LETÍCIA BARBOZA ROCHA

**ANTICORPOS ANTI-STX COMO FERRAMENTAS NA DETECÇÃO
DE *Escherichia coli* PRODUTORA DA TOXINA DE SHIGA (STEC)**

Anticorpos anti-Stx como ferramentas na detecção de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC)

LETÍCIA BARBOZA ROCHA

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

São Paulo
2008

Anticorpos anti-Stx como ferramentas na detecção de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC)

LETÍCIA BARBOZA ROCHA

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

Orientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Rocha, Letícia Barboza.

Anticorpos anti-Stx como ferramentas na detecção de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) / Letícia Barboza Rocha. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Roxane Maria Fontes Piazza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Imunodiagnóstico de *Escherichia coli* diarréiogênicas.

Versão do título para o inglês: Antibodies anti-Stx as tools on detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC).

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. Bacteriologia aplicada 3. Citotoxinas 4. Anticorpos monoclonais 5. Diagnóstico 6. ELISA I. Piazza, Roxane Maria Fontes II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB048/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Letícia Barboza Rocha.

Título da Dissertação: Anticorpos anti-Stx como ferramentas na detecção de
Escherichia coli produtora da toxina de Shiga (STEC).

Orientador(a): Roxane Maria Fontes Piazza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **() Aprovado(a)**

☐ **() Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 305/06, sobre o projeto intitulado "Anticorpos monoclonais contra Stx1 e Stx2: caracterização e padronização de ensaio de captura para detecção das toxinas de Shiga", sob a responsabilidade de Roxane Maria Fontes Piazza está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 09/05/2006.

São Paulo, 09 de maio de 2006.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho às pessoas que mais amo:
ao meu querido esposo Alexandre que me
acompanha desde o início da minha formação,
por seu amor, paciência e força;
à minha mãe, uma mulher forte e dedicada,
pelos ensinamentos, amor e zelo;
ao meu pai, uma pessoa singular e prestativa,
por sua dedicação, educação e incentivo;
ao meu avô, pelo exemplo de vida;
e aos meus irmãos Fabiane, Leonardo, Fernando
e Suélen, pela amizade, apoio e torcida.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida.

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza pela dedicação, disposição, ensinamentos e amizade.

À Dra. Denise pela assistência na revisão final do trabalho.

Ao Dr. Waldir Elias Pereira Júnior pelos conselhos científicos.

À Dra. Márcia Franzolin pela disposição em ajudar e Dra. Marta Domingos pelas dicas metodológicas.

À Dra. Beatriz Guth pelo fornecimento dos isolados de STEC.

À Dra. Irene Fernandes pelos ensinamentos sobre anticorpos monoclonais.

Aos meus amigos de bancada: Júlia, Márcio, Christiane, Keyde, Vanessa, Sarita, Fernanda, Caroline, Carol, Sílvio e Meire que tanto me ajudaram nos experimentos.

Aos colegas Renato, Sérgio e Andreza, pelas discussões dos trabalhos das disciplinas.

A todos os amigos do Laboratório de bacteriologia: alunos, pesquisadores e demais funcionários pela amizade e consideração.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Agradeço de coração.

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência”.

Augusto Cury

RESUMO

ROCHA, L. B. **Anticorpos anti-Stx como ferramentas na detecção de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC)**. 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2008.

Infecções causadas por STEC constituem problema de saúde pública, pois estão associadas à síndrome hemolítica urêmica e colite hemorrágica. A detecção de isolados STEC depende de um ensaio diagnóstico sensível, específico e de baixo custo. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de um ELISA de captura utilizando anticorpos policlonais e monoclonais. Primeiramente definiu-se um meio de cultivo para maior expressão de Stx e produziu-se anticorpos monoclonais anti-Stx1 e anti-Stx2. Os resultados mostraram que o cultivo de isolados por 4h em caldo EC com ciprofloxacina induziu maior produção de Stx no sobrenadante bacteriano, e o anticorpo monoclonal anti-Stx1 produzido reconheceu a subunidade A de ambas as toxinas, além de apresentar maior constante de afinidade que o anti-Stx2. Desta forma, o ELISA de captura foi padronizado com 250 µg/ml da fração IgG do soro policlonal anti-Stx1 e anti-Stx2 na sensibilização e 2,5 µg/ml de anticorpo monoclonal anti-Stx1 na captura da toxina, apresentando 80,7% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Palavras-chave: STEC. Toxina de Shiga. ELISA de captura. Caldo EC.

ABSTRACT

ROCHA, L. B. **Antibodies anti-Stx as tools on detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)**. 2008. 90 f. Master thesis (Biotechnology) Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2008.

STEC infection is a public health problem, causing hemolytic-uremic syndrome and haemorrhagic colitis. The detection of STEC isolates depends on a sensitive, specific and low cost diagnostic method. Thus, the aim of this study was to develop a capture ELISA using polyclonal and monoclonal antibodies. For this purpose, first of all a growth media that induce better expression and production of Stx was defined and monoclonals anti-Stx1 e anti-Stx2 antibodies were produced. The results show that the growth of the isolates for 4hs in EC broth with ciprofloxacin increased the production of Stx in the bacterial supernatant, and the monoclonal anti-Stx1 antibody produced was able to recognize the A subunit of both toxins, besides showing higher affinity constant than anti-Stx2. Thus, the capture ELISA was standardized using 250 µg/ml of the IgG enriched fraction of rabbit anti-Stx1 sera and anti-Stx2 for coating and 2.5 µg/ml of monoclonal anti-Stx1 antibody for the capture of the toxin, showing 80.7% of sensibility and e 100% de specificity.

Key words: STEC. Shiga toxin. capture ELISA. EC broth.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Curva de crescimento dos isolados de *E.coli* 597 (Stx1) (A) e 53B (Stx2) (B) em diferentes meios de cultura. Os meios de cultivo foram BHI (—), EC (—), Evans (—), LB (—), Penassay (—), BPW (—), Syncase (—) e TSB (—).....44

Figura 2 - Crescimento e expressão do isolado 597 (Stx1) em diferentes meios de cultura. O crescimento foi determinado por DO a 588 nm (—). A expressão de Stx1 no sobrenadante (-----) e no sedimento tratado com polimixina (....) foi determinada por ELISA a 492 nm.....46

Figura 3 - Crescimento e expressão do isolado 53B (Stx2) em diferentes meios de cultura. O crescimento foi determinado por DO a 588 nm (—). A expressão de Stx2 no sobrenadante (-----) e no sedimento tratado com polimixina (....) foi determinada por ELISA a 492 nm.....48

Figura 4 – Ensaio de *immuno-dot* do isolado 597 (Stx1) (A) e 53B (Stx2) (B) em diferentes tempos e meios. 100 µl de sobrenadante bacteriano foram aplicados em membrana de nitrocelulose, incubados com soro de coelho anti-Stx1 (A) ou anti-Stx2 (B) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase. Como solução cromógena foi utilizada DAB com adição de H₂O₂.....49

Figura 5 – Crescimento e expressão dos isolados 597(Stx1) (A e B) e 53B (Stx2) (C e D) em presença (A e C) ou ausência (B e D) de ciprofloxacina. O crescimento foi determinado por leitura da DO a 588 nm (—), expressão de Stx no sobrenadante (-----) e sedimento tratado com polimixina (....) foi medida por ELISA a 492 nm.....51

Figura 6 – Gráfico de dispersão representando a expressão de Stx em 19 isolados STEC cultivados em meio EC na presença e ausência de ciprofloxacina ou novobiocina. A expressão de Stx foi mensurada a 492 nm em meio EC com ciprofloxacina nas frações de (■) sedimento tratado com polimixina e (□) sobrenadante ou em meio EC com novobiocina nas frações de (●) sedimento tratado com polimixina e (○) sobrenadante ou em meio EC sem antibiótico nas frações de (▲) sedimento tratado com polimixina e (△) sobrenadante.....52

Figura 7 – Titulação dos soros de camundongos imunizados com os toxóides Stx1 (A) e Stx2 (B). Placas de ELISA sensibilizadas com 1 µg/ml das toxinas Stx1 e Stx2 e incubadas com os soros pré-ímmunes (azul), e após imunização (vermelho) em diferentes diluições, seguido de incubação com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:10.000). Como solução cromógena foi utilizada OPD com adição de peróxido de hidrogênio e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems)53

Figura 8 – Gel de poliácridamida a 12%. IgG anti-Stx1 (A e B) e anti-Stx2 (C e D) purificadas em coluna de proteína A-Sepharose foram submetidas a eletroforese em

condições não-redutoras (A e C) e redutoras (B e D) e visualizadas por coloração com Coomassie blue.....56

Figura 9 – Curvas de titulação de Stx1 (A) e Stx2 (B) de 50 µg/ml a 5,4 pg/ml. O ensaio foi realizado utilizando soro policlonal de coelho diluído 1:50 seguido de incubação com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:10.000). Como solução cromógena foi utilizada OPD (Sigma) com adição de H₂O₂ e a leitura realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).....57

Figura 10 – Ensaio de ELISA de afinidade dos hibridomas anti-Stx1 ou anti-Stx2. Em A e C foram definidas as concentrações de anticorpo anti-Stx1 e anti-Stx2, respectivamente; em B e D foram definidas as concentrações de Stx1 e Stx2, respectivamente. Placas de ELISA sensibilizadas com 1 µg/ml da toxina Stx1 (A e B) ou Stx2 (C e D) incubadas com diferentes concentrações de IgG dos hibridomas anti-Stx1 (A) ou anti-Stx2 (C), e IgG anti-Stx1 com Stx1 (B) ou anti-Stx2 com Stx2 (D) correspondentes a etapa 2, seguidas da incubação com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:10.000). Como solução cromógena foi utilizada OPD (Sigma) com adição de H₂O₂ e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).....58

Figura 11 – Membranas de nitrocelulose contendo frações protéicas das toxinas Stx1 (B e D) e Stx2 (A e C) incubadas com a fração IgG dos hibridomas anti-Stx1 (A e B) ou anti-Stx2 (C e D) seguido da incubação com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:2.000). Como solução reveladora foi utilizado DAB (Sigma) com adição de H₂O₂..... 59

Figura 12 – Dados resultantes do ELISA de Captura. Placa de ELISA sensibilizada com a fração IgG dos soros policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2 (250 µg/ml) e incubados com o sobrenadante do isolado bacteriano produtor (vermelho) e isolado não produtores (azul) da toxina de Shiga, capturados com anticorpo monoclonal anti-Stx1 (2,5 µg/ml) e incubados com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (A) 1:5.000 e (B) 1:10.000. Como solução cromógena foi utilizado OPD (Sigma) e H₂O₂ e leitura realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems). As barras representam o erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em duplicatas.....62

Figura 13 – Dados resultantes do ELISA de Captura. Placa de ELISA sensibilizada com a fração IgG dos soros policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2 (250 µg/ml) e incubada com o sobrenadante do isolado bacteriano produtor (vermelho) e isolado não produtor (azul) da toxina de Shiga nas condições de fresco e congelado. As toxinas foram capturadas com anticorpo monoclonal anti-Stx1 (2,5 µg/ml) e incubadas com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:5.000). Como solução cromógena foi utilizado OPD (Sigma) e H₂O₂ e leitura realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems). As barras representam o erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em duplicatas.....62

Figura 14 – Resultado em porcentagem do ELISA de captura dos isolados produtores de Stx. Em azul, os isolados de STEC produtores de Stx que foram positivos por ELISA e em amarelo, os isolados produtores de Stx que não foram positivos para o ensaio de ELISA.....63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos isolados STEC positivos por PCR.....	30
Tabela 2 – Composição dos diferentes meios de cultura utilizados.....	31
Tabela 3 – Reatividade cruzada obtida por ELISA dos anticorpos anti-Stx	60
Tabela 4 – Resultado do ELISA em diferentes microplacas.....	61
Tabela 5 – Comparação do ELISA de captura e ensaio de citotoxicidade em célula Vero.....	64

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

A/E – *Attaching and effacement*
BPW – *Buffer-peptone water*
BSA – *Bovine Serum Albumin*
CH – Colite hemorrágica
BHI – *Brain Heart Infusion*
DAB – Diaminobenzidina
DAEC – *Escherichia coli* difusamente aderente
DMSO – Dimetil sulfóxido
DO – Densidade ótica
EAEC – *Escherichia coli* enteroagregativa
EC – *E. coli* Broth
Efa1 – *Enterohemorrhagic Escherichia coli* factor for adherence
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
Ehly – *Enterohemolysin*
EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasora
ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica
Esp – *Encoded Secreted Protein*
ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica
HAT – Hipoxantina aminopterina e timidina
Ig – Imunoglobulina
Iha – *IrgA* homologue adhesin
IrgA – *Iron-regulated gene A*
LB – Luria-Bertani
LPF – *Long Polar Fimbriae*
LEE – *Locus of enterocyte effacement*
OPD – σ -fenilenodiamino
PEG – Polietilenoglicol
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PBST – *Phosphate Buffered Saline and Tween 20*
PCR – *Polymerase Chain Reaction*

Saa – *STEC autoagglutinating adhesin*

SDS-PAGE – *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

Sfp – *Sorbitol-fermenting plasmid*

SHU – Síndrome hemolítica urêmica

STEC – *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga

Stx1 – Toxina de Shiga 1

Stx2 – Toxina de Shiga 2

TBS – Tampão borato salina

Tir – *Translocade Intimin receptor*

ToxB – *Toxin B*

TSB – *Trypticase Soy Broth*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	18
1.1 <i>Escherichia coli</i> produtora da toxina de Shiga (STEC)	19
1.1.1 Histórico	19
1.1.2 Fatores de virulência	20
1.1.3 Epidemiologia	22
1.1.4 Diagnóstico	24
1.1.4.1 Níveis de expressão das toxinas de Shiga	24
1.1.4.2 Testes diagnósticos	24
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Isolados bacterianos	29
3.2 Condições de cultivo bacteriano dos isolados STEC	29
3.2.1 Cultivo bacteriano	31
3.2.2 Ensaio de avaliação da expressão das toxinas de Shiga.....	32
3.3 Imunização de camundongos	33
3.3.1 Obtenção dos toxóides	33
3.3.2 Imunização	33
3.4 Obtenção dos hibridomas	34
3.4.1 Cultivo de células mielomatosas	34
3.4.2 Preparo de células peritoneais	34
3.4.3 Fusão e seleção dos hibridomas	35
3.5 Sub-clonagem e classificação dos hibridomas anti-Stx1 e anti-Stx2	36
3.6 Congelamento dos hibridomas	37
3.7 Técnicas para purificação dos anticorpos	37
3.7.1 Precipitação da fração IgG do soro policlonal	37
3.7.2 Purificação dos anticorpos monoclonais em coluna de afinidade	38
3.8 Caracterização dos anticorpos	38
3.8.1 Caracterização dos anticorpos policlonais	38
3.8.2 Caracterização dos anticorpos monoclonais	39

3.8.2.1 Cálculo da constante de afinidade	39
3.8.2.2 <i>Immunoblotting</i>	39
3.9 ELISA de captura	40
3.9.1 Padronização	40
3.9.1.1 Concentrações e combinações da fração enriquecida em IgG e soro policlonal anti-Stx	40
3.9.1.2 Concentrações e combinações de anticorpos monoclonais anti-Stx	40
3.9.1.3 Diluições do soro anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase	41
3.9.1.4 Diferentes microplacas de ELISA	41
3.9.1.5 Sobrenadantes bacterianos	41
3.9.2 Desenvolvimento do ensaio	41
Validação do ensaio	42
3.10.1 Cálculos de sensibilidade, especificidade e eficiência	42
3.10.2 Análise estatística	43
3.11 Ensaio padrão de citotoxicidade em células Vero	43
 4 RESULTADOS	 44
4.1 Definição do meio de cultivo em relação a curva de crescimento e expressão das toxinas de Shiga	44
4.1.1 Crescimento bacteriano e meio de cultura	44
4.1.2 Produção das toxinas de Shiga	44
4.2 Resposta imune de camundongos	52
4.3 Hibridomas	53
4.4 Sub-clonagem e classificação dos hibridomas anti-Stx1 e anti-Stx2	54
4.4.1 Hibridomas anti-Stx1	54
4.4.2 Hibridomas anti-Stx2	55
4.5 Purificação dos anticorpos	55
4.5.1 Obtenção da fração IgG do soro policlonal	55
4.5.2 Obtenção dos anticorpos monoclonais.....	55
4.6 Caracterização dos anticorpos	56
4.6.1 Anticorpos policlonais	56
4.6.2 Anticorpos monoclonais	57
4.6.2.1 Constante de afinidade	57
4.6.2.2 Reatividade por <i>Immunoblotting</i>	58

4.7 Padronização de testes para o diagnóstico	59
4.7.1 Definição da concentração anticorpo policlonal x anticorpo monoclonal.....	59
4.7.2 Definição do tipo de microplaca	61
4.8 Aplicação do ELISA de captura em isolados bacterianos e comparação com o ensaio padrão para definição de STEC	63
 5 DISCUSSÃO	 65
 6 CONCLUSÕES	 73
 REFERÊNCIAS	 74
 ANEXO	 83

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A doença diarréica é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial. Nas últimas décadas, mesmo com redução na incidência, a diarréia ainda é apontada como significativa causa de morbidade e mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento onde as condições sanitárias são insuficientes (O' RYAN et al., 2005). Na década de 90, aproximadamente 1,4 bilhões de episódios de diarréia ocorreram por ano em crianças abaixo de cinco anos, das quais, 123,6 milhões necessitaram de cuidados médicos ambulatoriais e 9 milhões necessitaram hospitalização. Anualmente, neste mesmo grupo etário, aproximadamente de 2 a 2,5 milhões de mortes associadas à diarréia são estimadas, concentradas na maioria (85%) em áreas empobrecidas do mundo (O' RYAN et al., 2005).

Tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, como o Brasil, a importância da diarréia está relacionada aos impactos gerados pelos danos à saúde. Estes danos afetam o desenvolvimento infantil, bem como à sociedade, pelos custos diretos e indiretos que acarretam, como por exemplo: a demanda aos serviços médicos, atendimento ambulatorial, pronto atendimento, hospitalizações, perdas de dias de trabalhos e de escola, gastos com medicamentos, transportes, etc. (INFORMES TÉCNICOS INSTITUCIONAIS, 2004). Para se ter uma idéia, no Brasil, em um período de janeiro a outubro de 1996 foram registrados na rede de instituições vinculadas ao sistema público de saúde 160.091 hospitalizações por diarréia, ao custo aproximado de 20 milhões de dólares, que corresponde a cerca de 11,5% dos gastos hospitalares realizados no período em atendimentos a crianças abaixo de 1 ano de idade (OPAS, 1998). No Estado de São Paulo, cerca de 2 milhões de casos de diarréia ocorrem por ano e destes, estima-se que mais de 600 mil casos de diarréia são atendidos nos serviços de saúde (CVE, 2000).

Dentre os patógenos causadores de diarréia, o Rotavírus é responsável por 25 a 75% das gastroenterites, atingindo principalmente crianças abaixo de 2 anos de idade. Em segundo lugar as *Escherichia coli* (*E. coli*) diarreiogênicas são responsáveis por 30 a 40% dos episódios de diarréia aguda nos países em desenvolvimento, atingindo principalmente crianças abaixo de 5 anos e idosos (O' RYAN et al., 2005).

Embora *E. coli* seja a bactéria anaeróbia facultativa predominante na mucosa intestinal dos mamíferos, vivendo em simbiose com o hospedeiro, vários isolados ao adquirirem fatores de virulência específicos tornam-se potencialmente danosos (NATARO; KAPER, 1998). Os isolados de *Escherichia coli* diarreiogênica são usualmente classificados em seis diferentes categorias de acordo com mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorotipos O:H, os aspectos epidemiológicos e os tipos de interação com linhagens celulares *in vitro*. São elas: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998). Embora essa classificação continue sendo usada pela maioria dos autores, já se torna evidente que algumas categorias incluem patótipos bastante diferentes. Desta forma, as EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as EHEC passaram a constituir uma subcategoria de *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) (KAPER et al., 2004).

Dentre essas seis categorias, STEC está relacionada a um largo espectro de doenças humanas, desde diarreias leves até doenças severas como colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU), causadas pelas potentes toxinas de Shiga. Desta forma, torna-se necessário o estudo dos seus mecanismos de patogenicidade, assim como sua detecção, tratamento e prevenção.

1.1 *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC)

1.1.1 Histórico

A primeira descrição de STEC ocorreu em 1977, quando alguns isolados de *E. coli* pertencentes aos sorogrupos O18, O26, O111, O126 e O128 causaram efeito citotóxico em células Vero (célula epitelial renal de macaco verde africano), surgindo então o termo verotoxina ou verocitotoxina (KONOWALCHUK et al., 1977). Em 1982, O'Brien et al. descreveram que certas cepas de EPEC produziam uma citotoxina letal para células HeLa (linhagem contínua de células derivadas de carcinoma cervical humano). Esta toxina comportava-se como a toxina de Shiga produzida por *Shigella dysenteriae*, ou seja, inibia a síntese protéica em células

HeLa, era enterotóxica para intestino de coelhos e letal para camundongos; por esta razão, foi chamada de toxina do tipo Shiga. Posteriormente estes isolados bacterianos foram chamados de *E. coli* verocitotoxigênica (VTEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) devido ao alto grau de homologia estrutural e funcional da toxina de Shiga produzida por *Shigella dysenteriae* tipo I (CALDERWOOD et al., 1996).

Na década de 1980 aconteceu o primeiro isolamento em um surto de diarreia sanguinolenta, o qual foi associado à ingestão de carne de hambúrguer contaminada e mal-cozida. Este isolado foi caracterizado como *E. coli* O157:H7 devido aos seus antígenos somático e flagelar (RILEY et al., 1983), sendo reconhecido como patógeno humano que causava desde diarreias leves até doenças severas como a CH e SHU (O'BRIEN et al., 1983).

Devido a associação de O157:H7 com CH, as cepas pertencentes a este sorotipo foram denominadas *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). Atualmente, o termo STEC é utilizado para caracterizar cepas de *E. coli* produtoras de Stx, enquanto EHEC caracteriza cepas de *E. coli* que produzem Stx e também induzem uma lesão histopatológica (*attaching and effacing*, A/E), semelhante a produzida por EPEC (MAINIL; DAUBE, 2005).

1.1.2 Fatores de virulência

O principal fator de virulência, o qual define esse patotipo é a toxina de Shiga. A família Stx contém dois principais grupos: Stx1 e Stx2. Além destas toxinas, existem variantes sendo que, um isolado de STEC pode produzir somente Stx1 ou somente Stx2 ou ambas toxinas ou ainda múltiplas formas de Stx1 e Stx2 (SCHEUTZ et al, 2001).

Stx1 e Stx2 são produtos dos genes *stx1* e *stx2* (O'BRIEN et al., 1989; SCHMIDT et al., 1999; WELINDER-OLSSON et al., 2002) codificados por bacteriófagos lisogênicos. Pertencem ao grupo das toxinas do tipo A:B, apresentando uma subunidade A com 35 kDa e 5 subunidades B com 7,5 kDa. A subunidade A é composta por um peptídeo de 27,5 kDa (A₁) que possui atividade enzimática e um peptídeo de 7,5 kDa (A₂) que liga a subunidade A à subunidade B. A subunidade B é responsável pela ligação da toxina ao receptor

globotriasilceramida (Gb₃) presente na superfície de células eucarióticas (NATARO; KAPER, 1998; GYLES, 2007).

Stx1 é imunologicamente idêntica à toxina de Shiga produzida por *Shigella dysenteriae*. As subunidades A e B das toxinas Stx1 e Stx2 possuem, entre si, 55 e 57% da seqüência genética idêntica, respectivamente (NATARO; KAPER, 1998). Estas toxinas apresentam o seguinte mecanismo de ação: após ligação à célula hospedeira, a toxina é endocitada, encaminhada para o aparato de Golgi e então para o retículo endoplasmático; o peptídeo A₁, que é uma N-glicosidase, remove um resíduo de adenina da porção 28S do ribossomo eucariótico, inibindo a síntese protéica e acarretando a morte celular (JOHNSON et al., 2006).

Além das toxinas de Shiga, existem outros fatores capazes de aumentar ou colaborar na patogenicidade de STEC. A adesina intimina, produto do gene *eae*, presente em EPEC e EHEC contribui para lesão A/E (*attaching and effacement*). Esta lesão consiste na perda das microvilosidades do enterócito e na adesão íntima da bactéria à superfície das células do epitélio intestinal, levando a um extensivo rearranjo do citoesqueleto na região onde a bactéria adere, formando um pedestal. A capacidade de induzir a lesão A/E é codificada por genes contidos numa ilha de patogenicidade de 35 kb conhecida como região LEE (*Locus of enterocyte effacement*) (JERSE; KAPER, 1991). Funcionalmente, LEE é dividida em cinco regiões: nas três primeiras regiões denominadas LEE1, LEE2 e LEE3 encontram-se os genes que codificam o sistema de secreção do tipo III (JARVIS et al., 1995), na região LEE4 encontram-se os genes das proteínas Esps, na região LEE5, os genes da intimina e Tir, que é a proteína receptora de intimina (JERSE; KAPER, 1991).

Existe uma associação entre a presença do gene *eae* e a doença severa, no entanto, as lesões associadas à CH e SHU são causadas pela ação das toxinas de Shiga nas células endoteliais (O'BRIEN; HOLMES, 1987). Stx2 tem maior participação na patogênese de SHU e são mais tóxicas para célula eucariótica do que Stx1 (NATARO; KAPER, 1998).

Outras adesinas codificadas fora da região LEE têm sido descritas como possíveis fatores de virulência. Dentre elas destacamos: ToxB, uma proteína necessária para expressão da cepa Sakai do sorotipo O157:H7 (TATSUNO et al., 2001), Saa, uma adesina autoaglutinante identificada em sorotipos *eae* negativos (PATON et al., 2001) e Sfp, uma fímbria presente em isolados de EHEC fermentadores de sorbitol do sorogrupo O157 (BRUNDER et al., 2001); estas

adesinas são codificadas por genes plasmidiais. Diferentemente, Iha, uma proteína similar a IrgA responsável pela aderência de *V. cholerae* (SCHMIDT et al., 2001), Efa1, fator de aderência de EHEC (NICHOLLS et al., 2000) e LPF, uma longa fímbria polar similar a LPF de *S. enterica* serovar Typhimurium (DOUGHTY et al., 2002; TORRES et al., 2002), podem ser codificadas tanto em um plasmídeo de alto peso molecular nas cepas de STEC ou em um único segmento de DNA da *E. coli* EDL933 chamado de ilhas O (OIs) (PATON et al., 2001).

Além destes fatores de virulência, existe certa associação entre a presença de Stx e de hemolisina nos isolados de STEC (BEUTIN et al., 1989). A enterohemolisina A (Ehly) é codificada pelo gene *ehxA* localizado em um plasmídeo de 90 kb. Também EsP, uma serino protease codificada no plasmídeo de virulência pO157 e alguns mediadores inflamatórios como interleucina 1 β e TNF α , produzidos pelo hospedeiro, provavelmente participam na patogênese das diversas síndromes clínicas que estes patógenos causam (PATON; PATON, 1998).

1.1.3 Epidemiologia

E. coli O157:H7 é o sorotipo mais estudado entre as STEC, considerada a mais virulenta e freqüente (RILEY et al., 1983). Embora muita ênfase tenha sido dada à O157:H7, o grupo das STEC compreende quase 250 sorotipos diferentes e aproximadamente 100 destes, associados à 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 (PATON; PATON, 1998; VAZ et al., 2004; CAPRIOLI et al., 2005).

A infecção por STEC é facilitada pela dose extremamente baixa, de menos que 100 células. Estas infecções têm sido associadas ao consumo de carne, leite e derivados contaminados, pois as STEC são comumente encontradas no intestino de animais reservatório, dentre eles o gado bovino (principal reservatório), e nos ambientes onde são mantidos. Surtos de STEC também foram associados com fontes de água contaminada, consumo de vegetais frescos e produtos vegetais industrialmente processados (CAPRIOLI et al., 2005).

Acredita-se que o grande rebanho bovino e a importação de carnes são fatores que favorecem a disseminação dessas bactérias no Brasil. Estudos

mostraram que a presença de STEC em nosso rebanho variou de 12 a 95%, dependendo da região estudada (CERQUEIRA et al., 1999; LEOMIL et al., 2003; MOREIRA et al., 2003; IRINO et al., 2005; FARAH et al., 2007; TIMM et al., 2007). Aidar-Ugrinovich et al. (2007) determinaram a ocorrência de STEC em 10% de 546 amostras fecais de gado em São Paulo. Embora não detectado o sorotipo O157:H7, outros sorotipos mais freqüentes nas amostras foram: O7:H10, O22:H16, O111:NM, O119:HNM e O174:H21. O gene *eae* foi detectado em 25% das STEC. Estes dados recentes mostram que o gado brasileiro não é somente um reservatório de STEC, mas também uma fonte de infecção em humanos já que alguns sorotipos associados com doenças severas foram isolados de humanos, tais como O111:NM, O113:H21, O118:H16, e O174:H21 (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007). Também um estudo em ovelhas constatou a presença de STEC em 52,1% dos animais analisados (VETTORATO et al., 2003).

STEC constitui-se hoje como um dos principais problemas de saúde pública em vários países, atualmente é uma das maiores causas de diarreias nos Estados Unidos, Canadá, Japão e Europa, e existem vários relatos de casos na América Latina, principalmente Argentina, Uruguai e Chile (KAPER; O'BRIEN, 1998; BEUTIN, 2006).

Irino et al. (2002) e Guth et al. (2002) descreveram diversos casos de infecções por STEC no Brasil, principalmente em crianças. Também, Vaz et al. (2004), realizando um estudo retrospectivo em 2607 amostras isoladas de casos diarreicos entre 1976 e 1999 de crianças menores de cinco anos de idade e pacientes adultos imunocomprometidos, no estado de São Paulo, identificaram 29 STEC (1,1%) sendo que 89,6% apresentaram os genes *stx1* e *eae*. A maior parte das STEC encontradas pertenciam aos sorotipos, O111:NM, O111:H8, O26:H11; mas também foram encontradas STEC pertencentes aos sorotipos O55:H19, O93:H19, O118:H16 e O157:H7. Apenas a amostra O157:H7 apresentava o gene *stx2*. Os genes *stx1* e *stx2* foram observados na amostra O93:H19.

Casos notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) ou rastreados pela Autorização de Internação Hospitalar (AIH) e Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (Fundação SEADE) do Estado de São Paulo no período de 1998 a 2006 apontaram a ocorrência de 87 casos de SHU com 35 óbitos relacionados ou não a alimentos (CVE, 2007). Infelizmente, nesses casos, nem sempre o agente etiológico foi identificado, dificultando um panorama geral

epidemiológico das STEC. Além disso, um dos únicos agentes rastreados é a STEC O157:H7 e como esse sorotipo é pouco encontrado em nosso país, pode haver uma falsa realidade de que a fonte de SHU não seja STEC. Todavia, sabemos que existem outros sorotipos não-O157 associados a SHU que não são identificados nessas ocorrências.

Desta maneira, a capacidade para controlar as doenças causadas pela STEC em humanos, permitir um tratamento apropriado e limitar o número de surtos, depende do rápido diagnóstico e identificação da fonte de infecção.

1.1.4 Diagnóstico

1.1.4.1 Níveis de expressão das toxinas de Shiga

Em geral, existe um senso comum de que o nível de expressão de toxinas é dependente do meio em que a bactéria é cultivada. Em 1982, O'Brien et al. descreveram três categorias de *E. coli* produtora da toxina de Shiga compreendendo: baixa, moderada e alta produção da toxina. Desde esta descrição, diferentes meios para cultivo ou para enriquecimento foram empregados em diagnóstico de STEC com o objetivo de detectar diferentes níveis de Stx. Contudo, os dados disponíveis em relação ao meio mais adequado são divergentes. Vimont et al. (2006) revisaram a literatura citada sobre protocolos de enriquecimento para detecção de STEC em diferentes matrizes e concluíram que o meio Trypticase Soy Broth (TSB) é o meio de enriquecimento mais frequentemente utilizado (39,3%), seguido do meio *E. coli* (25,3%) e Buffer-peptone Water (BPW) (15,6%). De acordo com estes autores existem poucos estudos comparando a eficácia de protocolos de enriquecimento, além disso, os resultados divergem dependendo do grupo de pesquisa.

1.1.4.2 Testes diagnósticos

Com a emergência principalmente da *E. coli* O157, vários testes diagnósticos tornaram-se disponíveis para facilitar a detecção deste patógeno, como o ágar MacConkey-Sorbitol que se baseia na habilidade da *E. coli* O157 de não fermentar o sorbitol (KONEMAN et al., 1997; BOPP et al., 1999). No entanto, há variantes do

sorogrupo O157 e as STEC não-O157 que fermentam sorbitol, diminuindo assim a sensibilidade deste método na detecção destes patógenos (PATON; PATON, 1998).

A detecção das toxinas de Shiga por PCR, ou a detecção de vários fatores de virulência como intimina e enterohemolisina por multiplex PCR ou sondas de DNA são testes extremamente sensíveis e são realizados em alguns laboratórios, porém, não estão amplamente disponíveis (KEHL, 2002).

O uso de cultura de células para detectar e confirmar a produção de Stx1 e Stx2 é considerado o teste padrão para o diagnóstico das STEC, entretanto requer capacitação, demanda tempo e tem alto custo, o que o torna impróprio para diagnóstico em laboratórios de rotina (BETTELHEIM; BEUTIN, 2003).

Nos últimos anos, um grande número de métodos imunossorológicos para detecção de Stx foi desenvolvido, entre eles: ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), *colony immunoblot* e aglutinação passiva em látex, para identificação e confirmação de isolados de amostras clínicas (STROCKBINE et al., 1998) e de alimentos (VERNOZY-ROZAND, 1998; BÔER; HEUVELINK, 2001).

Dentre os ensaios disponíveis comercialmente podemos citar o teste de aglutinação *VTEC-Screen* da *SEIKEN* (Japão); os kits para ELISA: *premier-EHEC* (Meridian Bioscience, Inc. Cincinnati, OH, EUA), *Ridascreen Verotoxin* (R-biopharm, Darmstadt, Alemanha) e *Prospect Shiga toxin* (Alexon-Trend, REMEL, Lenexa, KS, EUA); o *colony immunoblot* (SIFIN GmbH, Berlin, Alemanha) e o kit imunocromatográfico *Duopath Verotoxin Test* (DV) (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) (BETTELHEIM; BEUTIN, 2003).

Este crescente número de diferentes métodos comercialmente disponíveis para detecção de Stx dificulta a escolha para o diagnóstico laboratorial, pois nem todos foram avaliados quanto à sua sensibilidade em laboratórios independentes. Além disso, nessa avaliação deveria ser levada em conta a grande variedade de cepas de STEC, incluindo-se isolados humanos, animais e ambientais, representando deste modo, a variedade de sorotipos, tipos e subtipos de toxinas (BETTELHEIM; BEUTIN, 2003). Ainda, estes testes não são utilizados na rotina laboratorial dos países em desenvolvimento porque são extremamente caros (STROCKBINE et al., 1998).

Beutin et al. (1997, 1998) avaliaram o kit Premier-EHEC e verificaram que este apresentou alta especificidade, mas baixa sensibilidade comparado ao ensaio de célula Vero. Posteriormente, esses autores concluíram que este kit é apropriado

para detecção de todos os tipos conhecidos de Stx, mas é pouco aplicável em teste de amostras onde se encontram baixas quantidades de Stx, tais como culturas misturadas e certas variantes de Stx2 (BEUTIN et al. 2006).

A presença de STEC no rebanho bovino e ovino, a existência de Stx nos diversos sorotipos de *E. coli* diarreiogênica, a emergência de casos clínicos de SHU no Brasil, e o alto custo dos ensaios diagnósticos comerciais, impõem a necessidade do desenvolvimento de um método que apresente as seguintes características: baixo custo, alta sensibilidade e especificidade, rapidez de resultados e facilidade de aplicação. Deste modo, com um ensaio padronizado, existe a possibilidade da sua utilização em estudos epidemiológicos e diagnóstico laboratorial clínico.

Uma das linhas de pesquisa desenvolvidas no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, o qual este trabalho foi realizado, é a obtenção das ferramentas específicas para ensaios empregados na detecção de fatores de virulência de *E. coli* diarreiogênicas, dentre elas a STEC. Neste sentido, Mendes-Ledesma (2005) imunizou coelhos com as toxinas Stx1 e Stx2 destoxificadas (toxóides), e observou que diferentemente do soro anti-Stx1, o soro de coelho anti-Stx2 reconheceu por *immunoblotting* ambas as toxinas e toxóides, Stx1 e Stx2. A reatividade destes soros com as respectivas toxinas foi idêntica, ambos reconhecendo as duas subunidades. O soro anti-Stx2 também foi capaz de neutralizar as toxinas Stx1 e Stx2 em ensaios de células Vero, o mesmo efeito não foi observado com o soro anti-Stx1, o qual só neutralizou os efeitos de Stx1 (MENDES-LEDESMA, 2005).

Estes antissoros foram utilizados na padronização dos ensaios de *immuno dot*, *colony immunoblot* e ELISA. Foram analisados sobrenadantes de 800 isolados de *E. coli* de crianças menores de cinco anos, com e sem diarreia. Exceto a ocorrência de diarreia, nenhuma outra informação clínica dos pacientes foi avaliada. Destes isolados, em oito foi detectada a presença dos genes *stx1* e/ou *stx2* (BUERIS et al., 2007). Ambos os antissoros, independente do ensaio imunossorológico realizado, apresentaram alta especificidade (99,6 - 100%) e alta eficiência (98%). Nos ensaios por *colony immunoblot* foi verificada a sensibilidade de 56% (anti-Stx1) e 51,8% (anti-Stx2). Por outro lado, na reação de *immuno dot* obteve-se uma sensibilidade de 66,6% quando utilizado o soro anti-Stx1 e uma sensibilidade de 61% quando utilizado o soro anti-Stx2. Esta diferença de sensibilidade utilizando-se os mesmos soros é explicada pela maior quantidade de toxina acessível no suporte

inerte, pois diferentemente do *colony immunoblot*, os sobrenadantes bacterianos foram submetidos a vácuo e em maior volume (MENDES-LEDESMA, 2005).

O ensaio de ELISA foi realizado sensibilizando-se diretamente as microplacas com os sobrenadantes bacterianos e este mostrou uma sensibilidade de 66,6% quando utilizado o soro anti-Stx1 e uma sensibilidade de 58% quando utilizado o soro anti-Stx2. A análise dos resultados do ELISA utilizando ambos os soros, mostrou uma concordância de 70% em relação ao ensaio de neutralização da citotoxicidade em células Vero (MENDES-LEDESMA, 2005).

Esses resultados do ensaio de ELISA foram promissores, entretanto, a literatura relata uma sensibilidade em torno de 80 a 100% para diferentes ensaios de ELISA (KEHL et al., 1997; MACKENZIE et al., 1998; NOVICKI et al., 2000; BEUTIN et al., 2006). Estes ensaios normalmente utilizam o anticorpo policlonal na sensibilização das microplacas, sendo a toxina detectada por anticorpo monoclonal, aumentando assim a sensibilidade do método.

Neste contexto e na tentativa de aumentar a sensibilidade do método, surgiram os objetivos desse trabalho, que foram: a padronização e o desenvolvimento de ELISA de captura, utilizando anticorpos policlonais e monoclonais contra as toxinas de Shiga. Porém, para alcançar os objetivos propostos, foi necessária a determinação do meio adequado para produção de Stx para utilização nos ensaios de captura, assim como, a obtenção e caracterização dos anticorpos monoclonais anti-Stx1 e anti-Stx2.

2 OBJETIVOS

- Determinação do meio adequado para produção de Stx para utilização nos ensaios de captura;
- Obtenção e caracterização dos anticorpos monoclonais anti-Stx1 e anti-Stx2;
- Padronização e desenvolvimento de ELISA de captura utilizando anticorpos policlonais e monoclonais contra as toxinas de Shiga.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados bacterianos

Neste trabalho foram utilizados 49 isolados de *E. coli* que possuem o gene *stx* e/ou expressam a toxina de Shiga em ensaio de citotoxicidade em células Vero. A relação desses e suas principais características estão listadas na Tabela 1. Na avaliação do ELISA de captura também foram utilizadas 100 isolados bacterianos não produtores da toxina de Shiga pertencentes a coleção do Laboratório de Bacteriologia (Instituto Butantan), dentre eles: 20 isolados de *E. coli* não diarreiogênica, 10 isolados de *E. coli* difusamente aderente (DAEC), 15 isolados de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), 12 isolados de *E. coli* enteropatogênica atípica (EPECa), 8 isolados de *E. coli* enteropatogênica típica (EPECt), 11 isolados de *E. coli* interoinvasora (EIEC), 14 isolados de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) e 10 isolados de outras enterobactérias (*Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Salmonella spp*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Providencia spp*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*).

3.2 Condições de cultivo bacteriano dos isolados STEC

A comparação de crescimento bacteriano e a expressão de Stx em diferentes meios de cultura foi inicialmente realizada utilizando os isolados 597 e 53B (Tabela 1). Estes isolados foram escolhidos por meio do trabalho anterior (MENDES-LEDESMA, 2005), o qual o isolado 53B indicava ser baixo produtor de Stx2 e o isolado 597 foi escolhido aleatoriamente entre os produtores de Stx1.

Tabela 1 – Características dos isolados STEC positivos por PCR

Isolado	Sorotipo	Origem	Presença do gene
1	O157:H7	Humana	<i>stx2</i>
2	O157:H7	Humana	<i>stx2</i>
4	O93:H19	Humana	<i>stx1/stx2</i>
5	O55:H19	Humana	<i>stx1</i>
9	O103:H2	Humana	<i>stx1/stx2</i>
11	O118:H16	Humana	<i>stx1</i>
16	O26:H11	Humana	<i>stx1</i>
20	O111:H8	Humana	<i>stx1</i>
23	O111:H8	Humana	<i>stx1</i>
26	O111:NM	Humana	<i>stx1</i>
27	O111:NM	Humana	<i>stx1</i>
41	ONT:NM	Animal	<i>stx2</i>
44	O98:H4	Animal	<i>stx1/stx2</i>
45	O181:H4	Animal	<i>stx1/stx2</i>
50	O87:H16	Animal	<i>stx2</i>
53	O98:H17	Animal	<i>stx1/stx2</i>
53B	O157:H7	Humana	<i>stx2</i>
55	O98:H17	Animal	<i>stx1/stx2</i>
57B	O26:H11	Animal	<i>stx1</i>
59	ONT:H16	Animal	<i>stx2</i>
59B	O26:H11	Humana	<i>stx1</i>
60	O26:H12	Humana	<i>stx1</i>
61	O26:H11	Humana	<i>stx1</i>
62	O26:H11	Humana	<i>stx1</i>
64	O26:H11	Humana	<i>stx1</i>
66	O105:H18	Animal	<i>stx1/stx2</i>
67	O26:H11	Humana	<i>stx1</i>
79	O22:H16	Animal	<i>stx2</i>
81	ONT:H38	Animal	<i>stx1/stx2</i>
82	O112:H21	Animal	<i>stx2</i>
82B	O157:H7	ND*	<i>stx1</i>
94	O157:H7	Animal	<i>stx2</i>
96	O93:H19	Alimentar	<i>stx2</i>
597	OR:NM	Humana	<i>stx1</i>
1132	ONT:H49	Humana	<i>stx2</i>
1189	ONT:H49	Humana	<i>stx2</i>
3003	O48:H7	Humana	<i>stx1</i>
4123	O26:H11	Humana	<i>stx1</i>
3299-85	O157:H7	Humana	<i>stx1</i>
46240	O157:H7	Humana	<i>stx1</i>
3104-88	O157:H7	Humana	<i>stx1/stx2</i>
3077-88	O157:H7	Humana	<i>stx1</i>
C7-88	O157:H7	Humana	<i>stx1</i>
O1	ONT:H8	Animal	<i>stx1</i>
O17	O112:H2	Animal	<i>stx1</i>
O3	O172:NM	Animal	<i>stx2</i>
O22	ONT:H16	Animal	<i>stx2</i>
O55	O146:H21	Animal	<i>stx1/stx2</i>
O36	O75:H8	Animal	<i>stx1/stx2</i>

* ND: dado não disponível

3.2.1 Cultivo bacteriano

Os isolados 597 (*Stx1*) e 53B (*Stx2*) foram cultivados nos seguintes meios: Luria-Bertani (LB), Evans (EVANS et al., 1973), Syncase, Penassay, Trypticase Soy Broth (TSB, Merck S.A., Rio de Janeiro, R.J., Brasil), Brain Heart Infusion (BHI, Bio-rad, Marnes-la-Coquette, França), *E. coli* Broth (EC, HiMedia Laboratories Pvt Ltd., Mumbai, Índia) e Buffer-peptone water (BPW). A composição dos diferentes meios está listada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição dos diferentes meios de cultura utilizados.

Composição	BHI	EC	Evans	LB	Penassay	BPW	Syncase	TSB
Triptona	-	-	-	1	0,5	-	0,5	-
Extrato de levedura	0,2	-	0,15	0,5	0,15	-	-	-
Caseína	1	2	-	-	-	-	1	3
Extrato de carne	-	-	-	-	0,15	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,25	-	-	-	-	0,35	-	-
NaCl	0,5	0,5	0,25	1	0,35	0,5	-	0,5
KH ₂ PO ₄	-	0,15	0,871	-	0,37	-	-	-
MnCl ₂ .4H ₂ O	-	-	0,0005	-	-	-	0,0004	-
MgCl ₂ .6H ₂ O	-	-	-	-	-	-	0,0042	-
MgSO ₄	-	-	0,005	-	-	-	-	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	-	0,0005	-	-	-	0,0005	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	0,0089	-
K ₂ HPO ₄	-	0,4	-	-	0,132	0,15	0,5	0,25
Peptona	1	-	-	-	-	1	-	-
NH ₄ Cl	-	-	-	-	-	-	0,118	-
Dextrose	0,2	-	-	-	-	-	-	-
Sais de Bile	-	0,15	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	0,5	-	-	-	-	-	-
Glicose	0,2	-	-	-	0,1	-	0,25	0,25
Infusão de cérebro de bezerro	1,25	-	-	-	-	-	-	-
Infusão de coração bovino	0,5	-	-	-	-	-	-	-

NOTA: As quantidades dos componentes estão expressas em g%.

Os isolado 597 e 53B foram primeiramente cultivados em 5 ml de LB a 37 °C sob agitação por 18h. Posteriormente, diluições de 1:100 dos cultivos foram incubadas nos diferentes meios citados a 37 °C (250 rpm) por 8h. Durante este período de crescimento, alíquotas de 1 ml de cada cultivo dos isolados foram retiradas a cada 30 min até 5h e de 5 a 8h foram retiradas em intervalos de 1h. A densidade ótica (DO) foi medida a 588 nm e as alíquotas centrifugadas a 13.000 x g

por 15 min. Após centrifugação, os sobrenadantes foram separados e armazenados a -20°C até o uso. Além disso, os sedimentos foram tratados com 0,1 mg/ml de polimixina em um volume final de 1 ml e incubados por 30 min a 37°C (250 rpm). As suspensões foram centrifugadas a $13.000 \times g$ por 15 min e o sobrenadante foi retirado e armazenado a -20°C até o uso.

3.2.2 Ensaios de avaliação da expressão das toxinas de Shiga

Para avaliar a expressão das toxinas após o cultivo nos diferentes meios, 100 μL dos sobrenadantes foram aplicados em microplacas de ELISA (Nalge Nunc International, Dinamarca) e em membrana de nitrocelulose usando o sistema *Dot Blot Filtration* (Bio Rad, Hercules, CA, EUA).

ELISA: as microplacas contendo os sobrenadantes bacterianos foram incubadas por 16-18h em temperatura entre 2 a 8°C . Posteriormente, as microplacas foram lavadas 4 vezes com tampão salina-fosfato (PBS) 0,01 M pH 7,4 contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e bloqueadas com PBS contendo 1% de albumina bovina (BSA) por 30 min a 37°C . Após bloqueio, as placas foram lavadas com PBST e incubadas com soro policlonal de coelho anti-Stx1 para a detecção de Stx1 e anti-Stx2 para a detecção de Stx2 (Mendes-Ledesma, 2005) nas diluições de 1:50 por 1h a 37°C . Posteriormente, as placas foram novamente lavadas com PBST e incubadas com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, Califórnia, EUA) diluído 1:5.000 por 40 min a 37°C . Após as lavagens com PBST, o ensaio foi revelado em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 contendo 0,5 mg/ml de σ -fenilenodiamino (OPD; Sigma Chemical Company, St. Louis, M.O., EUA) e 0,5 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de H_2O_2 . A reação foi interrompida com adição de 50 μL de HCl 1 N por poço. A absorbância foi mensurada a 492 nm em leitor Multiskan EX ELISA (Labsystems, Helsinki, Finlândia). Em cada etapa, o volume de solução adicionada foi de 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$, com exceção da solução de bloqueio que foi de 150 $\mu\text{L}/\text{poço}$.

Immuno-dot: as membranas contendo os sobrenadantes bacterianos foram lavadas 3 vezes por 5 min com PBST e bloqueadas PBS contendo 1% de BSA por 1h a temperatura ambiente. Após bloqueio, as membranas foram novamente lavadas

com PBST e incubadas com anti-IgG de coelho conjugado peroxidase (Zymed) diluído 1:5.000 por 1h a temperatura ambiente. Após as lavagens com PBST, o ensaio foi revelado com PBS contendo 0,033 mg/ml de diaminobenzidina (DAB, Sigma) e 5 µl/ml de H₂O₂. A reação foi interrompida com adição de água destilada.

Num segundo passo, os isolados 597 e 53B foram cultivados em meio EC na presença ou ausência de ciprofloxacina ou novobiocina nas concentrações finais de 5 ng/ml e 20 µg/ml, respectivamente. O crescimento bacteriano foi medido a 588 nm, a expressão da toxina foi avaliada no sobrenadante e o sedimento tratado com 0,1 mg/ml de polimixina utilizando-se soro de coelho anti-Stx2 na diluição de 1:50. O tempo de crescimento e as alíquotas foram processados como descrito anteriormente, bem como a reação imunoenzimática. Numa etapa posterior da pesquisa, a expressão de Stx1 e/ou Stx2 foi analisada nos isolados de STEC disponíveis, até então: 53B, 57B, 59B, 60, 61, 62, 64, 67, 82B, 597, 1132, 1189, 3003, 4123, 3299-85, 46240, 3104-88, 3077-88 e C7-88 (Tabela 1), tanto em sobrenadante quanto em sedimento tratado com polimixina depois do crescimento de 4h em presença ou ausência de ciprofloxacina ou novobiocina.

3.3 Imunização de camundongos

3.3.1 Obtenção dos toxóides

As toxinas Stx1 e Stx2, gentilmente cedidas pela Dra. Cheleste Thorpe (Tufts-New England Medical Center) foram previamente destoxificadas, a fim de reduzir a menos de 1% a citotoxicidade original (PERERA et al., 1988). A destoxificação consistiu na adição de 1 ml de tampão Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 8,0 contendo 0,11% de glutaraldeído a 100 µg de cada uma das toxinas Stx1 ou Stx2. A solução foi incubada por 30 min a 37 °C e os toxóides armazenados a -20 °C até o uso (BROWN et al., 1982).

3.3.2 Imunização

Camundongos Balb/c com 4 a 6 semanas de idade foram imunizados com o toxóide Stx1 ou Stx2. O protocolo de imunização consistiu em uma primeira dose de

10 µg do antígeno em Montanide™ ISA 50V (SEPPIC, Paris, França) v/v, via coxim plantar. Após quatro semanas, os animais receberam a primeira injeção de reforço, na mesma concentração da primeira dose e a cada 10 dias, novos reforços foram administrados aos animais. Após três reforços, o sangue dos animais foi coletado pelo plexo orbital para sangria de prova e o título de anticorpos foi medido por ELISA (ENGVALL; PERLMANN, 1971) utilizando como antígeno 1 µg/ml das toxinas purificadas. Três dias antes da fusão, os camundongos que apresentaram maior título de anticorpos contra seu respectivo antígeno receberam uma dose do toxóide (Stx1 ou Stx2) na concentração de 10 µg do antígeno em PBS.

Os camundongos imunizados com Stx1 ou com Stx2 foram sacrificados para a retirada dos linfonodos poplíteos em períodos diferentes.

3.4 Obtenção dos hibridomas

3.4.1 Cultivo de células mielomatosas

Células de mieloma de camundongo, denominadas de Sp2/O-Ag14 (ATCC) isoladas de baço de camundongo BALB/c possuem as características de não sintetizar imunoglobulinas e morrerem em meio suplementado com HAT (Hipoxantina, Aminopterina e Timidina) (SHULMAN et al., 1978). Essas células foram cultivadas em garrafas de cultura celular com meio RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, N.Y., EUA) contendo 10% de soro fetal bovino; e armazenadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Periodicamente foi realizada a troca do meio, assim como a transferência para outras garrafas devido à multiplicação celular.

3.4.2 Preparo de células peritoneais

“Feeder Layer” refere-se à camada de células peritoniais (fibroblastos) retiradas do camundongo e adicionadas a placa de cultura celular. Estas células são responsáveis por secretar citocinas, preparando o meio para receber as células resultantes da fusão. Para isso, um camundongo Balb/c foi sacrificado, imerso em álcool 70% e sua pele foi descolada da membrana que reveste o peritônio.

Posteriormente injetou-se 5 ml de meio RPMI no abdome e o local foi massageado levemente. Com o auxílio de uma seringa, o líquido injetado foi recuperado e adicionado à 40 ml de meio RPMI. Após homogeneização, o meio foi distribuído em placas de cultura celular de 96 poços e armazenado em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

3.4.3 Fusão e seleção dos hibridomas

O protocolo de fusão, tanto para obtenção de hibridoma anti-Stx1 quanto para anti-Stx2, foi realizado como descrito por Köhler e Milstein (1975). Em todas as etapas de obtenção dos hibridomas foi utilizado o meio RPMI com HEPES (ácido etanosulfônico-hidróxietilpiperazina) (Gibco).

Os linfonodos poplíteos foram retirados do animal imunizado e imersos imediatamente em frasco estéril contendo RPMI. O tecido adiposo foi retirado e o órgão macerado sobre peneira de malha fina, para a obtenção da suspensão de linfócitos. As células assim obtidas foram centrifugadas e ressuspensas em 10 ml de RPMI. As células mielomatosas foram lavadas 3 vezes com RPMI sem soro fetal bovino a 500 x g por min e ressuspensas em 10 ml de RPMI. Tanto os linfócitos quanto as células mielomatosas foram quantificadas com auxílio de câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram misturadas na proporção de duas células do linfonodo poplíteo para uma célula mielomatosa e a mistura de células foi novamente centrifugada a 500 x g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 1 ml do meio de fusão [0,5 g de PEG 4000 (polietilenoglicol), 0,7 ml de PBS e 50 µL de DMSO (dimetil sulfoxido)] sob agitação manual por 1 min a 37 °C. Em seguida, as células foram deixadas em repouso por 1,5 min a 37 °C. Logo após, 1 ml de RPMI foi adicionado sob agitação por 1 min e mais 20 ml de RPMI em 4 min. Após um novo repouso de 4 min, as células foram centrifugadas e ressuspensas em RPMI completo com HAT (2% de hipoxantina e timidina e 1% de aminopterina), de maneira a obter-se uma concentração final de 1 x 10⁶ células por ml. Após incubação por 2h a 37 °C, esta suspensão foi distribuída em placas de 96 poços contendo as células peritoneais de camundongo previamente aderidas (100 µL por poço). As placas foram armazenadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. O meio de cultivo celular foi renovado a

primeira vez três dias após a fusão e a seguir, a cada dois dias. A seleção dos hibridomas foi feita em meio RPMI com HAT.

Os hibridomas foram avaliados por ELISA com relação a produção ou não de anticorpos. Para detecção de anticorpos anti-Stx1 ou anti-Stx2 foi utilizada microplaca MaxiSorp™ (NUNC) sensibilizada com 1 µg/ml de Stx1 ou Stx2 purificadas. Após 18h de incubação a uma temperatura de 2 a 10 °C, a microplaca foi lavada por 4 vezes consecutivas com PBST e incubada por 30 min a 37 °C com 1% de BSA em PBS. Após bloqueio, os sobrenadantes dos hibridomas foram adicionados e novamente incubados por 1h a 37 °C. Após a lavagem foi acrescentado 1:10.000 de soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Zymed) e incubado por 30 min a 37 °C. A reação foi revelada com 0,5 mg/ml de OPD adicionado de H₂O₂ e a reação foi interrompida com adição de HCl 1 N. A absorbância foi mensurada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).

3.5 Sub-clonagem e classificação dos hibridomas anti-Stx1 e anti-Stx2

Após ocuparem metade dos poços, os hibridomas foram testados quanto ao seu isotipo. Para a determinação dos isotipos, as microplacas MaxiSorp (NUNC) foram sensibilizadas por 18h a uma temperatura de 2 a 8 °C com 10 µg/ml das diferentes subclasses de imunoglobulinas anti-camundongo: anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b e anti-IgG3 e reveladas com soro de cabra anti-camundongo (IgG+A+M) (Zymed) conjugado à peroxidase. IgM não específicos foram selecionados por ensaio de ELISA testando-se os hibridomas diretamente no tampão de diluição do antígeno (tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6), descartando-se assim, a possibilidade de hibridomas não relacionados.

Após seleção por ELISA, os hibridomas foram clonados por diluição limite em meio RPMI completo (com 10% de soro fetal bovino) em placas de 96 poços. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e diluídas de maneira a se obter 5 células por ml. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 10 a 15 dias, os sobrenadantes que teoricamente continham um só clone foram testados por ELISA para detecção da produção de anticorpos anti-Stx1 ou anti-Stx2.

3.6 Congelamento dos hibridomas

O congelamento dos clones foi realizado da seguinte maneira: a suspensão celular retirada das garrafas de cultura foi centrifugada a 500 x g por 5 min e o sobrenadante descartado. O sedimento foi homogeneizado por movimentos manuais e suaves e ressuspenso em RPMI na presença de 10% de soro fetal bovino. A seguir, igual volume de meio com 15% de DMSO foi adicionado gota a gota, homogeneizando com suavidade. As células assim preparadas foram separadas em alíquotas em tubos criogênicos. Todo este processo foi realizado em fluxo laminar e em banho de gelo. Os tubos criogênicos contendo a suspensão celular foram colocados a -80° C por 48h e depois transferidos para o nitrogênio líquido. Diferentes lotes dos hibridomas (anti-Stx1 e anti-Stx2) obtidos em todas as etapas do processo de diluições limites foram congelados.

3.7 Técnicas para purificação dos anticorpos

3.7.1 Precipitação da fração IgG do soro policlonal

Soros de coelho anti-Stx1 e anti-Stx2 (MENDES-LEDESMA, 2005) foram diluídos em quatro volumes de tampão acetato de sódio 60 mM pH 4,0 e ajustados para pH 4,5. Sob constante agitação, 25 µL de ácido caprílico (Vetec Química Fina Ltda., Rio de Janeiro, R.J., Brasil) foram adicionados gota-a-gota para cada ml da solução de antissoro e agitado por 30 min. A solução foi centrifugada a 10.000 x g por 30 min, o sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. PBS 10 vezes concentrado foi acrescido na proporção de uma parte de PBS para nove partes do sobrenadante; e o pH ajustado para 7,4 com NaOH 1 M. O sobrenadante foi resfriado a 4 °C e fracionado com 0,227 g de sulfato de amônio por ml da solução por 1h em agitação. A solução foi centrifugada a 5000 x g por 15 min e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi ressuspenso em PBS (cerca de 1/10 do volume original do soro) e submetido à diálise contra PBS por um dia e água destilada por outro dia a temperatura de 2 a 8 °C. A solução obtida foi filtrada em filtro de poro 0,45 µm. A dosagem de proteína foi estimada por leitura da DO a 280 nm e o valor obtido multiplicado por 0,7 (CROWTHER, 2001).

3.7.2 Purificação dos anticorpos monoclonais em coluna de afinidade

Os sobrenadantes das culturas dos hibridomas anti-Stx1 e anti-Stx2 foram coletados, centrifugados a 500 x g, filtrados em filtros de poro 0,45 µm e estocados a -20 °C até o uso. Para purificação, os sobrenadantes das culturas dos hibridomas foram descongelados a 4 °C.

A coluna de proteína A-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia) e os aparelhos para monitorar as curvas obtidas (Econo UV Monitor e Econo-Recorder Model 1327, Bio-Rad) foram utilizados para purificação dos sobrenadantes recolhidos da cultura de hibridomas produtores dos anticorpos monoclonais. Primeiramente, a coluna foi equilibrada com tampão borato salina (TBS) e o sobrenadante do hibridoma aplicado. A coluna foi lavada com TBS para descarte das proteínas não adsorvidas (primeira curva observada no aparelho). Posteriormente, as proteínas ligadas a matriz da coluna (anticorpos) foram eluídas com 0,2 M de glicina pH 2,8 e a curva visualizada através do aparelho. Imediatamente, o pH da amostra coletada nessa segunda curva foi neutralizado com solução de Tris 1 M. A solução obtida foi liofilizada, ressuspensa em um pequeno volume e dialisada em água destilada. O conteúdo protéico foi estimado pela leitura da absorbância a 280 nm multiplicada por 0,7 (CROWTHER, 2001).

Os anticorpos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) e corados com Coomassie blue para verificar o grau de pureza.

3.8 Caracterização dos anticorpos

3.8.1 Caracterização dos anticorpos policlonais

Para o cálculo do limite de detecção dos soros policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2, uma microplaca MaxiSorp™ (Nunc) foi sensibilizada com diferentes concentrações de Stx1 ou Stx2 (50 µg/ml a 5,4 pg/ml). Após 16h a temperatura de 2 a 8° C, a placa foi lavada 3 vezes com PBST e bloqueada com PBS contendo 1% de BSA por 30 min a 37 °C. Após novas lavagens com PBST, soro policlonal anti-Stx1 ou anti-Stx2 foi adicionado a diluição de 1:50 e incubados por 1h a 37 °C. Posteriormente a placa foi lavada com PBST e incubada com soro de cabra anti-IgG

de coelho conjugado a peroxidase 1:5.000 por 1h a temperatura ambiente. Depois da lavagem, o ensaio foi revelado com solução de tampão citrato/fosfato contendo OPD e 50 µg/poço de H₂O₂ e a leitura da absorbância foi feita em leitor de ELISA (Labsystems) a 492 nm. Em cada etapa, o volume de solução adicionada foi de 100 µl/poço, com exceção da solução de bloqueio que foi de 150 µl/poço.

3.8.2 Caracterização dos anticorpos monoclonais

3.8.2.1 Cálculo da constante de afinidade

As constantes de afinidade dos anticorpos monoclonais foram calculadas a partir dos dados obtidos por ELISA de afinidade em três etapas (FRIGUET et al., 1985). Brevemente: na primeira etapa calcula-se a concentração ideal de anticorpo, na segunda etapa incuba-se em microtubos a concentração ideal de anticorpo obtido na primeira etapa com diferentes concentrações de antígeno, finalmente, na terceira etapa calcula-se a concentração ideal de antígeno por meio dos anticorpos livres da segunda etapa. Todos os dados obtidos foram utilizados para o cálculo da K_d (constante de dissociação) por meio da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{DO título}}{\text{DO título} - \text{DO teste}} = \frac{1 + K_d}{M}$$

3.8.2.2 Immunoblotting

As proteínas (Stx) separadas por massa molecular através da técnica de SDS-PAGE, foram transferidas para membrana de nitrocelulose sob ação de corrente elétrica (*Western blot*). As membranas contendo as subunidades das toxinas já separadas por massa molecular, foram bloqueadas com BSA 1% em PBS pH 7,4 por 2h a temperatura ambiente. Após esse período, 153 µg dos anticorpos monoclonais anti-Stx1 ou anti-Stx2 foram incubados separadamente (16h a temperatura de 2 a 8 °C) com as fitas de nitrocelulose contendo ambas as toxinas. As fitas de nitrocelulose foram lavadas 3 vezes por 10 min com PBST e incubadas com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase 1:2.000 por 1h

a temperatura ambiente. Após incubação, as fitas foram novamente lavadas com PBST e o ensaio revelado com PBS contendo 0,033 mg/ml de DAB (Sigma) e 5 µl/ml de H₂O₂. A reação foi interrompida com adição de água destilada.

3.9 ELISA de captura

3.9.1 Padronização

3.9.1.1 Concentrações e combinações da fração enriquecida em IgG e soro policlonal anti-Stx

A microplaca MaxiSorp™ foi sensibilizada por 16-18h a uma temperatura de 2 a 8 °C com 500, 50 e 5 µg/ml da fração IgG do soro policlonal anti-Stx2 e do soro anti-Stx2 nas diluições de 1:100, 1:1.000 e 1:10.000. Posteriormente, a placa foi lavada por 4 vezes com PBST e bloqueada por 1h com BSA 1% em PBS. Após novas lavagens com PBST, o ensaio foi incubado com anticorpo monoclonal anti-Stx1 nas concentrações de 20, 10 e 2 µg/ml por 40 min a 37 °C. Após esta incubação e novas lavagens com PBST, a placa foi incubada por 40 min a 37 °C com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:10.000. Posteriormente, o ensaio foi revelado com 0,5 mg/ml de OPD (Sigma) contendo 0,5 µg/ml de H₂O₂ e a reação foi interrompida com adição de 50 µL de HCl 1 N por poço. A absorbância foi mensurada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems). Em cada etapa, o volume de solução adicionada foi de 100 µl/poço, com exceção da solução de bloqueio que foi de 150 µl/poço.

3.9.1.2 Concentrações e combinações de anticorpos monoclonais anti-Stx

Nas mesmas condições de tempo e temperatura do ensaio do item 4.9.1.1, a microplaca foi sensibilizada com 50 e 5 µg/ml da fração IgG do soro policlonal anti-Stx2 e do soro anti-Stx2 nas diluições de 1:1.000 e 1:10.000. Posteriormente, a placa foi incubada com o sobrenadante dos isolados bacterianos por 1h a 37°C e acrescido de anticorpo monoclonal anti-Stx1 nas concentrações de 2 e 10 µg/ml.

Após incubação e novas lavagens, a placa foi incubada com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase na diluição de 1:10.000 e tratado nas mesmas condições de revelação do item 4.9.1.1.

Para padronização do ELISA foram utilizados na captura do ensaio os anticorpos monoclonais anti-Stx1 e anti-Stx2 nas concentrações de 20, 10, 5 ou 2,5 µg/ml. Também foram testadas as combinações dos anticorpos monoclonais nas mesmas concentrações de anti-Stx1, anti-Stx2 ou anti-Stx1 com anti-Stx2.

3.9.1.3 Diluições do soro anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase

O soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Zymed) foi testado nas diluições de 1:5.000 e 1:10.000. Como controle positivo foi utilizado o isolado O55 (Tabela 1) e como controle negativo, um isolado não-STEC.

3.9.1.4 Diferentes microplacas de ELISA

Duas microplacas diferentes de ELISA foram testadas: MaxiSorp™ e PolySorp™ (NUNC). Para isso, o isolado O55 (Tabela 1) foi utilizado como controle positivo e um isolado não-STEC, como controle negativo.

A partir de um mesmo cultivo foram separadas duas alíquotas do sobrenadante: um deles para o ensaio de ELISA com a amostra fresca e outro para o ensaio com a amostra congelada.

3.9.1.5 Sobrenadantes bacterianos

O sobrenadante dos isolados bacterianos cultivados em caldo EC (ROCHA; PIAZZA, 2007 – artigo em anexo) foram testados logo após o cultivo ou após armazenamento de sete dias a -20 °C. Como controle positivo foi utilizado o isolado O55 (Tabela 1) e como controle negativo, um isolado não-STEC.

3.9.2 Desenvolvimento do ensaio

Microplacas para ELISA (MaxiSorp™, NUNC) foram sensibilizadas por 16 a 18h a temperatura de 2 a 8 °C com uma solução equimolar de 250 µg/ml de cada

uma das frações enriquecidas em IgG dos soros policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2. Após 4 lavagens consecutivas com PBST, as placas foram bloqueadas com BSA 1% em PBS por 1h a temperatura ambiente. Após incubação, as placas foram lavadas conforme descrito acima e incubadas por 1h a 37 °C com o sobrenadante da bactéria cultivada em meio EC (ROCHA; PIAZZA, 2007). Novamente, as placas de ELISA foram lavadas com PBST e incubadas com uma solução contendo 2,5 µg/ml do anticorpo monoclonal anti-Stx1 em BSA 1% por 40 min a 37 °C. Depois da lavagem, foi acrescentado soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase diluído 1:5.000 e incubado por mais 40 min a 37 °C. O ensaio foi revelado com 0,5 mg/ml de OPD (Sigma) contendo 0,5 µg/ml de H₂O₂ e a reação foi interrompida com adição de 50 µL de HCl 1 N por poço. A absorbância foi mensurada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems). Em cada etapa, o volume de solução adicionada foi de 100 µl/poço, com exceção da solução de bloqueio que foi de 150 µl/poço.

3.10 Validação do ensaio

3.10.1 Cálculos de sensibilidade, especificidade e eficiência

A sensibilidade (Se) e especificidade (Esp) e eficiência (Ef) dos ensaios imunossorológicos foram calculadas de acordo com Crowther (2001) utilizando as seguintes fórmulas:

$$Se = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de isolados verdadeiramente positivos (VP)}}{\text{n}^{\circ} \text{ de isolados verdadeiramente positivos (VP)} + \text{n}^{\circ} \text{ de isolados falsos negativos (FN)}}$$

$$Esp = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de isolados verdadeiramente negativos (VN)}}{\text{n}^{\circ} \text{ de isolados verdadeiramente negativos (VN)} + \text{n}^{\circ} \text{ de isolados falsos positivos (FP)}}$$

$$Ef = [(VP + VN)/(VP + FP + VN + FN)] \times 100$$

Para estes cálculos considerou-se como isolados verdadeiramente positivos aqueles que foram citotóxicos nos ensaios de citotoxicidade em células Vero.

3.10.2 Análise estatística

Os valores das densidades óticas obtidos pelos ensaios de ELISA foram analisadas pela média e erro padrão da média utilizando GraphPad Prism 3.0[®]. As correlações entre os dados foram feitas utilizando o teste *t* de Student.

3.11 Ensaio padrão de citotoxicidade em células Vero

A atividade citotóxica das toxinas Stx1 e Stx2 produzida pelos 49 isolados de STEC (Tabela1) foi verificada através de ensaios com células Vero após 72h de interação das toxinas com as células (KONOWALCHUCK, et al., 1977). Após a formação da camada de confluência das células Vero em placas de 24 poços, o meio de cultura celular foi trocado pelo meio de teste (meio 199 suplementado com 2% de soro fetal bovino e 125 µg/ml de gentamicina) (BEUTIN et al., 1998). Foram adicionados 900 µL do meio 199 e 100 µL do sobrenadante bacteriano em cada poço. Nestas condições, efeitos morfológicos nas células Vero foram observados após 24h, 48h e 72h de incubação a 37 °C em 5% de CO₂, em microscópio invertido. O resultado foi considerado negativo quando não houve alteração morfológica na monocamada celular; e positivo, quando as células apresentavam arredondadas e desprendidas da placa de cultura, ou seja, a morte celular. Quando a atividade citotóxica foi pouco evidente ou duvidosa, o ensaio foi repetido.

4 RESULTADOS

4.1 Definição do meio de cultivo em relação a curva de crescimento e expressão das toxinas de Shiga

4.1.1 Crescimento bacteriano e meio de cultura

Quando os isolados que expressam Stx1 (Figura 1 A) ou Stx2 (Figura 1 B) foram cultivados em BHI, Evans, LB, Penassay, Syncase e TSB, as densidades óticas obtidas a 588 nm foram similares e dependentes do tempo, exceto quando cultivados em BPW. A curva de crescimento em EC obteve uma longa fase lag, mas os valores de DO foram incomparavelmente mais altos do que nos outros meios (Figura 1 A e 1 B).

Figura 1 – Curva de crescimento dos isolados de *E.coli* 597 (Stx1) (A) e 53B (Stx2) (B) em diferentes meios de cultura. Os meios de cultivo foram BHI (—), EC (—), Evans (—), LB (—), Penassay (—), BPW (—), Syncase (—) e TSB (—).

4.1.2 Produção das toxinas de Shiga

A produção da toxina foi detectada em todos os meios empregados nos isolados que expressam Stx1 e Stx2, porém com algumas diferenças. A produção de Stx1, secretada no meio, foi detectada no sobrenadante entre 1,5 e 8h, alcançando o pico de produção em 4,5h, quando o isolado foi cultivado em caldo EC. Em meio syncase, Stx1 foi observado no sobrenadante em 1,5h, alcançando um nível máximo em 4h, que foi mantido até a fase estacionária. Em meio Evans,

Stx1 foi detectado entre 1,5h e a fase estacionária. Níveis de Stx1 em LB e BPW foram maiores na fase estacionária do que na fase log de crescimento. O maior nível de produção de BHI, Penassay e TSB foram em 6h, 7h e 4,5h, respectivamente (Figura 2). As densidades óticas referentes aos níveis de produção de Stx1 no sedimento tratado com polimixina foi inferior aos níveis de toxina encontradas no sobrenadante em todos os meios testados (Figura 2). O maior nível de expressão de Stx1 foi observada no meio syncase em 4,5h de cultivo (DO=1,410), seguido de caldo EC em 4 e 4,5h de cultivo (DO=1,360 e 1,364, respectivamente) (Figura 2).

Figura 2 – Crescimento e expressão do isolado 597 (Stx1) em diferentes meios de cultura. O crescimento foi determinado por DO a 588 nm (—). A expressão de Stx1 no sobrenadante (-----) e no sedimento tratado com polimixina (.....) foi determinada por ELISA a 492 nm.

A detecção precoce de Stx2 no sobrenadante foi detectada quando o isolado 53B foi cultivado em EC, syncase e penassay (1,5h), e LB, BPW (2h). A produção de Stx2 no sobrenadante alcançou o nível máximo em 2h em syncase, 3,5h em BHI, 5h em TSB e 7h em EC, Evans, LB, Penassay e BPW. A produção de Stx2 em sedimento tratado com polimixina iniciou em 1h de cultivo, alcançando os níveis máximos em BHI e TSB em 1h, Evans em 2,5h, LB em 1,5h, Penassay em 1h, BPW em 2h, EC em 4h e syncase em 4,5h (Figura 3). Dentre todos os meios testados, o maior nível de expressão de Stx2 foi observado quando a bactéria foi cultivada em meio Evans, na fração de sedimento em 2,5h (DO=1,242), seguido de meio EC, na fração de sobrenadante em 7h e 3,5h (DO=1,218 e 1,095, respectivamente).

Figura 3 – Crescimento e expressão do isolado 53B (Stx2) em diferentes meios de cultura. O crescimento foi determinado por DO a 588 nm (—). A expressão de Stx2 no sobrenadante (-----) e no sedimento tratado com polimixina (.....) foi determinada por ELISA a 492 nm.

A expressão das toxinas Stx detectada por ELISA a 492 nm foi confirmada com os resultados visualizados por *immuno-dot* (Figura 4). Por meio deste ensaio foi possível observar pontos mais escuros após 4h de cultivo bacteriano em caldo EC. Isso aconteceu tanto para o isolado 597 (Stx1), quanto para o isolado 53B (Stx2) (Figura 4).

Figura 4 – Ensaio de *immuno-dot* do isolado 597 (Stx1) (A) e 53B (Stx2) (B) em diferentes tempos e meios. 100 µl de sobrenadante bacteriano foram aplicados em membrana de nitrocelulose, incubados com soro de coelho anti-Stx1 (A) ou anti-Stx2 (B) e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase. Como solução cromógena foi utilizada DAB com adição de H₂O₂.

Como o interesse era empregar uma condição em comum que permitisse a melhor expressão de ambas as toxinas e, tendo em vista a similaridade dos resultados quando isolados Stx1 e Stx2 foram cultivados em caldo EC, decidiu-se optar por este meio para seqüência dos ensaios. Em um novo ensaio proposto, o caldo EC foi acrescido de antibiótico. Nestas condições, o crescimento bacteriano na presença de ciprofloxacina foi significativamente mais baixo (Figura 5 A e C) do que na ausência do antibiótico (Figura 5 B e D). O nível de Stx1 foi maior no sobrenadante que no sedimento, e o maior nível de produção foi por volta das 4h do crescimento bacteriano (Figura 5 A). Não houve diferença na expressão da toxina no sobrenadante, independente da ausência ou presença de antibiótico (Figura 5 B). No sedimento, o pico de produção foi 2,5h na presença de ciprofloxacina e 7h na ausência do antibiótico (Figura 5 A e B).

Stx2 foi detectada no sobrenadante de 30 min até 8h do cultivo na presença de ciprofloxacina (Figura 5 C) embora na ausência do antibiótico, a produção da toxina foi entre 1-2,5h e 5-8h (Figura 5 D). A síntese de Stx2 no sedimento, na presença de antibiótico, ocorreu entre 1 e 3,5h (Figura 5 C), e na ausência de ciprofloxacina, ocorreu entre 30 min e 8h (Figura 5 D). Uma notável redução na produção de Stx2 foi observada na fração de sobrenadante sem ciprofloxacina (Figura 5 D), porém esse mesmo fenômeno não foi observado na mesma fração com a presença de antibiótico (Figura 5 C).

Figura 5 – Crescimento e expressão dos isolados 597(Stx1) (A e B) e 53B (Stx2) (C e D) em presença (A e C) ou ausência (B e D) de ciprofloxacina. O crescimento foi determinado por leitura da DO a 588 nm (—), expressão de Stx no sobrenadante (-----) e sedimento tratado com polimixina (.....) foi medida por ELISA a 492 nm.

Estes resultados nos levaram a caracterizar a expressão de Stx após 4h de crescimento em caldo *E. coli* (EC) na presença ou ausência de ciprofloxacina. Para confirmação, uma nova avaliação foi feita em 19 isolados de STEC (Tabela 2) no sobrenadante e no sedimento tratado com polimixina empregando soro policlonal anti-Stx2. Independente do fato dos isolados serem produtores de Stx1 ou Stx2, a melhor expressão em ambos foi observada no sobrenadante em presença de ciprofloxacina. Nestas condições, a taxa de densidade ótica variou entre 0,781 a 1,784 (Figura 6). Quando os isolados foram cultivados na ausência de ciprofloxacina, a expressão da toxina no sobrenadante variou entre 0,082 e 1,856 (Figura 6). No sedimento, ao contrário, ocorreu maior dispersão de valores de DO quando os isolados foram cultivados na presença de antibiótico. O uso de novobiocina não apresentou diferença estatística quando comparada com ciprofloxacina por teste t de Student ($P=0,74$) (Figura 6).

Figura 6 – Gráfico de dispersão representando a expressão de Stx em 19 isolados STEC cultivados em meio EC na presença e ausência de ciprofloxacina ou novobiocina. A expressão de Stx foi mensurada a 492 nm em meio EC com ciprofloxacina nas frações de (■) sedimento tratado com polimixina e (□) sobrenadante ou em meio EC com novobiocina nas frações de (●) sedimento tratado com polimixina e (○) sobrenadante ou em meio EC sem antibiótico nas frações de (▲) sedimento tratado com polimixina e (△) sobrenadante.

4.2 Resposta imune de camundongos

Na titulação do soro anti-Stx1 foram observados valores superiores a uma DO até a diluição de 1:3.200 (Figura 7 A); e para o soro anti-Stx2 estes valores foram observados até diluição de 1:1.600 (Figura 7 B). Os soros pré-imunes dos camundongos não mostraram a presença de anticorpos anti-Stx1 e anti-Stx2 (Figura 7 A e B).

Figura 7 – Titulação dos soros de camundongos imunizados com os toxóides Stx1 (A) e Stx2 (B). Placas de ELISA sensibilizadas com 1 µg/ml das toxinas Stx1 e Stx2 e incubadas com os soros pré-ímunos (azul), e após imunização (vermelho) em diferentes diluições, seguido de incubação com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:10.000). Como solução cromógena foi utilizado OPD com adição de H₂O₂ e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).

4.3 Híbridomas

As fusões para obtenção dos híbridomas resultaram em:

- 232 hibridomas anti-Stx1, nos quais, apenas: 7 apresentaram DO acima de 1.0: B7 da primeira placa, E2, D5, E6 da terceira placa e D3, D11 e H3 da quarta placa de fusão. Outros 6 hibridomas apresentaram DO entre 0.9 - 0.5; e o restante com DO abaixo de 0,5.

- 39 hibridomas anti-Stx2, nos quais, dois hibridomas apresentaram DO acima de 1.0: A11 e D7 da primeira placa de fusão. O hibridoma E8 da segunda placa de fusão apresentou DO 0,968 e o F11 apresentou DO 0,766. O restante apresentou DO abaixo de 0.3.

Os hibridomas positivos foram transferidos para uma placa de 24 poços para posteriores testes.

4.4 Sub-clonagem e classificação dos hibridomas anti-Stx1 e anti-Stx2

4.4.1 Hibridomas anti-Stx1

Os clones positivos por ELISA foram transferidos para a placa de 24 poços. Para selecionar quais hibridomas seriam submetidos à primeira diluição limite para obtenção do que chama-se de K1, os hibridomas B7, E5 e F5, referentes a primeira placa de fusão (K0), os hibridomas F2 e C12, referentes a segunda placa de fusão (K0), os hibridomas D5, E2, F1, E6, H3 e A12, referentes a terceira placa de fusão (K0) e os hibridomas D3, D11, A3, D9 e E3, referentes a quarta placa de fusão (K0) foram testados quanto a sua estabilidade e a qual isotipo pertenciam. Foi observado grande mistura de isotipos IgG, e sub-classes IgA, IgM, porém com uma predominância de IgG1. Para diluição limite foi escolhido o hibridoma E2 por apresentar menor número de isotipos de IgG, o que reduziria o número de clonagens para obtenção de um hibridoma que secretasse somente um subtipo IgG. Após diluição limite de E2, os clones K1 positivos para Stx1 foram novamente testados quanto aos seus isotipos. Por meio deste procedimento foram realizadas duas diluições limite, porém, não obteve-se o hibridoma secretor somente de um isotipo IgG, ou seja, ainda há um grupo heterogêneo de anticorpos secretados. Porém, o hibridoma K₂ mostrou-se predominantemente produtor de IgG1.

4.4.2 Hibridomas anti-Stx2

Quatro hibridomas positivos resultantes da fusão entre as células mielomatosas e as células dos linfonodos poplíteos dos camundongos imunizados com Stx2 foram transferidos para placa de 24 poços. Para selecionar quais hibridomas seriam submetidos à primeira diluição limite para obtenção de K_1 , os hibridomas A11 e D7 referentes a primeira placa de fusão (K_0) e os hibridomas E8 e F11, referentes a segunda placa de fusão (K_0), foram testados quanto a sua estabilidade e a qual isotipo pertenciam.

Foi escolhido o hibridoma E8 (K_0) para a diluição limite, obtendo-se assim o K_1 . Desta mesma forma foram realizadas sete diluições limite, com o objetivo de isolar um clone que respondesse a somente um subtipo de IgG. Comparando-se a evolução da 1ª até a 7ª diluição limite, houve uma considerável redução na resposta a IgA e IgM, enquanto que a resposta a produção do subtipo IgG1 manteve-se relativamente estável. Da mesma forma que o hibridoma anti-Stx1, não foi obtido um hibridoma secretor somente de um isotipo IgG, apesar disso, o hibridoma anti-Stx2 foi caracterizado por produzir predominantemente IgG1.

4.5 Purificação dos anticorpos

4.5.1 Obtenção da fração IgG do soro policlonal

Após diálise e filtração das frações IgG do soro policlonal de coelho anti-Stx1 e anti-Stx2, a dosagem protéica foi estimada em 14,78 mg/ml para fração anti-Stx1 e 7,04 mg/ml para fração anti-Stx2.

4.5.2 Obtenção dos anticorpos monoclonais

No processo de cromatografia empregado, foi possível o isolamento da IgG presente no sobrenadante dos hibridomas. Após diálise em água destilada, a dosagem protéica foi estimada em 0,64 mg/ml com rendimento de aproximadamente 1,8 mg em 300 ml de sobrenadante do cultivo celular para IgG anti-Stx1 e 0,46 mg/ml com rendimento de aproximadamente 1,2 mg para IgG anti-Stx2 em um

mesmo volume de sobrenadante.

O grau de purificação dos anticorpos produzidos pelos hibridomas verificados por SDS-PAGE mostraram a IgG de ambos os hibridomas, nas condições não-redutoras, um polipeptídeo de massa molecular relativa de 150 kDa (Figura 8 A e C) e redutoras (acrescidos de 2-mercaptoetanol), verificando nesta última, as frações das cadeias leves e pesadas dos anticorpos com massa molecular relativa de 50 e 25 kDa, respectivamente (Figura 8 B e D).

Figura 8 – Gel de poliacrilamida a 12%. IgG anti-Stx1 (A e B) e anti-Stx2 (C e D) purificadas em coluna de proteína A-Sepharose foram submetidas a eletroforese em condições não-redutoras (A e C) e redutoras (B e D) e visualizadas por coloração com Coomassie blue.

4.6 Caracterização dos anticorpos

4.6.1 Anticorpos policlonais

O limite de detecção obtido para o soro policlonal anti-Stx1 foi de 19 ng da toxina Stx1 e para o soro policlonal anti-Stx2 foi de 0,3 ng da toxina Stx2 (Figura 9).

Figura 9 – Curvas de titulação de Stx1 (A) e Stx2 (B) de 50 µg/ml a 5,4 pg/ml. O ensaio foi realizado utilizando soro policlonal de coelho diluído 1:50 seguido de incubação com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (1:10.000). Como solução cromógena foi utilizado OPD (Sigma) com adição de H₂O₂ e a leitura realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).

4.6.2 Anticorpos monoclonais

4.6.2.1 Constante de afinidade

Na primeira etapa, definiu-se por ELISA a concentração do anticorpo anti-Stx1 em 0,06 µg/ml e do anti-Stx2 em 0,05 µg/ml, os quais representaram a metade do valor da DO correspondente a saturação do anticorpo (Figura 10 A e C). Estas concentrações fixas foram utilizadas na segunda etapa, com diferentes concentrações do Stx correspondente. Estes, empregados na terceira etapa, resultaram na definição de que 0,01 µg/ml de Stx1 e 20 µg/ml de Stx2 corresponderam a 50% de inibição dos anticorpos da etapa 2 livres (Figura 10 B e D).

Figura 10 – Ensaio de ELISA de afinidade dos hibridomas anti-Stx1 ou anti-Stx2. Em A e C foram definidas as concentrações de anticorpo anti-Stx1 e anti-Stx2, respectivamente; em B e D foram definidas as concentrações de Stx1 e Stx2, respectivamente. Placas de ELISA sensibilizadas com 1 µg/ml da toxina Stx1 (A e B) ou Stx2 (C e D) incubadas com diferentes concentrações de IgG dos hibridomas anti-Stx1 (A) ou anti-Stx2 (C), e IgG anti-Stx1 com Stx1 (B) ou anti-Stx2 com Stx2 (D) correspondentes a etapa 2, seguidas da incubação com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:10.000). Como solução cromógena foi utilizado OPD (Sigma) com adição de H₂O₂ e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).

As constantes de afinidade calculadas resultaram em $3,4 \times 10^{-10}$ M para os anticorpos anti-Stx1 e $1,2 \times 10^{-7}$ M para os anticorpos anti-Stx2.

4.6.2.2 Reatividade por *Immunoblotting*

O anticorpo anti-Stx1 reconheceu por *immunoblotting* somente a subunidade A tanto para Stx1 como para Stx2 (Figura 11 A e B). Por outro lado, a reatividade do anticorpo anti-Stx2 reconheceu as subunidades A e B das duas toxinas (Figura 11 C e D).

Figura 11 – Membranas de nitrocelulose contendo frações protéicas das toxinas Stx1 (B e D) e Stx2 (A e C) incubadas com a fração IgG dos hibridomas anti-Stx1 (A e B) ou anti-Stx2 (C e D) seguido da incubação com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:2.000). Como solução reveladora foi utilizado DAB (Sigma) com adição de H_2O_2 .

4.7 Padronização de testes para o diagnóstico

4.7.1 Definição da concentração anticorpo policlonal x anticorpo monoclonal

Para definir qual a concentração em que o anticorpo monoclonal não apresenta reatividade cruzada com o anticorpo policlonal, foi realizado o ELISA na ausência do antígeno.

Os melhores resultados, nos quais os anticorpos não apresentaram reatividade cruzada, foram obtidos quando utilizadas no ensaio as concentrações de 2,5 $\mu\text{g/ml}$ do anticorpo monoclonal em todas as concentrações da fração IgG do soro policlonal e nas concentrações de 10 $\mu\text{g/ml}$ do anticorpo monoclonal em todas as diluições do soro policlonal (Tabela 3).

Tabela 3 – Reatividade cruzada obtida por ELISA dos anticorpos anti-Stx

Soro policlonal anti-Stx2		Anticorpo monoclonal anti-Stx1 (µg/ml)		
		20	10	2,5
Fração IgG (µg/ml)	500	0,257	0,139	0,042
	50	0,324	0,162	0,049
	5	0,337	0,183	0,053
Soro (diluição)	1:100	0,079	0,039	0,009
	1:1.000	0,115	0,053	0,019
	1:10.000	0,128	0,059	0,007

NOTA: Os valores estão representados em densidade ótica

Após este ensaio, isolados produtores e não produtores de Stx foram testados aplicando as concentrações encontradas no ensaio anterior. Para isso, foram utilizados isolados: 4, 67, 1132, 1189, 3003 e O55 (Tabela 1) e 6 isolados de *E. coli* não diarreiogênicas.

O ensaio mostrou a maior diferença na reatividade entre os isolados produtores e não produtores da toxina, quando a fração IgG do soro policlonal anti-Stx2 foi utilizada na concentração de 50 µg/ml e o IgG1 anti-Stx1 na concentração de 2,5 µg/ml.

Apesar de observadas diferenças entre isolados produtores e não produtores, novos testes utilizando anticorpos policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2 e monoclonais anti-Stx1 e anti-Stx2 na ausência do sobrenadante bacteriano mostraram que as concentrações de 250 µg/ml da fração IgG do soro policlonal anti-Stx1 e anti-Stx2 e 2,5 µg/ml do IgG1 anti-Stx1 e anti-Stx2 apresentaram melhores resultados para utilização em ensaios posteriores.

Após definição da concentração dos soros policlonais anti-Stx1 juntamente com anti-Stx2 e dos anticorpos monoclonais IgG1 anti-Stx1 e anti-Stx2, foram realizados ensaios utilizando diferentes combinações de anticorpos monoclonais, já que as variações das densidades ópticas observadas estavam relacionadas diretamente com os anticorpos monoclonais.

Utilizando-se sete isolados produtores e sete não produtores de Stx observou-se que a utilização de anticorpo monoclonal anti-Stx1 apresentou menor reatividade com os controles negativos e eficiência de resposta com os controles positivos. Neste caso, a análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre os

produtores e não produtores de Stx ($P < 0,05$), ao contrário do anticorpo monoclonal anti-Stx2 que não apresentou esta diferença ($P > 0,05$).

4.7.2 Definição do tipo de microplaca

Os valores de densidade ótica foram maiores em placa Maxisorp™ que em placa PolySorp™ (Tabela 4).

Tabela 4 – Resultado do ELISA em diferentes microplacas

Isolado	Controle	Microplaca	
		MaxiSorp™	PolySorp™
O55	Positivo	0,865	0,587
255	Negativo	0,169	0,093
Caldo EC	Negativo	0,166	0,155

NOTA: Os valores estão representados em densidade ótica

O soro de cabra anti-camundongo foi testado nas diluições de 1:5.000 e 1:10.000 em solução contendo 1% de BSA. Os resultados foram semelhantes, porém, a diluição de 1:5.000 foi adotada para os ensaios posteriores por apresentar maior diferença entre o controle positivo e o negativo em relação a diluição de 1:10.000 (Figura 12).

Figura 12 – Dados resultantes do ELISA de Captura. Placa de ELISA sensibilizada com a fração IgG dos soros policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2 (250 µg/ml) e incubados com o sobrenadante do isolado bacteriano produtor (vermelho) e isolado não produtores (azul) da toxina de Shiga, capturados com anticorpo monoclonal anti-Stx1 (2,5 µg/ml) e incubados com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (A) 1:5.000 e (B) 1:10.000. Como solução cromógena foi utilizado OPD (Sigma) e H₂O₂ e leitura realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems). As barras representam o erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em duplicatas.

Com relação ao ensaio dos sobrenadantes frescos e congelados, observamos que não houve diferença significativa na preservação das toxinas entre o sobrenadante nos dois processos mencionados (Figura 13).

Figura 13 – Dados resultantes do ELISA de Captura. Placa de ELISA sensibilizada com a fração IgG dos soros policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2 (250 µg/ml) e incubada com o sobrenadante do isolado bacteriano produtor (vermelho) e isolado não produtor (azul) da toxina de Shiga nas condições de fresco e congelado. As toxinas foram capturadas com anticorpo monoclonal anti-Stx1 (2,5 µg/ml) e incubadas com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (1:5.000). Como solução cromógena foi utilizada OPD (Sigma) e H₂O₂ e leitura realizado a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems). As barras representam o erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em duplicatas.

4.8 Aplicação do ELISA de captura em isolados bacterianos e comparação com o ensaio padrão para definição de STEC

A média de corte (*cut off*) do ELISA de captura foi definida utilizando-se a média dos valores das densidades óticas dos isolados não-STECS x 5. Esse corte foi então definido como 0,070 à 492 nm. Desta maneira, todos os resultados do ELISA de captura que apresentaram a DO abaixo de 0,070 foram considerados negativos, por outro lado, todos os resultados que apresentaram a DO acima de 0,07 foram consideradas positivos.

Após o ensaio de captura padronizado, este foi utilizado testando-se 149 isolados, dentre eles, 49 isolados de *E. coli* que possuem o gene *stx* e 100 isolados não-STECS. Dentre os isolados de STECS que possuem o gene *stx*, 46 foram considerados verdadeiramente positivos pelo ensaio padrão de citotoxicidade em célula Vero. Os isolados 53B, 5 e 94 não foram positivos para o ensaio de célula Vero, portanto, não foram incluídos nos cálculos de sensibilidade e eficiência (Tabela 5).

Observou-se que 35 (80,7%) isolados bacterianos produtores de Stx foram reconhecidos por ELISA como STECS e 11 (19,3%) isolados bacterianos produtores de Stx não foram reconhecidos como STECS (Figura 14).

Figura 14 – Resultado em porcentagem do ELISA de captura dos isolados produtores de Stx. Em azul, os isolados de STECS produtores de Stx que foram positivos por ELISA e em amarelo, os isolados produtores de Stx que não foram positivos para o ensaio de ELISA.

O ELISA de captura não foi capaz de reconhecer os isolados 1132, 1189, 1, 2, 20, 41, 59, 79, 82, 96 e O3, porém estes isolados foram positivos no ensaio de célula Vero (Tabela 5). Após o ELISA de captura padronizado e sua aplicação nos 149 isolados, calculou-se a acurácia do diagnóstico; obtendo-se uma sensibilidade de 80,7 %, especificidade de 100% e eficiência de 93%.

Tabela 5 - Comparação do ELISA de captura e ensaio de citotoxicidade em célula Vero

Isolado	Presença do gene	ELISA de captura	Citotoxicidade em célula Vero
1	<i>stx2</i>	-	+
2	<i>stx2</i>	-	+
4	<i>stx1/stx2</i>	+	+
5	<i>stx1</i>	-	-
9	<i>stx1/stx2</i>	+	+
11	<i>stx1</i>	+	+
16	<i>stx1</i>	+	+
20	<i>stx1</i>	-	+
23	<i>stx1</i>	+	+
26	<i>stx1</i>	+	+
27	<i>stx1</i>	+	+
41	<i>stx2</i>	-	+
44	<i>stx1/stx2</i>	+	+
45	<i>stx1/stx2</i>	+	+
50	<i>stx2</i>	+	+
53	<i>stx1/stx2</i>	+	+
53B	<i>stx2</i>	-	-
55	<i>stx1/stx2</i>	+	+
57B	<i>stx1</i>	+	+
59	<i>stx2</i>	-	+
59B	<i>stx1</i>	+	+
60	<i>stx1</i>	+	+
61	<i>stx1</i>	+	+
62	<i>stx1</i>	+	+
64	<i>stx1</i>	+	+
66	<i>stx1/stx2</i>	+	+
67	<i>stx1</i>	+	+
79	<i>stx2</i>	-	+
81	<i>stx1/stx2</i>	+	+
82	<i>stx2</i>	-	+
82B	<i>stx1</i>	+	+
94	<i>stx2</i>	-	-
96	<i>stx2</i>	-	+
597	<i>stx1</i>	+	+
1132	<i>stx2</i>	-	+
1189	<i>stx2</i>	-	+
3003	<i>stx1/stx2</i>	+	+
4123	<i>stx1</i>	+	+
3299-85	<i>stx1</i>	+	+
46240	<i>stx1</i>	+	+
3104-88	<i>stx1/stx2</i>	+	+
3077-88	<i>stx1</i>	+	+
C7-88	<i>stx1</i>	+	+
O1	<i>stx1</i>	+	+
O17	<i>stx1</i>	+	+
O3	<i>stx2</i>	-	+
O22	<i>stx2</i>	+	+
O55	<i>stx1/stx2</i>	+	+
O36	<i>stx1/stx2</i>	+	+

5 DISCUSSÃO

Dentre as categorias de *E. coli* diarreio gênica, isolados de *E. coli* produtores da toxina de Shiga (STEC) estão relacionados a um largo espectro de doenças humanas, desde diarreias leves até doenças severas como colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica, causadas por essas potentes toxinas. A relevância clínica e epidemiológica das STEC tem levado há vários estudos sobre mecanismos de patogenicidade, diagnóstico, tratamento e prevenção.

Uma das preocupações epidemiológicas é a possível disseminação de STEC em nosso país. Esta disseminação pode ser favorecida pela presença do grande rebanho bovino, aliada ao fato dos ruminantes constituírem-se em principais reservatórios dessas bactérias. Estudos mostram que a presença de STEC em nosso rebanho bovino varia de 12 a 95%, dependendo da região estudada (CERQUEIRA et al., 1999; LEOMIL et al., 2003; MOREIRA et al., 2003; IRINO et al., 2005; FARAH et al., 2007; TIMM et al., 2007).

Nos últimos anos, um grande número de métodos imunossorológicos para detecção de Stx foi desenvolvido, entre eles: ELISA, *colony immunoblot* e aglutinação passiva em látex, para identificação e confirmação de isolados de amostras clínicas (STROCKBINE et al., 1998) e de alimentos (VERNOZY-ROZAND, 1998; BÔER; HEUVELINK, 2001). Este crescente número de diferentes métodos comercialmente disponíveis para detecção de Stx dificulta a escolha para o diagnóstico laboratorial, pois nem todos foram avaliados quanto a sua sensibilidade em laboratórios independentes (BETTELHEIM; BEUTIN, 2003). Além disso, estes testes não são utilizados na rotina laboratorial dos países em desenvolvimento porque são extremamente caros (STROCKBINE et al., 1998).

Neste contexto, surgiram os objetivos desse trabalho que foi a padronização e o desenvolvimento de ELISA de captura, utilizando anticorpos policlonais e monoclonais contra as toxinas de Shiga.

Para isso, primeiramente verificamos que em geral, existia um senso comum de que o nível de expressão de toxinas era dependente do meio em que a bactéria era cultivada. Em 1982, O'Brien et al. descreveram três categorias de *E. coli* produtora da toxina de Shiga compreendendo: baixa, moderada e alta produção da toxina. Desde esta descrição, diferentes meios para cultivo ou para enriquecimento

foram empregados em diagnóstico de STEC com o objetivo de detectar diferentes níveis de Stx. Contudo, os dados disponíveis em relação ao meio mais adequado eram divergentes. Vimont et al. (2006) revisaram a literatura citada sobre protocolos de enriquecimento para detecção de STEC em diferentes matrizes e concluíram que o meio Trypticase Soy Broth (TSB) era o meio de enriquecimento mais freqüentemente utilizado (39,3%), seguido do meio *E. coli* (25,3%) e bacto-água peptona (BPW) (15,6%). De acordo com estes autores existiam poucos estudos comparando a eficácia de protocolos de enriquecimento, além disso, os resultados foram divergentes dependendo do grupo de pesquisa (VIMONT et al., 2006).

Como não existia na literatura um trabalho comparando os meios de cultivo para a expressão das toxinas de Shiga sob as mesmas condições de cultivo, decidiu-se definir um método padrão para possível aumento da produção das toxinas. A escolha dos meios foi realizada através de pesquisa bibliográfica dos meios utilizados para crescimento de *E. coli* produtores das toxinas de Shiga (KONOWALCHUCK et al., 1978; O'BRIEN et al., 1982; KARMAI et al., 1985; DONOHUE-ROLFE et al., 1989; INGRAM et al., 1998; BEUTIN et al., 2002).

Dentre todos os meios testados, o caldo EC foi o meio em comum que mais aumentou a expressão de ambas as toxinas no período entre 3,5 a 4,5h. Depois de eleito o meio mais adequado e revisando a literatura, constatamos que a expressão de Stx é aumentada com a adição de antibiótico ao meio de cultivo. O antibiótico mais usado para Stx, segundo Vimont et al. (2006) foi novobiocina, mas, também a ciprofloxacina estimula a toxina associada à bactéria (Strauch et al., 2004). Estas informações levaram a novos experimentos, nos quais, isolados de STEC foram cultivados em meio EC em presença ou ausência de antibiótico. Além disso, a presença de ambas as toxinas foi pesquisada tanto no sedimento tratado com polimixina, quanto no sobrenadante bacteriano. Constatou-se que a produção de Stx1 foi maior na fração do sobrenadante. A produção de Stx2 ocorreu nas primeiras horas de cultivo no sedimento tratado com polimixina, por outro lado, a expressão no sobrenadante foi observada posteriormente.

Embora, o isolado 53B apresentasse um decréscimo na produção de Stx2 no sobrenadante em 4 horas de cultivo, quando cultivado na presença de antibiótico esse fato não ocorreu. Além disso, também o isolado 1139 cultivado nas mesmas condições em vários tempos, não houve decréscimo na expressão de Stx2 (dados

não mostrados). Estes ensaios confirmatórios sugerem uma interferência experimental no primeiro resultado apresentado do isolado 53B.

Na definição de um protocolo em comum de crescimento para a expressão de Stx1 e Stx2, optou-se por escolher a fração do sobrenadante, já que as duas toxinas foram produzidas em maior quantidade nesta fração em relação ao sedimento tratado com polimixina.

Conforme constatamos, esta é a primeira vez que uma avaliação para expressão de Stx em diferentes meios usando os mesmos parâmetros foi feita. Uma vez que a detecção bem sucedida depende da produção de proteínas em quantidades suficientes para detecção (ZHANG et al., 2008), os resultados descritos constituem uma importante contribuição para detecção de isolados de STEC, mostrando a eficácia de cada meio na variação da expressão destas toxinas e permitindo rápido diagnóstico (ROCHA; PIAZZA, 2007).

No laboratório de Bacteriologia (Instituto Butantan) foram obtidos soros policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2. Esses antissoros foram utilizados na padronização do *colony immunoblot*, *immuno-dot* e ELISA, mas, somente por ELISA uma mistura de ambos os soros foi capaz de reconhecer seis isolados de STEC; apesar de apresentarem um limite de detecção das toxinas na ordem de nanogramas (MENDES-LEDESMA et al., 2008). Como a maioria dos ensaios de ELISA disponíveis comercialmente utiliza anticorpos policlonais e monoclonais para detecção de isolados de STEC decidiu-se obter anticorpos monoclonais para capturar as toxinas de Shiga.

A fusão das células mielomatosas de camundongo com as células dos linfonodos poplíteos dos camundongos imunizados com as toxinas Stx1 e Stx2 resultaram em 13 hibridomas anti-Stx1 e quatro hibridomas anti-Stx2. Alguns desses hibridomas produziam predominantemente IgM, outros produziam somente IgM e IgA, sub-classes que não são interessantes para os objetivos do presente trabalho, já que anticorpos da classe IgM não são boas ferramentas para diagnóstico e anticorpos da classe IgA são mais úteis na imunoterapia. Para a obtenção dos anticorpos monoclonais escolheu-se dois hibridomas: um anti-Stx1 e outro anti-Stx2, ambos predominantemente pertencentes à subclasse IgG1.

Tendo-se disponíveis anticorpos policlonais e monoclonais decidiu-se investir no ELISA de captura (MENEZES et al., 2006), por ser um método quantitativo e que aumenta a sensibilidade. A padronização deste ensaio envolveu várias etapas. A

primeira etapa foi a definição de qual soro policlonal utilizar na sensibilização das microplacas e em qual concentração: anti-Stx1 ou anti-Stx2 ou uma mistura de ambos, pois sabia-se que o soro de coelho anti-Stx2 reconhecia por *immunoblotting* ambas as toxinas, Stx1 e Stx2, diferentemente do soro anti-Stx1. A reatividade destes soros com as respectivas toxinas foi idêntica, ambos reconhecendo as duas subunidades (MENDES-LEDESMA, 2008). Após várias combinações definiu-se que uma mistura de 250 µg/ml da fração enriquecida em IgG dos soros policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2 apresentaram melhores resultados para utilização no desenvolvimento do ELISA.

A definição do anticorpo monoclonal para captura da reação também foi investigada de várias formas, primeiro precisou-se definir uma concentração que não apresentasse reatividade cruzada com a fração enriquecida em IgG do anticorpo policlonal. Também foi necessário definir se o anticorpo monoclonal anti-Stx1 ou o anti-Stx2 ou uma mistura de ambos seria utilizada, uma vez que, por *immunoblotting* o anticorpo monoclonal IgG1 anti-Stx1 reconheceu somente a subunidade A tanto para Stx1 como para Stx2. Por outro lado, as subunidades A e B das duas toxinas foram reconhecidas pelo anticorpo monoclonal IgG1 anti-Stx2. No entanto, a definição entre isolados produtores e não produtores da toxina de Shiga foi observada quando na concentração de 2,5 µg/ml do anticorpo monoclonal IgG1 anti-Stx1 na captura do antígeno, esses resultados mostraram que as variações das densidades óticas observadas estavam relacionadas diretamente com as constantes de afinidade dos anticorpos monoclonais, definidas como $3,4 \times 10^{-10}$ M para os anticorpos anti-Stx1 e $1,2 \times 10^{-7}$ M para os anticorpos anti-Stx2.

Três outros parâmetros foram também estabelecidos nessa padronização: a utilização da microplaca MaxisorpTM (NUNC) onde os valores de absorbância foram superiores aos observados na microplaca PolysorpTM (NUNC); a diluição de 1:5.000 do soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase, por apresentar maior diferença entre o controle positivo e o negativo; por fim, a utilização de sobrenadantes congelados, já que não foi encontrada diferença significativa na preservação das toxinas entre o sobrenadante fresco e congelado.

Após todos os parâmetros definidos, avaliou-se a sensibilidade, especificidade e eficiência do ELISA de captura em 149 isolados bacterianos. Dentre os 49 isolados que possuem o gene *stx*, 46 foram positivos e três negativos no ensaio padrão de citotoxicidade em células Vero. Por outro lado, o ELISA de

captura reconheceu 35 isolados como positivos e 11 como negativos, dentre aqueles 46 isolados positivos no ensaio padrão. Desta forma, ao comparar o ensaio padrão com o ELISA de captura, obteve-se uma sensibilidade de 80,7 %, especificidade de 100% e eficiência de 93%.

É importante ressaltar que dentre os 11 isolados negativos por ELISA de captura e positivos por citotoxicidade em célula Vero, somente um isolado (41) foi tão citotóxico quanto o controle. Por outro lado, 10 isolados apresentaram uma citotoxicidade parcial em ensaio de célula Vero. Essa citotoxicidade parcial se traduz como um efeito citotóxico que não se comportou como o padrão citotóxico do controle positivo, mas também, não se apresentou como o controle negativo. Porém, para fins de resultados, estes isolados foram considerados positivos, já que algum efeito celular foi observado. Este evento pode ser explicado pela hipótese desses isolados produzirem baixas concentrações de Stx; por esse motivo, não foram reconhecidos pelo ensaio de ELISA e apresentaram ação citotóxica reduzida.

Tendo em vista estes resultados intrigantes e para certificar se o meio estava influenciando a produção de Stx destes isolados, resolveu-se testar novamente os 11 isolados produtores que foram negativos por ELISA de captura. Porém, desta vez, os isolados foram cultivados em TSB e comparados com estes mesmos isolados cultivados em caldo EC com antibiótico. Neste ensaio comparativo de ELISA, resultados interessantes foram observados: justamente o isolado 41 quando cultivado em TSB foi positivo e quando cultivado em caldo EC com antibiótico foi negativo. Todavia, os outros dez isolados continuaram negativos, tanto em TSB quanto em caldo EC. Outros isolados de STEC também foram testados e apresentaram maior expressão em caldo EC com antibiótico (dados não apresentados). Portanto, com exceção do isolado 41, as STEC tiveram sua produção de Stx aumentada quando cultivadas em meio EC com ciprofloxacina, confirmando a padronização de cultivo já anteriormente estabelecida.

Chama-nos atenção a presença do gene *stx* em três isolados (5, 53B, 94) que, aparentemente, não expressam a toxina. Esses dados demonstram que a pesquisa genética por si só não seria suficiente como método único na detecção de STEC, pois somente a presença do gene não representa uma significância epidemiológica. Vale a pena ressaltar que a *E. coli* 53B possui o gene *stx2*, porém foi isolada de criança sem diarreia (BUERIS et al., 2007).

Segundo Bettelheim e Beutin (2003), resultados falso-positivos em PCR podem ser obtidos se as seqüências alvo estão presentes na amostra, tais como: fagos VT (Verotoxigênico) livres ou genes *stx* defectivos em bactéria, ou ainda, quando produtos de amplificação de PCR de seqüências de DNA alternadas são formados. Em um outro trabalho, Beutin (2006) comenta que o PCR detecta seqüência de genes, independente da expressão ou não da toxina.

Para contornar essa não detecção, vários ensaios de PCR-ELISA foram desenvolvidos (FACH et al., 2001; GE et al., 2002; PULZ et al., 2003) e podem detectar até 14% a mais de isolados comparando com teste de citotoxicidade em célula Vero (FACH et al., 2001). Recentemente um ensaio de *Immuno*-PCR foi desenvolvido com o objetivo de aumentar o sinal de Stx2 que não é detectado pelos ensaios imunológicos e de célula Vero (ZHANG et al., 2008). Este ensaio que se baseia no ELISA, combinando anticorpo de captura e amplificação de DNA, foi capaz de detectar 10 pg/ml de Stx2 purificado comparado a 1 ng/ml detectável pelo Ridascreen, sendo assim 100 vezes mais sensível (ZHANG et al., 2008).

A partir deste último trabalho surgiram os seguintes questionamentos: será que (1) os isolados possuidores do gene *stx* (não detectados pelo ensaio padrão de citotoxicidade em célula Vero e outros ensaios imunológicos como Premier EHEC), não estariam expressando a(s) toxina(s), ou (2) os métodos padrões não seriam capazes de detectar baixas quantidades de Stx? Revisando mais uma vez a literatura, verificou-se que as duas hipóteses seriam possíveis, dependendo do isolado em estudo (BETTELHEIM; BEUTIN, 2003; ZHANG et al., 2008). De qualquer forma, o ensaio de *Immuno*-PCR não seria aplicável em nosso país, já que exige equipamentos e reagentes de altos custos.

Desta maneira, mais uma vez, observa-se a importância dos testes imunossorológicos na detecção de *E. coli* produtora da toxina de Shiga. Testes como ELISA são aplicáveis em locais onde o acesso a testes como o *Immuno*-PCR seria impossível. Isto pode ocorrer, desde que o método seja sensível e específico e o sinal de toxina, previamente aumentado.

Em estudos comparativos de ELISA comercial como: Premier-EHEC, Ridascreen e Prospect relatam a sensibilidade variando entre 82,4 a 100% e a especificidade variando entre 91 a 100%, dependendo da avaliação realizada, onde levou-se em conta: o número de isolados positivos e o teste padrão comparativo. Kehl et al. (1997) avaliaram o Premier-EHEC em 974 isolados, dos quais, 15 eram

positivos por ensaio de célula Vero e obteve uma sensibilidade de 100% e especificidade de 99,7%. Novicki et al. (2000) avaliaram o Premier-EHEC em 488 isolados, dos quais, 14 eram STEC positivos por ensaio de célula Vero e obteve uma sensibilidade de 82,4% e especificidade de 100%.

Nestas duas avaliações, é possível encontrar dados que revelam ambigüidade em relação a sensibilidade do método. No caso da primeira avaliação, num total de 15 isolados positivos, 12 eram STEC O157:H7 e somente três eram STEC não-O157. Sabemos que na maioria dos kits disponíveis, a sensibilidade para O157 é superior a não-O157, alcançando, na maioria dos casos a 100%. Desta forma, a avaliação de Kehl e colaboradores torna-se tendenciosa a uma alta sensibilidade. Por outro lado, na avaliação de Novicki e colaboradores, num total de 14 isolados, 8 eram O157 e 6 não-O157. Desta vez, a sensibilidade tendeu a diminuir, já que o número de não-O157 aumentou.

Outra avaliação do Premier-EHEC levando em consideração como ensaio padrão o *colony dot blot* e o soro anti-O157, encontrou uma sensibilidade de 89% e especificidade de 91% após análise de 876 isolados (dentre eles, 56 STEC) (MACKENZIE et al., 1998). Recentemente, Griff et al. (2007) avaliaram o Premier-EHEC em 240 isolados, destes, 66 STEC positivas por PCR, e calculou em 95,4% e 97,2% a sensibilidade e especificidade, respectivamente.

O kit Ridascreen foi avaliado por Beutin et al. (2006) em 162 isolados positivos e 70 isolados negativos por PCR e ELISA não comercial. A sensibilidade foi de 95,7% e a especificidade foi de 98,7%.

O ProSpect foi avaliado num estudo de Gavin et al. (2004) em 974 isolados, destes, 15 eram STEC positivas por Premier-EHEC e MacConkey Sorbitol. A sensibilidade e especificidade foram de 100%.

As avaliações dos kits disponíveis comercialmente se tornam confusas e de impossível comparação, já que foram avaliados em estudos diferentes, com isolados diferentes, além de testes padrões de comparação distintos. Seria interessante, se um grande número de isolados de diferentes sorotipos de STEC fosse aplicado num estudo comparativo destes ensaios comerciais com o objetivo de esclarecer a acurácia dos diferentes ensaios. No entanto, este tipo de avaliação ainda não será possível em nosso laboratório, já que demanda custo e aquisição de isolados não encontrados em nosso país.

A falta destes kits no Brasil, ou seja, a não existência de um fabricante deste tipo de ensaio em nosso país; dificulta o diagnóstico de STEC por questões já relacionadas. Com a possibilidade de um produto brasileiro, a detecção de STEC teria menor custo e aplicável em laboratórios clínicos e não só em laboratórios de referências.

Existem outros tipos de kits imunológicos, conforme já citado; porém o uso de ELISA, PCR e ensaio de citotoxicidade em células Vero têm demonstrado maior sensibilidade e especificidade, por isso, ainda são considerados ensaios padrões. Neste contexto foi escolhido o ensaio de ELISA de captura, que de acordo com os resultados deste trabalho, apesar da sensibilidade não ter sido a esperada (próximo de 100%), se mostrou próxima da encontrada na literatura.

O estudo futuro de um método que aumente ainda mais a expressão de Stx, principalmente Stx2 está entre as perspectivas do grupo, o que poderá aumentar a sensibilidade do ELISA de captura, uma vez que o presente método não foi capaz de capturar os isolados que apresentam baixa produção de Stx2.

6 CONCLUSÕES

O conjunto de dados obtido neste trabalho permite definir que:

- os isolados de STEC cultivados em caldo EC contendo ciprofloxacina por um período entre 3,5 e 4,5 horas a 37 °C a 250 rpm apresentaram aumento da produção de Stx no sobrenadante;
- anticorpos monoclonais anti-Stx1 reconheceram a subunidade A de Stx1 e Stx2 e apresentaram maior constante de afinidade que anticorpos monoclonais anti-Stx2, que por sua vez, reconheceram as subunidades A e B de ambas toxinas;
- a utilização de 250 µg/ml da fração IgG do soro policlonal anti-Stx1 e anti-Stx2 na sensibilização de microplacas MaxisorpTM e posterior captura das toxinas com 2,5 µg/ml de anticorpo monoclonal anti-Stx1, permitiram a detecção de 80,7% dos isolados produtores das toxinas de Shiga.

REFERÊNCIAS

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.

BETTELHEIM, K. A.; BEUTIN, L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). **J. Appl. Microbiol.**, v. 95, p. 205-217, 2003.

BEUTIN, L. et al. Close association of verocytotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 2559-2564, 1989.

BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Human infections with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in Germany. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, p. 635-639, 1998.

BEUTIN, L.; ZIMMERMANN, S.; GLEIER, K. Evaluation of the VTEC-screen 'Seiken' test for detection of different types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* (STEC) in human stool samples. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 42, p. 1-8, 2002.

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.

BOER, E.; HEUVELINK, A. E. Evaluation of methods for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from foods and faeces. Proceedings of European Union concerted Action CT98-3935. Verocytotoxigenic *E. coli* in Europe. In: DUFFY, G.; GARVEY, P.; COIA, J.; WASTESON, Y.; MCDOWELL, D.A. Methods for Verocytotoxigenic *E. coli*. **J. Food Microbiol.**, v. 66, p. 25-35, 2001.

BOPP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 459-474.

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BROWN, J. E.; GRIFFIN, D. E.; ROTHMAN, S. W.; PROCTOR, B. P. Purification and biological characterization of Shiga toxin from *Shigella dysenteriae*. **Infect. Immun.**, v. 36, p. 996-1005, 1982.

BRUNDER, W.; KHAN, A. S.; HACKER, J.; KARCH, H. Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-). **Infect. Immun.**, v. 69, p. 4447-4457, 2001.

BUERIS, V. et al. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 839-844, 2007.

CALDERWOOD, S. et al. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM News.**, v. 62, p. 118-119, 1996.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.**, v. 36, p. 289-311, 2005.

CROWTHER, J.R. **The ELISA Guidebook.** Totowa: Humana Press, 2001. v. 149, 421 p.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). Manual de doenças transmitidas por alimentos (2000). Informe-net DTA, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Ecolinet.htm>. Acesso em: 02 set. 2007.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). Dados estatísticos de doenças transmitidas por alimentos no Estado de São Paulo. Síndrome hemolítico-urêmica e *E. coli* O157:H7. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/dados/ifnet9806_SHU.ppt>. Acesso em: 12 abr. 2007.

CERQUEIRA, A.M.F.; GUTH, B.E.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle at Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 70, p. 111-121, 1999.

DONOHUE-ROLFE, A.; KELLEY, M. A.; BENNISH, M.; KEUSCH, G. T. Enzyme-linked immunosorbent assay for Shigella toxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 24, p. 65-68, 1986.

DONOHUE-ROLFE, A.; ACHESON, D.W.K.; KANE, A.V.; KEUSCH, G.T. Purification of Shiga toxin and Shiga-like toxins I and II by receptor analog affinity chromatography with immobilized P1 glycoprotein and production of cross-reactive monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, v. 57, p. 3888-3893, 1989.

DOUGHTY, S.; SLOAN, J.; BENNETT-WOOD, V.; ROBERTSON, M.; ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 6761-6769, 2002.

ENGVALL, E.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin. **Immunochemistry**, v. 8, p. 871, 1971.

EVANS, D.G.; EVANS, D.J.; PIERCE, N.F.. Differences in the Response of Rabbit Small Intestine to Heat-Labile and Heat-Stable Enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 7, p. 873-880, 1973.

FACH, P.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; GROUT, J. Comparison between a PCR-ELISA test and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains. **J. Appl. Microbiol.**, v. 90, p. 809-818, 2001.

FARAH, S.M. et al. Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Parana State, southern Brazil. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 44, p. 607-12, 2007.

FRIGUET, B.; CHAFFONE, A. F.; DJAVADI-OHANIAN, L.; GOLDBERG, M. E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Immunol. Methods**, v. 77, p. 305-319, 1985.

GAVIN, P.J. et al. Evaluation of performance and potential clinical impact of ProSpecT Shiga toxin *Escherichia coli* microplate assay for detection of Shiga Toxin-producing *E. coli* in stool samples. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 1652-1656, 2004.

GE, B.; ZHAO, S.; HALL, R.; MENG, J. A PCR-ELISA for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 285-290, 2002.

GRIF, K.; ORTH, D.; DIERICH, M. P.; WÜRZNER, R. Comparison of an immunochromatographic rapid test with enzyme-linked immunosorbent assay and polymerase chain reaction for the detection of Shiga toxins from human stool

samples. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 59, p. 97-99, 2007.

GUTH, B.E.C.; SOUZA, R.L.; VAZ, T.I.M.; IRINO, K. 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

INFORMES TÉCNICOS INSTITUCIONAIS. Diarréia e rotavírus. **Rev. Saúde Pública**, v. 38, p. 844-845, 2004.

INGRAM, D.T.; LAMICHHANE, C.M.; ROLLINS, D.M.; CARR, L.E.; MALLINSON, E.T.; JOSEPH, S.W. Development of a Colony Lift Immunoassay To Facilitate Rapid Detection and Quantification of *Escherichia coli* O157:H7 from Agar Plates and Filter Monitor Membranes. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 5, p. 567-573, 1998.

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. 5, p. 29-36, 2005.

JARVIS, K. G.; GIRÓN, J. A.; JERSE, A. E.; McDANIEL, T.K.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 15, p. 7996-8000, 1995.

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 of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 1587-1595, 2006.

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

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

KARMALI, M. A.; PETRIC, M.; LIM, C.; CHEUNG, R.; ARBUS, G. S. Sensitive method for detecting low numbers of verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of verotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 22, p. 614-619, 1985

KEHL, K. S.; HAVENS, P.; BEHNKE, C. E.; ACHESON, D. W. Evaluation of the premier EHEC assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2051-2054, 1997.

KEHL, S. C. Role of the Laboratory in the Diagnosis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2711-2715, 2002.

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

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, J. R. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. 1395 p.

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

KONOWALCHUK, J.; DICKIE, N.; STAVRIC, S.; SPEIRS, J.I. Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 22, p. 644-648, 1978.

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.

MACKENZIE A. M. et al. Sensitivities and specificities of premier *E. coli* O157 and premier EHEC enzyme immunoassays for diagnosis of infection with verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli*. The SYNSORB Pk Study investigators. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 1608-1611, 1998.

MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? **J. Appl. Microbiol.**, v. 98, p. 1332-1344, 2005.

MENDES-LEDESMA, M. R. B. **Avaliação de Métodos Imunossorológicos na Detecção de Isolados de *Escherichia coli* Produtora da Toxina de Shiga (STEC)**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MENDES-LEDESMA, M. R. B. et al. STEC detection by policlonal sera against Stx. **Microbiol. Immun.**, 2008. In press.

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, n. 875-880, 2006.

MOREIRA, C.N. et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 93, p. 179-183, 2003.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NICHOLLS, L.; GRANT, T. H.; ROBINS-BROWNE, R. M. Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v. 35, p. 275-288, 2000.

NOVICKI, T. J.; DALY, J. A.; MOTTICE, S. L.; CARROLL, K. C. Comparison of sorbitol MacConkey agar and a two-step method which utilizes enzyme-linked immunosorbent assay toxin testing and a chromogenic agar to detect and isolate enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 547-551, 2000.

O'BRIEN, A. D.; LAVECK, G. D.; THOMPSON, M. R.; FORMAL, S. B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, v. 146, p. 763-769, 1982.

O' BRIEN, A. D.; LIVELY, T. A.; CHANG, T. W.; GORBACH, S. L. Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. **Lancet**, v. 2, p. 573, 1983.

O' BRIEN, A. D.; MARQUES, L. R.; KERRY, C. F.; NEWLAND, J. W.; HOLMES, R. K. Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933. **Microb. Pathog.**, v. 6, p. 381-390, 1989.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). A saúde no Brasil – Representação da OPAS/OMS no Brasil. 1998. Disponível em: <<http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/SAUDEBR.PDF#search=%22Gastos%20com%20diarreia%20Brasil%22>>. Acesso em: 15 set. 2006.

O'RYAN, M. et al. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, p.125-136, 2005.

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

PATON, A. W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M. C.; PATON, J.C. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6999-7009, 2001.

PERERA, L. P.; MARQUES, L. R. M.; O'BRIEN, A. D. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-Like Toxin II of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbent assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 2127-2131, 1988.

PULZ, M. et al. Comparison of a shiga toxin enzyme-linked immunosorbent assay and two types of PCR for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 4671-4675, 2003.

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

ROCHA, L. B.; PIAZZA, R.M. Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* (STEC) in broth media: from divergence to definition. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 45, p. 411-417, 2007.

SCHEUTZ, F.; BEUTIN, L.; PIERARD, D.; SMITH, H. Nomenclature of verotoxins. In: DUFFY, G.; GARVEY, P.; MCDOWELL, D.A. **Verocytotoxigenic E. coli**. Trumbull: Food and Nutrition Press, 2001. p. 447-452.

SCHMIDT, H.; GEITZ, C.; TARR, P. I.; FROSCH, M.; KARCH, H. Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. **J. Infect. Dis.**, v. 179, p. 115-123, 1999.

SCHMIDT, H. et al. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6863-6873, 2001.

SHUMAN, M.; WILDE, C. D.; KÖHLER, G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. **Nature**, v. 276, p. 269-270, 1978.

STRAUCH, E.; SCHAUDINN, C.; BEUTIN, L. First-Time Isolation and Characterization of a Bacteriophage Encoding the Shiga Toxin 2c Variant, Which Is Globally Spread in Strains of *Escherichia coli* O157. **Infect. Immun.**, v. 72, p. 7030–7039, 2004.

STROCKBINE, N. A.; WELLS, J. G.; BOPP, C. A.; BARRETT, T. J. Overview of detection and subtyping methods. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, A. D. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli* strains. Washington: American Society for Microbiology, 1998. p. 331-356.

TATSUNO, I. et al. toxB gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 6660-6669, 2001.

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.

TORRES, A. G. et al. Identification and characterization of lpfABCC'DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 5416-5427, 2002.

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.

VERNOZY-ROZAND, C. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in food. **J. Appl. Microbiol.**, v. 82, p. 537-551, 1998.

VETTORATO, M. P.; LEOMIL, M.; GUTH, B. E.; IRINO, K.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Properties of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates from sheep in the State of São Paulo, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v. 95, p. 103-109, 2003.

VIMONT, A.; VERNOSY-ROZAND, C.; DELIGNETTE-MULLER, M. L. Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 42, p. 102-108, 2006.

WELINDER-OLSSON, C.; BADENFORS, M.; CHEASTY, T.; KJELLIN, E.; KAIJER, B. Genetic profiling of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains in relation to clonality and clinical signs of infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 659-964, 2002.

ZHANG, W. et al. A New Immuno-PCR Assay for the Detection of Low Concentrations of Shiga Toxin 2 and Its Variants. **J. Clin. Microbiol.**, 2008. In press.

ANEXO

ROCHA, L. B.; PIAZZA, R.M. Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* (STEC) in broth media: from divergence to definition. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 45, p. 411-417, 2007.

ORIGINAL ARTICLE

Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* (STEC) in broth media: from divergence to definition

L.B. Rocha and R.M.F. Piazza

Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

Keywords

broth media, diagnostic, polyclonal antibody, Stx, toxin production.

Correspondence

Roxane Maria Fontes Piazza, Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: roxane@butantan.gov.br

2006/1650: received 27 November 2006, revised 3 May 2007 and accepted 23 May 2007

doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02214.x

Abstract

Aims: To determine the suitability of eight different commercial broth media for Shiga toxin (Stx) production.

Methods and Results: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains producing *Stx1* or *Stx2* were grown at 37°C (250 rev min⁻¹) for 24 h in brain heart infusion broth, *E. coli* broth, Evans medium, Luria-Bertani broth, Penassay broth, buffered-peptone water, syncase broth and trypticase soy broth. Toxin production was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in polymyxin-treated cell pellets and/or supernatants of cultures. ELISA optical densities reached 1 when isolates were grown for 2–4 h in *E. coli* broth in the presence of antibiotic. Besides, a collection of STEC-expressing Stx strains was evaluated and the Stx production was assayed in the supernatants and in polymyxin-treated pellets of bacterial growth after 4 h of cultivation in *E. coli* broth in the presence of antibiotic.

Conclusions: The most suitable medium for Stx production was *E. coli* broth when the bacterial isolates were grown for 4 h in the presence of ciprofloxacin and the Stx production is detected in the supernatant.

Significance and Impact of the Study: This study presents the first comprehensive comparison of different broth media with regard to Stx production to establish optimal culture conditions for STEC detection in routine diagnostic laboratories.

Introduction

The expression of *Stx1* and/or *Stx2* genes characterizes Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains, and their products function as major virulence factors. The only way to identify all types of STEC, in any kind of test sample, is the detection of these toxins produced by the bacteria or of the genes associated with Shiga toxin (Stx) production (Bettelheim and Beutin 2003). O'Brien *et al.* (1982) described three categories of *E. coli* producing Shiga toxin, comprising trace-, low- to moderate-, and high-level producers of the toxin, and since this description, several distinct types of culture or enrichment media have been employed in STEC diagnosis in order to achieve detectable levels of Stx synthesis.

However, the data regarding the most suitable medium for that aim are divergent. Recently, Vimont *et al.* (2006) reviewed the cited literature describing enrichment protocols for STEC detection in different matrices and concluded that trypticase soy broth (39.3%), *E. coli* broth (EC; 25.3%) and buffered-peptone water (BPW; 15.6%) were the most frequently used enrichment broth. According to these authors, few studies to date have compared the efficacy of enrichment protocols, and their results vary depending on the research group. Furthermore, not even a comparison of different broth media for culturing isolates has been conducted. Thus, we evaluated the performance of different broth media in order to determine the most suitable and the best parameters for Stx production.

Materials and methods

Bacterial strains

We tested 19 bacterial isolates from our laboratory collection, previously characterized as STEC by the presence of *stx* gene assayed by polymerase chain reaction (PCR) and/or Stx production by Vero cell assay (VCA) (Table 1).

Broth media

The following broth media were employed in this study: brain heart infusion (BHI; 10 g peptone, 2.5 g Na₂HPO₄·2H₂O, 5 g NaCl, 2 g glucose, 5 g heart infusion and 12.5 g brain infusion per litre) (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France), EC (20 g casein, 5 g NaCl, 1.5 g KH₂PO₄, 4 g K₂HPO₄, 1.5 g bile salt mixture and 5 g lactose per litre) (HiMedia Laboratories, Mumbai, India), Evans medium (1.5 g yeast extract, 2.5 g NaCl, 8.71 g KH₂PO₄ and salts trace per litre) (Evans *et al.* 1973), Luria-Bertani broth (LB; 10 g tryptone, 5 g yeast extract and 10 g NaCl per litre), Penassay broth (5 g tryptone, 1.5 g yeast extract, 1.5 g beef extract, 3.5 g NaCl, 3.7 g KH₂PO₄, 1.3 g K₂HPO₄ and 1 g glucose per litre), BPW (3.5 g Na₂HPO₄·2H₂O, 5 g NaCl, 1.5 g K₂HPO₄ and 10 g peptone per litre), syncase broth (5 g tryptone, 10 g casein, 5 g K₂HPO₄, 1.18 g NH₄Cl, 2.5 g glucose and trace of salts per litre) and trypticase soy broth (TSB; 17 g casein, 5 g NaCl, 2.5 g K₂HPO₄, 3 g peptone and 2.5 g glucose per litre) (Merck, Rio de Janeiro, Brazil).

Broth medium selection and antibiotic influence

Broth medium selection was performed employing the STEC isolates 597 (Stx1) and 53 (Stx2). Initially, the isolates were precultivated in 5 ml of LB at 37°C with shaking (180 rev min⁻¹) for 18 h. Subsequently, dilutions of 1:100 of LB growth were added to flasks containing 40 ml of each broth medium tested and incubated at 37°C with shaking (250 rev min⁻¹). Aliquots of 1 ml from each flask containing the bacterial isolates were taken every 30 min for 5 h. Between 5 and 8 h of culture, 1-ml samples were collected at 1-h intervals. Immediately, each aliquot of the bacterial growth was measured for optical density (OD) at 588 nm and centrifuged at 13 000 g for 15 min. All supernatants were stored at -20°C until time of toxin assay. A volume of 1 ml of 0.1 mg ml⁻¹ of polymyxin was added to the pellets. The polymyxin-treated pellets were incubated at 37°C with shaking (250 rev min⁻¹) for 30 min, suspensions were centrifuged at 13 000 g for 15 min, and the supernatants were kept at -20°C until toxin assay.

Additionally, the STEC isolates 597 (Stx1) and 53 (Stx2) were grown in EC medium in the presence or absence of ciprofloxacin at a final concentration of 5 ng ml⁻¹. Bacterial growth and toxin production were determined in the supernatants or polymyxin-treated pellets. The 19 STEC strains (Table 1) were grown in EC at 37°C with shaking (250 rev min⁻¹) for 4 h in the presence or absence of 5 ng ml⁻¹ of ciprofloxacin or 20 µg ml⁻¹ of novobiocin, and toxin production was determined in the supernatants or polymyxin-treated pellets.

Table 1 Characteristics of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli*

Strain number	Serotype	Gene presence	Vero cell assay
53	O157:H7	<i>stx2</i>	-
597	OR:NM	<i>stx1</i>	+
1132	ONT:H49	<i>stx2</i>	+
1189	ONT:H49	<i>stx2</i>	+
3003	O48:H7	<i>stx1/stx2</i>	+
4123	O26:H11	<i>stx1</i>	+
57B	O26:H11	<i>stx1</i>	+
59	O26:H11	<i>stx1</i>	+
60	O26:H12	<i>stx1</i>	+
61	O26:H11	<i>stx1</i>	+
62	O26:H11	<i>stx1</i>	+
64	O26:H11	<i>stx1</i>	+
67	O26:H11	<i>stx1</i>	+
3299-85	O157:H7	<i>stx1/stx2</i>	+
46240	O157:H7	<i>stx1/stx2</i>	+
3104-88	O157:H7	<i>stx1/stx2</i>	+
C1520-77	O157:H7	<i>stx2</i>	-
C7-88	O157:H7	<i>stx1</i>	+
C374-83	O157:H7	<i>stx2</i>	-

Stx1 and Stx2 rabbit polyclonal antisera

The polyclonal antisera against Stx1 and Stx2 utilized in this study, detected their respective A (35 kDa) and B (7.5 kDa) toxin subunits by immunoblotting. The A subunit of the Stx1 toxin was recognized by anti-Stx2 antiserum and vice versa. In contrast, only Stx2-specific antiserum was found to neutralize both toxins (Mendes-Ledesma 2005). The purified Stx1 and Stx2 used for rabbit immunization were kindly donated by Dr Cheleste M. Thorpe (Tufts University School of Medicine, Boston, MA, USA).

Limit of toxin detection

The sensitivity of the antisera was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in which microplates were coated with different concentrations of purified Stx1 or Stx2 (from 5 µg to 54 pg). After blocking (10 g bovine serum albumin per litre of phosphate-buffered saline), the microplates were incubated with

anti-Stx1 or anti-Stx2 polyclonal antiserum diluted 1 : 50, followed by incubation with goat antirabbit antibodies conjugated to peroxidase (Zymed, San Francisco, CA, USA) diluted 1 : 5000. ELISA was developed with 0.5 mg ml⁻¹ of O-phenylenediamine (OPD; Sigma Aldrich Co, St Louis, MO) plus hydrogen peroxide, and the reaction was stopped by the addition of 1 mol l⁻¹ of HCl. The absorbance was measured at 492 nm in a Multiskan EX ELISA reader (LabSystems, Helsinki, Finland). The limit of detection for the antisera was defined as 0.5 OD, where preimmune rabbit serum served as the negative control. The lowest amount of toxin detected by ELISA was 19 ng for Stx1 using anti-Stx1 antiserum and 0.3 ng for Stx2 and 39 ng for Stx1 using anti-Stx2 antiserum.

Toxin production

Production of toxins in the isolates was determined by ELISA in which microplates were coated with 100 µl of supernatants and incubated at 4°C for 16–18 h. ELISA reaction was developed as described in the protocol for limit of toxin detection. In addition, the production of Stx1 and/or Stx2 in the 19 STEC strains (Table 1) was determined by ELISA employing rabbit anti-Stx2 antiserum.

Results

Growth and toxin production of STEC strains 597 (Stx1) and 53 (Stx2)

The growth of strain 597 after being cultivated in BPW followed by Evans, Penassay, LB, TSB and BHI showed OD values at 588 nm lower than those for syncase and EC, which had a longer lag phase (Fig. 1). Similar results were seen for strain 53 after being grown in the eight broth media (Fig. 2).

Stx1 was detected in the supernatant of strain 597 between 1.5 and 8 h, reaching a production peak at 4 h, when the bacterial isolate was grown in EC. In syncase medium, Stx1 was evident in the supernatant at 1.5 h, reaching a maximum level at 4 h, which was maintained through the stationary phase. In Evans medium, Stx1 was detected between 1.5 h and the time of the stationary phase. Levels of Stx1 in LB and BPW were higher in stationary growth phase than in log phase. The OD observed at production peaks of Stx1 in BHI, Penassay and TSB were 0.683, 0.511 and 0.724, respectively. These values decreased in stationary growth phase to 0.440, 0.227 and 0.476 (Fig. 1). Stx1 production was detected in the polymyxin-treated pellets only when strain 597 was grown in LB and Penassay broth after 4 and 5 h of growth, respectively (Fig. 1).

The earliest detection of Stx2 in the supernatants was when isolate 53 was grown in syncase (1 h), followed by

Penassay and EC (1.5 h), and BHI, LB, BPW and TSB (2 h). The production of Stx2 measured in the polymyxin-treated pellets began at 1 h of bacterial growth and maximum toxin levels were observed in BHI and TSB at 1 h, Evans at 2.5 h, LB at 1.5 h, Penassay at 2 h, BPW at 2 h, EC at 4 h and syncase at 4.5 h (Fig. 2). Among all the media tested, the highest level of Stx2 was observed when the bacteria were grown in Evans medium.

Production of Stx by STEC strains using *Escherichia coli* broth in the presence and the absence of antibiotic

The strains 597 (Stx1) and 53 (Stx2) were grown in EC broth medium in the presence or the absence of ciprofloxacin to determine the presence of the toxin in the supernatants or in the polymyxin-treated pellets. Bacterial growth in the presence of ciprofloxacin (Fig. 3a,c) was significantly lower than in the absence of this antibiotic (Fig. 3b,d). The level of Stx1 in isolate 597 was higher in the supernatant than in the pellet, and peak production was around 4 h of bacterial growth (Fig. 3a). No difference in the peaks of Stx1 in the supernatant was observed in the presence or absence of ciprofloxacin (Fig. 3b). In the pellets, the peaks of Stx1 production were 2.5 h when ciprofloxacin was added and 7 h in the absence of the antibiotic (Fig. 3a,b).

Stx2 was detected in the supernatant of isolate 53 from 30 min up to 8 h of growth in the presence of ciprofloxacin (Fig. 3c) while in its absence toxin production was seen at 1–2.5 h and 5–8 h, respectively (Fig. 3d). The synthesis of Stx2 in the pellet with antibiotic present, occurred between 1 and 3.5 h (Fig. 3c), and in the absence of ciprofloxacin, it occurred between 30 min and 8 h (Fig. 3d). These results led us to further characterize the production of Stx after 4 h of bacterial growth in EC broth in the presence or absence of ciprofloxacin; this evaluation was performed by ELISA employing anti-Stx2 antiserum to assay the supernatants and polymyxin-treated pellets of the 19 STEC isolates used. Despite the fact that the isolate was either Stx1 or Stx2-expressing strain, the best production was observed in the supernatants of broth cultures grown in the presence of antibiotic, where under these conditions the range of OD varied from 0.781 to 1.784 (Fig. 4). When the isolates were grown in the absence of ciprofloxacin, OD were from 0.082 to 1.856 in the supernatants (Fig. 4). The use of novobiocin showed no statistical difference ($P = 0.74$) when compared with ciprofloxacin by Student's *t*-test (Fig. 4).

Discussion

It is understandable that the level of toxin expression is dependent on the medium in which the bacteria are

Figure 1 Growth and Shiga toxin (Stx) production by *Escherichia coli* 597 (Stx1) in different culture media. Growth was determined by optical density readings at 588 nm (—), and production of Stx1 in the supernatants (---) and polymyxin-treated pellets (···) were measured by ELISA at 492nm.

Figure 2 Growth and Shiga toxin (Stx) production by *Escherichia coli* 53 (Stx2) in different culture media. Growth was determined by optical density readings at 588 nm (—), and production of Stx2 in the supernatants (---) and polyxin-treated pellets (···) were measured by ELISA at 492nm.

Figure 3 Growth and Shiga toxin (Stx) production by *Escherichia coli* 597 (Stx1) (a and b) and *E. coli* 53 (Stx2) (c and d) in presence (a and c) or absence (b and d) of ciprofloxacin. Growth was determined by optical density readings at 588 nm (—), and production of Stx in the supernatants (---) and polymyxin-treated pellets (···) were measured by ELISA at 492 nm.

Figure 4 Production of Shiga toxin (Stx) in *Escherichia coli* (EC) medium in the presence or absence of 0.5 mg l^{-1} of ciprofloxacin or 2 g l^{-1} of novobiocin. Production of the Stx was measured by enzyme-linked immunosorbent assay at 492 nm in the polymyxin-treated pellets in the presence of ciprofloxacin (■); in the supernatants in the presence of ciprofloxacin (□); in the polymyxin-treated pellets in the presence of novobiocin (●); in the supernatants in the presence of novobiocin (○); in the polymyxin-treated pellets in the absence of the antibiotic (▲); and in the supernatants in the absence of the antibiotic (△).

grown, but it may not be clear as to which is the most suitable medium, at least for Stx production. These facts led us to examine Stx synthesis in bacterial isolates grown under the same conditions but in eight different

broth media. Regarding the growth curve, the behaviour of the two strains was similar in all broth media, with the exception of BPW and EC, where growth was poor in the former and delayed in the latter, but incomparably higher compared with the other media. Besides, when testing more strains in the eight broth media studied, we observed similar growth curves (data not shown).

Concerning toxin production, when the strains 597 and 53 were cultivated in the eight broth media, both strains were able to produce Stx. Usually Stx1 is secreted into the medium and our results confirmed that the level of Stx1 production in the polymyxin-treated pellets was lower than in the supernatants. The synthesis of Stx1 in strain 597 started earlier in syncase followed by EC and Evans media.

Stx2 has been shown to be periplasmatic and not secreted into the medium and polymyxin has been shown to be effective for extracting intracellular proteins from gram-negative bacteria (Cerny and Tauber 1971), although in Fig. 2, Stx2 in strain 53 was detected either in the supernatant or in the polymyxin-treated pellet.

Moreover, when testing more strains in the eight broth media evaluated, we observed that Stx production was strain-dependent, i.e. each strain showed different toxin levels depending on the broth medium in which they were cultivated. For example, the supernatant level of Stx1 in strain 4123 grown in Evans medium differed from

that for strain 597 (data not shown), and strain 1189 grown in syncase broth showed Stx production in the supernatant or in the polymyxin-treated pellet that was lower than that for strain 53 (data not shown).

In general, the production of Stx in EC broth was always higher when compared with the other broth media, but the level of Stx detected was variable. The formulation of EC broth may explain its relatively common use in the enrichment protocol. Indeed, the bile salts contained in EC inhibited the non-*Enterobacteriaceae* strains, which made up a majority of background microflora (Vernozy-Rozand and Ray-Gueniot 1997). Bacterial stress conditions, such as bile salts (de Jesus *et al.* 2005) and/or antibiotic presence, as showed in this study, results in increased expression and synthesis of virulence factors.

For Stx synthesis at least one antibiotic is added to the broth medium and novobiocin is the most common one used (Vimont *et al.* 2006). Also, ciprofloxacin stimulates the production of the toxin associated with the bacterium (Strauch *et al.* 2004). There was no statistical difference in the effect of novobiocin or ciprofloxacin on Stx production, but the required concentration of novobiocin was four thousand times higher than that of ciprofloxacin.

Stx was detected either in the supernatants or in the polymyxin-treated pellets. However, lower variability and higher levels of production were observed in the supernatants of the isolates grown in the presence of the antibiotic. These results emphasize that production of Stx was independent of bacterial growth as the levels of Stx in the supernatants were similar, but bacterial growth was completely different.

In summary, a common protocol applicable for testing all Stx types should be as follows. An unknown bacterial colony is grown in LB at 37°C for 18 h with shaking (180 rev min⁻¹). A dilution of 1 : 100 of the LB growth is then added to the EC broth containing 5 ng ml⁻¹ of ciprofloxacin, which is incubated at 37°C for 4 h with shaking (250 rev min⁻¹). The bacterial culture was centrifuged at 13 000 g for 15 min and production of Stx was measured in the supernatant. These are important conditions for Stx1 and Stx2 detection. Besides, the use of a polyclonal antiserum that recognizes both toxins facilitates Stx detection by immunoserological assays, demonstrating that the peak level of Stx production was during the early phase of bacterial multiplication. This information on the optimal incubation period before harvesting cells for Stx detection can be helpful for diagnostic purposes because strains can be tested for Stx on the same day.

As far as we know, this is the first report of the determination of Stx production in different media using the same parameters. Accordingly, the results described here constitute an important contribution to the detection of STEC isolates, showing the efficacy of each broth medium in the production of these important toxins and allowing a rapid diagnosis.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP, Brazil (Grant 04/12136-5 to R.M.F. Piazza and fellowship to L.B. Rocha). The authors thank Dr Waldir P. Elias and Dr Martha H. Sonobe for helpful suggestions.

References

- Bettelheim, K.A. and Beutin, L. (2003) Rapid laboratory identification and characterization of Verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *J Appl Microbiol* **95**, 205–220.
- Cerny, G. and Tauber, M. (1971) Differential release of periplasmic versus cytoplasmic enzymes from *Escherichia coli* B by polymyxin B. *Arch Mikrobiol* **78**, 166–179.
- Evans, D.G., Evans, D.J. Jr and Pierce, N.F. (1973) Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **7**, 873–880.
- de Jesus, M.C., Urban, A.A., Marasigan, M.E. and Barnett Foster, D.E. (2005) Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity. *J Infect Dis* **192**, 1430–1440.
- Mendes-Ledesma, M.R.B. (2005) Immunoassay evaluation for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Microbiology master thesis, São Paulo University: Biomedical Science Institute, p. 82.
- O'Brien, A.D., Laveck, G.D., Thompson, M.R. and Formal, S.D. (1982) Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **146**, 763–769.
- Strauch, E., Schaudinn, C. and Beutin, L. (2004) First-time isolation and characterization of a bacteriophage encoding the Shiga toxin 2c variant, which is globally spread in strains of *Escherichia coli* O157. *Infect Immun* **72**, 7030–7039.
- Vernozy-Rozand, C. and Ray-Gueniot, S. (1997) Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in food. *J Appl Microbiol* **82**, 537–551.
- Vimont, A., Vernozy-Rozand, C. and Delignette-Muler, M.L. (2006) Isolation of *E. coli* O157:H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Lett Appl Microbiol* **42**, 102–108.