUS). **Informações de saúde**. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203>. Acesso em: 05. dez. 2012.

DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 8, n. 1, p. 28-34, 2005.

DUARTE, P. C. et al. Comparação de um soro indireta fluorescente anticorpo teste com dois testes de Western blot para o diagnóstico de mieloencefalite protozoária equina. **Vet. Diagn. J. Invest.**, v. 15, p. 8-13, 2003.

DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of Escherichia coli DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **J. Bacteriol.**, v. 7, p. 2597-2606, 2008.

ELGERT, K. D. **Immunology:** understanding the immune system. 2nd ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2009.

ELLIOTT, S. J.; NATARO, J. P. Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. **Vet. Med. Microbiol.**, v. 6, p. 196-206, 1995.

ELLIOTT, S. J. et al. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli.* **Infect. Immun.**, v. 68, n. 11, p. 6115-6126, 2000.

ESCHERICH, T. Die darmbakterien des neugeborenen und säuglings. **Fortshr. Med.**, v. 3, p. 515-522, 1885.

EVANS, D. J.; EVANS, D. G. Three characteristics associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. **Infect. Immun**., v. 8, p. 322-328, 1973.

FARAH, S. M. et al. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Paraná State, southern Brazil. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 607-612, 2007.

FENG, P.; MONDAY, S. R. Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. **Mol. Cell. Probes.**, v. 14, p. 333-337, 2000.

FRANKE, J. et al. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 2460-2463, 1994.

FRANKEL, G. et al. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1835-1842, 1994.

FRANZOLIN, M. R. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 359-363, 2005.

FRIEDRICH, A.W. et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **J. Infect. Dis.**, v. 185, p. 74-84, 2002.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. **Infect. Immun.,** v. 73, v. 5, p. 2573-2585, 2005.

GE Healthcare. **RECOMBINANT phage antibody system**, 2002.

GEORGE, A. J. Single-chain Fv radioimmunotargeting. **Q. J. Nucl. Med.**, v. 40, n. 3, p. 320-33, 1996.

GIRARD, F. et al. Interaction of Enteropathogenic and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*and Porcine Intestinal Mucosa: Role of Intimin and Tir in Adherence. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 6005–6016, 2005.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S. Y.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli.* **Science.**, v. 254, p. 710-713, 1991.

GIVOL D. The minimal antigen-binding fragment of antibodies--Fv fragment. **Mol. Immunol.**, v. 28, p. 1379-1386, 1991.

GRIFFIN P. M.; TAUXE R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E.coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol. Rev.**, v. 13, p. 60-98, 1991.

GLOCKSHUBER, R. et al. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. **Biochemistry**, v. 13, n. 6, p. 1362-1367, 1990.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby imunologia.** 4. ed. Rio de Janeiro. Revinter, 2002.

GOMES, T. A. T. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 331-337, 1991.

GOOSNEY, D. L. et al. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. **Current Biology**, v. 10, n. 12, p. 735-738, 2000.

GRUENHEID, S. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* tir binds nck to initiate actin pedestal formation in host cells. **Nature Cell Biol.**, v. 3, p.856-859, 2001.

GUTH, B. E. C. et al. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from a patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 535-536, 2002.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **J. Anim. Sci.**, v. 85, p. 45-62, 2007.

HAGEMEYER, C. E. et al. Single-chain antibodies as diagnostic tools and therapeutic agents. **Thromb. Haemost.***,* v. 101, p. 1012-1019, 2009.

HAYDEN, F. G. et al. Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. **N. Engl. J. Med.**, v. 337, n. 13, p. 874–879, 1997.

HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 297, n. 2, p. 137-149, 2009.

HOLLIGER, P.; HUDSON, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. **Nat. Biotechnol.**, v. 23, p. 1126-1136, 2005.

HUMPHRIES, R. M.; ARMSTRONG, G. D. Sticky situation: localized adherence of enteropathogenic Escherichia coli to the small intestine epithelium. **Future Microbiol.**, v.5, n.11, p.1645-1661, 2010.

HYLAND, R. M. et al. The bundling pilin of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. **Cell Microbiol.**, v.10, n.1, p.177-187, 2008.

HUSTON, J. S. et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of a specific activity in an anti-digoxin single chain Fv analogue produced in *Escherichia coli.* **Proc. Natl. Acad. Sci.** *USA*, v. 85, p. 5879-5883, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **População**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/mapa_site/mapa_site.php#populacao>. Acesso em: 25 nov. 2012.

IRINO, K. et al. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, p. 446-447, 2002.

IRINO, K. et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 105, p. 29-36, 2005.

JAFARI, F. et al. Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals. **J. Infect.**, v. 58, p. 21-27, 2009.

JERSE, A. E. et al. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells**. PNAS**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990.

JERSE, A. E.; KAPER, J. B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infect. Immun.**, v. 59, p. 4302-4309, 1991.

JOHNSON, K. E.; THORPE, C. M.; SEARS, C. L. The emerging clinical importance de non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 1587-1595, 2006.

KAPER J. B.; NATARO J. P.; MOBLEY H. L. Pathogenic *Escherichia coli.* **Nature Reviews.**, v. 2, p. 123–140, 2004.

KAPER, J. B.; O´BRIEN, A. D. ***Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains**. Washington: ASM Press, 1998. 465 p.

KARCH, H.; MEYER, T. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli.* **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 1180-1186, 1989.

KARMALI, M. A. et al. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony is weeps and polymyxin extraction of verotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, p. 614-619, 1985.

KARMALI, M. A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 2, p. 15-37, 1989.

KETTLEBOROUGH, C. A. et al. Isolamento de tumor de células-specific single-chain Fv de ratinhos imunizados utilizando bibliotecas de anticorpos fago e a re-construção de anticorpos completos a partir destes fragmentos de anticorpo. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 4, p. 952-958, 1994.

KERSCHBAUMER, R. J. et al. Single-chain Fv fusion proteins suitable as coating and detecting reagents in a double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. **Anal. Biochem.**, v. 249, n. 2, p. 219-227, 1997.

KENNY, B.; WARAWA, J. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1444-1453, 2001.

KIMATA, K. et al. Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **Microbiol. Immunol.**, v. 49, n. 6, p. 485-492, 2005.

KITAGAWA, Y. et al. ELISA indirecto e ensaio de anticorpo imunofluorescente indirecto para detectar o anticorpo contra a murinanorovirus S7 em ratos. **Anim. Exp.**, v. 59, p. 47-55, 2010.

KNUTTON, S. et al. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 2166-2176, 1998.

KNUTTON, S. et al. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Mol. Microbiol.**, v. 33, p. 499-509, 1999.

KIPRIYANOV, S. M.; LE GALL, F. Generation and production of engineered antibodies. **Mol. Biotech.,** v. 26, p. 39-60, 2004.

KOGA, P. C. M. et al. Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and its use in EPEC diagnosis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 5-7, 2003.

KOGA, P. C. M. **Identificação fenotípica de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) utilizando anticorpos anti-intimina**. 2003. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

KOHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.

KONOWALCHUK, J.; Speirs, J. I.; Stavric, S. Vero Response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 18, p. 775-779, 1977.

KÜHNE, S. A. et al. Isolation of recombinant antibodies against EspA and intimin of *Escherichia coli* O157:H7. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 2966-2976, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAGERKVIST, A. C.; FUREBRING, C.; BORREBAECK, C. A. Single, antigen-specific B cells used to generate Fab fragments using CD40-mediated amplification or direct PCR cloning. **Biotechniques**, v. 18, n. 5, p. 862-869, 1995.

LANATA, C. F. et al. An intervention for the promotion of hygienic feces disposal behaviors in a shanty town of Lima, Peru. **Health Educ. Res.**, v. 17, n. 6, p. 761-773, 2002.

LARRICK, J. W. et al. Direct cDNA cloning of the rearranged immunoglobulin variable region. **Biotechniques**, v. 7, n. 4, p. 360-366, 1989.

LEONG, M. K.; CHEN, T. H. Prediction of cytochrome P450 2B6-substrate interactions using pharmacophore ensemble/support vector machine (PhE/SVM) approach. **Med. Chem.**, v. 4, n. 4, p. 396-406, 2008.

LEOMIL, L. et al. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 97, p. 103-109, 2003.

LEVINE, M. M. et al. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heatlabile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v. 27, n. 1, p. 1119-1122, 1978.

LEVINE, M. M. et al. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **J. Infect. Dis.**, v. 152, p. 550-559, 1985.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v. 155, p. 377-389, 1987.

LEWIN, B. **Genes V.** 5th ed. Oxford: Oxford University Press and Cell Press, 1994. 1272 p.

LEWIN B. **Genes VI.** 6th ed. Oxford. Oxford University Press and Cell Press, 1997. 1260 p.

LORIMER, I. A. Imunotoxinas recombinantes específicas para um receptor do factor de crescimento epidérmico: mutante alvo com um único domínio variável de cadeia de anticorpo isolado por exibição por fagos. **Proc. Natl. Acad. Sci. EUA**, v. 93, n. 25, p. 14815-14820, 1996.

LUO, Y. et al. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v. 405, n. 6790, p. 1073-1077, 2000.

MA, Y. et al. Engineering an anti-Stx2 antibody to control severe infections of EHEC O157:H7. **Immunol. Lett.**, v. 121, p. 110-115, 2008.

MAHGOUB, I. O. Expression and characterization of a functional single-chain variable fragment (scFv) protein recognizing MCF7 breast cancer cells in *E. coli* cytoplasm. **Biochem. Genet.**, v. 50, p. 625-641, 2012.

MAK, T. W.; SAUDERS, M. E. **Primer to the immune response.** China: Elsevier, 2008.

MAKINO, T.; SKRETAS, G.; GEORGIOU, G. Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. **Microb. Cell. Fact.**, v. 14, p. 10-32, 2011.

MALMBORG, A. C.; BORREBAECK, C. A. BIAcore as a tool in antibody engineering. **J. Immunol. Methods.**, v. 183, p. 7-13, 1995.

MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Anticorpos humanizados. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 38-43, 2000.

MARANHÃO, A. Q.; BRÍGIDO, M. M. Anticorpos humanizados – humanização de anticorpos de interesse clínico. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento**, v. 23, p. 38-43, 2001.

MARKS, J. D. et al. By-passing immunization. Human antibodies from v-gene libraries displayed on phage. **J. Mol. Biol.**, v. 222, p. 581-597, 1991.

MARKS, J. D. et al. Molecular evolution of proteins on filamentous pahge. Mimicking the strategy of the immune system. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 16007-16010, 1992.

McCAFFERTY, J. et al. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. **Nature**, v. 348, p. 552-554, 1990.

McDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **PNAS**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.

MELLIES, J. L. et al. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Molec. Microbiol.**, v. 32, p. 296-306, 1999.

MENDES-LEDESMA, M. R. et al. Production and characterization of rabbit polyclonal sera against Shiga toxins Stx1 and Stx2 for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli.* **Microbiol. Immunol.**, v. 52, p. 484-491, 2008.

MENEZES, C. A. **Anticorpos monoclonais para detecção de amostras de *Escherichia coli* produtoras de ST–I e LT–I.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MENEZES, C. A. et al. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 11-13, 2003.

MENEZES, C. A. et al. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli.* **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 101, p. 875-880, 2006.

MENEZES, M. A. et al. Identification of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin. **J. Appl. Microbiol.**, v. 108, n. 3, p. 878-887, 2010.

MENEZES, M. A. et al. Cloning approach and functional analysis of anti-intimin single-chain variable fragment (scFv). **BMC Research Notes.**, v. 4, n. 30, p. 1-9, 2011.

MILENIC, D. E. et al. Construction, binding properties, metabolism, and tumor targeting of a single-chain Fv derived from the pancarcinoma monoclonal antibody CC49. **Cancer Res.**, v. 51, p. 6363-6371, 1991.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J Mol Biol.**, v. 3, p. 289-298, 1996.

MOON, H. W. et al. *Attaching* and *effacing* activities of rabbit and human nteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340-1351, 1983.

MORENO, A. C. et al. Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.,** v. 66, n. 1, p. 50-57, 2010.

MOYES, A. et al. A avaliação preliminar de "Chlamydia Clearview" para a detecção rápida de antígeno por clamídia em secreções cervicais. **Genitourin Med.**, v. 67, n. 2, p. 120-123, 2009.

MÜLLER, P. J.; IVANOVA, I. I.; BERGTER, F. Bistability in the activity of glutamine synthetase in ammonium-limiting chemostat cultures of Escherichia coli ML 30. **Z. Allg. Mikrobiol.**, v. 17, n 3, p. 221-5, 2006.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Janeway's Immunobiology**. EUA, Garland Science, v. 7, p 887, 2008.

NARA, J. M. et al. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of *bundle-forming pilus* expression. **J. of App. Microbiol.**, v. 109, p. 35-43, 2010.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 142-201, 1998.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 6, n. 9, p. 829-831, 1987.

NETER, E. et al. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v. 16, n. 6, p. 801-808, 1955.

NGUYEN, R. N. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12, n. 4, p. 597-603, 2006.

NOVAGEN. **pET system manual**. 10th ed. 2003.

NUNES, M. R. Attaching and effacing *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *E. coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 106, n. 1, p. 43-47, 2012.

OCHOA, T. J. et al. New insights into the epidemiology of *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, p. 852-856, 2008.

OGURA, Y. et al. TccP2 of O157:H7 and Non-O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): Challenging the Dogma of EHEC-Induced Actin Polymerization. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 2, p. 604–612, 2007.

OLIVEIRA, T. C. R.; LATORRE, M. R. D. O. Tendências da internação e da mortalidade infantil por diarreia: Brasil, 1995 a 2005. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, p. 102-111, 2010.

ORLANDI, P. P. et al. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 4, p. 507-517, 2006.

OZAKI, C. Y. **Clonagem e expressão de um fragmento variável em cadeia única contra a toxina termo-lábil de *Escherichia coli* enterotoxigênica.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

OSWALD, E. et al. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 1, p. 64-71, 2000.

OSEK, J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. **J. Appl. Microbiol.***,* v. 95, p. 1217-1225, 2003.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing E*scherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev**., v. 11, p. 450-479, 1998.

PATON, J. C.; PATON, A. W. Direct detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex pcr for stx1, stx2, eae, ehxa, and saa. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 271-274, 2002.

PASS, M. A.; ODEDRA, R.; BATT, R. M. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2001-2004, 2000.

PERSSON, S. et al. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, p. 516-524, 2007.

PORTES JUNIOR, J. A. **Detecção da proteína plp2 em glioblastomas.** 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

QADRI, F. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 465-483, 2005.

RAJAWAT, R. et al. A single-chain antibody fragment against human thyroglobulin: construction and evaluation of immunoreactivity. **Hybridoma**, v. 30, n. 3, p. 253-259, 2011.

RAMACHANDRAN, V. et al. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5022-5032, 2003.

RAMOS, C. R. et al. A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, p. 1103-1109, 2004.

RAPPELLI, P. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the simultaneous identification of enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohemorrhagic and enteroinvasive *Escherichia coli.* **New Microbiol.**, v. 24, p. 77-83, 2001.

REGUA-MANGIA, A. H. et al. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Infect.**, v. 48, n. 2, p. 161-167, 2004.

REID, S. D.; BETTING, D. J.; WHITTAM, T. S. Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2719-2722, 1999.

RENDÓN, M. et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. **PNAS**, v. 104, n. 25, p. 10637-10642, 2007.

RICH, C. et al. Identification of human enterovirulent *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. **J. Clin. Lab. Anal.**,v. 15, p. 100-103, 2001.

RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.,** v. 308, p. 681-685, 1983.

RODRIGUES, M. L. et al. Engineering a humanized bispecific F(ab')2 fragment for improved binding to T cells. **Int. J. Cancer Suppl.**, v. 7, p. 45-50, 1992.

ROCHA, L. B. et al. Interaction between Shiga toxin and monoclonal antibodies: binding characteristics and in vitro neutralizing abilities. **Toxins**, v. 4, n. 9, p. 729-747, 2012.

ROITT, I. M. **Imunologia.** 4. Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987. 299 p.

ROITT, I. M.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology.** 6th ed. Londres: Mosby, 2001. 480 p.

ROSA, A. C. et al. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 781–790, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning:** a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHEZ-SANMARTIN, C. et al. Transcriptional Regulation of the *orf19* Gene and the *tir-cesT-eae* Operon of Enteropathogenic *Escherichia coli.* **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 9, p. 2823–2833, 2001.

SCALETSKY, I. C. A. et al. A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, n. 7, p. 3410-3415, 1999.

SEARS, H. J.; BROWNLEE, I.; UCHIYAMA, J. K. Persistence of individual strains of Escherichia coli in the intestinal tract of man. **J. Bacteriol.,** v. 59, n. 2, p. 293-301, 1950.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiol. Rev.**, v. 60, n. 1, p. 167-215, 1996.

SCHAER, R. et al. **Imunofluorescência.** Trabalho realizado no laboratório de imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, 2010.

SMITH, H. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 45–49, 1996.

STRYER, L. **Biochemistry.** New York. W. H. Vfreeman and company, 1988. 881 p.

SVENNERHOLM, A. M. et al. Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* heat-stabile toxin (STa) and their use in a diagnostic ST ganglioside GM1-Enzime-linked immunosorbent assay. **J.Clin. Microbiol.**, v. 2, p. 585-590, 1986.

TABNET.DATASUS. Disponível em: <http://www.tabnet.datasus.gov.br>. Acesso em: 27 nov. 2012.

TIMM, C. D. et al. Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 419-425, 2007.

TOLEDO, M. R. F. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infection and Immunity**, v. 39, p. 586-589, 1983.

TORRES, A. G.; ZHOU, X.; KAPER J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. **Infect Immun.**, v. 73, p. 18–29, 2005.

TRABULSI, L. R. et al. Infantile diarrhea caused by enteropathogenic colibacilli: preliminary studies on the occurrence of certain groups and serological types in Sao Paulo. **Inst. Méd. Trop.**, v. 3, p. 267-270, 1961.

TRABULSI, L. R. et al. **Epidemiology of infantile bacterial diarrheal disease in Brazil**. Scientific Publishers, 1985.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infec. Dis.**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTETHUM, F. **Microbiologia** 4. ed. rev. atual. São Paulo: Atheneu, 2005.

TURNER, S. M. et al. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenis *Escherichia coli.* **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 263, p. 10-20, 1997.

UMETSU, M. et al. How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single chain fv fragment. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 11, p. 8979-8987, 2003.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND (UNICEF). **Pneumonia and diarrhoea:** tackling the deadliest diseases for the world's poorest children. New York: UNICEF, 2012. 77 p. Disponivel em: <http://www.unicef.org/media/files/unicef_p_d_complete_0604.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2012.

VALLANCE, B. A.; FINLAY, B. B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 8799-8806, 2000.

VAZ, N. M.; FARIA, A. M. C. Decrease in susceptibility to oral tolerance induction and occurrence of oral immunization to ovalbumin in 20-38-week-old mice. The effect of interval between oral exposures and rate of antigen intake in the oral immunization. **Immunology**, v. 78, p. 147-151, 1993.

VAZ, T. M. et al. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 903-905, 2004.

VERMA, R.; BOLETI, E.; GEORGE, E. J. Antibody engeneering: comparision of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. **J. Immunol. Methods**, v. 216, n. 1-2, p. 165-181, 1998.

VILHENA-COSTA, A. B. et al. Slot blot immunoassay as a tool for plasmid-encoded toxin detection in enteroaggregative *Escherichia coli* culture supernatants. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 55, n. 2, p. 101-106, 2006.

ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. **Can. J. Microbiol**., v. 38, n. 7, p. 699-704, 1992.

WEISSER, N. E.; HALL, J. C. Aplications of single-chain variable fragment antibody in therapeutics and diagnostic. **Biotchnol. Adv.**, v. 27, p. 502-520, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Manual for laboratory investigations of acute enteric infections.** 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); THE UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND UNICEF). **Diarrhoea:** why children are still dying and what can be done. 2009.

WORLD HEALTH STATISTICS (WHS). New York: WHO Press, 2011. p. 75. Disponível em: <http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2011_Full.pdf> . Acesso em: 02 dez. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Children: reducing mortality. **Fact Sheet**, n. 178, Jun. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/index.html>. Acesso em 05 dez. 2012.

ZAHA, A. et al. **Biologia molecular básica.** Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 336 p.

ZHANG, W. L. et al. Genetic diversity of intimim genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, n. 12, p. 4486-4492, 2002.

ZUO, X. et al. Enhanced expression and purification of membrane proteins by SUMO fusion in *Escherichia coli.* **J. Struct. Funct. Genomics**, v. 6, p. 103-111, 2005.