LETÍCIA BARBOZA ROCHA

**Desenvolvimento e padronização de testes
imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli*
produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli*
enterotoxigênica (ETEC)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2012

LETÍCIA BARBOZA ROCHA

**Desenvolvimento e padronização de testes
imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli*
produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli*
enterotoxigênica (ETEC)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dra. Roxane Maria
Fontes Piazza

Versão corrigida

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Rocha, Letícia Barboza.

Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) / Letícia Barboza Rocha. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Diagnóstico de *Escherichia coli* diarreiogenicas.

Versão do título para o inglês: Development and standardization of immunochromatographic test for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diagnosis.

1. Diarreia 2. *Escherichia coli* 3. Imunodiagnóstico I. Piazza, Profa. Dra. Roxane Maria Fontes II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB0135/2012

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 Tese: Desenvolvimento e padronização de testes
imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli*
produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli*
enterotoxigênica (ETEC).

Orientador(a): Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 Projeto intitulado "*Escherichia coli* diarreiogênica: ferramentas inovadoras para o imunodiagnóstico", protocolo nº 469/08, sob a responsabilidade de **Roxane Maria Fontes**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 09/04/2008.

A CEUA aprovou, em reunião de 17/06/09, a inclusão de 12 camundongos no protocolo, após a análise do pedido com justificativa do responsável do projeto.

Vigência do Projeto: 08/2008 a 12/2011	Nº de animais/espécie
Laboratório de Bacteriologia	2/ coelho – 09/04/08 12 / Camundongos Balb/c – 17/06/09

São Paulo, 09 de dezembro de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

“A minha amada filha Laura, que com seu sorriso e carinho me fortalece a cada dia ...

Ao meu amado esposo Alexandre pelo apoio e cumplicidade ...

E aos meus pais, Antonio e Maria, pela vida, amor, força, incentivo e credibilidade.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e pelos dons a mim oferecidos.

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza pela oportunidade, pelos longos anos de orientação, ensinamentos, disposição, compreensão, estímulo e companheirismo.

À Dra. Denise pela orientação, paciência, assistência e dedicação.

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Júnior pelo apoio e conselhos científicos.

Aos amigos: Christiane Ozaki, Andressa Caravelli, Anna Raquel dos Santos, Lucas Cardoso, Danielle Munhoz, Daniela Luz, Keyde Mello, Gabrielle Andrade, Márcio Menezes, Cristiane Souza, Natália Freitas, Caio Silveira e Milton Pereira, pelo apoio, companheirismo, discussões e momentos de descontração.

Aos pesquisadores e técnicos do laboratório de Bacteriologia pelas dicas metodológicas.

A todos os amigos do Laboratório de Bacteriologia: alunos e funcionários pela amizade e colaboração.

Ao apoio financeiro da FAPESP e CNPq.

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

Muito Obrigada!

“Assim como uma casa é feita de tijolos, a ciência é feita de fatos. Mas assim como uma pilha de tijolos não é uma casa, um amontoado de fatos não é ciência.”

Jules Poincaré

RESUMO

ROCHA, L. B. **Desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para diagnóstico de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC).** 2012. 178 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Globalmente a diarreia é apontada como a segunda causa de morte em crianças abaixo de cinco anos, causando cerca de 800.000 mortes anuais. Dentre os patógenos causadores, as *Escherichia coli* diarreiogênicas são responsáveis, em média, por 30 a 40% dos episódios de diarreia. Dentre esses, *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) produzem potentes toxinas prejudiciais ao homem. O diagnóstico é uma importante ferramenta para o correto tratamento e o controle de surtos. Comparando-se aos métodos moleculares de detecção, ensaios imunossorológicos, como o teste imunocromatográfico (IC) apresentam diversas vantagens, por serem testes rápidos, de fácil execução e baixo custo. Assim, a obtenção de anticorpos policlonais (PAbs) e monoclonais (MAbs) nos levou ao desenvolvimento e padronização de testes ICs para detecção de ETEC e STEC por meio de seus fatores de virulência: a toxina termolábil (LT) e as toxinas de Shiga (Stx1 e Stx2), respectivamente. No desenvolvimento do teste IC, os MAbs anti-LT (IgG2b, $4,9 \times 10^{-11}$ M); anti-Stx1 (IgG1, $2,5 \times 10^{-10}$ M), anti-Stx2 (IgG1, $6,1 \times 10^{-10}$ M) e os PAbs correspondentes foram conjugados ao ouro coloidal e as fitas do teste IC foram previamente tratadas e montadas. Na padronização do teste IC foram testadas diferentes posições dos MAbs e PAbs, assim como diferentes concentrações dos anticorpos na linha teste, limite de detecção com as respectivas toxinas purificadas e ensaios com o sobrenadante dos cultivos bacterianos. Utilizando os PAbs conjugados ao ouro coloidal e seus correspondentes MAbs na captura, o teste detectou após 20 min até 15,6 ng/mL de LT, 15,6 ng/mL de Stx1 e 62,5 ng/mL de Stx2. Os três testes ICs não apresentaram reatividade cruzada com os isolados não produtores da respectiva toxina alvo e os resultados obtidos demonstram a viabilidade e aplicabilidade desses testes como ferramentas no diagnóstico de ETEC e STEC.

Palavras-chave: Diarreia. *Escherichia coli* diarreiogênica. Teste imunocromatográfico. Toxinas de Shiga. Toxina termolábil.

ABSTRACT

ROCHA, L. B. **Development and standardization of immunochromatographic test for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diagnosis.** 2012. 178 p. Ph. D. thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) are worldwide involved in diarrheal diseases and produce the heat-labile (LT) and the Shiga (Stx1 and Stx2) toxins, which, cause injuries to man. The diagnosis is an important tool for the correct treatment and control of outbreaks. Thus, immunochromatographic assays (ICs) for ETEC and STEC based on toxins detection were developed and standardized using polyclonal antibodies-gold conjugated (PABs) and their corresponding monoclonal antibodies (MAbs): anti-LT (IgG2b, 4.9×10^{-11} M), anti-Stx1 (IgG1, 2.5×10^{-10} M) and anti-Stx2 (IgG1, 6.1×10^{-10} M). The three ICs detect up to 15.6 ng/mL of LT, 15.6 ng/mL of Stx1 and 62.5 ng/mL of Stx2 and showed no cross-reaction with non-producers isolates of the respective target toxin. These results demonstrate the feasibility and applicability of the test ICs as diagnostic tools for diarrheagenic *E. coli*.

Keywords: Diarrhea. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Immunochromatographic assay. Shiga toxins. Heat-labile toxin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de classificação das <i>E. coli</i> patogênicas.....	28
Figura 2 - Lesão <i>attaching and effacing</i> (A/E).....	30
Figura 3 - Sistema de secreção tipo três (SSTT) de EPEC.....	32
Figura 4 - Organização estrutural da toxina LT.....	34
Figura 5 - Organização estrutural da toxina ST.....	35
Figura 6 - Organização estrutural da toxina Stx.....	38
Figura 7 - Esquema do princípio de funcionamento do teste imunocromatográfico de captura.....	49
Figura 8 - Fluxograma das principais etapas de desenvolvimento do projeto.....	52
Figura 9 - Esquema de montagem dos testes imunocromatográficos.....	57
Figura 10 - Procedimento e interpretação dos resultados dos testes ICs.....	58
Figura 11 - Ação de Stx2 após a detoxificação.....	60
Figura 12 - MAb anti-Stx2 após purificação por cromatografia de afinidade em proteína A-Sepharose.....	64
Figura 13 - Definição da concentração de anticorpo necessária para estabilização do ouro coloidal.....	70
Figura 14 - Teste IC para definição do volume do conjugado.....	70
Figura 15 - Teste IC para definição do local de bloqueio.....	71
Figura 16 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-Stx1.....	72
Figura 17 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-Stx1 na presença de sobrenadante de isolados.....	72
Figura 18 - Teste IC para definição da concentração de MAb anti-Stx1 na linha teste (T).....	73
Figura 19 - Teste IC para definição do limite de detecção de Stx1.....	74
Figura 20 - Teste IC para Stx1 com isolados bacterianos.....	74
Figura 21 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-Stx2.....	75

Figura 22 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-Stx2 na presença de sobrenadante de isolados.....	76
Figura 23 - Teste IC para definição da concentração de MAb anti-Stx2 na linha teste (T).....	76
Figura 24 - Teste IC para definição do limite de detecção de Stx2.....	77
Figura 25 - Teste IC para Stx2 com isolados bacterianos.....	78
Figura 26 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-LT.....	79
Figura 27 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-LT na presença de sobrenadante de isolados.....	79
Figura 28 - Teste IC para definição da concentração de MAb anti-LT na linha teste (T).....	80
Figura 29 - Teste IC para definição do limite de detecção de LT.....	80
Figura 30 - Teste IC para LT com isolados bacterianos.....	81
Figura 31 - Teste IC para detecção de Stx1 e LT.....	82
Figura A.1 - <i>Immunoblotting</i> do PAb e MAb anti-ST.....	135
Figura A.2 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-ST.....	139
Figura A.3 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-ST na presença de sobrenadante de isolados.....	139
Figura B.1 - Perfil eletroforético das proteínas His-EspA e His-EspB purificadas...	148
Figura B.2 - <i>Immunoblotting</i> dos soros anti-EspA ou anti-EspB.....	149
Figura B.3 - <i>Immuno-dot</i> utilizando MAbs anti-EspB dos 64 clones produtores.....	151
Figura B.4 - <i>Immunoblotting</i> do MAb anti-EspB.....	152
Figura B.5 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-EspB.....	155
Figura B.6 - Teste IC para definição da concentração de PAb anti-EspB na linha teste (T).....	155

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição global de causas de morte em crianças abaixo de 5 anos de idade, 2010.....	21
Gráfico 2 - Distribuição regional do número de internações por diarreia no Brasil, 2011.....	23
Gráfico 3 - Reatividade dos MAb anti-Stx2.....	63
Gráfico 4 - Expressão da toxina LT no isolado de ETEC H10407 em diferentes meios de cultivo.....	66
Gráfico 5 - Expressão da toxina LT no isolado ETEC H10407 na presença ou ausência de antibióticos.....	67
Gráfico 6 - Expressão da toxina LT em ETEC H10407 após tratamento com diferentes compostos.....	68
Gráfico 7 - Expressão de LT em isolados de ETEC após cultivo na presença ou ausência de antibióticos.....	69
Gráfico A.1 - Expressão de ST em ETEC H10407 em diferentes meios de cultivo.....	136
Gráfico A.2 - Expressão de ST em ETEC H10407 na presença ou ausência de antibióticos.....	136
Gráfico A.3 - Expressão de ST em ETEC H10407 após tratamento com diferentes compostos.....	137
Gráfico A.4 - Expressão de ST em isolados ETEC após cultivo na presença ou ausência de antibióticos.....	138
Gráfico B.1 - Reatividade do MAb 4D9 (K1) anti-EspB.....	152
Gráfico B.2 - Expressão de EspB pelo isolado E2348/69 em diferentes meios.....	153
Gráfico B.3 - Expressão de EspB por isolados após cultivo e tratamento padronizados.....	154

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características dos papéis utilizados nos testes imunocromatográficos.....	56
Quadro 2 - Características dos anticorpos policlonais anti-Stx1, anti-Stx2 e anti-LT.....	62
Quadro 3 - Características dos anticorpos monoclonais anti-Stx1, anti-Stx2 e anti-LT.....	65
Quadro A.1 - Isolados bacterianos utilizados no presente estudo.....	119
Quadro B.1 - Composição dos meios de cultivo utilizados.....	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Absorbância
A/E - *Attaching and effacement*
AA - Adesão agregativa
AAFs - *Aggregative adherence fimbriae*
aEAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa atípica
aEPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica atípica
Afa - *Afimbrial adhesin*
AIEC - *E. coli* aderente invasiva
BCIP - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*
BFP - *Bundle-forming pilus*
BSA - *Bovine Serum Albumin*
C - Controle
CFA - Ácido casamínico e extrato de levedura com ágar
CFs - fatores de colonização
CH - Colite Hemorrágica
CylA - *Cytolysin activator*
DA - Adesão difusa
DAB - Diaminobenzidina
DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderente
DEC - *Escherichia coli* diarreiogênica
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO - Dimetil sulfóxido
DO - Densidade óptica
EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
EAF - *EPEC adherence factor*
EAST1 - *Enteraggregative E. coli ST*
EatA - *ETEC autotransporter A*
EC - *E. coli*
E. coli - *Escherichia coli*
ECP - *E. coli common pilus*
EDTA - Ácido etilenodiaminotetraacético
Efa1 - *EHEC factor adhesin*
EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica
Ehly - *Enterohemolysin*
EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
Esp - *E. coli secreted protein*
EspA - *E. coli secreted protein A*
EspB - *E. coli secreted protein B*
EspD - *E. coli secreted protein D*
EspF - *E. coli secreted protein F*
EspP - *Extracellular serine protease, plasmid encoded*
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
Gb₃ - Globotriasilceramida
GC-C - Guanilato ciclase C

GD1 / GM1 - Complexo gangliosídeos
HAT - Hipoxantina aminopterina e timidina
Hda - *DnaA-homolog*
Hra - *Heat-resistant agglutinin*
IC - Imunocromatográfico
IcsA - *Intracellular spread*
Ig - Imunoglobulina
Iha - *IrgA homologue adhesin*
IMS - *Immunomagnetic separation*
IpaA - *Invasion plasmid antigen A*
IpaB - *Invasion plasmid antigen B*
IpaC - *Invasion plasmid antigen C*
IpgD - *Inositol phosphate phosphatase*
IPTG - *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*
IrgA - *Iron-regulated gene A*
K_D - Constante de dissociação
LA - Adesão localizada
LabBact/IBu - Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan
LAL - Adesão localizada-*like*
LB - Lúria Bertani
LEE - *Locus of enterocyte effacement*
Ler - LEE-encoded regulator
LifA - *Lymphocyte inhibitory factor*
LPF - *Long Polar Fimbriae*
LPS - Lipopolissacarídeo
LT - Termolábil
MAb - *Monoclonal Antibody* (Anticorpo Monoclonal)
MAb-Au - Anticorpo Monoclonal conjugado ao ouro coloidal
Map - *Mitochondrial associated protein*
MV - Microvilosidades
NBT - *Nitro blue tetrazolium*
NMEC - *E. coli* causadora de meningite neonatal
NT - Não tipável
OPD - σ -fenilenodiamino
ORS - *Oral rehydration salts*
ORT - *Oral rehydration therapy*
PAb - *Polyclonal Antibody* (Anticorpo Policlonal)
PAb-Au - Anticorpo Policlonal conjugado ao ouro coloidal
PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão salina-fosfato)
PBST - Tampão salina-fosfato com detergente *Tween 20*
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PEG - Polietilenoglicol
Pet - *plamid-encoded toxin*
Pic - *protease involved in colonization*
PO - Peroxidase
RIA - *Radioimmunoassay*
rpm - Rotações por minuto
Saa - *STEC autoagglutinating adhesin*
Sat - *Secreted autotransporter toxin*
SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SFB - Soro fetal bovino
Sfp - *Sorbitol-fermenting plasmid*
ShET1 - *Shigella enterotoxin 1*
SHU - Síndrome hemolítico-urêmica
SSTT - Sistema de Secreção do Tipo III
ST - Termo-estável
STEAEc - *Escherichia coli* enteroagregativa produtora da toxina de Shiga
STEC - *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga
Stx1 - Toxina de Shiga 1
Stx2 - Toxina de Shiga 2
Sub. A - Subunidade A
Sub. B - Subunidade B
T - Teste
TBS - Tampão borato salina
tEAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa típica
tEPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica típica
Tia - *Toxigenic invasion A*
Tir - *Translocated intimin receptor*
ToxB - *Toxin B*
TSB - *Trypticase Soy Broth* (caldo triptona de soja)
UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica
VTEC - *Escherichia coli* produtora de verotoxina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	21
1.1 Doença diarreica	23
1.1.1 <i>Transmissão</i>	24
1.1.2 <i>Tratamento</i>	24
1.1.3 <i>Prevenção</i>	25
1.1.4 <i>Agentes causadores da diarreia</i>	26
1.2 <i>Escherichia coli</i>	27
1.2.1 <i>Escherichia coli enteropatogênica (EPEC)</i>	29
1.2.2 <i>Escherichia coli enterotoxigênica (ETEC)</i>	33
1.2.3 <i>Escherichia coli produtora da toxina de Shiga (STEC)</i>	35
1.2.4 <i>Escherichia coli enteroagregativa (EAEC)</i>	39
1.2.5 <i>Escherichia coli enteroinvasora (EIEC)</i>	41
1.2.6 <i>Escherichia coli de aderência difusa (DAEC)</i>	42
1.3 Diagnóstico	42
1.3.1 <i>Diagnóstico de EPEC</i>	44
1.3.2 <i>Diagnóstico de ETEC</i>	45
1.3.3 <i>Diagnóstico de STEC</i>	46
1.4 Aplicabilidade de anticorpos em imunodiagnóstico	47
1.4.1 <i>Características dos testes imunocromatográficos</i>	48
2 OBJETIVOS	51
3 PLANO DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Antígenos	53
4.2 Produção de anticorpos	53
4.2.1 <i>Anticorpos policlonais</i>	53
4.2.2 <i>Anticorpos monoclonais</i>	53
4.3 Isolados bacterianos	54
4.4 Expressão dos fatores de virulência	54
4.5 Desenvolvimento e padronização dos testes imunocromatográficos	55
4.5.1 <i>Conjugação dos anticorpos monoclonais ou policlonais com ouro coloidal</i>	55
4.5.2 <i>Tratamento dos papéis</i>	56
4.5.3 <i>Montagem e aplicação dos testes ICs</i>	57

4.5.4 Padronização dos testes ICs.....	59
5 RESULTADOS.....	60
5.1 Anticorpos policlonais e monoclonais.....	60
5.1.1 Obtenção do toxóide Stx2.....	60
5.1.2 Características dos anticorpos policlonais.....	61
5.1.3 Obtenção e caracterização dos MAb's anti-Stx2 e características dos MAb's anti-Stx1 e anti-LT.....	63
5.2 Expressão da toxina termolábil (LT).....	66
5.3 Testes imunocromatográficos.....	69
5.3.1 Concentração do anticorpo para estabilização do ouro coloidal.....	69
5.3.2 Volume do conjugado.....	70
5.3.3 Localização do bloqueio e definição do tempo de leitura dos resultados do teste IC.....	71
5.4 Padronização do teste IC para detecção de Stx1.....	71
5.5 Padronização do teste IC para detecção de Stx2.....	75
5.6 Padronização do teste IC para detecção de LT.....	78
5.7 Emprego do teste IC para detecção simultânea de dois antígenos.....	81
6 DISCUSSÃO.....	83
7 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXOS.....	118
ANEXO A - Isolados bacterianos.....	119
ANEXO B - Metodologia complementar.....	121
ANEXO B.1 - Anticorpos policlonais e monoclonais.....	121
B.1.1 Obtenção da fração enriquecida em IgG dos soros de coelhos.....	121
B.1.2 Immunoblotting.....	121
B.1.3 ELISA indireto.....	122
B.1.4 ELISA indireto com antígeno nativo e desnaturado.....	122
ANEXO B.2 - Produção e caracterização dos anticorpos monoclonais.....	123
B.2.1 Obtenção dos anticorpos monoclonais anti-Stx2.....	123
B.2.1.1 Obtenção do toxóide Stx2.....	123
B.2.1.2 Imunização dos camundongos.....	123
B.2.1.3 Cultivo de células mielomatosas.....	124
B.2.1.4 Preparo de células peritoneais.....	124

<i>B.2.1.5 Fusão e seleção dos hibridomas.....</i>	125
<i>B.2.2 Avaliação da produção de anticorpos monoclonais anti-Stx2.....</i>	125
<i>B.2.3 Subclonagem e classificação dos hibridomas.....</i>	126
<i>B.2.4 Congelamento dos hibridomas.....</i>	127
<i>B.2.5 Purificação dos anticorpos monoclonais.....</i>	127
<i>B.2.6 Cálculo da constante de dissociação.....</i>	128
ANEXO B.3 - Expressão da toxina termolábil produzida por <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC).....	128
<i>B.3.1 Cultivo e expressão de LT.....</i>	128
<i>B.3.2 Cultivo bacteriano em meio contendo antibióticos.....</i>	130
<i>B.3.3 Tratamento do cultivo bacteriano.....</i>	130
APÊNDICES.....	131
APÊNDICE A - Estratégias empregadas na pesquisa para a futura detecção de etec utilizando a toxina termoestável (ST) como alvo.....	132
A.1 Metodologia.....	132
<i>A.1.1 Obtenção de ST.....</i>	132
<i>A.1.2 Anticorpos policlonais anti-ST.....</i>	133
<i>A.1.3 Expressão de ST.....</i>	134
<i>A.1.4 Padronização do teste IC para detecção de ST.....</i>	134
A.2 Resultados.....	135
<i>A.2.1 Anticorpos policlonal e monoclonal.....</i>	135
<i>A.2.2 Análise da expressão da toxina ST.....</i>	135
<i>A.2.3 Teste IC para detecção de ST.....</i>	138
A3 - Desafios e perspectivas na padronização do teste IC para detecção de ETEC utilizando como alvo a toxina ST.....	139
APÊNDICE B - Estratégias empregadas na pesquisa para a futura detecção de EPEC.....	142
B.1 Metodologia.....	143
<i>B.1.1 Obtenção das proteínas EspA e EspB.....</i>	143
<i>B.1.2 Anticorpos policlonais anti-EspA e anti-EspB.....</i>	144
<i>B.1.3 Anticorpos monoclonais anti-EspA e anti-EspB.....</i>	145
<i>B.1.4 Cultivo e expressão de EspB.....</i>	146
<i>B.1.5 Padronização do teste IC para detecção de EspB.....</i>	147
B.2 Resultados.....	147

<i>B.2.1 Anticorpos policlonais e monoclonais anti-EspA e anti-EspB.....</i>	147
<i>B.2.2 Análise da expressão de EspB.....</i>	153
<i>B.2.3 Teste IC para detecção de EspB.....</i>	154
B.3 Desafios e perspectivas na padronização do teste IC para detecção de EPEC/EHEC.....	156
APÊNDICE C – ARTIGO DE PERIÓDICO.....	158

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Dados recentes apontam que anualmente quase oito milhões de crianças menores de cinco anos morrem em todo mundo. A grande maioria dessas mortes (85%) ocorre principalmente nas áreas rurais dos países da África e Sudeste Asiático (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND, UNICEF, 2012). Dentre as principais causas desta mortalidade, em primeiro lugar, a pneumonia é responsável por 18%, e em segundo lugar, a diarreia causa 11% (**Gráfico 1**), ou 800.000 mortes, considerando que 80% deste índice correspondem a crianças menores de dois anos de idade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2012; WORLD HEALTH STATISTICS, 2011; WHO; UNICEF, 2009).

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

Fonte: WHO (2012).

Nos países em desenvolvimento, crianças menores de três anos, sofrem em média, três episódios de diarreia a cada ano, sendo uma das principais causas da desnutrição (WHO, 2009). A desnutrição severa torna as crianças 9,5 vezes mais vulneráveis à morte por diarreia quando comparadas a crianças nutridas (UNICEF,

2012). A diarreia, também, é causa de hospitalização importante entre as crianças menores de um ano, acarretando em consequências não só no desenvolvimento infantil, mas 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 dentre outros. Por estas razões, a doença diarreica é considerada um dos principais problemas de saúde pública mundial.

Em todo mundo, ainda cerca de um bilhão de pessoas carecem de acesso à água tratada, 2,5 bilhões não têm acesso a saneamento básico, e 1,1 bilhão praticam defecação a céu aberto (UNICEF, 2012). Consequentemente, estes ambientes insalubres possibilitam a proliferação e disseminação dos patógenos causadores de diarreia (WHO, 2009).

No Brasil, no período de 1997 a 2006 houve um declínio de 66,7% da taxa de mortalidade por doenças infecciosas intestinais em crianças menores de um ano (MALTA et al., 2010). Esta redução se deve às ações de promoção e adequada atenção à saúde, como: terapias de reidratação oral, diminuição da desnutrição infantil, melhora no acesso a serviços de saúde, aumento do aleitamento materno e políticas de saneamento básico. Mesmo assim, de acordo com Oliveira e Latorre (2010), no período de 1995 a 2005 ocorreram 39.421 mortes por diarreia e 1.505.800 internações associadas a esta doença em crianças menores de um ano de idade. Isto indica que a diarreia ainda é grande causa de morbidade e mortalidade infantil no nosso país, principalmente nas regiões norte e nordeste. Dados recentes apontam que no ano de 2011, os maiores índices de internações por diarreia nas unidades hospitalares participantes do Sistema Único de Saúde (SUS) (públicas ou particulares conveniadas) ocorreram na região nordeste e norte, principalmente nos meses de clima quente (DEPARTAMENTO DE INFORMÁTICA DO SUS, DATASUS, 2012) (**Gráfico 2**). Apesar das regiões norte e sudeste possuírem números de internações semelhantes, estes representam 0,21% da população da região norte, contra 0,04% da população da região sudeste, indicando que proporcionalmente, as populações das regiões norte e nordeste (0,17%) ainda carecem de ações de promoção a saúde (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE, 2012).

Gráfico 2 - Distribuição regional do número de internações por diarreia no Brasil, 2011.

Fonte: DATASUS (2012).

1.1 Doença diarreica

A diarreia é definida como a presença de três ou mais evacuações líquidas ou semilíquidas em um período de 24 h ou mais de uma evacuação líquida ou semilíquida com sangue no mesmo período (MORRIS et al., 1994). Durante um episódio de diarreia, água e eletrólitos (sódio, cloreto de potássio e bicarbonato) são perdidos através das fezes líquidas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), três tipos de diarreia podem ocorrer (WHO, 2009):

- diarreia aguda*: associada com perda significativa de fluídos e rápida desidratação em indivíduos infectados. Geralmente duram algumas horas ou dias;
- diarreia sanguinolenta*: também referida como disenteria, é caracterizada por presença visível de sangue nas fezes. Associada com dano intestinal e perda de nutrientes no indivíduo infectado;
- diarreia persistente*: episódios de diarreia com ou sem sangue que duram pelo menos 14 dias. Crianças desnutridas e imunocomprometidas são

mais suscetíveis a desenvolver diarreia persistente, que de modo geral, tende a piorar suas condições.

Uma das consequências mais expressiva da diarreia é a desidratação. A desidratação ocorre quando a perda de água e eletrólitos não é substituída. O grau de desidratação é classificado numa escala de três (WHO, 2009):

- 1) *desidratação inicial*: não há sinais ou sintomas;
- 2) *desidratação moderada*: comportamento agitado ou irritado, diminuição da elasticidade da pele, olhos encovados;
- 3) *desidratação severa*: os sintomas tornam-se mais graves, choque com consciência diminuída, falta de urina, sensação de frio, extremidades úmidas, pulso rápido e fraco, pressão arterial baixa ou indetectável e pele pálida.

Portanto, nos casos de quadros graves de diarreia, a perda de fluidos pode ser fatal, particularmente em crianças abaixo de cinco anos e pessoas que estão desnutridas ou imunocomprometidas (WHO, 2009).

1.1.1 Transmissão

Os patógenos que causam diarreia possuem um modo de transmissão similar, a transmissão fecal-oral. Esta transmissão pode ocorrer de maneira direta, de pessoa a pessoa e/ou indireta, ou seja, as fezes humanas ou de animais contaminadas entram em contato com alimentos e/ou água, que por sua vez, quando não higienizados ou tratados corretamente, são ingeridos juntamente com os patógenos (O'RYAN; PRADO; PICKERING, 2005; WHO, 2009).

1.1.2 Tratamento

O tratamento da diarreia, de acordo com as recomendações da OMS e UNICEF, baseia-se na reposição de água e eletrólitos por gotejamento intravenoso e/ou terapia de reidratação oral (*oral rehydration therapy* - *ORT*), realizada pela ingestão de sais de reidratação oral (*oral rehydration salts* - *ORS*). Os ORS são compostos de glicose, cloreto de sódio, citrato de sódio e cloreto de potássio (AVERY et al., 1990). Na criança doente, patógenos causam danos ao intestino, ocasionando a secreção de grande quantidade de água e eletrólitos. Quando os

ORS atingem o intestino delgado, o sódio e a glicose são transportados juntos através da parede intestinal, e o sódio promove absorção de água do intestino delgado para o corpo, proporcionando considerável reposição de água e eletrólitos (WATER, 1978).

Inicialmente os ORS possuíam uma osmolaridade de 311 mmol/L (AVERY et al., 1990), porém, em 2002, uma nova fórmula conhecida como *low-osmolarity ORS* foi recomendada pela OMS. Esta nova fórmula, com concentrações de glicose e sódio reduzidas e osmolaridade de 245 mmol/L proporcionou melhores resultados quando comparada com fórmula original (HAHN et al., 2001). Mesmo assim, atualmente, apenas 39% de crianças com diarreia nos países em desenvolvimento recebem a terapia de reidratação oral, um quadro que pouco avançou desde 2000 (UNICEF, 2012).

A suplementação de micronutrientes como a vitamina A e zinco também colabora no tratamento da diarreia, pois de acordo com Barreto et al. (1994), a incidência de casos graves de diarreia foi 20% menor no grupo suplementado com vitamina A do que no grupo placebo. Estudos realizados demonstraram que o tratamento com zinco por 10 a 14 dias reduziu a severidade e duração da diarreia aguda em 25%, assim como na diarreia persistente em 40% (LAZZERINI; RONFANI, 2008; WHO, 2009).

Diversas drogas antidiarreicas tais como: loperamida, difenoxilato, colestiramina e sais de alumínio não são efetivas no tratamento da diarreia aguda, por isso não são recomendadas na prática clínica. O seu uso inadequado aumenta não só o custo da terapia, mas expõem as crianças a potenciais efeitos tóxicos. Por outro lado, desvia a atenção dos responsáveis pela criança da abordagem mais efetiva: prevenção, tratamento da desidratação e os cuidados com a alimentação (SILVA, 2002). Assim também, quando o agente etiológico não foi identificado, não é aconselhado o uso de antibióticos no tratamento de diarreias, já que algumas destas substâncias podem causar a piora do quadro clínico do paciente infectado por alguns agentes patogênicos específicos (CLEMENTS, 2012).

1.1.3 Prevenção

A vacinação é um ótimo mecanismo de prevenção, porém, a maioria dos países pobres não possui programas de vacinação contra os patógenos causadores,

como rotavírus, por exemplo. Além disso, a grande variedade de tipos e sorotipos de vírus e bactérias causadoras torna a prática da imunização contra todos estes patógenos inviável. No entanto, existem vacinas contra alguns tipos de maior incidência que auxiliam na diminuição da prevalência. Dados comparativos antes e após a introdução da vacina contra o rotavírus no Brasil indicaram uma redução de 22% do número de mortes e 17% do número de internação por diarreia em crianças abaixo de cinco anos (do CARMO et al., 2011).

Além da imunização, algumas medidas para prevenção da diarreia incluem: acesso à água potável, saneamento apropriado e promoção de boas práticas de higiene. Um número estimado de 88% de mortes por diarreia é atribuído à água contaminada, saneamento inadequado e falta de higiene (BLACK et al., 2003). Melhorias no saneamento reduzem a transmissão de patógenos causadores da diarreia por impedir que as fezes humanas contaminem o ambiente. De acordo com estudos, as melhorias no saneamento foram associadas com a redução na incidência da diarreia em 36% (JAMISON et al., 2008). Também, o ato de lavar as mãos com sabão pode reduzir a incidência da doença diarreica em mais de 50% (LUBY et al., 2005). Além disso, intervenções para melhorar a qualidade da água na fonte, juntamente com o tratamento de água para uso doméstico e sistemas de armazenamento seguro, têm demonstrado a redução da incidência de diarreia em até 47% (PRÜSS-ÜSTÜN et al., 2008). A prevenção da diarreia também pode ser realizada por meio de nutrição adequada e aleitamento materno, já que crianças não amamentadas têm seis vezes mais risco de morrer por doenças infecciosas nos primeiros dois meses de vida, incluindo a diarreia, quando comparadas às crianças amamentadas (COLLABORATIVE, 2000).

1.1.4 Agentes causadores da diarreia

Dentre os patógenos causadores, Rotavírus é responsável por em média 40% das admissões hospitalares por diarreia em crianças abaixo de cinco anos em todo mundo (WHO, 2008). Em segundo lugar, *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) é responsável por 30 a 40% dos episódios de diarreia aguda nos países em desenvolvimento, atingindo principalmente crianças abaixo de 5 anos e idosos (O'RYAN; PRADO; PICKERING, 2005). Além destes, outros agentes causadores incluem: Norovirus, *Shigella spp*, *Salmonella spp*, *Campylobacter jejuni / coli*, *Vibrio*

cholerae, *Aeromonas spp*, *Plesiomonas spp*. e infecções causadas por protozoários e helmintos ocorrem principalmente em áreas onde o saneamento ambiental é significativamente precário (O'RYAN; PRADO; PICKERING, 2005).

Devido à importância epidemiológica de *Escherichia coli* como o principal agente bacteriano causador da diarreia, este micro-organismo – objeto desse estudo – será detalhado nas próximas seções.

1.2 *Escherichia coli*

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

E. coli é um bacilo Gram-negativo anaeróbico facultativo, vastamente distribuído no intestino de humanos e animais de sangue quente como parte da microbiota essencial para fisiologia do hospedeiro saudável (CONWAY, 1995). Como possui habilidade de se adaptar no habitat intestinal (anaeróbico) e extraintestinal (aeróbico ou anaeróbico) este micro-organismo pode ser encontrado em diferentes locais, como solo, água, alimento e oportunamente, outras partes do corpo do hospedeiro, podendo causar doenças.

Alguns isolados podem adquirir fatores de virulência por aquisição de DNA exógeno proveniente do ambiente e/ou por transferência de genes na forma de plasmídeos, transposons, ilhas genômicas e bacteriófagos (BRUSSOW; CANCHAYA; HARDT, 2004). Estes fatores conferem à bactéria mecanismos de resistência para sobreviver em novos nichos, causando danos aos tecidos do hospedeiro e levando a doenças.

E. coli patogênicas são tradicionalmente divididas em oito patotipos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004) (**Figura 1**). Isolados de DEC são usualmente classificados de acordo com mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os aspectos epidemiológicos e os tipos de interação com linhagens celulares *in vitro*. Embora essa classificação continue sendo usada pela maioria dos autores, já se torna evidente que algumas categorias incluem patotipos bastante diferentes. Desta forma, *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enteroagregativa (EAEC) foram subdivididas em típicas e atípicas e *E. coli*

enterohemorrágica (EHEC) passou a constituir uma subcategoria de *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004) (**Figura 1**).

Figura 1 - Esquema de classificação das *E. coli* patogênicas.

Fonte: Baseado em Kaper, Nataro e Mobley (2004).

Alguns autores consideram mais dois novos patótipos que surgiram recentemente: *E. coli* aderente invasiva (AIEC), que aparentemente está associada a doença de Crohn, mas não causa diarreia (CROXEN; FINLAY, 2010) e *E. coli* enteroagregativa produtora da toxina de Shiga (STEAEC) (CLEMENTS et al., 2012), responsável pelo surto de *E. coli* em 2011 na Alemanha (FRANK et al., 2011).

Por muitos anos, isolados de *E. coli* foram classificados apenas de acordo com seu sorogrupo por meio do antígeno O (lipopolissacarídeo - LPS) ou sorotipo por meio do antígeno H (flagelar). No entanto, existem mais de 180 sorogrupos O e cada um pode ser subdividido em mais de 60 sorotipos H, o que pode resultar em mais de 10.000 possíveis combinações (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). Atualmente, sabe-se que, cada patótipo contém muitos sorotipos (exemplo: *E. coli* enterotoxigênica, ETEC, possui 117 sorotipos) e que alguns sorotipos pertencem a mais de um patótipo (exemplo: O26:H11, pode pertencer ao grupo das EPEC, EHEC ou EAEC), portanto, a sorotipagem é insuficiente para correta classificação do isolado (CLEMENTS et al., 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.2.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

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

Conforme já citado, EPEC se divide em EPEC típica e atípica. EPEC típica (tEPEC) diferencia-se da EPEC atípica (aEPEC) pela presença do plasmídio EAF (EPEC *adherence factor*) e expressão da fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*) (ABE et al., 2009; NARA et al., 2010; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). A diarreia causada por tEPEC apresenta um quadro diarreico agudo, atinge crianças de até um ano de idade e seu reservatório é somente o homem, já aEPEC é também associada à diarreia persistente, acomete crianças de até cinco anos de idade e seus reservatórios são homens, animais domésticos e animais de corte (AFSET et al., 2004; BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; MORENO et al., 2010; OCHOA; CONTRERAS, 2011; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

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

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

Com relação à patogênese de EPEC, após a passagem pela barreira gástrica, a bactéria se adere à mucosa do intestino delgado e grosso e secreta proteínas efetoras causando alterações complexas que levam à diarreia (GOMES; GONZÁLEZ-PEDRAJO, 2010). O processo de colonização ocorre em três fases: adesão, injeção de proteínas efetoras e íntima aderência que resulta na lesão *attaching and effacing* (A/E) (GOMES; GONZÁLEZ-PEDRAJO, 2010). A lesão A/E é uma lesão histopatológica típica no epitélio do intestino que se caracteriza pela destruição localizada das microvilosidades intestinais e pela adesão íntima da bactéria ao epitélio intestinal, formando um pedestal rico em actina (NATARO; KAPER, 1998) (**Figura 2**).

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

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

A lesão A/E é resultado da ação conjunta de proteínas codificadas numa ilha de patogenicidade de 35,5 kb conhecida como *locus of enterocyte effacement* (LEE) (McDANIEL et al., 1995 ; McDANIEL; KAPER, 1997). A região LEE compreende cinco *operons* principais (LEE1-5; mais R1/R2) e 41 genes que codificam um grupo de proteínas que se distribuem em seis categorias: 1) reguladores transcricionais, tal como o regulador de LEE ou Ler; 2) proteínas do Sistema de Secreção do Tipo III (SSTT) como EspA, EspB, EspD e EspF, denominadas em conjunto como *E. coli secreted protein* (Esp); 3) translocadores; 4) chaperonas moleculares; 5) proteínas efetoras secretadas, incluindo Tir; 6) adesina intimina (ABE et al., 1999; DEAN;

MARESCA; KENNY, 2005; DENG et al., 2004; ELLIOTT et al., 1998, 1999, 2000; JARVIS et al., 1995; JERSE et al., 1990; KENNY et al., 1997; YOUNIS et al., 2010).

A **intimina** é uma proteína de membrana externa de 94 kDa expressa pelo gene *eae* responsável pela adesão íntima da bactéria com o enterócito (JERSE et al., 1990). A adesão é mediada por seu receptor **Tir** (*translocated intimin receptor*), uma proteína efetora que é inserida na membrana da célula hospedeira (KENNY et al., 1997). A interação intimina-Tir permite a ancoragem da EPEC na superfície da célula hospedeira, inicia processos de sinalização celular e reorganiza os componentes do citoesqueleto para formar o pedestal (GOOSNEY et al., 2000). A região variável da porção C-terminal da intimina define seus distintos subtipos (ADU-BOBIE et al., 1998; OSWALD et al., 2000), no entanto, existe uma identidade de cerca de 80% de aminoácidos entre estes diversos subtipos (ZHANG et al., 2002).

O SSTT também conhecido como “injetossomo” reúne em uma complexa estrutura macromolecular mais de vinte proteínas diferentes que atravessam o envelope celular bacteriano (GALÁN; WOLF-WATZ, 2006) e formam um *translocon* na célula hospedeira, que é essencial para a secreção de proteínas e a translocação de vários efetores (KNUTTON et al., 1998) (**Figura 3**). Algumas proteínas do SSTT merecem destaque de acordo com seus papéis característicos na patogênese bacteriana, dentre elas, EspA, EspB e EspD, EspF e Map.

EspA (*E. coli secreted protein A*) é uma proteína de aproximadamente 25 kDa que forma uma agulha ou espécie de ponte física, através da qual proteínas passam da bactéria para célula eucariótica (KNUTTON et al., 1998) (**Figura 3**). Além disso, foi proposto que EspA medeia uma aderência inicial em isolados de EPEC que perderam BFP (CLEARY et al., 2004).

EspB (*E. coli secreted protein B*) é uma proteína de aproximadamente 37 kDa que juntamente com **EspD** forma o poro de translocação na membrana da célula hospedeira, através da qual proteínas efetoras são injetadas no citoplasma (FRANKEL, et al., 1998; IDE et al., 2001) (**Figura 3**). Além da função de formação de poro, EspB foi encontrada no citoplasma da célula hospedeira com função de proteína efetora (TAYLOR et al., 1998), ou seja, EspB facilita a antifagocitose por inibição da função da miosina (IIZUMI et al., 2007) e liga-se à alfa-catenina ocasionando o rearranjo da actina (HAMAGUCHI et al., 2008; KODAMA et al., 2002). Assim como intimina, EspB possui diferentes variantes, identificadas como *alpha*, *beta* e *gamma*.

Figura 3 - Sistema de secreção tipo três (SSTT) de EPEC.

Fonte: Garmendia et al. (2005).

Conforme revisado por Croxen e Finlay (2010), muitas das proteínas efetoras translocadas possuem múltiplas funções. Por exemplo: **Map** (*mitochondrial associated protein*) age regulando a dinâmica da actina para formação de *filopodia* que cercam as microcolônias bacterianas e também altera a estrutura e função mitocondrial; **EspF** desencadeia a morte mitocondrial, é implicada na inibição da fagocitose, rompimento das junções comunicantes e mimetismo da via de sinalização celular envolvida no transporte de membrana.

Alguns fatores de virulência, que não são codificados na região LEE, são encontrados em parte dos isolados EPEC. Como exemplos, as fímbrias **LPF** (*long polar fimbriae*) (TATSUNO et al., 2006) e **ECP** (*E. coli common pilus*) (RENDÓN et al., 2007) e a proteína Efa1 (*EHEC factor adhesin*) ou LifA (*Lymphocyte inhibitory factor*) (KLAPPROTH et al., 2000), mais conhecida por **EFA/LIF** encontrada em 62% das EPEC típicas e 30% das EPEC atípicas (VIEIRA et al., 2010).

1.2.2 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

ETEC é conhecida por causar diarreia aquosa, que pode variar desde leve e auto limitante até episódios diarreicos tipo cólera desidratante e fatal, principalmente em crianças abaixo de cinco anos nos países em desenvolvimento (BLACK, 1993; KAPER et al., 2004; WHO, 2009). Este patotipo é relatado como um dos enteropatógenos mais comumente isolados em crianças menores de 5 anos de idade em alguns países em desenvolvimento, representando aproximadamente 20% dos casos, o equivalente a centenas de milhões de casos de diarreia e dezenas de milhares de mortes a cada ano (QADRI et al., 2005; WHO, 2009). ETEC é também o principal agente associado à chamada “diarreia dos viajantes”, podendo afetar 20 a 60% dos viajantes em trânsito em regiões de baixa renda do mundo (HILL; BEECHING, 2010). Em estudos realizados no Brasil, ETEC foi isolada em 3,7% das amostras em Salvador (BUERIS et al., 2007), 9,2% em Teresina (NUNES et al., 2011), 10% em João Pessoa (MORENO et al., 2010) e 4,4% em Porto Velho (ORLANDI et al., 2006). ETEC também é um importante patógeno no setor agrícola devido ao potencial risco de infecção em leitões pós-desmame, causando diarreia e perdas econômicas (NATARO; KAPER, 1998).

A adesão inicial de ETEC é mediada por fatores de colonização (**CFs**) que podem ser fimbriais, não fimbriais, helicoidais ou fibrilares. Mais de 25 CFs já foram descritos, porém, os mais frequentes são CFA/I, CFA/II e CFA/IV (GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996; TURNER et al., 2006).

ETEC produz as enterotoxinas termolábil (**LT**) e termo-estável (**ST**). Estes nomes são atribuídos segundo as respectivas sensibilidades ao aquecimento: a incubação de LT a 70 °C por 10 minutos é suficiente para destruir sua atividade (GILL et al., 1981), já ST ainda se mantém ativa mesmo depois de submetida a 95 °C por 60 minutos (SACK, 1975). Cepas de ETEC podem produzir isoladamente ou simultaneamente os dois tipos de enterotoxinas, que diferem em estrutura e mecanismo de ação (LEVINE et al., 1983).

LT é uma toxina de 86 kDa com estrutura do tipo AB₅ (uma subunidade A ligada a um pentâmero de subunidades B) (**Figura 4**), codificada no *operon eltAB* presente no plasmídeo Ent (OCHI et al., 2009). LT possui 82% de homologia dos aminoácidos com a toxina colérica LT e é dividida em duas famílias: LT-I e LT-II. LT-I é comumente encontrada em humanos e pode ser subdividida em LTh (derivada de

humanos) e LTp (derivada de porcos). O mecanismo de ação de LT inicia pela ligação da subunidade B a gangliosídeos GM1 (LT-I) ou GD1 (LT-II) presentes na superfície do epitélio intestinal. Posteriormente, LT é internalizada por endocitose e transportada através do Golgi e do retículo endoplasmático; a subunidade A sofre processamento pós-traducional para gerar os peptídeos A1 e A2. A1 é então translocado para o citossol atuando como ADP-ribosil transferase do NAD para subunidade alfa da proteína G (proteína que regula adenilato ciclase). Esta ativação permanente inibe sua atividade GTPase e induz a ativação celular da adenilato ciclase, levando a elevação descontrolada do AMPc intracelular, efluxo de íons Cl^- e diarreia aquosa (SPANGLER, 1992).

Figura 4 - Organização estrutural da toxina LT.

Fragmento globular A1 (ouro) e peptídeo helicoidal A2 (amarelo) juntamente com o anel de cinco subunidades B (verde, cinza, vermelho, azul e pink). A região que contém o local ativo da molécula é realçada por um asterisco e da ligação dissulfeto na subunidade A é indicado pela seta.

Fonte: Odumosu et al. (2010).

A toxina ST é um peptídeo de aproximadamente 2 kDa composto por 18-19 aminoácidos que mimetiza o hormônio intestinal guanilina (HUGHES et al., 1978) (**Figura 5**). ST é classificada em ST-I (ou STa), codificada pelo gene *estA* presente no plasmídeo pCS1 (SMITH et al., 1979) e isolada principalmente de fezes humanas e ST-II (ou STb) isolada principalmente de fezes animais. ST-I é sintetizada como uma proteína precursora de 72 aminoácidos e então convertida para a forma ativa, contendo três pontes dissulfeto intramoleculares, depois de liberada para o

periplasma bacteriano (WEIGLMEIER; RÖSCH; BERKNER, 2010). Uma vez liberada no intestino, ST liga-se ao receptor de guanilato ciclase C (GC-C) presente no epitélio intestinal. Esta interação ativa o domínio intracelular da GC-C, levando a acúmulo de GMPc e interrupção dos canais de cloreto na célula, induzindo a diarreia secretória (SCHULZ et al., 1990).

Figura 5 - Organização estrutural da toxina ST.

A região hidrofóbica implicada na ligação ao receptor está representada em vermelho.
Fonte: Weiglmeier, Rösch e Berkner (2010).

Outros fatores de virulência incluem **EatA** (*ETEC autotransporter A*), uma serino-protease autotransportadora que cliva catepsina G e pode acelerar o acúmulo de fluidos (PATEL et al., 2004) e **ClyA** (*cytolysin activator*), uma citotoxina formadora de poros (LUDWIG et al., 1999).

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

STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*) ou VTEC (*Verotoxin-producing E. coli*) foi primeiramente descrita por Konowalchuk, Speirs e Stavric (1977) por sua atividade citotóxica em células Vero (célula epitelial renal de macaco verde africano) surgindo então o termo verotoxina ou verocitotoxina (KONOWALCHUK et al., 1977). Na década de 1980 aconteceu o primeiro isolamento de STEC do sorotipo O157:H7 em um surto de diarreia sanguinolenta, o qual foi associado à ingestão de carne de hambúrguer contaminada e mal-cozida (RILEY et al., 1983). Este patotipo foi reconhecido por causar desde diarreias leves até doenças severas como a colite

hemorrágica (CH), trombocitopenia e síndrome hemolítico-urêmica (SHU) (O'BRIEN et al., 1983).

Dentre as STEC, além da produção das toxinas, um subgrupo, as *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) induzem a lesão *attaching and effacing* (A/E), de forma semelhante à que ocorre em EPEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

O gado leiteiro e de corte são reconhecidos como maior reservatório natural de STEC. No entanto, mais de 100 sorotipos de STEC foram isolados de outros animais como ovelhas, porcos, cabras, veados, cavalos, cachorros e pássaros (GYLES, 2007). A maioria dos surtos tem sido associada ao consumo de carne, leite e derivados contaminados, fontes de água contaminada, consumo de vegetais frescos e produtos vegetais industrialmente processados (CAPRIOLI et al., 2005; EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL AND EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, ECDC, EFSA, 2011).

Os grandes rebanhos bovino e ovino podem favorecer a disseminação dessas bactérias no Brasil, pois, além de reservatório de STEC, os animais também representam potencial fonte de infecção em humanos. Estudos mostraram que a presença de STEC em nosso rebanho bovino variou de 10 a 83%, dependendo da região estudada (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007; ANDRADE et al., 2012; CERQUEIRA et al., 1999; FARAH et al., 2007; IRINO et al., 2005; LEOMIL et al., 2003; MOREIRA et al., 2003; TIMM et al., 2007). Também, um estudo em ovelhas constatou a presença de STEC em 52,1% dos animais analisados (VETTORATO et al., 2003). O impedimento da disseminação de STEC depende em grande parte das boas práticas de higiene na manipulação destes animais nos abatedouros e frigoríficos, no sentido de evitar a contaminação cruzada das fezes com a carne.

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

O grupo STEC compreende quase 250 sorotipos diferentes e aproximadamente 100 destes, associados a doenças (JOHNSON; THORPE; SEARS, 2006). O sorotipo O157:H7 é o mais estudado, considerado o mais virulento e frequente (ECDC, EFSA, 2011; CROXEN; FINLAY, 2010; RILEY et al., 1983). Os sorogrupos e sorotipos implicados em surtos variam de país para país,

embora certos sorogrupos como O26, O103, O111, e O145 sejam comumente encontrados na maioria dos países (GYLES, 2007).

Recentemente, um sorotipo raro, O104:H4, causou um dos maiores surtos por STEC envolvendo 3.816 casos (incluindo 54 mortes) na Alemanha, 845 dos quais (22%) resultaram em SHU (FRANK et al., 2011). Conforme citado anteriormente, alguns autores classificaram esse isolado como STEAEC (*E. coli* enteroagregativa produtora da toxina de Shiga) devido a presença de características das categorias de STEC e EAEC (CLEMENTS et al., 2012).

Guth et al. (2002) descreveram o primeiro caso de SHU causado por STEC no Brasil e Irino et al. (2002) reportaram três amostras STEC do sorotipo O157:H7 isoladas de casos diarreicos em São Paulo. 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 isolados de STEC.

Casos notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) ou rastreados pela Autorização de Internação Hospitalar (AIH) do Estado de São Paulo no período de 1998 a 2011 apontaram a ocorrência de 93 casos de SHU com 35 óbitos relacionados ou não a alimentos (CVE, 2011). Destes, em 22 casos foram relatados diarreia sanguinolenta, 13 diarreia não-sanguinolenta, 35 sem diarreia e 23 ignorados. Porém, somente em 10 destes casos a coprocultura foi realizada, e a detecção de O157:H7 foi descrita em um caso de 2007 (CENTRO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA, 2011). Vale ressaltar que, nos casos de SHU a partir de 2003, com coleta de amostra e resultado de *E. coli*, as cepas foram encaminhadas para Instituto Adolfo Lutz para sorotipagem (CVE, 2011).

Infelizmente, na maioria dos casos, nem sempre o agente etiológico foi identificado, pela ausência de coleta de fezes para diagnóstico. Além disso, um dos únicos agentes rastreados em laboratório clínico é STEC O157:H7, mas como esse sorotipo é pouco encontrado em nosso país, pode haver uma falsa interpretação 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, como O26 e O111 (GUTH et al., 2002; VAZ et al., 2004). Neste sentido, um estudo provando que STEC é o principal agente causador dessa doença, evidenciou a infecção por STEC em 92,3% dos 13 casos de SHU

identificados em São Paulo no período de janeiro de 2001 a agosto de 2005 (de SOUZA et al., 2011).

Os principais fatores de virulência, os quais classificam esse patotipo são as toxinas de Shiga 1 e/ou 2 (**Stx1** e/ou **Stx2**). Stx1 e Stx2 podem ser subdivididas em Stx1, Stx1a, Stx1c e Stx1d (BÜRK et al., 2003) e Stx2, Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g (PERSSON et al., 2007). Desta forma, um isolado de STEC pode produzir apenas uma das toxinas, Stx1 ou Stx2, ou ambas ou ainda suas múltiplas formas (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 integrados no cromossomo bacteriano (CAPRIOLLI et al., 2005). Pertencem ao grupo das toxinas do tipo AB₅, apresentando uma subunidade A com 32 kDa e 5 subunidades B com 7,5 kDa (**Figura 6**). A subunidade A é composta por um peptídeo A1 que possui atividade enzimática e um peptídeo A2 que liga a subunidade A à subunidade B. A subunidade B é responsável pela ligação da toxina ao receptor globotriasilceramida (Gb₃) presente no homem predominantemente na superfície das células renais, intestinais e cerebrais, o que explica as manifestações clínicas das pessoas infectadas por STEC (CLEMENTS et al., 2012; GYLES, 2007; NATARO; KAPER, 1998).

Figura 6 - Organização estrutural da toxina Stx.

Subunidade A (azul) ligada às cinco subunidades B (coloridas).
Fonte: Odumosu et al. (2010).

Stx1 é estrutural e imunologicamente idêntica à toxina de Shiga produzida por *Shigella dysenteriae* tipo I. As subunidades A e B das toxinas Stx1 e Stx2 possuem,

entre si, 55 e 57% de semelhança na sequência genética, 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 proteica e acarretando a morte celular (JOHNSON; THORPE; SEARS, 2006).

Além das toxinas de Shiga, existem outros fatores capazes de aumentar ou colaborar na patogenicidade de STEC, porém encontrados em parte dos isolados. A enterohemolisina A (**Ehly**) é codificada pelo gene *ehxA* localizado em um plasmídeo de 90 kb. Também **EspP** (*extracellular serine protease, plasmid encoded*) uma serino protease codificada no plasmídeo de virulência pO157 tem a capacidade de clivar o fator V de coagulação, podendo resultar na exacerbação da doença hemorrágica (BRUNDER et al., 1997). As proteínas encontradas em EPEC e codificadas na região **LEE**, também são encontradas em EHEC resultando na associação com 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). Algumas adesinas codificadas fora da região LEE têm sido descritas como possíveis fatores de virulência. Dentre elas destacamos: **ToxB** (*Toxin B*), que contribui na aderência da cepa Sakai do sorotipo O157:H7 (TATSUNO et al., 2001), **Saa** (*STEC autoagglutinating adhesin*), uma adesina autoaglutinante identificada em sorotipos *eae* negativos (PATON et al., 2001), **Sfp** (*sorbitol-fermenting plasmid*), uma fímbria presente em isolados de EHEC fermentadores de sorbitol do sorogrupo O157 (BRUNDER et al., 2001), **Iha** (*IrgA homologue adhesin*), uma proteína similar a IrgA responsável pela aderência de *V. cholerae* (SCHMIDT et al., 2001) e **LPF** (*long polar fimbriae*), uma longa fímbria polar similar a LPF de *S. enterica* serovar Typhimurium (DOUGHTY et al., 2002; TORRES et al., 2002).

1.2.4 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

A diarreia causada por EAEC é frequentemente aquosa, mas também pode ser acompanhada de muco ou sangue (CROXEN; FINLAY, 2010). EAEC é reconhecida como um patógeno emergente, e segunda maior causa de diarreia

persistente em crianças de países em desenvolvimento depois de EPEC atípica e de diarreia dos viajantes depois de ETEC (revisado em CLEMENTS et al., 2012). Uma meta-análise de 41 estudos de caso-controle demonstrou uma associação entre EAEC e diarreia aguda e crônica entre os viajantes, crianças, adultos e pessoas infectadas pelo HIV, tanto nos países industrializados como nos países em desenvolvimento (HUANG et al., 2006).

Estudos no Brasil mostraram uma variada prevalência de isolados EAEC de acordo com o local pesquisado: 5,5% em Porto Velho (ORLANDI et al., 2006); 8,9% em São Paulo (ARAÚJO et al., 2007); 10,7% em Salvador (BUERIS et al., 2007); 25% em João Pessoa (MORENO et al., 2010); 14,6% em crianças com diarreia e 11,1% em crianças saudáveis do Rio de Janeiro (REGUA-MANGIA et al., 2004); 19,6% em crianças com diarreia e 10,8% em crianças saudáveis de Brasília (PIVA et al., 2003). Em um estudo com isolados de várias regiões do Brasil, identificou-se EAEC em 22% dos casos diarreicos e 5% dos casos controle (ZAMBONI et al., 2004). Além disso, um estudo relacionou a alta prevalência de EAEC na microbiota de pacientes com doenças intestinais inflamatórias, ou seja, 60,9% de pacientes com colite ulcerativa e 87,5% de pacientes com Doença de Crohn (THOMAZINI et al., 2011).

Isolados de EAEC possuem grande diversidade genômica e heterogeneidade nos fatores de virulência. Apesar dos diferentes fatores descritos para EAEC, como: adesinas, toxinas e formação de biofilme, a patogênese da diarreia causada por este patótipo ainda não foi esclarecida (HARRINGTON et al., 2006). Isolados de EAEC são definidos pelo fenótipo de aderência agregativa ou “tijolos empilhados” em células HEp-2, embora na mucosa intestinal, EAEC possa formar uma espessa camada de biofilme (TZIPORI et al., 1992). A colonização requer aderência por meio de estruturas fimbriais conhecidas como **AAFs** (*aggregative adherence fimbriae*). Até o momento, quatro variantes de AAFs foram identificadas (AAF/I, AAF/II, AAF/III e Hda) (BOISEN et al., 2008; HARRINGTON et al., 2006).

Isolados de EAEC podem ser subdivididos em EAEC típica (tEAEC), caracterizada pela presença do regulador AggR e EAEC atípica (aEAEC) caracterizada pela ausência deste regulador (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). AggR é um ativador transcricional que regula vários fatores de virulência de EAEC (NATARO et al., 1994).

Além dos fatores de colonização encontramos em alguns isolados de EAEC a proteína **Hra** (*Heat-resistant agglutinin*) e **Tia** (*Toxigenic invasion A*) (também encontrado em ETEC) (MANCINI et al., 2011). A proteína secretada **dispersina** é secretada para o meio extracelular, onde permanece ligada ao lipopolissacarídeo da bactéria, neutralizando a carga negativa da superfície externa e permitindo a projeção das fímbrias (VELARDE et al., 2007). Além disso, dispersina atua diminuindo a autoagregação das bactérias permitindo a dispersão das mesmas. Isolados de EAEC também podem produzir proteases, como **Pic** (*protease involved in colonization*) que possui atividade de hemaglutinina e mucinolítica (HENDERSON et al., 1999); toxinas como **ShET1** (*Shigella enterotoxin 1*), **EAST1** (*enteroaggregative E. coli ST*) (MENARD; DUBREUIL, 2002) com funções ainda não bem entendidas e/ou **Pet** (*plamid-encoded toxin*), que provoca o rompimento da actina presente no citoesqueleto da célula hospedeira causando seu arredondamento e descolamento (ESLAVA et al., 1998).

1.2.5 *Escherichia coli* enteroinvasora (EIEC)

EIEC é bioquímica e geneticamente semelhante à *Shigella spp* e possui o mesmo mecanismo de patogenicidade (revisado em CROXEN; FINLAY, 2010). EIEC pode causar uma colite inflamatória invasiva, e ocasionalmente disenteria, mas na maioria dos casos causa diarreia aquosa, como as outras DEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Este patotipo é pouco isolado em relação aos outros descritos anteriormente. Estudos no Brasil descreveram a presença de EIEC em 1,4% dos isolados em Porto Velho e João Pessoa e menos de 1% em Salvador e Rio de Janeiro (FRANZOLIN et al., 2005; MORENO et al., 2010; ORLANDI et al., 2006; REGUA-MANGIA et al., 2004).

O mecanismo de patogênese consiste em penetração da célula epitelial, lise do vacúolo endocítico, multiplicação celular, deslocamento no citoplasma e passagem para célula adjacente (PARSOT, 2005). As proteínas envolvidas neste mecanismo são codificadas por genes contidos em um grande plasmídeo de 213 kb, como a proteína de membrana externa **IcsA**, e um sistema de secreção tipo III, composto por várias proteínas secretadas, como as proteínas **IpaA** (*invasion plasmid antigen A*), **IpaB** (*invasion plasmid antigen B*), **IpaC** (*invasion plasmid antigen C*) e **IpgD** (*Inositol phosphate phosphatase*) que medeiam eventos de

sinalização, rearranjo do citoesqueleto, lise do vacúolo endocítico, entre outras funções (COSSART; SANSONETTI, 2004).

1.2.6 *Escherichia coli* de aderência difusa (DAEC)

Isolados de DAEC possuem baixa prevalência em relação às outras DEC. A importância de DAEC para doença entérica ainda permanece incerta. Este patotipo é caracterizado pelo fenótipo de aderência difusa em células HEp2, devido a ação de adesinas afimbriais (**Afa**, *afimbrial adhesin*) ou fimbriais (**Dr**) (CLEMENTS et al., 2012; NATARO, et al., 1987). Uma das adesinas mais encontradas (75% das DAEC) é a adesina **F1845** pertencente à família de adesinas Dr (BILGE et al., 1989; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A única toxina encontrada em alguns isolados foi a toxina **Sat** (*secreted autotransporter toxin*), a qual desempenha um papel proteolítico causando lesões nas junções comunicantes de células Caco2/TC7 (GUIGNOT et al., 2007).

No Brasil, este patotipo foi pouco isolado, porém, num estudo realizado em Vitória (ES) utilizando sonda de DNA para o gene *daaC*, DAEC foi isolada em 18,3% dos casos diarreicos e 8,1% dos casos controle, principalmente em crianças acima de um ano de idade (SPANNO et al., 2008). No entanto, Snelling et al. (2009) demonstraram que a sonda *daaC* utilizada para diagnóstico de DAEC possui reatividade cruzada com *aafC* (gene fimbrial) de EAEC, pois apresenta 84% de identidade. Esta hibridização cruzada pode ter contribuído para a alta incidência de *daaC* e consequentemente de DAEC em alguns estudos (SNELLIN et al., 2009).

1.3 Diagnóstico

A associação de diarreia persistente e má nutrição como causa de mortalidade tem reforçado a necessidade do desenvolvimento de programas de intervenção além do tratamento baseado em terapia de reidratação oral. Dentro destes programas de intervenção existe a detecção dos patógenos por ensaios diagnósticos, a fim de evitar possíveis surtos e escolher o melhor método de tratamento para minimizar os sintomas dos infectados. É importante ressaltar que muitas vezes, quando a diarreia é detectada, erroneamente, aplica-se a antibioticoterapia. Conforme citado anteriormente, este tipo de tratamento não é

recomendado quando o agente causador não foi identificado, uma vez que nos casos de infecção por STEC, por exemplo, algumas substâncias podem induzir a expressão de Stx e permitir sua liberação e disseminação, agravando o quadro clínico dos pacientes (CLEMENTS et al., 2012). Com isso, reforça-se a ideia do diagnóstico como pré-requisito para o correto tratamento.

Enquanto que *V. cholerae*, *Shigella* spp e rotavírus podem ser detectados por ensaios padrões, a detecção de *E. coli* é mais difícil, aliado ao fato de que, erroneamente, este patógeno não costuma ser considerado como principal causa de diarreia em crianças, uma vez que é a espécie predominante da microbiota intestinal.

Atualmente, o diagnóstico das DEC é realizado em laboratórios de referência e alguns laboratórios clínicos. Na maioria dos casos, a detecção dos vários fatores de virulência é realizada por meio de testes moleculares como: PCR, multiplex PCR ou sondas de DNA (ANTIKAINEN et al., 2009; ARANDA et al., 2007; BISCHOFF et al., 2005; GANNON et al., 1993; GUNZBURG; TORNIEPORTH; RILEY, 1995; HUBBARD et al., 1998; KABIR et al., 2012; KIMATA et al., 2005; MÜLLER et al., 2006; PAVLOVIC et al., 2010; PERSSON et al., 2007; RAPPELLI et al., 2001; TOMA et al., 2003; VIDAL et al., 2005; WATTERWORTH et al., 2005; WEAGANT et al., 1999). Estes testes são extremamente sensíveis, no entanto, necessitam de equipamentos específicos e mão-de-obra especializada, o que os torna inviáveis para a realidade de alguns hospitais e laboratórios clínicos, principalmente de regiões com poucos recursos estruturais. Neste sentido, alguns testes fenotípicos são opções para detecção dos fatores de virulência.

Dentre os patótipos de DEC, EPEC, ETEC, EAEC e STEC possuem maior significância epidemiológica relacionada com a maioria dos surtos diarreicos. Com exceção da EAEC, a qual ainda não foi descrito um fator comum a todos os isolados pertencentes a esta categoria, as três categorias acima citadas possuem um ou mais fatores de virulência característicos, o que permite o diagnóstico.

Alguns testes imunológicos para STEC e ETEC estão disponíveis comercialmente, porém possuem alto custo por se tratar de material importado. Infelizmente não existem testes fenotípicos comerciais para detecção de EPEC, EAEC, EIEC e DAEC. Conforme veremos a seguir, os ensaios fenotípicos descritos para EPEC, STEC e ETEC apresentam-se em diferentes formatos.

1.3.1 Diagnóstico de EPEC

Na rotina clínica de alguns laboratórios é realizado o ensaio de aglutinação utilizando soros polivalentes para a detecção dos sorogrupos clássicos de EPEC reconhecidos pela OMS em 1987, sendo eles: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, e O158. Porém, o resultado deste tipo de ensaio é apenas indicativo e deve ser complementado por outros testes para garantir a correta classificação do patótipo. Além disso, 81% das EPEC atípicas não pertencem a estes sorogrupos clássicos, 26,6% não são tipáveis (TORRES et al., 2010) e mais de 200 sorotipos já foram identificados em EPEC (OCHOA et al., 2011). Outro método de classificação é baseado no tipo de interação com linhagens celulares *in vitro*, na qual isolados de EPEC típica possuem uma adesão localizada (LA) em células HEp-2 em 3 h e isolados de EPEC atípicas podem apresentar os padrões localizado-*like* (LAL), difuso (DA) e agregativo (AA) em 6 h (NATARO et al., 1987; SCALETSKY et al., 1984, 1999). Porém, as EAEC também apresentam padrão agregativo, e as DAEC apresentam padrão difuso; mostrando não ser um método específico, além de necessitar de mão-de-obra especializada e alto custo, não aplicável à rotina clínica.

Anticorpos policlonais e monoclonais anti-intimina foram obtidos e reconheceram por *immunoblotting* vários sorotipos de EPEC e EHEC que expressam diversos subtipos de intimina, resultando em 97% de sensibilidade quando se utilizou anticorpos policlonais e 78% de sensibilidade, quando se utilizou anticorpos monoclonais (KOGA, 2003; MENEZES et al., 2010).

Por outro lado, um ensaio de aglutinação passiva reversa em látex utilizando anticorpos policlonais anti-EspB foi desenvolvido, apresentando 100% de sensibilidade e 100% de especificidade (LU et al., 2002). Também, o mesmo grupo, desenvolveu um ensaio imunocromatográfico (IC) utilizando anticorpos policlonais anti-EspB que apresentou 96,9% de sensibilidade e 100% de especificidade (NAKASONE et al., 2007). Porém, estes ensaios descritos não estão disponíveis comercialmente.

1.3.2 Diagnóstico de ETEC

A forma de reconhecer os isolados de ETEC é pela expressão de uma ou ambas as toxinas que eles produzem, sendo assim, o diagnóstico depende preferencialmente da identificação de LT e/ou ST. Os ensaios biológicos para detecção de ST utilizam animais (DEAN et al., 1972; EVANS; EVANS; PIERCE, 1973), portanto, de uso impossível na rotina clínica. Para detecção de LT os ensaios biológicos tradicionais avaliam seu efeito citopático em culturas celulares, sejam em células adrenais ou células epiteliais (DONTA; MOON; WHIPP, 1974; GUERRANT et al., 1974; SPEIRS et al., 1977). Como esses ensaios são extremamente trabalhosos, testes imunossorológicos foram desenvolvidos para detecção dessas toxinas. Para ST foi desenvolvido o RIA (*radioimmunoassay*) (GIANNELLA; DRAKE; LUTTRELL, 1981) e ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (*E. COLI ST EIA*, Therm Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). E para LT, o teste Biken (HONDA et al., 1981), ELISA (YOLKEN et al., 1977), ensaios de aglutinação (ITO et al., 1983), ensaio de aglutinação de látex passiva reversa e ensaio de coaglutinação estafilocócica (*VET-RPLA TOXIN*, Therm-Scientific, Therm Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) mostraram-se específicos, no entanto, não são amplamente utilizados para fins diagnósticos (QADRI et al., 2005). Por outro lado, o ELISA-GM1 (SACK et al., 1980; SVENNERHOLM; HOLMGREN, 1978; SVENNERHOLM; WIKLUND, 1983) tornou-se um método para detectar LT e subsequentemente combinado para detecção de ST e LT tem sido utilizado em diferentes estudos epidemiológicos (QADRI et al., 2005). Porém, GM1 é extremamente caro para países em desenvolvimento e a sensibilidade deste teste é dependente do anticorpo utilizado.

Um ELISA de captura utilizando a fração enriquecida em IgG do anticorpo anti-LT-I obtido em coelho e um anticorpo MAb anti-LT-I, caracterizado como IgG2b foi também desenvolvido e sua sensibilidade foi de 78% e sua especificidade de 92%, este método mostrou-se três vezes mais sensível do que o ensaio GM1-ELISA (MENEZES et al., 2003). Nos ensaios de revalidação um meio de cultura para melhor expressão de LT-I, o uso da polimixina para liberar a toxina do periplasma e um número maior de amostras de ETEC produtoras e não produtoras de LT, assim com outras enterobactérias foram testados. Esta revalidação levou a um método com 100% de sensibilidade e 99% de especificidade (MENEZES et al., 2006).

1.3.3 Diagnóstico de STEC

A forma de reconhecer os isolados de STEC é pela expressão de uma ou ambas as toxinas que eles produzem, sendo assim, o diagnóstico depende preferencialmente da identificação de Stx1 e/ou Stx2.

A dificuldade de isolamento do agente patogênico é minimizada com procedimentos de pré-enriquecimento da amostra por meio de separação imunomagnética (IMS) e/ou cultivo em meio de enriquecimento específico. Estes procedimentos auxiliam no aumento da sensibilidade do teste de detecção empregado. Para enriquecimento e isolamento por IMS existem disponíveis o kit para o sorogrupo O157 (*Dynabeads® anti-E.coli O157*, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) e não-O157 (*RapidChek® CONFIRM™ non-O157 STEC Kit*, Sdix, Newark, DE, EUA) que detecta os sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121, O145. Os meios de enriquecimento diferenciais geralmente possuem substâncias, como antibióticos, por exemplo, que aumentam a expressão dos fatores de virulência alvo.

Com a emergência principalmente de *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 (BOPP et al., 1999; KONEMAN et al., 1997). No entanto, há variantes do sorogrupo O157 e STEC não-O157 que fermentam sorbitol, diminuindo assim a sensibilidade deste método na detecção destes patógenos (PATON; PATON, 1998).

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

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). Dentre os ensaios disponíveis comercialmente podemos citar os testes de aglutinação: *VTEC-Screen* (SEIKEN, Japão) e *VTEC-RPLA TOXIN* (Therm Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA); os testes de 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 os testes imunocromatográficos (IC) *Duopath Verotoxin Test* (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha) e *RIDA® QUICK Verotoxin/O157 Combi* (R-biopharm, Darmstadt, Alemanha). 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, 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.

Mendes-Ledesma et al. (2008) obtiveram soros policlonais de coelhos contra Stx1 e Stx2. A reatividade destes soros com as respectivas toxinas foi idêntica, ambos reconhecendo as duas subunidades. O soro anti-Stx2 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. Todos os seis isolados STEC testados foram positivos por ELISA e cinco isolados foram positivos por *immuno dot* (MENDES-LEDESMA et al., 2008).

1.4 Aplicabilidade de anticorpos em imunodiagnóstico

Anticorpos são ferramentas essenciais que têm sido utilizadas no desenvolvimento de ensaios diagnósticos. De modo geral, anticorpos policlonais são obtidos a partir do soro de animais imunizados com o antígeno alvo e conferem a sensibilidade ao teste. Anticorpos monoclonais são produzidos por hibridomas, células obtidas a partir da fusão de mielomas com plasmócitos de animais previamente imunizados com o antígeno alvo; possuem características de homogeneidade, especificidade e podem ser produzidos ilimitadamente (SVENNERHOLM et al., 1986). Assim, a utilização de ambos anticorpos no mesmo ensaio (captura) conferem a sensibilidade e a especificidade de um teste. Além disso, comparados com outros métodos de detecção, os ensaios sorológicos, como por exemplo: o teste imunocromatográfico, apresentam características condizentes com a realidade social de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, já que

pode ser aplicado em qualquer laboratório, evitando surtos e minimizando os danos causados por infecções individuais através do diagnóstico rápido.

1.4.1 Características dos testes imunocromatográficos

Atualmente, o teste imunocromatográfico (IC), também chamado de ensaio de fluxo lateral, *dipstick* ou ensaio de fita é amplamente utilizado na detecção de diferentes patógenos e substâncias como hormônios e pesticidas. O teste IC possui diversas características vantajosas, como: resultado rápido, baixo custo, estabilidade a longo prazo em diferentes climas e pode ser realizado por pessoal não treinado pela facilidade de aplicação e leitura dos resultados (CHIAO et al., 2004; PAEK et al., 2000). O primeiro teste IC comercialmente disponível foi o teste de gravidez, baseado na rápida detecção de gonadotrofina coriônica humana em amostras de urina (MAY et al., 1991).

Basicamente, o teste é composto de dois anticorpos com ligação distinta a epitopos presentes em uma molécula analisada (analito) (**Figura 7**). Um dos anticorpos, o anticorpo de detecção, é marcado com um gerador de sinal, como esferas de látex ou ouro coloidal, e o outro anticorpo, é denominado anticorpo de captura, ambos são imobilizados sobre superfície sólida. O anticorpo de detecção é colocado em um estado desidratado em uma membrana de fibra de vidro de modo que possa ser instantaneamente dissolvido em contato com o meio aquoso contendo o analito, ou seja, a molécula a ser detectada. O anticorpo, em seguida, participa na reação de ligação para formar um complexo com o analito na fase líquida. Este complexo migra por capilaridade até ser capturado pelo anticorpo previamente imobilizado sobre a superfície da membrana de nitrocelulose (**Figura 7**). Um anticorpo adicional específico para o anticorpo de detecção pode ser utilizado para produzir um sinal de controle. Uma fibra de celulose deve estar localizada nas extremidades anterior e posterior da fita para induzir uma contínua absorção do complexo imune. O sinal de cor gerado pela reação pode ser lido dentro de 10 a 20 minutos, de maneira qualitativa e/ou quantitativa (PAEK et al., 2000).

Figura 7 - Esquema do princípio de funcionamento do teste imunocromatográfico de captura.

Fonte: ROCHA (2012).

Considerando as facilidades descritas, o teste IC pode ser empregado em locais de baixa renda e poucos recursos laboratoriais, principalmente na detecção de doenças de pouco interesse para países desenvolvidos, como a diarreia. Neste sentido, o grupo de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, no qual este projeto foi realizado, vem dedicando-se ao desenvolvimento e padronização de ensaios imunossorológicos para detecção de algumas das categorias mais frequentes em nosso meio e também para as consideradas emergentes. Para isso, soros policlonais e anticorpos monoclonais contra diversos fatores de virulência de diferentes categorias de *E. coli* diarreiogênica foram obtidos em trabalhos anteriores realizados no laboratório (KOGA et al., 2003; MENDES-LEDESMA et al., 2008; MENEZES et al., 2002, 2003, 2006; MENEZES et al., 2010; NARA et al., 2010; ROCHA; PIAZZA, 2007; VILHENA-COSTA et al., 2006).

Sendo assim, a carência de testes fenotípicos para detecção das DEC, o alto custo dos ensaios comerciais disponíveis para detecção de STEC, a alta prevalência EPEC e ETEC, a presença de STEC no rebanho bovino e ovino (com potencial risco de SHU) e a falta de recursos laboratoriais de muitas regiões do Brasil impõem a necessidade do desenvolvimento de um método de baixo custo, alta sensibilidade e especificidade, rapidez de resultados e facilidade de aplicação. Neste contexto, o desenvolvimento de um teste imunocromatográfico (IC) para detecção dos patótipos emergentes e prevalentes é de grande importância para suprir essas necessidades, levando-nos aos objetivos do presente trabalho. Desta forma, num futuro próximo, o teste IC poderá ser aplicado não só nos laboratórios de referência, como em laboratórios clínicos e hospitais, dado a importância do diagnóstico como premissa para o correto tratamento e impedimento de novos surtos e contaminações.

2 OBJETIVOS

Desenvolvimento e padronização dos testes imunocromatográficos para a detecção de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) por meio de seus fatores de virulência: toxina termo lábil (LT) e as toxinas de Shiga 1 e 2 (Stx1 e Stx2), respectivamente.

3 PLANO DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Na presente tese de doutorado, antes do desenvolvimento dos testes imunocromatográficos, anticorpos policlonais e monoclonais contra fatores de virulência produzidos por STEC e ETEC foram obtidos e protocolos para aumento de expressão das toxinas Stx1, Stx2 e LT foram padronizados (**Figura 8**). Portanto, apresentou-se nessa tese o desenvolvimento e padronização dos testes imunocromatográficos para detecção de STEC e ETEC, além de outras estratégias apresentadas no apêndice para a futura detecção de EPEC empregando as proteínas secretadas, EspA e EspB e a complementação da detecção de ETEC, empregando a toxina ST. Detalhes de procedimentos foram descritos no **ANEXO B**.

Figura 8 - Fluxograma das principais etapas de desenvolvimento do projeto.

*PAb – corresponde a fração enriquecida em IgG dos soros policlonais
Fonte: Rocha (2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Antígenos

Na obtenção dos anticorpos policlonais e monoclonais foram utilizados diferentes antígenos alvos para a imunização dos coelhos ou camundongos. As toxinas Stx1 e Stx2 foram adquiridas comercialmente da *Tufts-New England Medical Center* (EUA) (ACHESON et al., 1993). A toxina LT foi gentilmente cedida pelo Dr. John Clementes da *Tulane University Health Sciences Center* (EUA) (BOWMAN; CLEMENTS, 2001; CLEMENTS; FINKELSTEIN, 1979).

4.2 Produção de anticorpos

Todos os animais utilizados foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e todos os procedimentos seguiram os princípios do código de ética para o uso de animais de laboratório.

4.2.1 Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2 utilizados nesse trabalho foram desenvolvidos previamente por Rocha e Piazza (2007) e Mendes-Ledesma et al. (2008) e os anticorpos policlonais anti-LT foram obtidos por Menezes et al. (2003, 2006).

Cada um dos soros policlonais obtidos foi avaliado quanto à reatividade e o título dos anticorpos por ELISA indireto. A fração enriquecida em IgG de cada soro de coelho (PAb) foi obtida conforme metodologia descrita por McKinney e Parkinson (1987) e analisada por *immunoblotting* para comprovar a reatividade com seu respectivo antígeno (nas seções **B.1.1** e **B.1.2** do **ANEXO B**). A reatividade também foi analisada por ELISA indireto, empregando a respectiva proteína nativa ou desnaturada por calor (na seção **B.1.3** do **ANEXO B**).

4.2.2 Anticorpos monoclonais

O MAb anti-Stx1 foi obtido previamente (ROCHA, 2008) e o MAb anti-Stx2 foi

obtido e caracterizado no presente trabalho (na seção **B.2** do **ANEXO B**). As metodologias utilizadas, os resultados e suas características estão descritos no manuscrito aceito para publicação no fascículo especial *Toxin-antibody interaction*, da revista *Toxins* (ROCHA et al., 2012, *Interaction between Shiga toxin and monoclonal antibodies: binding characteristics and in vitro neutralizing abilities*, doi:10.3390/toxins40x000x) (**APÊNDICE C**).

O MAb anti-LT utilizado no presente trabalho foi obtido anteriormente (MENEZES et al., 2003, 2006). Todos os anticorpos monoclonais foram purificados em cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose após a obtenção dos hibridomas secretores, seleção, subclonagem e expansão. O grau de pureza foi determinado por SDS-PAGE em condições redutoras, a classificação quanto ao isotipo e a constante de dissociação foram determinadas por ELISA (na seção **B.2** do **ANEXO B**). A reatividade foi analisada por *immunoblotting* e ELISA indireto empregando a respectiva proteína nativa ou desnaturada por calor (nas seções **B.1.3** e **B.1.4** do **ANEXO B**).

4.3 Isolados bacterianos

Para o desenvolvimento dos ensaios desse trabalho foram utilizados os isolados protótipos de ETEC H10407, pertencente ao sorotipo O78:H11 produtor das toxinas LT-I e ST-I (EVANS; EVANS, 1973) e STEC EDL933, pertencente ao sorotipo O157:H7 produtora das toxinas Stx1 e Stx2 (O'BRIEN et al., 1983). Outros isolados testados nos diferentes ensaios estão listados no **quadro A.1 (Anexo A)**.

4.4 Expressão dos fatores de virulência

A expressão das toxinas Stx1 e Stx2 foi testada anteriormente em diferentes meios de cultivo (caldo de infusão de cérebro e coração, meio de Evans, caldo Luria-Bertani, caldo Penassay, caldo Syncase, caldo de triptona de soja, água peptonada e caldo *E. coli*) utilizando-se cepas de referência produtoras da toxina de Shiga (ROCHA; PIAZZA, 2007).

A expressão da toxina LT foi testada por ELISA na cepa protótipo de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC, H10407) após cultivo nos seguintes meios: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), caldo *E. coli* (EC), meio de Evans, caldo Syncase

e caldo de triptona de soja (TSB) (**Quadro B.1 do ANEXO B**). A expressão dessa toxina foi avaliada em 40 isolados bacterianos produtores de LT ou LT/ST (**Quadro A.1 do ANEXO A**) após a padronização do meio de cultivo e condições adequadas de liberação da toxina pela cepa protótipo. Os resultados encontrados foram analisados por análise de variância com auxílio do programa *GraphPad Prism5®* e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.5 Desenvolvimento e padronização dos testes imunocromatográficos

4.5.1 *Conjugação dos anticorpos monoclonais ou policlonais com ouro coloidal*

O protocolo de conjugação dos anticorpos monoclonais ou policlonais com ouro coloidal foi realizado de acordo com Oliver (2010) com algumas modificações. Brevemente: a solução de ouro coloidal a 0,01% (partículas de 20 nm de diâmetro) (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA ou BBInternacional, Cardiff, Inglaterra) foi previamente ajustada para pH 9,0 com solução de carbonato de potássio 0,1 M (K_2CO_3). Primeiramente, 1 mg de cada um dos anticorpos monoclonais ou policlonais foi ressuspendido em 1 mL de tampão borato 0,2 M (borato de sódio 0,2 M, NaCl 0,15 M, pH 9,0) e dialisado contra tampão borato 2 mM (borato de sódio 2 mM, NaCl 1,5 mM, pH 9,0) a temperatura ambiente por 2 h.

A quantidade de anticorpo necessária para estabilizar o ouro coloidal foi determinada da seguinte maneira: 100 μ L de ouro coloidal foram adicionados em microtubos contendo 10 μ L de diluições seriadas de cada anticorpo (MAb ou PAb) previamente dialisados. Após 10 min, adicionou-se 11 μ L de 10% de cloreto de sódio (NaCl) a cada tubo. A quantidade de anticorpo suficiente para estabilizar o ouro foi a diluição em que a solução não sofreu alteração de cor, ou seja, quantidade insuficiente de anticorpo alterava a coloração da solução de vermelho para azul (OLIVER, 2010).

Após determinação da concentração ótima de anticorpo, a quantidade de anticorpo determinada na etapa anterior foi adicionada gota-a-gota a 10 mL da solução de ouro coloidal, que foi mantida sob agitação a temperatura ambiente por 20 min. Para bloquear a reação, uma solução 10% de BSA (10% de BSA em tampão borato 0,02 M, pH 9,0) foi acrescentada em volume suficiente para concentração final de 1%. Após incubação a temperatura ambiente por 30 min, a solução foi

centrifugada a 15.000 x g por 25 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. Em seguida, o sedimento foi ressuspenso em 2 mL de uma solução 2% BSA (2% de BSA em tampão borato 0,01 M) e centrifugado a 15.000 x g por 25 min a 4 °C. Por último, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de tampão de armazenamento (3% de BSA, 3% de sacarose, borato de sódio 0,01 M e 0,05% de azida de sódio, pH 7,5) e os anticorpos monoclonais ou policlonais conjugados ao ouro coloidal (MAb-Au ou PAb-Au) foram estocados a 4 °C.

4.5.2 Tratamento dos papéis

Os papéis utilizados para montagem do teste IC, assim como suas funções no teste e medidas de utilização estão listados no **quadro 1**.

Quadro 1 - Características dos papéis utilizados nos testes imunocromatográficos.

Tipo do papel	Função	Medidas
<p><i>Fibra de celulose</i></p> <p>(6,3x)</p>	<p>Absorver a amostra no início (<i>sample pad</i>) e final da fita (<i>absorbing pad</i>)</p>	<p><i>Sample pad</i>: 2 x 0,5 cm <i>Absorbing pad</i>: 2 x 0,5 cm</p>
<p><i>Fibra de vidro</i></p> <p>(6,3x)</p>	<p>Porção de localização do anticorpo conjugado ao ouro coloidal</p>	<p>1 x 0,5 cm</p>
<p><i>Nitrocelulose HiFlow</i></p> <p>(6,3x)</p>	<p>Permitir o fluxo da amostra juntamente com o conjugado para reagir com a linha teste e linha controle previamente fixados</p>	<p>2,5 x 0,5 cm</p>

Fonte: Millipore (2008).

Cada tipo de papel foi tratado separadamente antes da montagem da fita, conforme indicado a seguir:

- 1) *sample pad*: imersos em tampão *pad* (20 mM de tampão borato de sódio, 0,1% de Triton X-100 e 0,1% de azida de sódio, pH 8,5) contendo 1% de BSA e secos a 56 °C por 2 h;
- 2) *conjugate pad*: 10 a 20 µL da solução de MAb-Au ou PAb-Au foram aplicados nas membranas. Em seguida, as membranas foram secas em estufa a 37 °C por 2 h;
- 3) *nitrocellulose HiFlow Plus*: 1,5 µL de diferentes concentrações de MAb ou PAb diluídos em PBS 0,01 M pH 7,2 foram aplicados (linha teste); e 1,5 µL de anticorpo anti-IgG de camundongo a 0,5 mg/mL ou anti-IgG de coelho a 0,5 mg/mL (Sigma) foram aplicados após 0,5 cm da linha teste (linha controle). Em seguida, as membranas foram secas a temperatura ambiente por 2 h;
- 4) *absorbing pad*: não necessita de tratamento.

4.5.3 Montagem e aplicação dos testes ICs

Para montagem dos testes, os papéis previamente tratados foram sobrepostos em uma base plástica de aproximadamente 6,2 x 0,5 cm e fixados com auxílio de fita adesiva dupla-face (**Figura 9**).

Figura 9 - Esquema de montagem dos testes imunocromatográficos.

Fonte: Adaptado de Tech and Bio (2011).

Após montagem, as fitas foram testadas mergulhando a extremidade *sample pad* em 300 μL das amostras: soluções contendo os antígenos purificados ou sobrenadantes dos isolados bacterianos (**Figura 10**). A leitura visual do resultado foi realizada depois de 20 min. O teste foi considerado positivo, quando as duas linhas (linha teste e linha controle) foram visíveis, independentemente da variação da intensidade de cor. O teste foi considerado negativo quando somente a linha controle estava presente e inválido quando não foi evidenciada a linha controle (**Figura 10**).

Figura 10 - Procedimento e interpretação dos resultados dos testes ICs.

Após 20 minutos de contato com a amostra o teste é interpretado. O teste é considerado **POSITIVO**: quando duas linhas são visíveis, sendo uma linha na região controle (C) e outra na região teste (T), **NEGATIVO**: quando apenas uma linha controle (C), não sendo observada a linha teste (T) e **INVÁLIDO**: quando não é evidenciada a linha controle (C).

Fonte: Rocha (2012).

4.5.4 Padronização dos testes ICs

Na padronização dos testes ICs, diferentes parâmetros foram analisados, dentre eles, o volume do anticorpo conjugado ao ouro, a região de bloqueio, a definição do conjugado ideal, a concentração do anticorpo na linha teste para a captura dos antígenos, o tempo de leitura, o limite de detecção e o teste com sobrenadante de isolados bacterianos positivos e negativos.

Para avaliação do volume dos anticorpos conjugados ao ouro, diferentes volumes (10, 15 e 20 μ L) foram aplicados na fibra de vidro e a intensidade da resposta foi medida visualmente após montagem e realização do teste. O bloqueio da reação foi realizado com tampão *pad* acrescido de 1% de BSA nas regiões do *sample pad* ou nitrocelulose e a presença das linhas foi avaliada após montagem e realização do teste.

Para a definição do conjugado ideal para a detecção dos antígenos, MAb-Au ou PAb-Au foram avaliados, empregando-se na linha teste os anticorpos monoclonais ou policlonais correspondentes. Para isso, 20 μ L de cada conjugado (MAb-Au ou PAb-Au) foram aplicados na porção fibra de vidro e secos a 37 °C por duas horas. Ao mesmo tempo, 1,5 μ L dos anticorpos monoclonais ou policlonais na concentração de 1 mg/mL foram aplicados na membrana de nitrocelulose e secos a temperatura ambiente por 2 h. A presença das linhas foi avaliada após montagem e realização do teste com seu respectivo antígeno diluído em PBS 0,01 M pH 7,2.

Para avaliar a concentração ideal do anticorpo da linha teste, 1,5 μ L das concentrações 0,25, 0,5, 1, 2 e 4 mg/mL do anticorpo escolhido na etapa anterior (MAb ou PAb) foram aplicados na membrana de nitrocelulose e secos a temperatura ambiente por 2 h. A intensidade das linhas foi avaliada após montagem e realização do teste com seu respectivo antígeno diluído em PBS 0,01 M pH 7,2.

O limite de detecção de cada teste foi determinado utilizando-se cada antígeno nas concentrações de 15,6 a 500 ng/mL com as fitas previamente montadas com as concentrações padronizadas. Uma vez padronizados os testes ICs, isolados bacterianos foram cultivados e tratados em condições pré-estabelecidas para expressão dos respectivos antígenos, e após centrifugação, os sobrenadantes foram utilizados nos testes ICs para avaliar a reatividade cruzada entre as toxinas.

5 RESULTADOS

5.1 Anticorpos policlonais e monoclonais

5.1.1 Obtenção do toxóide Stx2

Como as toxinas de Shiga são as mais potentes citotoxinas conhecidas (O'BRIEN et al., 1983), antes da imunização dos animais foi necessária a inativação de seu efeito citotóxico. Essa ação foi abolida efetivamente até a maior concentração testada (1.000 ng) quando comparadas com a toxina (**Figura 11A e B**), que por sua vez, causou a morte em mais de 90% das células nesta mesma concentração. Para verificar, se o toxóide ainda mantinha sua propriedade antigênica, realizou-se um ELISA indireto utilizando o toxóide Stx2 e a toxina Stx2. Os resultados confirmaram que o soro reconheceu tanto a toxina quanto o toxóide com valores semelhantes (média de $A_{492nm} = 2,5$ para a toxina e 2,4 para o toxóide). Após estes ensaios o toxóide foi utilizado para imunizar os camundongos.

Figura 11 - Ação de Stx2 após a detoxificação.

A) Placa de cultura contendo células Vero coradas com cristal violeta após incubação com: PBS, toxóide Stx2 ou Stx2. **B)** Leitura das absorbâncias (A_{620nm}) após solubilização com metanol do corante fixado nas células incubadas com PBS, toxóide Stx2 ou Stx2.

Fonte: Rocha (2012).

5.1.2 Características dos anticorpos policlonais

Os títulos dos soros de coelho anti-Stx1, anti-Stx2 e anti-LT foram altos, indicando a predominância de anticorpos contra a respectiva proteína alvo (**Quadro 2**). Com a finalidade de minimizar possíveis reações inespecíficas do soro total, no presente trabalho utilizou-se a fração enriquecida em IgG dos soros dos coelhos imunizados. Portanto quando se menciona anticorpos policlonais (PAbs) refere-se a fração enriquecida em IgG dos respectivos soros.

As frações enriquecidas em IgG dos soros de coelhos anti-Stx2 e anti-LT reconheceram por ELISA indireto seus respectivos antígenos, na sua forma nativa e desnaturada (**Quadro 2**), indicando que a maioria dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos presentes na fração IgG podem ser sequenciais e não dependem do arranjo conformacional da proteína alvo. Por *immunoblotting*, as frações enriquecidas em IgG dos soros policlonais anti-Stx1, anti-Stx2 e anti-LT, reconheceram as subunidades A e B de Stx1, Stx2 e LT, respectivamente (**Quadro 2**), confirmando que, na sua grande maioria, os anticorpos reconhecem epítomos sequenciais.

No caso dos PAbs anti-Stx1 houve reatividade apenas com a respectiva toxina na forma desnaturada em presença de agentes redutores (*immunoblotting*). O aquecimento da toxina não permitiu a exposição dos epítomos para a ligação dos anticorpos estudada por ELISA indireto (**Quadro 2**).

Quadro 2 - Características dos anticorpos policlonais* anti-Stx1, anti-Stx2 e anti-LT.

Soro	Anti-Stx1	Anti-Stx2	Anti-LT
Título do soro	1:80.000	1:80.000	1:50.000
Proteína alvo	Stx1	Stx2	LT
Reatividade com a proteína nativa (ELISA)	+	+	+
Reatividade com a proteína desnaturada** (ELISA)	-	+	+
<p>Immunoblotting</p>			

NOTA: *PAbs – corresponde a fração enriquecida em IgG dos anticorpos policlonais

**Proteína submetida à temperatura de 100 °C por 10 min.

Fonte: Rocha (2012).

5.1.3 Obtenção e caracterização dos MAb anti-Stx2 e características dos MAb anti-Stx1 e anti-LT

Uma particularidade na obtenção do MAb anti-Stx2 foi o número de tentativas realizadas na obtenção dos hibridomas, somente a 8ª fusão resultou em seis hibridomas produtores de anticorpos contra Stx2 (2E11, 2F2, 1E12, 3F12, 4H5 e 4C6) (**Gráfico 3**). A pesquisa da reatividade desses hibridomas empregando como antígeno o sobrenadante de cultivo de isolados produtores e não-produtores de Stx2 foi de fundamental importância para o êxito na escolha do clone adequado. Por essa seleção excluiu-se o clone 4C6 que reagiu com os isolados não produtores da toxina Stx2 e escolheu-se o clone 2E11 para posterior diluição limite e caracterização.

Gráfico 3 - Reatividade dos MAb anti-Stx2.

Placas de ELISA sensibilizadas com PAb anti-Stx2 e incubadas com sobrenadante de isolados produtores de Stx2 (azul) e não produtores de Stx2 (vermelho), e incubadas novamente com sobrenadante dos hibridomas anti-Stx2, seguido de incubação com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (PO). Como solução cromógena foi utilizada OPD com adição de H_2O_2 e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Labsystems).
Fonte: Rocha (2012).

Todos os MAb empregados apresentaram alto nível de pureza quando analisados por SDS-PAGE em condições redutoras, observando-se dois componentes de massa molecular aparente de 50 kDa e 25 kDa, referentes as cadeias pesada e leve do anticorpo, respectivamente. A **figura 12** mostra os

resultados da purificação do MAb anti-Stx2; os demais anticorpos apresentaram o mesmo padrão de pureza.

Figura 12 - MAb anti-Stx2 após purificação por cromatografia de afinidade em Proteína A-Sepharose.

Gel de poliacrilamida a 12%: MAb anti-Stx2 purificado, submetido a eletroforese em condições redutoras e visualizadas por coloração com *Coomassie blue*. 1) Padrão de massa molecular (97 – 14,4 kDa, GE); 2) MAb anti-Stx2.

Fonte: Rocha (2012).

O MAb anti-Stx2 foi classificado por ELISA como do isotipo IgG1 (**Quadro 3**) e os demais MAb's utilizados no presente estudo foram classificados em IgG1 para o MAb anti-Stx1 e IgG2b para o MAb anti-LT, como é o caso de vários MAb's já produzidos para diferentes antígenos, como uma consequência do longo período de imunização (NAKAO et al., 1999, 2002).

Os MAb's mostraram uma interação eficiente com seus respectivos antígenos, indicado pelas altas constantes de dissociação (K_D) de $6,1 \times 10^{-10}$ M para MAb anti-Stx2, $2,5 \times 10^{-10}$ M para o anti-Stx1 e $4,9 \times 10^{-11}$ M para o anti-LT (**Quadro 3**). Outras características dos MAb's anti-Stx1 e anti-Stx2 estão descritas no manuscrito apresentado no **Apêndice C**.

Sabe-se que os MAb's reconhecem um único epítipo que pode ser conformacional ou sequencial (BURNS, 2005). Neste sentido, testes com os MAb's em estudo indicaram que os epítipos são sequenciais, já que os anticorpos apresentaram reatividade por *immunoblotting* com seus respectivos antígenos. No caso das toxinas de Shiga, houve reatividade do anticorpo anti-Stx1 com a subunidade B de Stx1 e do anticorpo anti-Stx2 com a subunidade A de Stx2

(**Quadro 3**). Uma particularidade é o MAb anti-LT que reconhece ambas subunidades, neste caso, provavelmente se trata de epítipo que encontra-se na região de união das subunidades A e B (**Quadro 3**). Porém, mesmo quando estas subunidades são separadas por SDS-PAGE, o reconhecimento dos fragmentos das sequências de aminoácidos ainda se mantém evidente.

Quadro 3 - Características dos anticorpos monoclonais anti-Stx1, anti-Stx2 e anti-LT

Anticorpos monoclonais	Anti-Stx1	Anti-Stx2	Anti-LT
Nome	3E2	2E11	D1
Isotipo IgG	IgG1	IgG1	IgG2b
Constante de dissociação (K_D)	$2,5 \times 10^{-10}$ M	$6,1 \times 10^{-10}$ M	$4,9 \times 10^{-11}$ M
Proteína alvo	Stx1	Stx2	LT
Reatividade com a proteína nativa (ELISA)	+	+	+
Reatividade com a proteína desnaturada* (ELISA)	-	-	-
<p>Immunoblotting</p>			

NOTA: * Proteína submetida a temperatura de 100 °C por 10 min.

Fonte: Rocha (2012).

Quando a proteína está íntegra, o epítopo fica exposto para reconhecimento do anticorpo, por outro lado, após fervura dos antígenos a 100 °C por 10 min, verificou-se que os MAbs anti-Stx1, anti-Stx2 e anti-LT perderam a capacidade de ligação (**Quadro 3**). Provavelmente, nestas condições, as alterações sofridas pelas toxinas não permitiram que os epítops fossem expostos para reconhecimento dos anticorpos, ou pelo menos não fossem expostos de maneira eficaz.

5.2 Expressão da toxina termolábil (LT)

O isolado protótipo de ETEC H10407 expressa LT tanto no espaço periplasmático como no sobrenadante do cultivo bacteriano (LASARO et al., 2006). Dessa maneira, nesta primeira etapa, a avaliação da presença e aumento da expressão de LT foi realizada no sobrenadante bacteriano do isolado protótipo. Os meios DMEM, TSB e EC possibilitaram maior expressão de LT do que os meios Syncase e Evans (**Gráfico 4**). Convém salientar que, a expressão da toxina LT foi semelhante nos tempos de 8 h ou 24 h.

Gráfico 4 - Expressão da toxina LT no isolado de ETEC H10407 em diferentes meios de cultivo.

A expressão foi medida por ELISA de captura nos sobrenadantes dos cultivos.
Fonte: Rocha (2012).

Alguns trabalhos citam que a adição de lincomicina ao meio de cultivo estimula a produção de LT na cepa protótipo (CHAPMAN; SWIFT et al., 1984; LEVNER; WIENER; RUBIN, 1977; MINAMI et al., 1984). Outros autores afirmam

que a presença de sais de bile causa a liberação de LT no meio de cultivo (HUNT et al., 1991). Por este motivo, após seleção do caldo EC como meio para expressão de LT, o isolado H10407 foi cultivado na presença ou ausência de lincomicina ou ciprofloxacina (ROCHA; PIAZZA, 2007). Conforme já descrito, verificou-se que a lincomicina provocou um aumento na expressão de LT (**Gráfico 5**) quando comparado ao meio sem antibiótico. Por outro lado, a ciprofloxacina pouco contribuiu para o aumento da produção de LT quando comparado ao meio sem antibiótico.

Gráfico 5 - Expressão da toxina LT no isolado ETEC H10407 na presença ou ausência de antibióticos.

Isolado H10407 cultivado na ausência (azul) ou presença de lincomicina (vermelha) ou ciprofloxacina (verde). A expressão foi medida por ELISA de captura no sobrenadante do cultivo bacteriano. Fonte: Rocha (2012).

A expressão de LT não foi detectada em alguns sobrenadantes de isolados de ETEC quando estes foram cultivados em caldo EC acrescido de lincomicina. De fato, de acordo com a literatura, não há homogeneidade na produção de toxinas pelos diferentes isolados bacterianos (O'BRIEN et al., 1984). Além disso, existem isolados que secretam LT, outros mantêm a toxina no espaço periplasmático, outros mantêm a toxina secretada em vesículas (KESTY et al., 2005) e outros ainda secretam uma parte e mantêm outra parte internalizada (LASARO et al., 2006).

Como o pré-requisito para a detecção dessa toxina é a produção e liberação em quantidade adequadas, investigou-se o tratamento com diferentes compostos

(EDTA, polimixina B e Triton X-100). A expressão de LT também foi avaliada no cultivo como forma de abranger tanto o sobrenadante quanto o sedimento bacteriano como descrito por Ristaino, Levine e Young (1983). Esses autores observaram que o tratamento direto do cultivo bacteriano com polimixina B incrementava a quantidade de toxina liberada, o que foi também observado no presente trabalho. Também o Triton X-100 mostrou-se eficaz na liberação de LT tanto do sedimento como do cultivo bacteriano (**Gráfico 6**).

Gráfico 6 - Expressão da toxina LT em ETEC H10407 após tratamento com diferentes compostos.

A expressão foi medida por ELISA de captura no sobrenadante de cultivo sem tratamento (azul), sobrenadante do sedimento tratado (vermelho) e sobrenadante do cultivo bacteriano tratado (verde).
Fonte: Rocha (20,12).

Durante os ensaios realizados observou-se que alguns isolados de ETEC expressaram LT na presença de ciprofloxacina, outros na presença de lincomicina, outros ainda expressaram na presença dos dois antibióticos. Dessa forma, padronizou-se a adição dos dois antibióticos ao meio EC para expressão de LT num teste com 40 isolados bacterianos produtores de LT (**Quadro A.1** do **ANEXO A**). Altos níveis de expressão foram detectados nessa condição, ou seja, pode-se afirmar que os antibióticos favoreceram o aumento significativo da produção de LT ($p < 0,001$) (**Gráfico 7**).

Gráfico 7 - Expressão de LT em isolados de ETEC após cultivo na presença ou ausência de antibióticos.

Isolados produtores de LT cultivados na ausência (azul) ou presença (vermelho) de lincomicina e ciprofloxacina. A expressão foi medida após tratamento com Triton X-100 no cultivo bacteriano por ELISA de captura.

Fonte: Rocha (2012).

5.3 Testes imunocromatográficos

5.3.1 Concentração do anticorpo para estabilização do ouro coloidal

A quantidade necessária de MAb ou PAb para estabilização do ouro coloidal variou de 1 a 2 μg de anticorpo para cada 100 μL da solução de ouro coloidal, ou seja, 10 a 20 $\mu\text{g/mL}$ de ouro. Concentrações de anticorpo abaixo de 1 μg não foram capazes de estabilizar a solução (**Figura 13**, tubos 5 e 6). A figura 13 mostra o resultado obtido na estabilização do ouro coloidal durante a conjugação com o MAb anti-LT e é representativa dos testes com os demais conjugados.

Figura 13 - Definição da concentração de anticorpo necessária para estabilização do ouro coloidal.

100 μ L de ouro coloidal 0,01% foi acrescido de 10 μ L de diferentes concentrações de PAb anti-LT: **1)** 8 μ g; **2)** 4 μ g; **3)** 2 μ g; **4)** 1 μ g; **5)** 0,5 μ g; **6)** 0,25 μ g. Após 10 min as soluções foram acrescidas de 11 μ L de NaCl 10% e a leitura dos resultados realizada visualmente.
Fonte: Rocha (2012).

5.3.2 Volume do conjugado

O volume do anticorpo conjugado ao ouro escolhido foi de 20 μ L porque permitiu a visualização de linhas com colorações mais intensas (**Figura 14**, fita1). A figura 14 mostra o resultado obtido para o teste utilizando o conjugado MAb-Au anti-Stx2 e é representativa dos testes com os demais conjugados.

Figura 14 - Teste IC para definição do volume do conjugado.

Montagem das fitas: MAb-Au anti-Stx2: **1)** 20 μ L; **2)** 15 μ L; **3)** 10 μ L, linha em teste (T): 1,5 μ L da solução de 3 mg/mL de PAb anti-Stx2 e linha controle (C) com 0,5 mg/mL do anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (Invitrogen). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min numa solução de 1 μ g/mL de Stx2 em PBS.
Fonte: Rocha (2012).

5.3.3 Localização do bloqueio e definição do tempo de leitura dos resultados do teste IC

Em nossos experimentos observou-se que com o bloqueio na porção *sample pad* a visualização da reatividade foi mais nítida do que quando o bloqueio foi feito na membrana de nitrocelulose (**Figura 15**, fita 1). A figura 15 mostra o resultado obtido para o teste utilizando o conjugado MAb-Au anti-Stx1 e é representativa dos testes com os demais conjugados. Desta maneira, a partir desse momento, escolheu-se utilizar o agente de bloqueio na fração *sample pad*.

Figura 15 - Teste IC para definição do local de bloqueio.

1) Bloqueio na porção *sample pad*; 2) Bloqueio na membrana de nitrocelulose. Na porção do conjugado foi utilizado 20 μ L de MAb-Au anti-Stx1; na porção da linha foi empregado 1,5 μ L da solução de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo 0,5 mg/mL (Invitrogen); teste realizado com PBS.

Fonte: Rocha (2012).

Em relação ao tempo de leitura do teste padronizou-se em 20 min, pois períodos inferiores mostraram resultados falsos negativos com fraco aparecimento de linhas de reatividade. Por outro lado, incubações acima de 30 min mostraram resultados falsos positivos (resultados observados ao longo da realização dos diversos experimentos).

5.4 Padronização do teste IC para detecção de Stx1

Para verificar a combinação mais eficiente dos Mabs e PAbs no ensaio IC para detecção de Stx1, testou-se as fitas empregando MAb-Au anti-Stx1 e seu respectivo PAb na linha teste e vice-versa. Como amostra teste utilizou-se solução de Stx1 diluída em PBS (**Figura 16**).

Ambas as combinações resultaram em testes positivos. No entanto, quando se utilizou sobrenadantes de cultivos bacterianos de isolado produtor (isolado 11) e não produtor de Stx1 (H10407), apenas a combinação de PAb-Au anti-Stx1 e MAb anti-Stx1 na linha teste mostrou um teste positivo para sobrenadante do isolado 11 e negativo para o isolado H10407 (**Figura 17**, fitas 3 e 4). A combinação de MAb-Au e PAb na linha teste não resultou em um teste positivo para o isolado 11, essa combinação diminuiu a sensibilidade do teste para a detecção de Stx1 (**Figura 17**, fitas 1 e 2).

Figura 16 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-Stx1.

Montagem das fitas: **1)** MAb-Au anti-Stx1, 1 mg/mL de PAb anti-Stx1 na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de camundongo na linha controle (C); **2)** PAb-Au anti-Stx1, 1 mg/mL de MAb anti-Stx1 na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min numa solução de 1 µg/mL de Stx1 em PBS.
Fonte: Rocha (2012).

Figura 17 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-Stx1 na presença de sobrenadante de isolados.

Montagem das fitas: **1, 2)** MAb-Au anti-Stx1, 1 mg/mL de PAb anti-Stx1 na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de camundongo na linha controle (C); **3, 4)** PAb-Au anti-Stx1, 1 mg/mL de MAb anti-Stx1 na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min nos sobrenadantes de isolados: **1, 3)** Isolado 11 (Stx1); **2, 4)** Isolado H10407 (LT, ST).
Fonte: Rocha (2012).

A partir destes ensaios, decidiu-se utilizar a combinação de PAb-Au anti-Stx1 na porção do conjugado e MAb anti-Stx1 na linha teste. Posteriormente, diferentes concentrações de MAb anti-Stx1 foram avaliadas na linha teste para selecionar a mais adequada na visualização dos resultados (**Figura 18**). Desta forma escolheu-se a concentração de 2 mg/mL (**Figura 18**, linha 2).

Figura 18 - Teste IC para definição da concentração de MAb anti-Stx1 na linha teste (T).

Montagem das fitas: PAb-Au anti-Stx1; diferentes concentrações de MAb anti-Stx1 na linha teste : **1)** 4 mg/mL; **2)** 2 mg/mL; **3)** 1 mg/mL; **4)** 0,5 mg/mL; **5)** 0,25 mg/mL; 0,5 mg de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 1 µg/mL de Stx1 em PBS.

Fonte: Rocha (2012).

Após padronização do teste, o limite de detecção foi avaliado em diferentes concentrações da toxina Stx1. Para isso, as fitas foram montadas utilizando 20 µL de conjugado (PAb-Au anti-Stx1) e 1,5 µL de MAb anti-Stx1 (2 mg/mL) e imersas em microtubos contendo as soluções de 15,6 a 500 ng/mL de Stx1. Verificou-se que o limite de detecção para Stx1 foi de 15,6 ng/mL (**Figura 19**, linha 6). É importante ressaltar que não houve reatividade com controle negativo, quando a fita foi imersa em PBS, indicando que PAb e MAb não reagem entre si (**Figura 19**, linha 7).

Figura 19 - Teste IC para definição do limite de detecção de Stx1.

Montagem das fitas: PAb-Au anti-Stx1, 2 mg/mL de MAb anti-Stx1 na linha teste (T) e 0,5 mg de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em diferentes concentrações de Stx1 em PBS: **1)** 500 ng/mL; **2)** 250 ng/mL; **3)** 125 ng/mL; **4)** 62,5 ng/mL; **5)** 31,2 ng/mL; **6)** 15,6 ng/mL; **7)** PBS.

Fonte: Rocha (2012).

Para verificar uma possível reatividade cruzada com Stx2, LT ou ST, o teste padronizado para Stx1 foi avaliado após ensaio com isolados produtores e não produtores dessas toxinas. O teste foi positivo para o isolado 57B (Stx1) e EDL933 (Stx1 e Stx2) (**Figura 20**, fitas 1 e 2) e negativo para os isolados 1 (Stx2) e H10407 (LT e ST) (**Figura 20**, fitas 3 e 4).

Figura 20 - Teste IC para Stx1 com isolados bacterianos.

Montagem das fitas: PAb-Au anti-Stx1, 2 mg/mL de MAb anti-Stx1 na linha teste (T) e 0,5 mg de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em diferentes sobrenadantes de isolados: **1)** EDL933 (Stx1, Stx2); **2)** 57B (Stx1); **3)** 1 (Stx2); **4)** H10407 (LT, ST).

Fonte: Rocha (2012).

5.5 Padronização do teste IC para detecção de Stx2

Como realizado para Stx1, verificou-se a combinação mais eficiente do MAb e PAb no ensaio IC para detecção de Stx2, testando-se as fitas com MAb-Au e PAb na linha teste e vice-versa. Para amostra teste utilizou-se solução de Stx2 diluído em PBS (**Figura 21**). Os resultados foram positivos para as duas combinações.

No ensaio utilizando sobrenadantes de cultivo de isolado produtor (isolado 1) e não produtor de Stx2 (isolado H10407), assim como ocorreu para Stx1, a combinação de PAb-Au anti-Stx2 e MAb anti-Stx2 na linha teste resultou em positividade para o isolado produtor da toxina (isolado 1) e negatividade para o isolado não produtor (H10407) (**Figura 22**, fitas 3 e 4, respectivamente). A combinação de MAb-Au anti-Stx2 e PAb anti-Stx2 na linha teste apresentou uma linha de fraca intensidade com o isolado produtor (**Figura 22**, linha 1), comprometendo assim, a sensibilidade do teste.

Figura 21 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-Stx2.

Montagem das fitas: **1)** MAb-Au anti-Stx2, 1 mg/mL de PAb anti-Stx2 na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de camundongo na linha controle (C); **2)** PAb-Au anti-Stx2, 1 mg/mL de MAb anti-Stx2 na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min numa solução de 1 µg/mL de Stx2 em PBS.

Fonte: Rocha (2012).

Figura 22 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-Stx2 na presença de sobrenadante de isolados.

Montagem das fitas: **1, 2** MAb-Au anti-Stx2, 1 mg/mL de PAb anti-Stx2 na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de camundongo na linha controle (C); **3, 4** PAb-Au anti-Stx2, 1 mg/mL de MAb anti-Stx2 na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min nos sobrenadantes de isolados: **1, 3** Isolado 1 (Stx2); **2, 4** Isolado H10407 (LT, ST).

Fonte: Rocha (2012).

Com base nestes resultados decidiu-se utilizar a combinação de PAb-Au anti-Stx2 na porção do conjugado e MAb anti-Stx2 na linha teste. O passo seguinte foi avaliar diferentes concentrações de MAb anti-Stx2 na linha teste para selecionar a mais adequada para visualização dos resultados. Após realização dos ensaios escolheu-se a concentração de 1 mg/mL (**Figura 23**, linha 3).

Figura 23 - Teste IC para definição da concentração de MAb anti-Stx2 na linha teste (T).

Montagem das fitas: PAb-Au anti-Stx2; diferentes concentrações de MAb anti-Stx2 na linha teste: **1**) 4 mg/mL; **2**) 2 mg/mL; **3**) 1 mg/mL; **4**) 0,5 mg/mL; **5**) 0,25 mg/mL; 0,5 mg de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 1 µg/mL de Stx2 em PBS.

Fonte: Rocha (2012).

Após padronização do teste, o limite de detecção foi avaliado empregando-se diferentes concentrações da toxina Stx2. Para isso, as fitas foram montadas utilizando 20 µL de conjugado (PAb-Au anti-Stx2) e 1,5 µL de MAb anti-Stx2 (1 mg/mL) e imersas em microtubos contendo as concentrações de 15,6 a 500 a ng/mL de Stx2. Verificou-se que o limite de detecção para Stx2 foi de 62,5 ng/mL (**Figura 24**, linha 4). É importante ressaltar que não houve reatividade com controle negativo, quando a fita foi imersa em PBS, indicando que PAb e MAb não reagem entre si (**Figura 24**, linha 7).

Figura 24 - Teste IC para definição do limite de detecção de Stx2.

Montagem das fitas: PAb-Au anti-Stx2, 1 mg/mL de MAb anti-Stx2 na linha teste (T) e 0,5 mg de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em diferentes concentrações de Stx2 em PBS: **1)** 500 ng/mL; **2)** 250 ng/mL; **3)** 125 ng/mL; **4)** 62,5 ng/mL; **5)** 31,2 ng/mL; **6)** 15,6 ng/mL; **7)** PBS.

Fonte: Rocha (2012).

Para verificar possível reatividade cruzada com Stx1, LT ou ST, o teste padronizado para Stx2 foi avaliado após ensaio com isolados produtores e não produtores dessas toxinas. O teste foi positivo para o isolado 82 (Stx2) e EDL933 (Stx1 e Stx2) (**Figura 25**, fitas 1 e 2) e negativo para os isolados 57B (Stx1) e H10407 (LT e ST) (**Figura 25**, fitas 3 e 4).

Figura 25 - Teste IC para Stx2 com isolados bacterianos.

Montagem das fitas: PAb-Au anti-Stx2, 1 mg/mL de MAb anti-Stx2 na linha teste (T) e 0,5 mg de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em diferentes sobrenadantes de isolados: **1)** EDL933 (Stx1, Stx2); **2)** 82 (Stx2); **3)** 57B (Stx1); **4)** H10407 (LT, ST).

Fonte: Rocha (2012).

5.6 Padronização do teste IC para detecção de LT

Para verificar a combinação mais eficiente do MAb e PAb no ensaio IC para detecção de LT testou-se as fitas empregando anticorpo MAb anti-LT conjugado ao ouro e PAb na linha teste e vice-versa. Como amostra teste utilizou-se solução de LT diluída em PBS.

Resultados positivos com linhas bem evidentes foram obtidos com as duas combinações (**Figura 26**). Para simular uma situação real do teste, utilizou-se sobrenadantes de cultivo de isolado produtor (4702-1) e de não produtor de LT (EDL933) (**Figura 27**). A combinação de PAb anti-LT conjugado ao ouro e anticorpo MAb anti-LT na linha T permitiu a positividade do teste para o sobrenadante do isolado 4702-1 e a negatividade do teste com o isolado EDL933 (**Figura 27**, fitas 3 e 4). A combinação de anticorpo MAb anti-LT-Au e PAb anti-LT na linha teste apresentou positividade, porém com uma linha de menor intensidade quando comparada com a combinação anterior (**Figura 27**, fita 1).

Figura 26 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-LT.

Montagem das fitas: **1)** MAb-Au anti-LT, 1 mg/mL de PAb anti-LT na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de camundongo na linha controle (C); **2)** PAb-Au anti-LT, 1 mg/mL de MAb anti-LT na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min numa solução de 2 µg/mL de LT em PBS.
Fonte: Rocha (2012).

Figura 27 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-LT na presença de sobrenadante de isolados.

Montagem das fitas: **1, 2)** MAb-Au anti-LT, 1 mg/mL de PAb anti-LT na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de camundongo na linha controle (C); **3, 4)** PAb-Au anti-LT, 1 mg/mL de MAb anti-LT na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min nos sobrenadantes de isolados: **1, 3)** Isolado 4702-1 (LT); **2, 4)** Isolado EDL933 (Stx1, Stx2).
Fonte: Rocha (2012).

Com base nos resultados decidiu-se utilizar a combinação de PAb-Au na porção do conjugado e MAb na linha teste. Subsequentemente, diferentes concentrações de MAb anti-LT na linha teste foram avaliadas. Os testes foram positivos em todas as concentrações testadas (**Figura 28**), sendo a concentração de 1 mg/mL (**Figura 28**, linha 3) escolhida para a padronização do teste.

Figura 28 - Teste IC para definição da concentração de MAb anti-LT na linha teste (T).

Montagem das fitas: PAb-Au anti-LT; diferentes concentrações de MAb anti-LT na linha teste : **1)** 4 mg/mL; **2)** 2 mg/mL; **3)** 1 mg/mL; **4)** 0,5 mg/mL; **5)** 0,25 mg/mL; 0,5 mg de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 2 µg/mL de LT em PBS.

Fonte: Rocha (2012).

O limite de detecção do teste foi avaliado em diferentes concentrações de soluções contendo LT. Para isso, as fitas foram montadas utilizando 20 µL de conjugado (PAb-Au anti-LT) e 1,5 µL de MAb anti-LT (1 mg/mL) e imersas em microtubos contendo as soluções de 15,6 a 500 ng/mL de LT. Após realização do teste, verificou-se que o limite de detecção para LT foi de 15,6 ng/mL (**Figura 29**, linha 6). É importante ressaltar que não houve reatividade com o controle negativo, quando a fita foi imersa em PBS, indicando que PAb e MAb não reagem entre si (**Figura 29**, linha 7).

Figura 29 - Teste IC para definição do limite de detecção de LT.

Montagem das fitas: PAb-Au anti-LT, 1 mg/mL de MAb anti-LT na linha teste (T) e 0,5 mg de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em diferentes concentrações de LT em PBS: **1)** 500 ng/mL; **2)** 250 ng/mL; **3)** 125 ng/mL; **4)** 62,5 ng/mL; **5)** 31,2 ng/mL; **6)** 15,6 ng/mL; **7)** PBS.

Fonte: Rocha (2012).

Para verificar reatividade cruzada com ST e Stx, o teste padronizado para LT foi avaliado em ensaio com isolados de ETEC produtores dessas toxinas e isolados não produtores. O teste foi positivo para os isolados H10407 (LT, ST) e 51 (LT) (**Figura 30**, fitas 1 e 2) e negativo para os isolados 3321-4 (ST) e EDL933 (Stx1 e Stx2) (**Figura 30**, fitas 3 e 4), indicando que não houve reatividade cruzada com as demais toxinas testadas.

Figura 30 - Teste IC para LT com isolados bacterianos.

Montagem das fitas: PAb-Au anti-LT, 1 mg/mL de MAb anti-LT na linha teste (T) e 0,5 mg de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em diferentes sobrenadante de isolados: **1)** H10407 (LT, ST); **2)** 51 (LT); **3)** 3321-4 (ST); **4)** EDL933 (Stx1, Stx2).

Fonte: Rocha (2012).

5.7 Emprego do teste IC para detecção simultânea de dois antígenos

Para comprovar a viabilidade do teste para detecção de mais de um antígeno, decidiu-se testar o IC no diagnóstico de STEC e ETEC, por meio da detecção de Stx1 e LT, respectivamente. Como esperado, os resultados indicaram que a amostra Stx1 foi reconhecida somente pela linha teste contendo MAb anti-Stx1 (**Figura 31**, fita 1), a amostra LT foi reconhecida somente pela linha teste contendo MAb anti-LT (**Figura 31**, linha 2), como controle negativo utilizou-se a proteína EspB que não reagiu com nenhum dos anticorpos da linha teste (**Figura 31**, linha 3).

Figura 31 - Teste IC para detecção de Stx1 e LT.

Montagem das fitas: PAb-Au anti-Stx1 e anti-LT fixados na porção do conjugado; linha teste (T): **A)** MAb anti-LT, **B)** MAb anti-Stx1; linha controle (C): 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de coelho. Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 1 µg/mL de: **1)** Stx1; **2)** LT; **3)** EspB. Fonte: Rocha (2012).

Estes resultados indicaram que existe a possibilidade de detecção de mais de um antígeno no mesmo teste IC.

6 DISCUSSÃO

A diarreia ainda é um dos maiores problemas de saúde pública mundial, principalmente em regiões menos favorecidas. Dados da Organização Mundial de Saúde apontam a falta de acesso a água tratada e saneamento básico como principais responsáveis pela proliferação e contaminação por micro-organismos causadores de diarreia. Como medidas preventivas, além do melhoramento das condições sanitárias e acesso a água tratada, as ações de boas práticas de higiene e a vacinação são de suma importância.

O diagnóstico também colabora não só na profilaxia, como no correto tratamento, já que a rápida identificação do agente causador, evita surtos e indica a viabilidade de medidas terapêuticas como o uso de antibióticos. Drogas antimicrobianas podem matar as bactérias, mas não erradicar as toxinas pré-formadas (CHOW; CASADEVALL, 2012), mostrando com isso que, muitas vezes quando o tratamento não se baseia na correta identificação do patógeno pode ocorrer um agravamento da doença.

Neste contexto, o diagnóstico dos agentes causadores da diarreia é uma ferramenta essencial no combate a doença. A maioria dos trabalhos sobre diagnóstico relata a busca de fatores de virulência utilizando métodos moleculares, como PCR e sondas de DNA, porém, o uso dessas técnicas ainda é economicamente inviável para muitos laboratórios clínicos e hospitais, principalmente nas regiões pobres.

A ideia do desenvolvimento de um teste para detecção de *E. coli* diarreiogênicas surgiu da necessidade de ferramentas diagnósticas adequadas a realidade dos países em desenvolvimento. Como uma das linhas de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan é o diagnóstico desses patógenos por métodos imunossorológicos, anticorpos policlonais e monoclonais contra alguns dos fatores de virulência já haviam sido obtidos em trabalhos anteriores e estão disponíveis para utilização. Desta maneira, o desenvolvimento de um ensaio imunodiagnóstico rápido para detecção de ETEC e STEC seria possível após a obtenção de anticorpos monoclonais anti-Stx2 e padronização de meios de enriquecimento para detecção de LT.

A baixa quantidade de *E. coli* patogênica em relação a *E. coli* não-patogênica presente na microbiota (cerca de 1 EHEC para cada 200-300 *E. coli*) (TORRES,

2010) e a dificuldade de isolamento e detecção diretamente das fezes são dificuldades para o diagnóstico das *E. coli* diarreio gênicas, pois, diminui drasticamente a sensibilidade do ensaio. Além disso, em geral, existe um senso comum de que o nível de expressão de toxinas é dependente do meio em que a bactéria é cultivada. Para minimizar estes problemas, habitualmente os testes comercialmente disponíveis para STEC e ETEC sugerem o pré-enriquecimento da amostra antes do ensaio (BURGOS; BEUTIN, 2012). Em um estudo clínico para detecção de STEC em 223 amostras de fezes antes e após enriquecimento, os testes por ELISA demonstraram uma diferença significativa onde a sensibilidade antes do enriquecimento foi de 35,7% contra 83,3% após enriquecimento (R-BIOPHARM, 2002). Portanto, devido à baixa sensibilidade, a detecção direta das amostras de fezes sem um pré-enriquecimento, não é suficiente como método de rotina, havendo sempre a necessidade de confirmação através da cultura enriquecida.

Dentre as várias condições descritas na literatura para a expressão de fatores de virulência das bactérias não há um consenso sobre as condições de cultivo e tratamento para a liberação desses fatores e muitas vezes os resultados são contraditórios. Os meios EVANS, Syncase e TSB testados no presente trabalho foram aqueles usualmente empregados no cultivo de ETEC (CHAPMAN; SWIFT, 1984; EVANS; EVANS; PIERCE, 1973; MUNDELL; ANSELMO; WISHNOW, 1976; RISTAINO; LEVINE; YOUNG, 1983). O caldo EC foi também testado em função dos excelentes resultados para a produção de Stx (ROCHA; PIAZZA, 2007) e o meio DMEM por aumentar a produção de algumas proteínas secretadas por EPEC (KNUTTON et al., 1998). O meio CAYE (MUNDELL; ANSELMO; WISHNOW, 1976), também utilizado para expressão de LT, foi posteriormente testado, e como esperado demonstrou resultados semelhantes ao meio EVANS (dados não mostrados), pois contem os mesmos componentes do meio EVANS, porém com glicose e extrato de levedura em diferentes concentrações.

Dos meios testados, escolheu-se o caldo *E. coli* (EC) que foi um dos meios que possibilitou altos índices de expressão de LT na fração sobrenadante do isolado protótipo H10407. Este fato pode ser explicado por um estudo realizado por Hunt et al. (1991) provando que a presença de sais de bile libera LT no meio de cultivo. Posteriormente testou-se a variação da expressão de LT na presença ou ausência de antibióticos. A adição de lincomicina ao meio de cultivo melhora um aumento na

expressão de LT quando isolados de ETEC são cultivados na sua presença (CHAPMAN; SWIFT et al., 1987; LEVNER; WIENER; RUBIN, 1977; MINAMI et al., 1984). Em nossos experimentos observou-se que em alguns isolados a presença de ciprofloxacina também favorecia a expressão de LT, portanto adicionou-se ciprofloxacina e lincomicina no caldo EC o que beneficiou o aumento da expressão dessa toxina em todos os isolados testados quando comparados aos mesmos isolados cultivados na ausência de antibióticos.

Em seguida verificou-se em qual fração bacteriana a toxina LT era liberada e/ou localizada. Os resultados de Lasaro et al. (2006) indicaram que a produção e liberação de LT em 26 diferentes isolados humanos foram heterogeneas, ou seja, as concentrações de LT presentes nos isolados variaram de 49,8 a 2.415 ng/mL, sendo que do total de toxina sintetizada, 0 a 50% foram liberadas no sobrenadante de cultura e menos de 5% em vesículas de membrana. Portanto, existem isolados que secretam LT, outros mantêm a toxina no espaço periplasmático, outros em vesículas e outros ainda secretam uma parte e mantêm outra parte internalizada (KESTY et al., 2004; LASARO et al., 2006).

Esses dados sugerem que ao invés de utilizar-se o sobrenadante ou o sedimento bacteriano tratado para detecção da expressão de LT, o cultivo bacteriano é a fração ideal para a liberação total de toxina produzida por um isolado bacteriano, e que diferentes compostos podem aumentar essa liberação. A polimixina B é o composto mais usado para liberação de LT (CHAPMAN; SWIFT, 1984; LEVNER; URBANO; RUBIN, 1980; RISTAINO; LEVINE; YOUNG, 1983). Dentre os compostos testados no presente trabalho a polimixina B e o Triton X-100 permitiram a liberação da toxina de forma mais eficiente. Drevet e Guinet (1991) descreveram um superior desempenho do Triton X-100 na liberação de LT em relação a polimixina B. Como em nossos resultados esse desempenho foi semelhante optou-se pelo emprego do Triton X-100 por ser um detergente de fácil manuseio e menor custo do que a polimixina, permitindo assim a detecção da toxina nos ensaios imunossorológicos.

Antes do desenvolvimento do teste imunocromatográfico, os anticorpos policlonais anti-LT, anti-Stx1 e anti-Stx2 obtidos em trabalhos anteriores (MENDES-LEDESMA et al., 2008; MENEZES et al., 2003, 2006; ROCHA; PIAZZA, 2007) foram avaliados com relação ao título e a reatividade com seu respectivo antígeno na forma nativa e desnaturada.

Anticorpos policlonais podem reconhecer vários epítomos de uma mesma proteína, alguns se ligam a epítomos conformacionais, que são formados pela união de aminoácidos no dobramento de proteínas ou ligam-se a epítomos sequenciais que são formados por simples sequências de aminoácidos (BURNS, 2005). Pela técnica de *immunoblotting* verifica-se de maneira simples se um epítomo é conformacional, pois submete-se um antígeno ao SDS-PAGE em condições redutoras. Nessa condição, a proteína apresenta-se completamente linearizada pela ação dos agentes redutores que romperam as pontes dissulfeto, facilitando a ligação dos anticorpos com epítomos sequenciais e abolindo a ligação com os epítomos conformacionais (BURNS, 2005). Por outro lado, quando uma proteína é submetida apenas ao aquecimento, as ligações eletrostáticas presentes nas pontes de hidrogênio são desestabilizadas, porém as pontes dissulfeto ainda se mantêm estáveis (MARZZOCO; TORRES, 1999).

As frações enriquecidas em IgG dos soros de coelhos anti-Stx2 e anti-LT reconheceram seus respectivos antígenos na sua forma nativa e desnaturada, indicando que os epítomos, ou a maioria dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos presentes na fração IgG são sequenciais e não dependem do arranjo conformacional da proteína alvo. Quando todos os antígenos foram linearizados ao serem submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de condições redutoras, seus respectivos anticorpos reconheceram a proteína desnaturada. Além disso, ainda nestas condições, os anticorpos policlonais reconheceram as subunidades A e B de suas respectivas toxinas: LT, Stx1 e Stx2 que são toxinas do tipo AB₅.

No caso dos anticorpos policlonais anti-Stx1 houve reatividade com sua respectiva proteína na forma desnaturada por agentes redutores (*Immunoblotting*), mas não houve reatividade com sua forma desnaturada por aquecimento (ELISA). Com isso, diferentemente da proteína linearizada por agentes redutores, o aquecimento pode não permitir a exposição dos epítomos para ligação dos anticorpos, o que explica a não reatividade por ELISA após fervura de Stx1. Os anticorpos policlonais testados reconheceram sua proteína alvo na forma nativa, ainda que em epítomos conformacionais ou sequenciais. Isto indica a possibilidade do emprego desses anticorpos no teste imunocromatográfico, pois os antígenos presentes no cultivo bacteriano em teste serão apresentados na sua forma nativa ao anticorpo.

Em relação aos anticorpos monoclonais anti-Stx1 e anti-LT obtidos em trabalhos anteriores (MENEZES et al., 2003, 2006; ROCHA, 2008); novos lotes foram purificados no presente trabalho e suas características foram avaliadas frente aos seus respectivos antígenos. Já o MAb anti-Stx2 foi produzido no presente trabalho. Após detoxificação de Stx2, o toxóide foi utilizado na imunização de camundongos e posterior retirada de plasmócitos para fusão com células mielomatosas e obtenção de hibridomas produtores de anticorpos anti-Stx2.

Embora a tecnologia da obtenção de anticorpos monoclonais seja bem estabelecida (KÖHLER; MILSTEIN, 1975), para alguns antígenos, esse processo apresenta pouco êxito e necessita de diferentes procedimentos que podem depender do preparo e concentração do antígeno, protocolos e vias de imunização. Por estas razões, após oito tentativas, os hibridomas produtores de MAbs anti-Stx2 foram obtidos, dos quais um deles foi selecionado pela reatividade com os controles positivos e ausência de reatividade com os controles negativos por ELISA. Este clone, denominado 2E11 foi subclonado por diluição limite e seu subclone (K1) foi caracterizado pela produção de MAbs do isotipo IgG1 que possui reatividade com a subunidade A de Stx2 e constante de dissociação de $6,1 \times 10^{-10}$ M. É importante salientar que ensaios realizados por ELISA e *immunoblotting* demonstraram que não houve reatividade cruzada dos MAbs anti-Stx1 e anti-Stx2 com as toxinas heterólogas (**APÊNDICE C**) garantindo assim, a especificidade dos anticorpos.

Com relação ao reconhecimento da toxina, em alguns estudos, os MAbs reconheceram a subunidade A de Stx2 (DOWNES et al., 1988; PERERA; MARQUES; O'BRIEN, 1988). No entanto, Padhye, Zhao e Doyle (1989) relataram que um dos MAbs obtidos reagiu com a subunidade A de Stx1 e Stx2, enquanto que outros reagiram apenas com a subunidade A ou B de Stx2. MAbs obtidos por Downes et al. (1988) reconheceram a subunidade A da toxina, já outros reconheceram a subunidade B, além disso, o MAb BC5 não reagiu cruzadamente com Stx1, por *immunoblotting* e ELISA, porém reagiu com toxina de Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1 nos ensaios testados. Também, Perera, Marques e O'Brien (1988) obtiveram cinco MAbs que reconheceram a subunidade A de Stx2 e não reagiram cruzadamente com Stx1. Estes trabalhos demonstram que há uma heterogeneidade de MAbs anti-Sx2, porém, a maioria citada refere-se ao isotipo IgG1 (DONOHUE-ROLFE et al., 1989; DOWNES et al., 1988; MUKHERJEU et al., 2002; NAKAO et al., 1999) e reconhecimento da subunidade A de Stx2 como

características mais comuns, características estas descritas para o MAb 2E11 obtido no presente estudo.

Poucos estudos descrevem a afinidade dos MAb para com seus antígenos. Dentre estes, Tanikawa et al. (2008) e Kimura et al. (2002) mostraram para o MAb anti-Stx1 a K_D de $2,6 \times 10^{-10}$ M e para o MAb anti-Stx2 a K_D de $3,3 \times 10^{-9}$ M, respectivamente; as quais são similares as descritas no presente trabalho. Por sua constante de dissociação elevada e à sua capacidade para detectar níveis baixos de toxina purificada, podemos afirmar então que o MAb 2E11 demonstrou alta afinidade por Stx2.

Sabe-se que os MAb reconhecem um único epítopo que pode ser um epítopo conformacional ou sequencial (BURNS, 2005). Neste sentido, testes com os anticorpos monoclonais em estudo indicaram que os epítopos são sequenciais, já que os anticorpos apresentaram reatividade por *immunoblotting* com seus respectivos antígenos. Os MAb anti-Stx2 obtidos por Perera et al. (1988) não reconheceram Stx2 por *immunoblotting*, indicando se tratar de epítopos conformacionais.

Assim como para o MAb anti-Stx2 que reconheceu apenas uma das subunidades de Stx2 (subunidade A), o MAb anti-Stx1 apresentou reatividade somente com a subunidade B de Stx1. Diferentemente, o MAb anti-LT reconheceu ambas subunidades, conforme demonstrado por Menezes et al. (2006) e reavaliado no presente trabalho. Neste caso, há a hipótese de epítopo conformacional que se encontra na região de união das subunidades A e B. Adicionalmente, mesmo quando estas subunidades são separadas por SDS-PAGE, o reconhecimento dos fragmentos das sequências de aminoácidos ainda se mantém, provavelmente parte da região de ligação com anticorpo está presente na subunidade A e parte na subunidade B.

Quando a proteína está íntegra, o epítopo fica exposto para reconhecimento do anticorpo, por outro lado, após fervura dos antígenos, verificou-se que os MAb anti-Stx1, anti-Stx2 e anti-LT perderam a capacidade de ligação. Provavelmente, nestas condições, as alterações sofridas pelas moléculas não permitiram a exposição dos epítopos para reconhecimento dos anticorpos. Apesar de desnaturadas, quando submetidas ao aquecimento, as proteínas não se apresentaram linearizadas como no *immunoblotting*, o que explica essa diferença de resultados. De qualquer forma, todos os MAb testados reconheceram sua

respectiva proteína alvo na forma íntegra, isto indica a possibilidade de utilização nos testes posteriores, uma vez que os antígenos presentes nos cultivos bacterianos em teste não serão submetidos à desnaturação.

Após a obtenção e caracterização dos anticorpos, ferramentas essas, indispensáveis na padronização e desenvolvimento de um método imunossorológico partiu-se para a escolha do ensaio. Quando comparado ao mais comum dos métodos de detecção, o ensaio imunoenzimático (ELISA), que necessita de equipamento para leitura dos resultados e demanda algumas horas, o teste imunocromatográfico oferece vantagens por seu resultado rápido, e conveniência de ser visível a olho nu, características que facilitam o diagnóstico clínico (LOU et al., 2012).

Inicialmente, a possibilidade de acoplamento dos anticorpos a tintas coloidais para uso nos testes imunocromatográficos foi testada (SNOWDEN; HOMMEL, 1991). Contudo, essa abordagem foi descontinuada, pois, nos ensaios realizados para avaliar a eficiência da acoplagem do MAb à tinta coloidal observou-se baixo rendimento da conjugação: apenas 27% dos MAbs adsorveram a tinta coloidal. Além disso, a alta concentração de anticorpos necessária para a adsorção (100 µg/mL) tornou esse processo pouco viável. Os resultados da conjugação do anticorpo-tinta coloidal nas membranas de nitrocelulose não foram reprodutíveis, provavelmente pela concentração inadequada de anticorpo, ou possíveis alterações estruturais que ocorreram durante a adsorção, prejudicando assim a afinidade pelo antígeno. Somando-se a essas limitações, é interessante observar que nenhum artigo novo foi publicado com esta técnica, o que demonstra a sua ineficiência. Um estudo avaliou a utilização de marcadores de testes IC e concluiu que o ouro coloidal é amplamente utilizado, representando 75% dos 72 testes reportados (NGOM et al., 2010). Portanto, a alta eficiência de conjugação a anticorpos levou-nos a optar pelo ouro coloidal no desenvolvimento do teste IC deste estudo.

O ouro coloidal é sintetizado a partir da redução do cloreto de ouro por citrato de sódio em temperatura de ebulição (FRENS et al., 1973), assim a coloração amarelada da solução altera-se para vermelha brilhante (HAYAT, 1989¹ apud ZHANG et al., 2009). Os coloides de ouro são instáveis na presença de soluções iônicas e se tornam estáveis quando conjugados com proteínas, como os anticorpos. A imunoglobulina é adsorvida a partícula de ouro por forças de London-Van der Waals e interações hidrofóbicas (PAEK; LEE; CHO, 2000).

¹Hayat, M. A. **Colloidal gold: principles, methods and applications**. New York: Academic Press, 1989. p. 421.

Testes com diferentes tamanhos de partículas de ouro coloidal (2 a 100 nm) foram realizados por Nakasone et al. (2007). Esses autores verificaram que coloides com diâmetros entre 15 a 40 nm proporcionaram melhores resultados. Também Lou et al. (2012) relataram que nanopartículas de ouro entre 20 e 40 nm são as mais utilizadas em ensaios imunocromatográficos, pois partículas menores que 20 nm resultam em colorações claras e partículas maiores que 40 nm são instáveis. Empregamos apenas partículas de ouro com 20 nm, porque no momento de realização dos ensaios, somente partículas desse diâmetro eram comercializadas.

Os protocolos descritos para conjugação de anticorpo com ouro coloidal são semelhantes, porém a concentração de anticorpos necessária para estabilização do ouro coloidal varia de acordo com cada anticorpo e o tamanho da partícula de ouro coloidal (LOU et al., 2012). Baixas concentrações de anticorpo mantêm os coloides insaturados e instáveis. A estabilidade do conjugado é reforçada com o aumento da concentração de anticorpo, porém as partículas de ouro tornam-se insaturadas novamente quando a competição ocorre devido ao excesso de anticorpos resultando em agregação dos coloides (LOU et al., 2012; OLIVER, 2010). Desta maneira determinou-se a concentração mínima de anticorpos para estabilização do ouro coloidal, sendo que, quantidades entre 10 a 20 µg de anticorpo para cada mililitro da solução de ouro coloidal foram suficientes na estabilização dos conjugados.

Na conjugação, o bloqueio, as lavagens por centrifugação e o armazenamento são etapas muito importantes no desempenho final do ouro no teste. O bloqueio é necessário para cobrir as partículas coloidais com substâncias inertes, pois, após ligação com as imunoglobulinas, superfícies residuais dos coloides de ouro podem sofrer interações entre as partículas e a matriz sólida e entre as próprias partículas. Diferentes substâncias usadas criam variações no ambiente químico, tal como a distribuição de cargas na superfície externa das partículas, que podem causar reações inespecíficas nos coloides de ouro (PAEK; LEE; CHO, 2000). A albumina bovina e o polietilenoglicol são os agentes de bloqueio mais utilizados, pois produzem condições de neutralidade (MILLIPORE, 2008; PAEK; LEE; CHO, 2000).

As lavagens por centrifugação são necessárias para eliminação de anticorpos não ligados. Ao final da lavagem o conjugado (anticorpo e ouro) deve ser acrescido de tampão de armazenamento contendo albumina e sacarose. Os anticorpos podem sofrer mudanças conformacionais estruturais durante o período de

desidratação e estocagem; que podem ser prevenidas pela presença de agentes estabilizadores (PAEK; LEE; CHO, 2000). Sendo assim, a albumina bovina pode proteger o anticorpo de riscos ambientais como: radicais livres, atividade proteolítica e metais pesados. Quando a proteína é desidratada, as moléculas de água ligadas na estrutura proteica por pontes de hidrogênio evaporam, induzindo instabilidade estrutural da proteína. Açúcares como a trealose e sacarose podem reocupar estes locais e manter a conformação proteica intacta (PAEK; LEE; CHO, 2000). Além de servir como agente preservativo a sacarose é também um agente que propicia a solubilidade da proteína (CHIAO et al., 2004; MILLIPORE, 2008).

Com relação ao tratamento prévio dos diferentes papéis que compõem o teste IC, na maioria dos ensaios imunocromatográficos o bloqueio da membrana não é necessário, pois as proteínas estranhas presentes na amostra ou nos agentes de bloqueio adicionados no *sample pad* são frequentemente suficientes para prevenir o reagente detector e analito da não-especificidade da nitrocelulose (MILLIPORE, 2008). No ensaio realizado, o melhor resultado foi o bloqueio na porção *sample pad*, pois a fraca reatividade da linha após bloqueio na membrana de nitrocelulose deveu-se provavelmente ao excesso de agente de bloqueio, que produziu cristais após secagem da membrana de nitrocelulose bloqueando fisicamente os poros da mesma, com consequente redução de sua eficiência (MILLIPORE, 2008).

Na membrana de nitrocelulose, os anticorpos representantes das linhas teste e controle foram aplicados manualmente com o auxílio de micropipeta, porém existem plataformas de equipamentos com esta função, garantindo a homogeneidade das linhas, volume e concentrações uniformes dos anticorpos empregados. A concentração do anticorpo empregado na linha controle foi previamente estabelecida em 0,5 mg/mL para todos os ensaios, permitindo assim a observação de resultados positivos.

Na padronização dos testes imunocromatográficos, primeiramente verificou-se em qual combinação a localização dos anticorpos monoclonais e policlonais seria mais eficiente: na porção de conjugado ou nitrocelulose (linha teste). Como acontece nos ensaios de captura, o melhor desempenho foi quando ao PAb-ouro coloidal comportou-se como conjugado (*sample pad*) e o MAb na linha teste (nitrocelulose), como anticorpo de captura (NGOM et al., 2010), possibilitando ao teste a sensibilidade oferecida pelo PAb e a especificidade oferecida pelo MAb.

Depois de avaliada a posição dos anticorpos que permitiram melhor reatividade com os controles positivos (respectivas toxinas e sobrenadantes de isolados produtores) e ausência de reatividade com controles negativos, diferentes concentrações de MAbs foram avaliadas na linha teste para selecionar a mais adequada na visualização dos resultados. Após determinação das respectivas concentrações, o limite de detecção do teste foi avaliado em diferentes concentrações de soluções contendo a referente toxina e um controle negativo (PBS) para avaliar uma possível reatividade entre os anticorpos do conjugado e da captura. Posteriormente, cada teste padronizado: Stx1, Stx2 e LT foram testados com sobrenadante de isolados produtores e não produtores da respectiva toxina. Como esperado não houve reatividade cruzada entre as toxinas testadas.

Comparado ao teste disponível comercialmente para detecção de Stx (Duopath® Verotoxins, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), no qual o limite de detecção de Stx1 é de 25 ng/mL e de Stx2 de 62,5 ng/mL, os testes padronizados neste trabalho o limite de detecção foi compatível e até superior, ou seja, para Stx1 foi maior do que 15 ng/mL e para Stx2 foi de 62,5 ng/mL. O outro teste IC (RIDA® QUICK Verotoxin/O157 Combi, R-biopharm) foi recentemente apresentado no 8º simpósio Internacional de VTEC (Amsterdam, Holanda) e ainda não está disponível para venda no site do fabricante, porém encartes do referido produto descrevem que o teste possui partículas de látex coloridas cobertas por anticorpos anti-Stx e anti-O157, capazes de detectar simultaneamente Stx1, Stx2 e LPS (O157) em até 10 bactérias EHEC inoculadas em 25 g de salada. Porém informações sobre o limite de detecção das toxinas, assim como o preço de venda não foram disponibilizados, dificultando uma avaliação comparativa.

Além do limite de detecção, comparando-se ao teste IC comercial, a vantagem de se ter um mesmo produto, porém, nacional seria o valor. O preço para compra do teste Duopath® Verotoxins é de aproximadamente €500,00 (25 testes), ou seja, cada teste custaria em média R\$ 50,00. Este valor por teste é inviável aos países mais pobres. Convém ressaltar que um estudo financeiro mais detalhado deve ser realizado para melhor avaliar o valor final de venda do produto desenvolvido no presente trabalho.

Por outro lado, para a detecção de LT não existe no mercado um teste IC, portanto, nosso trabalho é inovador, pois se desenvolveu um novo produto e com excelente limite de detecção. Os testes fenotípicos mais utilizados para detecção de

LT são: teste de Biken, o teste de coaglutinação estafilocócica (Coa) e o ELISA GM1. Em um estudo comparativo destes três métodos, todos apresentaram ótimo desempenho com uma concordância de 94% dos resultados, além disso, apresentaram características de praticidade e reprodutibilidade (SEN; SAHA; PAL, 1984). Porém, algumas desvantagens prejudicam a ampla utilização, como a demora de resultado do teste de Biken (3 a 4 dias) e a necessidade de fotômetro para leitura dos resultados do ELISA GM1. O Coa é comercialmente encontrado (Phadebac® ETEC-LT Test, MKL Diagnostics, Sollentuna, Suécia) e possui 90% de sensibilidade e 95,1% de especificidade, porém seu limite de detecção não foi demonstrado (MKL DIAGNOSTICS, 2003), dificultando a análise comparativa com teste IC desenvolvido.

Os anticorpos anti-LT utilizados no desenvolvimento do teste IC quando testados por ELISA de captura apresentaram sensibilidade de 100% e especificidade de 99% (MENEZES et al., 2006). Os ELISAs de captura descritos para LT utilizam a combinação de soros de coelho (DREVET; GUINET, 1991) ou soro de coelho e soro de camundongo (LASARO et al., 2006). Não foram encontrados outros trabalhos relatando a utilização de PAb em combinação com MAb em ELISA de captura para LT que possibilitaria uma comparação com o trabalho de Menezes et al. (2006). Porém, no sentido de desempenho deste tipo de combinação de anticorpos, os melhores ELISAs, recomendados pelo FDA, são do tipo captura que utilizam PAb e MAb (Premier EHEC, Meridian Diagnostics e ProSpect STEC, Alexon-Trend).

Vale a pena salientar que nos ensaios de ELISA, tanto os MAb quanto os PAb anti-LT não reagiram com isolados produtores de ST, indicando que a especificidade destes anticorpos não permite a reatividade cruzada das toxinas de ETEC (dados não mostrados). Apesar do limite de detecção do ELISA ser superior ao limite de detecção do teste IC (ELISA: limite de detecção de 10 ng da toxina LT purificada), o método é mais laborioso, necessita de fotômetro para leitura dos resultados e é mais demorado.

Para avaliar a viabilidade do teste para mais de uma categoria, decidiu-se testar o IC por meio da detecção de Stx1 e LT. Por motivos técnicos de falta de disponibilidade de ouro coloidal, não incluímos o Stx2 nestes testes. Como esperado, a amostra Stx1 foi reconhecida somente pela linha teste contendo MAb anti-Stx1 e a amostra LT foi reconhecida somente pela linha teste contendo MAb

anti-LT. Não houve reatividade cruzada e nem reconhecimento do controle negativo.

Com base neste estudo, a indicação de aplicação do teste IC para detecção de ETEC ou STEC seria realizada da seguinte forma:

- a amostra de fezes seria semeada em meio de cultivo indicado (caldo EC com ciprofloxacina e lincomicina) e cultivada por 16-18 h para enriquecimento;
- posteriormente, 1 mL do cultivo seria tratado com 2% de Triton X-100 por 1 h;
- as fitas (uma para ETEC e outra para STEC) seriam mergulhadas por 20 min no cultivo bacteriano tratado;
- leitura e interpretação dos resultados;
- desta forma, a partir da coleta da amostra, o resultado estaria pronto após 18-20 h, aproximadamente.

Convém ressaltar que a proposta inicial da presente tese foi o desenvolvimento e padronização de testes imunocromatográficos para o diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) por meio de seus fatores de virulência: intimina, toxina termo lábil (LT) e termo estável (ST) e as toxinas de Shiga 1 e 2 (Stx1 e Stx2), respectivamente.

No entanto, no decorrer desses anos, algumas alterações foram feitas, como é o caso da substituição da intimina pelas proteínas secretadas (EspS) como alvo para o diagnóstico de EPEC (**Apêndice B**). Contudo, não se finalizou o teste IC para a detecção de EPEC, mas o desenvolvimento das estratégias utilizadas e os resultados obtidos na padronização permitirão a continuação e finalização desse teste (**Apêndice B**). Também na detecção de ETEC somente se padronizou o teste IC para LT, no entanto para a detecção de ST, as estratégias utilizadas e os desafios necessários para alcançar-se o objetivo estão descritos no **Apêndice A**.

Contudo ressalta-se os resultados obtidos no presente trabalho:

- os teste ICs desenvolvidos para detecção de Stx1 e Stx2 apresentaram limites de detecção compatíveis com testes comerciais;

- o teste IC desenvolvido para detecção de LT apresentou-se inovador por detectar isolados positivos e não detectar isolados negativos, além do alto limite de detecção;
- cultivo de isolados ETEC cultivados em caldo EC contendo ciprofloxacina e lincomicina tratados com Triton X-100 permitiu aumento da produção e liberação de LT, favorecendo o aumento da sensibilidade do teste, assim como para Stx1 e Stx2;
- os métodos cromatográficos desenvolvidos representam uma promissora ferramenta no diagnóstico por sua rapidez e praticidade.

7 CONCLUSÕES

Os ensaios ICs desenvolvidos são uma promissora ferramenta para o diagnóstico de ETEC e STEC, uma vez que, apresentaram o limite de detecção compatível com os testes existentes, não reagiram cruzadamente com os antígenos não relacionados testados, além de apresentar rapidez e facilidade de aplicação, características estas que facilitam sua aplicação nas regiões desprovidas de pessoal qualificado e equipamentos sofisticados.

REFERÊNCIAS*

- ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae (+) EAF-negative stx(-) genetic profile. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 64, n. 4, p. 357-365, 2009.
- ACHESON, D. W. et al. One step high yield affinity purification of Shiga-like toxin II variants and quantitation using enzyme linked immunosorbent assays. **Microbial Pathogenesis**, v. 14, p. 57-66, 1993.
- ADU-BOBIE, J. et al. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin α and intimin β from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 12, p. 5643-5649, 1998.
- AFSET, J. E.; BERGH, K.; BEVANGER, L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 52, n. 11, p. 1015-1019, 2003.
- AFSET, J. E. et al. Association of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) with prolonged diarrhea. **J. Med. Microbiol.**, v. 53, p. 1137-1144, 2004.
- 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.
- ANDRADE, G. I. et al. Identification of virulence factors by multiplex PCR in *Escherichia coli* isolated from calves in Minas Gerais, Brazil. **Trop. Anim. Health. Prod.**, Published online, 5 Apr. 2012.
- ANTIKAINEN, J. et al. New 16-plex PCR method for rapid detection of diarrheagenic *Escherichia coli* directly from stool samples. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 28, n. 8, p. 899-908, 2009.
- ARANDA, K. R. et al. Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 267, n. 2, p. 145-150, 2007.
- ARAUJO, J. M. et al. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 10, p. 3396-3399, 2007.
- AREF, N. M.; SAEED, A. M. An enhanced protocol for expression and purification of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Biochem. Molecular Toxicology**, v. 26, n. 4, p. 168-175, 2012.
- AVERY, M. E.; SNYDER, J. D. Oral therapy for acute diarrhoea: the underused simple solution. **New Engl. J. Med.**, v. 323, p. 891-894, 1990.

* De acordo com:

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

BARRETO, M. L. et al. Effect of vitamin A supplementation on diarrhoea and acute lower-respiratory-tract infections in young children in Brazil. **The Lancet**, v. 344, p. 228-231, 1994.

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

BETANCOURT-SANCHES, M.; NAVARRO-GARCIA, F. Pet secretion, internalization and induction of cell death during infection of epithelial cells by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 155, p. 2895-2906, 2009.

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. 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.

BILGE, S. S. et al. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **J. Bacteriol.**, v. 171, n. 8, p. 4281-4289, 1989.

BISCHOFF, C. et al. Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real-time PCR. **J. Microbiol. Methods**, v. 61, n. 3, p. 335-341, 2005.

BLACK, R. E. Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. **Vaccine**, v. 11, p. 100-106, 1993.

BLACK, R. E.; MORRIS, S. S.; BRYCE, J. Where and why are 10 million children dying every year?. **The Lancet**, v. 361, p. 2226-2234, 2003.

BOISEN, N. et al. New adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 3281-3292, 2008.

BOPP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELLS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 459-474.

BOWMAN, C. C; CLEMENTS, J. D. Differential biological and adjuvant activities of cholera toxin and *Escherichia coli* heatlabile enterotoxin hybrids. **Infect. Immun.**, v. 69, p. 1528-1535, 2001.

BRUNDER, W.; SCHIMIDT, H.; KARCH, H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. **Mol. Microbiol.**, v. 24, n. 4, p. 767-778, 1997.

BRUNDER, W. et al. 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.

BRUSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W. D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p. 560-602, 2004.

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.

BURGOS, Y.; BEUTIN, L. Evaluation of an Immuno-Chromatographic detection system for Shiga Toxins and the *E. coli* antigen. In: ABUELZEIN, E. **Trends in immunolabelled and related techniques**. [S.l.]: InTech. 2012. p. 29-41.

BÜRK, C. et al. Identification and Characterization of a New Variant of Shiga Toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H19 of Bovine Origin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 2106-2112, 2003.

BURNETTE, W.N. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. **Analyt. Biochem.**, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981.

BURNS, R. **Immunochemical protocols**. 3rd ed. New York: Humana Press, 2005. 328 p.

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

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE). **Síndrome hemolítico-urêmica e *E. coli* O157:H7** - dados estatísticos de 1998 – 2011. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dados/4lfnet9811_SHUa.pdf>. Acesso em: 01 jun. 2012.

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

CHAPMAN, P. A.; SWIFT, D. L. A simplified method for detecting the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **J. Med. Microbiol.**, v. 18, n. 3, p. 399-403, 1984.

CHIAO, D. J. et al. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. **J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 809, n. 1, p. 37-41, 2004.

CHOW, S.; CASADEVALL, A. Monoclonal antibodies and toxins: a perspective on function and isotype. **Toxins**, v. 4, n. 6, p. 430-454, 2012.

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

CLEMENTS, J. D.; FINKELSTEIN, R. A. Isolation and characterization of homogeneous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. **Infect. Immun.**, v. 24, p. 760-769, 1979.

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

COLLABORATIVE Study Team on the Role of Breastfeeding on the Prevention of Infant Mortality. Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. **The Lancet**, v. 355, p. 451-455, 2000.

CONWAY, P. L. Microbial ecology of human large intestine. In: GIBSON, G. R.; MACFARNE, G. T. **Human colonic bacteria: role in nutrition, physiology and pathology**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 1-24.

COSSART, P.; SANSONETTI, P. J. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. **Science**, v. 304, p. 242-248, 2004.

CREPIN, V. F. et al. Molecular basis of antigenic polymorphism of EspA filaments: development of a peptide display technology. **J. Mol. Biol.**, v. 350, n. 1, p. 42-52, 2005.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Rev. Microbiol.**, v. 8, p. 26-38, 2010.

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

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

DE SOUZA, R. L. et al. Hemolytic uremic syndrome in pediatric intensive care units in São Paulo, Brazil. **Open. Microbiol. J.**, v. 5, p. 76-82, 2011.

DEAN, A. G. et al. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis.**, v. 125, p. 407-411, 1972.

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

DENG, W. et al. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. **PNAS**, v. 101, n. 10, p. 3597-3602, 2004.

DO CARMO, G. M. I. et al. Decline in diarrhea mortality and admissions after routine childhood rotavirus immunization in Brazil: a time-series analysis. **Plos. Medicine**, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2011.

DONOHUE-ROLFE, A. et al. 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.

DONTA, S. T.; MOON, D. J.; WHIPP, S. C. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. **Science**, v. 183, p. 334-336, 1974.

DOUGHTY, S. et al. 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.

DOWNES, F.P. et al. Affinity purification and characterization of Shiga-like toxin II and production of toxin-specific monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 1926-1933, 1988.

DREVET, P.; GUINET, R. Comparison of sandwich-ELISA and GM1-ELISA for the detection of *Escherichia coli* thermolabile enterotoxin. **J. Immunoassay**, v. 12, n. 3, p. 293-304, 1991.

ELLIOTT, S. J. et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 1998.

ELLIOTT, S. J. et al. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 33, n. 6, p. 1176-1189, 1999.

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

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

ESLAVA, C. et al. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 3155-3163, 1998.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL AND EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (ECDC, EFSA) **Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC O104, 2011.** Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/doc/166e.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2012.

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

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

FAN, M.; HE, J. Recent progress in noncompetitive hapten immunoassays: a review. In: ABUELZEIN, E. **Trends in immunolabelled and related techniques.** [S.l.]: InTech, 2012. p. 53-66.

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

FRANK, C. et al. Epidemic profile of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. **N. Engl. J. Med.**, v. 365, n. 19, p. 1771-1780, 2011.

FRANKEL, G. et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, v. 30, n. 5, p. 911-921, 1998.

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

FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. **Phys. Sci.**, n. 241, p. 20-22, 1973.

FRIGUET, B. et al. 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.

GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends Microbiol.**, v. 4, p. 444-452, 1996.

GALÁN, J. E.; WOLF-WATZ, H. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. **Nature**, v. 444, n. 7119, p. 567-573, 2006.

GANNON, V. P. et al. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 5, p. 1268-1274, 1993.

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

GIANNELLA, R. A.; DRAKE, K. W.; LUTTRELL, M. Development of a radioimmunoassay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: comparison with the suckling mouse bioassay. **Infect. Immun.**, v. 33, n. 1, p. 186-192, 1981.

GIBS, J. Immobilization principles: selecting the surface. **ELISA Technical Bulletin, Corning Life Sciences**, n. 1, p. 1-8, 2001.

GILL, D. M. et al. Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.**, v. 33, p. 677-682, 1981.

GOMES, T. A. T.; GONZÁLEZ-PEDRAJO, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). In: TORRES, A. G. **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2010. p. 25-47.

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

GUERRANT, R. L. et al. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 10, p. 320-327, 1974.

GUIGNOT, J. et al. The secreted autotransporter toxin, Sat, functions as a virulence factor in Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* by promoting lesions in tight junction of polarized epithelial cells. **Cell. Microbiol.**, v. 9, n. 1, p. 204-221, 2007.

GUNZBURG, S. T.; TORNIEPORTH, N. G.; RILEY, L. W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 5, p. 1375-1377, 1995.

GUTH, B. E. C. et al. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolate from a patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 5, p. 535-536, 2002.

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

HAHN, S. K.; KIM, Y. J.; GARNER, P. Reduced osmolarity oral rehydration solution for treating dehydration due to diarrhoea in children: systematic review. **Brit. Med. J.**, v. 323, p. 81-85, 2001.

HAIGH, R. et al., Carbon dioxide regulated secretion of the EaeB protein of enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 129, n. 1, p. 63-67, 1995.

HAMAGUCHI, M. et al. Molecular basis of actin reorganization promoted by binding of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* EspB to alpha-catenin. **FEBS J.**, v. 275, p. 6260-6267, 2008.

HARRINGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO, J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 254, p. 12-18, 2006.

HENDERSON, I. L. et al. Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5587-5596, 1999.

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

HILL, D. R.; BEECHING, N. J. Travelers' diarrhea. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 23, n. 5, p. 481-487, 2010.

HONDA, T.; TAGA, S.; TAKEDA, Y.; MIWATANI, T. Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 13, p. 1-5, 1981.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. 556-563, 2006.

HUBBARD, A. L. et al. Direct detection of *eae*-positive bacteria in human and veterinary colorectal specimens by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 8, p. 2326-2330, 1998.

HUGHES, J. M. et al. Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Nature**, v. 271, p. 755-756, 1978.

HUNT, P. D. Heat-labile enterotoxin can be released from *Escherichia coli* cells by host intestinal factors. **Infec. Immun.**, v. 59, n. 1, p. 168-171, 1991.

IDE, T. et al. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cell Microbiol.**, v. 3, n. 10, p. 669-679, 2001.

IIZUMI, Y. et al. The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. **Cell. Host. Microbe**, v. 2, p. 383-392, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **População**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/mapa_site/mapa_site.php#populacao>. Acesso em: 20 jun. 2012.

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

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

ITO, T.; KUWAHARA, S.; YOKOTA, T. Automatic and manual latex agglutination tests for measurement of cholera toxin and heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 17, p. 7-12, 1983.

JAMISON, D. T. et al. (Ed.). **Disease control priorities in developing countries**. 2nd ed. London: School of Hygiene and Tropical Medicine. 2008. 1400 p. Disponível em: <<http://www.dcp2.org/pubs/DCP>>. Acesso em: 10 Apr. 2012.

JARVIS, K. G. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **PNAS**, v. 15, p. 7996-8000, 1995.

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

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.

KABIR, M. R. et al. Multiplex polymerase chain reaction for rapid identification of diarrheagenic *Escherichia coli*. **Mymensingh Med. J.**, v. 21, n. 3, p. 404-410, 2012.

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

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

KENNY, B. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511-520, 1997.

KESTY, N. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. **The EMBO Journal**, v. 23, n. 23, 4538-4549, 2004.

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

KIMURA, T. et al. Development of humanized monoclonal antibody TMA-15 which neutralizes Shiga toxin 2. **Hybrid Hybridomics**, v. 21, p. 161-168, 2002.

KLAPPROTH, J. M. A. et al. A Large Toxin from Pathogenic *Escherichia coli* Strains That Inhibits Lymphocyte Activation. **Infect. Immun.**, v. 68, n. 4, p. 2148-2155, 2000.

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

KODAMA, T. et al. The EspB protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* interacts directly with alpha-catenin. **Cell Microbiol.**, v. 4, n. 4, p. 213-222, 2002

KOGA, P. C. M. et al. Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and its use in EPEC diagnosis. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 5-7, 2003.

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

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

KONEMAN, E. W. et al. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5th 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.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANATA, C. F.; MENDOZA, W. **Improvind diarrhoea estimates**. Apresentado em: Monitoring and Evaluation Team, Child and Adolescent Health and Development World Health Organization. Geneva, Switzerland, October 2002. Disponível em: <http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/pdfs/improving_diarrhoea_estimates.pdf>. Acesso em: 10 Mar. 2012.

LASARO, M. A. et al. Production and release of heat-labile toxin by wild-type human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 123-31, 2006.

LAZZERINI, M.; RONFANI, L. **Oral zinc for treating diarrhoea in children (Review)**. The Cochrane Collaboration. [S.l.]: JohnWiley & Sons, 2008. 65 p.

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

LEVINE, M. M. et al. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development. **Microbiol. Rev.**, v. 47, p. 510-550, 1983.

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

LEVNER, M.; WIENER, F. P.; RUBIN, B. A. Induction of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* enterotoxins by an inhibitor of protein synthesis. **Infect. Immun.**, v. 15, n. 1, p. 132-137, 1977.

LEVNER, M.; URBANO, C.; RUBIN, B. A. Polymyxin B release of unnicked cholera toxin subunit A. **J. Bacteriol.**, v. 144, n. 3, p. 1203-1204, 1980.

LOCKWOOD, D. E.; ROBERTSON, D. C. Development of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa). **J. Immunol. Methods**, v. 75, n. 2, p. 295-307, 1984.

LOU, S. et al. A gold nanoparticle-based immunochromatographic assay: the influence of nanoparticulate size. **Analyst**, v. 137, p. 1174-1181, 2012.

LOUREIRO, I. et al. Human colostrum contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins: intimin, BfpA, EspA, and EspB. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v. 27, p. 166-171, 1998.

LU, Y. et al. Detection of EspB using reversed passive latex agglutination: application to determination of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 43, n. 1, p. 7-12, 2002.

LUBY, S. P. et al. 'Effect of Handwashing on Child Health: A randomized controlled trial'. **The Lancet**, v. 366, p. 225-233, 2005.

LUDWIG, A. et al. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. **Mol. Microbiol.**, v. 31, p. 557-567, 1999.

MALTA, D. C. et al. Avoidable causes of infant mortality in Brazil, 1997-2006: contributions to performance evaluation of the Unified National Health System. **Cad. Saúde Pública**, v. 26, n. 3, p. 481-491, 2010.

MANCINI, J. et al. The heat-resistant agglutinin family includes a novel adhesin from enteroaggregative *Escherichia coli* strain 60A. **J. Bacteriol.**, v. 193, p. 4813-1820, 2011.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 360 p.

MAY, K. Home tests to monitor fertility. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 165, n. 6, 2000-2002, 1991.

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

McDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Mol. Microbiol.**, v. 23, p. 399-407, 1997.

McKINNEY, M. M.; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **J. Immunol. Met.**, v. 96, n. 2, p. 271-278, 1987.

MENARD, L. P.; DUBREUIL, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 28, n. 1, p. 43-60, 2002.

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

MENEZES, C.A. **Anticorpos monoclonais para detecção de amostras de *Escherichia coli* produtoras de ST-I e LT-I**. 2002. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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

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

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

MILLIPORE CORPORATION. **Rapid lateral flow test strips**: considerations for product. Billerica, 2008. 39 p.

MINAMI, J. et al. Quantitative analysis of the production of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Acta. Med. Okayama**, v. 38, n. 5, p. 461-469, 1984.

MKL DIAGNOSTICS. **Phadebact® ETEC-LT Test**. 2003. Disponível em: <http://www.mkldiagnostics.com/downloadable/download/sample/sample_id/41/>. Acesso em: 03 jul. 2012.

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.

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

MORRIS, S. S. et al. Diarrhoea-defining the episode. **Int. J. Epidemiol.**, v. 23, n. 3, p. 617-623, 1994.

MÜLLER, D. et al. Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 7, p. 2626-2629, 2006.

MUNDEL, D. H.; ANSELMO, C. R.; WISHNOW, R. M. Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. **Infect. Immun.**, v. 14, n. 2, p. 383-388, 1976.

NAKAO, H. et al. Monoclonal antibody to Shiga toxin 2 which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 5717-5722, 1999.

NAKAO, H. et al. Monoclonal antibody to Shiga toxin 1, which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. **Microbiol. Immunol.**, v. 46, p. 777-780, 2002.

NAKASONE, N. et al. Development of a rapid immunochromatographic test to identify enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* by detecting EspB. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 57, n. 1, p. 21-25, 2007.

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

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

NATARO, J. P. et al. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 15, p. 4691-4699, 1994.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, n.1, p. 142-201, 1998.

NEVES, B. C. et al. Polymorphisms within EspA filaments of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect Immun.**, v. 71, n. 4, p. 2262-2265, 2003.

NGOM, B. et al. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 397, n. 3, p. 1113-1135, 2010.

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

NUNES, M. R. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil: distribution of enterotoxin and colonization factor genes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 111, n. 1, p. 224-232, 2011.

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

O'BRIEN, A. D. et al. Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. **The Lancet**, v. 2, p. 573, 1983.

O'BRIEN, A. D. Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. **Science**, v. 226, n. 4675, p. 694-696, 1984.

O'BRIEN, A. D.; HOLMES, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.**, v. 51, p. 206-220, 1987.

O'BRIEN, A. D. et al. Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933. **Microb. Pathog.**, v. 6, p. 381-390, 1989.

O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L. K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, p.125-136, 2005.

OCHI, S. et al. Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. **DNA Res.**, v. 16, n. 5, p. 299-309, 2009.

OCHOA, T. J. et al. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102, n. 9, p. 852-856, 2008.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 24, n. 5, p. 478-483, 2011.

ODUMOSU, O. et al. AB Toxins: A Paradigm Switch from Deadly to Desirable. **Toxins**, v. 2, n. 7, p. 1612-1645, 2010.

OLIVEIRA, T. C. R.; LATORRE, M. R. D. O. Tendências da internação e da mortalidade infantil por diarreia: Brasil, 1995 a 2005. **Rev. Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 102-111, 2010.

OLIVER, C. **Immunocytochemical methods and protocols**: methods in molecular biology. 3rd ed. New York: Humana Press, 2010. 401 p.

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

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

PADHYE, V. V.; ZHAO, T.; DOYLE, M. P. Production and characterisation of monoclonal antibodies to Verotoxins 1 and 2 from *Escherichia coli* of serotype O 157:H7. **J. Med. Microbiol.**, v. 30, n. 3, p. 219-226, 1989.

PAEK, S. H.; LEE, S. H.; CHO, J. H. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. **Methods**, v. 22, p. 53-60, 2000.

PARSOT, C. Shigella spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 252, n. 1, p. 11-18, 2005.

PATEL, S. K. et al. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 3, p. 1786-1794, 2004.

PATON, A. W. et al. 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.

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.

PAVLOVIC, M. et al. Development of a multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 7, n. 7, p. 801-808, 2010.

PEDROSO, M. Z. et al. Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *E. coli* serogroups. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 3, p. 1152-1156, 1993.

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.

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

PIVA, I. C. et al. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasília, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 1827-1832, 2003.

PRÜSS-ÜSTÜN, A. et al. **Safer water, better health: costs, benefits and sustainability of interventions to protect and promote health.** Geneva: WHO, 2008. 54 p.

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

QIAN, S.; BAU, H. H. Analysis of lateral flow biodetectors: competitive format. **Anal. Biochem.**, v. 326, n. 2, p. 211-224, 2004.

RAGIONE, R. M. et al. Recombinant anti-EspA antibodies block *Escherichia coli* O157:H7-induced attaching and effacing lesions in vitro. **Microbes. Infect.**, v. 8, n. 2, p. 426-433, 2006.

RAPPELLI, P. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the simultaneous identification of enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohemorrhagic and enteroinvasive *Escherichia coli*. **New Microbiol.**, v. 24, n. 1, p. 77-83, 2001.

R-BIOPHARM. **Ridascreen® Verotoxin**: Enzyme immunoassay for the detection of Verotoxin 1 and 2. Suplemento C 2201, 38 p. 2002. Disponível em: <<http://www.corpodiagnostica.com/user/Verotoxin%2002-05-28.pdf>>. Acesso em: 13 mar. 2012.

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

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

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

RISTAINO, P. A.; LEVINE, M. M.; YOUNG, C. R. Improved GM1-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 18, n. 4, p. 808-815, 1983.

ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. Advances in pediatric gastroenterology and hepatology. **J. Gast. Hepat.**, v. 17, p. 467-475, 2002.

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.

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) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SACK, R. B. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 29, p. 333-353, 1975.

SACK, D. A. et al. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins and antitoxins. **J. Clin. Microbiol.**, v. 11, p. 35-40, 1980.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. New York: CSHL, 1989.

SARIDAKIS, H. O. **Fatores de virulência e outras características de sorotipos de *Escherichia coli* pertencentes ao sorogrupo O26**. 1994. 102 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1994.

SCALETISKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 45, n. 2, p. 534-536, 1984.

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

SCHÄGGER, H.; JAGOW, G. V. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal. Biochem.**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SCHEUTZ, F. et al. 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. et al. 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.

SCHULZ, S. et al. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. **Cell**, v.63, p. 941-948, 1990.

SEN, D.; SAHA, M. R.; PAL, S. C. Evaluation of three simple and rapid immunological tests for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 19, n. 2, p. 194-196, 1984.

SILVA, G. A. P. Diarreia Aguda: fatores de risco e manejo. **Rev. Ped. Ceará**, v. 3, n. 1, p. 5-9, 2002.

SILVEIRA, C. R. F. **Obtenção e caracterização de anticorpos recombinantes (scFv) contra a toxina termo-estável (ST) de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**. 2012. Exame de Qualificação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SMITH, H. R. et al. A plasmid coding for the production of colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in strains of *Escherichia coli* of serogroup 078. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 6, p. 255-260, 1979.

SNELLING, A. M. et al. The commonly-used DNA probe for diffusely-adherent *Escherichia coli* cross-reacts with a subset of enteroaggregative *E. coli*. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 269, 2009.

SNOWDEN, K.; HOMMEL, M.. Antigen detection immunoassay using dipsticks and colloidal dyes. **J. Immunol. Methods**, v. 140, p. 57-65, 1991.

SPANGLER, B. D. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **Microbiol. Rev.**, v. 56, p. 622-647, 1992.

SPANO, L. C. et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, n. 3, p. 359-363, 2008.

SPEIRS, J. I.; STAVRIC, S.; KONOWALCHUK, J. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells. **Infect. Immun.**, v. 16, p. 617-622, 1977.

STAPLES, S.; ACHER, S.; GIANELLA, R. Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by strain of *E. coli* pathogenic for man. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 4716-4721, 1980.

STROCKBINE, N. A. et al. 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.

STUDIER, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **J. Mol. Biology**, v. 79, n.2, p. 237-248, 1973.

SVENNERHOLM, A. M.; HOLMGREEN, J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA). **Current. Microbiol.**, v. 1, p. 19-23, 1978.

SVENNERHOLM, A. M.; WIKLUND, G. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 17, p. 596-600, 1983.

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

TANIKAWA, T. et al. Characterization of monoclonal immunoglobulin A and G against shiga toxin binding subunits produced by intranasal immunization. **Scand. J. Immunol.**, v. 68, n. 4, p. 414-422, 2008.

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.

TATSUNO, I. et al. The *lpf* gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* or virulence of *Citrobacter rodentium*. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 1, p. 265-272, 2006.

TAYLOR, K. A. et al. The EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. **Infect. Immun.**, v. 66, n. 11, p. 5501-5507, 1998.

TECH and Bio. **Cara Kerja Testpack Kehamilan**. Part 2. Disponível em: <<http://cripx.wordpress.com/>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

THOMAZINI, C. M. et al. High prevalence of aggregative adherent *Escherichia coli* strains in the mucosa-associated microbiota of patients with inflammatory bowel diseases. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 301, n. 6, p. 475-479, 2011.

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.

TOMA, C. et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 6, p. 2669-2671, 2003.

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.

TORRES, A. G. **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2010. 264 p.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **PNAS**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

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

TURNER, S. M. et al. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 263, p. 10-20, 2006.

TZIPORI, S. et al. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infect. Immun.**, v. 60, n. 12, p. 5302-5306, 1992.

U N I T E D N A T I O N S
C H I L D R E N ' S F U N D (UNICEF). **Pneumonia and
diarrhoea: Tackling the deadliest diseases for the world's poorest children**.
New York: UNICEF, 2012. 77 p. Disponível em:

<http://www.unicef.org/media/files/UNICEF_P_D_complete_0604.pdf>. Acesso em: 04 jul. 2012.

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.

VELARDE, J. J. et al. Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 5, p. 1123-1135, 2007.

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. et al. 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.

VIDAL, M. et al. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 10, p. 5362-5365, 2005.

VIEIRA, M. A. et al. Prevalence and characteristics of the O122 pathogenicity island in typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. **J. Clin. Microbiol.**, v. 48, n. 4, p. 1452-1455, 2010.

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

WATTERWORTH, L. et al. Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic *Escherichia coli*. **J. Microbiol. Methods**, v. 60, n. 1, p. 93-105, 2005.

WEAGANT, S. D. et al. Development of digoxigenin-labeled PCR amplicon probes for use in the detection and identification of enteropathogenic *Yersinia* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from foods. **J. Food. Prot.**, v. 62, n. 5, p. 438-443, 1999.

WEIGLMEIER, P. R.; RÖSCH, P.; BERKNER, H. Cure and Curse: *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin and Its Receptor Guanylyl Cyclase C. **Toxins**, v. 2, n. 9, p. 2213-2229, 2010.

WELINDER-OLSSON, C. et al. Genetic profiling of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains in relation to clonality and clinical signs of infection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 659-664, 2002.

WATER with Sugar and salt. **The Lancet**, v. 312, n. 8084, p. 300-301, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global networks for surveillance of rotavirus gastroenteritis, 2001-2008. **Weekly epidemiological record**, v. 83, n. 47, 421-428, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Diarrhoeal disease the world health.** 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>>. Acesso em: 20 set. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Children: reducing mortality. **Fact Sheet**, n. 178, Jun. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/index.html>>. Acesso em 14 jun. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO); UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. **Diarrhoea**: why children are still dying and what can be done. New York: WHO Press, 2009. 68 p.

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

YOLKEN, R. H. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, v. 5, p. 439-444, 1977.

YOUNIS, R. et al. SepL resembles an aberrant effector in binding to a class 1 type III secretion chaperone and carrying an N-terminal secretion signal. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 22, p. 6093-6098, 2010.

YU, X. B. et al. Preparation and characterization of monoclonal antibody against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EspA. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.**, v. 23, n. 7, p. 657-659, 2007.

ZAMBONI, A. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 3, p. 1058-1063, 2004.

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

ZHANG, M. Z. et al. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 395, p. 2591-2599, 2009.

ANEXOS

ANEXO A – Isolados bacterianos

Quadro A.1 - Isolados bacterianos utilizados no presente estudo.

(continua)

Isolado	Patotipo	Sorotipo ou sorogrupo	Fatores de virulência de interesse	Referência
EDL933	STEC	O157:H7	Stx1/Stx2	O'Brien et al. (1983)
1	STEC	O157:H7	Stx2	Cedida por Guth, BEC (UNIFESP)
9	STEC	O103:H2	Stx1/Stx2	Cedida por Guth, BEC (UNIFESP)
11	STEC	O118:H16	Stx1	Cedida por Guth, BEC (UNIFESP)
57B	STEC	O26:H11	Stx1	Saridakis (1994)
82	STEC	O112:H21	Stx2	Cedida por Guth, BEC (UNIFESP)
BA 597	STEC	OR:NM	Stx1	Bueris et al. (2007)
H10407	ETEC	O78:H11	LT-I/ST-I	Evans e Evans (1973)
28	ETEC	O112:H10	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
51	ETEC	ONT:H19	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
10/1B	ETEC	OR:H-	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
117A1	ETEC	OR:HNT	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
21089	ETEC	NT	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
220A1	ETEC	ONT:H16	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
2A5	ETEC	O88:H25	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
39A1	ETEC	O109:H19	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
4541-5	ETEC	O64:H-	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
4702-1	ETEC	OR:HNT	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
106172-1	ETEC	OR:H10	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
115181-1	ETEC	O64:H-	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
117820-1	ETEC	OR:H-	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
K2	ETEC	NT	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
104	ETEC	OR:H17	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
224	ETEC	OR:H10	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
308	ETEC	OR:H16	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
622	ETEC	OR:H9	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
906	ETEC	O15:H40	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
913	ETEC	O6:H16	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
922	ETEC	OR:H-	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
1334	ETEC	ONT:H16	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
1457	ETEC	NT	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
2109	ETEC	ONT:H32	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
2464	ETEC	OR:H10	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
2684	ETEC	O133:H25	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
3081	ETEC	OR:H-	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
3584	ETEC	OR:H32	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
4125	ETEC	O82:H40	LT-I	Bacterioteca LabBact/IBu
4	ETEC	OR:H16	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
5	ETEC	O6:H16	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
155A1	ETEC	O6:H16	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
156A1	ETEC	ONT:H34	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
157A2	ETEC	OR:H16	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
159A2	ETEC	O6:H16	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
160A2	ETEC	OR:H16	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
170A1	ETEC	O6:H16	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
40T	ETEC	OR:H-	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
99237	ETEC	O78:H12	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
237	ETEC	O6:H16	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
2335	ETEC	OR:H16	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
2811	ETEC	O15:H18	LT-I/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu

(conclusão)

Isolado	Patotipo	Sorotipo ou sorogrupo	Fatores de virulência de interesse	Referência
3026	ETEC	O6:H16	LT-/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
3095	ETEC	O6:H16	LT-/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
3238	ETEC	O6:H16	LT-/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
3950	ETEC	O6:H16	LT-/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
15	ETEC	ONT:H19	LT-/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
150-4	ETEC	ONT:H8	LT-/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
30	ETEC	O89:HNT	LT-/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
127	ETEC	ONT:HNT	LT-/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
98046	ETEC	NT	LT-/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
170	ETEC	O6:H16	LT-/ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
84/3353	ETEC	O4:H1	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
3321-4	ETEC	O153:H16	ST-I	Cedida por Guth, BEC (UNIFESP)
616	ETEC	O25:H16	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
2016	ETEC	O8:H2	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
E10702D167	ETEC	O171:HNT	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
6546-1	ETEC	OR:HNT	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
416	ETEC	O148:H27	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
2859	ETEC	O78:H27	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
74499-1	ETEC	ONT:H15	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
76359-1	ETEC	O166:H15	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
3541	ETEC	ONT:HNT	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
1791-1	ETEC	OR:H21	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
4961-2	ETEC	ONT:H21	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
501-4	ETEC	O78:HNT	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
O211-1	ETEC	O6:H16	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
3231-4	ETEC	ONT:HNT	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
84/3046	ETEC	O6:HNT	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
84/3610	ETEC	ONT:H5	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
2021-1	ETEC	OR:H27	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
3511-1	ETEC	OR:H21	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
4011-1	ETEC	OR:H-	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
3891-1	ETEC	O153:H45	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
75525-1	ETEC	OR:H7	ST-I	Bacterioteca LabBact/IBu
E2348/69	EPEC	O127:H6	EspB	Levine et al. (1985)
C54-58	EPEC	O55:H6	EspB	Isolada na Guiana (1958)
				Bacterioteca LabBact/IBu
3451-3	EPEC	O26:H11	EspB	Isolada em São Paulo (1986)
				Bacterioteca LabBact/IBu
EPM3821-1	EPEC	O111ab:H2	EspB	Isolada em São Paulo (1990)
				Bacterioteca LabBact/IBu
BA 2297	EPEC	O153:H11	EspB	Bueris et al. (2007)
BA 2103	EPEC	O26:H11	EspB	Bueris et al. (2007)
DH5a	-	-	-	Sambrook; Fritsch; Maniats (1989)
JM109	-	-	-	Sambrook; Fritsch; Maniats (1989)

NOTA - LabBact/IBu: Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan
 Fonte: Rocha (2012).

ANEXO B – Metodologia complementar

ANEXO B.1 - Anticorpos policlonais e monoclonais

B.1.1 Obtenção da fração enriquecida em IgG dos soros de coelhos

A fração enriquecida em IgG de cada um dos soros de coelhos imunizados com a diferentes proteínas foi obtida conforme metodologia descrita por McKinney e Parkinson (1987). Para isso, cada um dos soros foi diluído em quatro volumes de tampão acetato de sódio 60 mM pH 4,0 e o pH final ajustado para pH 4,5. Ácido caprílico foi adicionado gota-a-gota, na proporção de 25 µL por mL da solução, a temperatura ambiente sob constante agitação. Após 30 min, a solução foi centrifugada a 10.000 x g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e acrescido de PBS 0,1 M pH 7,2 (1 parte de PBS para 9 partes do sobrenadante), sendo o pH final ajustado para 7,4 com NaOH 1 M. A seguir, o sobrenadante foi resfriado a 4 °C e submetido à precipitação com sulfato de amônio (0,227 g de sulfato de amônio por mL da solução) a 4 °C por 1 h sob agitação. A solução foi centrifugada a 5.000 x g por 15 min a 4 °C e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi dissolvido com PBS 0,01 M pH 7,2 (cerca de 1/10 do volume original do soro) e submetido à diálise contra PBS por dois dias com duas trocas por dia. A solução obtida foi filtrada em filtro de poro 0,45 µm e o conteúdo proteico foi determinado (*Micro BCA Protein Assay Kit*, Pierce).

B.1.2 Immunoblotting

A fração enriquecida em IgG de cada um dos soros foi testada por *immunoblotting* para comprovar a reatividade com seu respectivo antígeno. Para isso, 5 µg da respectiva proteína foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970; STUDIER, 1973) em condições redutoras e transferidos para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) a 150 mA a 4° C por 16 h na presença de tampão Tris-glicina (0,025 M Tris e 0,2 M de glicina) pH 8,3 contendo 20% metanol (BURNETTE, 1981; TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com 1% de BSA em PBS a

temperatura ambiente por 1 h, e incubadas com 30 µg/mL da fração enriquecida em IgG de cada um dos soros a temperatura ambiente por 2 h. Depois de três lavagens de 5 min com PBS contendo 0,05% Tween-20 (PBST) as membranas foram incubadas com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (PO) (Sigma) na diluição de 1:5.000 a temperatura ambiente por 1 h. Após novas lavagens, as reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAB, Sigma) 0,033 mg/mL em PBS e 5 µL/mL de H₂O₂ e interrompidas com adição de água destilada.

B.1.3 ELISA indireto

Para avaliar reatividade e o título dos anticorpos, microplacas Maxisorp™ (Nunc, Rochester, NY, EUA) foram sensibilizadas com os antígenos de interesse (1 µg/mL para Stx1, Stx2, EspB, 2 µg/mL para LT e 10 µg/mL de ST) em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 e mantidas a 4 °C por 16-18 h. Posteriormente, as microplacas foram lavadas por 4 vezes consecutivas com PBST e bloqueadas com 1% BSA a 37 °C por 30 min. Após nova lavagem, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 60 min com diluições seriadas dos soros pré ou após a imunização dos coelhos ou camundongos. Em seguida, as microplacas foram lavadas e incubadas a 37 °C por 45 min com o conjugado adequado [soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:5.000 em solução de bloqueio ou soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000]. Após as lavagens com PBST, o ensaio foi revelado com a solução contendo 0,5 mg/mL de orto-fenileno diamino (OPD, Sigma) em tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 e 0,5 µL/mL de H₂O₂. 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 adicionado foi de 100 µL/poço, com exceção da solução de bloqueio que foi de 200 µL/poço. O título dos anticorpos foi definido como a maior diluição em que a DO atingiu 0,2 em A_{492nm}.

B.1.4 ELISA indireto com antígeno nativo e desnaturado

Para avaliar a reatividade dos anticorpos (PAbs ou MAbs) com seu respectivo antígeno na forma desnaturada ou nativa, 1 µg/mL de Stx1, Stx2 ou EspB, 2 µg/mL

de LT e 10 µg/mL de ST foram submetidos ou não ao aquecimento em banho seco *Dryblock* (Lanan Technology, Zhejiang Province, China) a 100 °C por 10 min e posteriormente utilizados na sensibilização de microplacas Maxisorp™ (NUNC) a 4 °C por 16-18 h. As etapas seguintes seguem a mesma metodologia do item anterior (B.1.3).

ANEXO B.2 – Produção e caracterização dos anticorpos monoclonais

B.2.1 Obtenção dos anticorpos monoclonais anti-Stx2

B.2.1.1 Obtenção do toxóide Stx2

Antes da imunização, a toxina Stx2 foi inativada por formaldeído, a fim de reduzir a menos de 1% sua citotoxicidade original. Para isso, 100 µg de Stx2 foram adicionadas a 1 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0 contendo 1% de formaldeído. Após incubação a 37 °C por três dias, a solução foi dialisada por 2 dias em PBS (DONOHUE-ROLFE et al., 1984) e armazenada a -20 °C até o uso.

Para constatar a eficiência do processo foi realizado o ensaio de citotoxicidade em células Vero (célula epitelial renal de macaco verde africano). Brevemente, concentrações de 1 a 1000 ng dos toxóides e da toxina Stx2 foram adicionadas a placa de cultura celular de 24 poços contendo células Vero e mantidos a 37 °C por 48 h. A morfologia celular foi visualizada a cada 24 h. Após 48 h, a placa foi lavada com PBS e corada com 0,2% de cristal violeta em solução de 20% de metanol por 15 min. Posteriormente, após lavagem e secagem, os poços foram adicionados de 100 µL de metanol para permitir a solubilização do corante e a absorbância medida a 620 nm.

B.2.1.2 Imunização dos camundongos

Camundongos BALB/c fêmeas com 4 a 6 semanas de idade foram imunizados com o toxóide Stx2. O protocolo de imunização consistiu de uma primeira dose de 3 µg de Stx2 adsorvidas a 250 µg de hidróxido de alumínio, via

coxim plantar. Após 15 dias, os animais receberam a primeira injeção de reforço, na concentração de 15 µg de Stx2. Após 15 dias do reforço, o sangue dos animais foi coletado pelo plexo orbital para sangria de prova e a verificação da produção de anticorpos foi medida por ELISA indireto (seção **B.1.3**) utilizando como antígeno: 1 µg/mL de Stx2. Os camundongos receberam ainda uma terceira dose de toxóide após 30 dias. Três dias antes da fusão, o camundongo que apresentou maior título de anticorpos recebeu uma injeção de reforço contendo o toxóide Stx2 diluído em PBS.

B.2.1.3 Cultivo de células mielomatosas

As células de mieloma de camundongo 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, Grand Island, NY, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB); 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 acompanhando a multiplicação celular.

B.2.1.4 Preparo de células peritoneais

Feeder layer refere-se à camada de células peritoneais (fibroblastos) retiradas do camundongo e adicionadas à 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 eutanasiado, 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 a 40 mL de meio RPMI. Após homogeneização, o meio foi distribuído em placas de cultura celular de 96 poços, que foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

B.2.1.5 Fusão e seleção dos hibridomas

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

Os linfonodos poplíteos foram retirados do animal imunizado e imersos imediatamente em frasco estéril contendo RPMI e 0,01 mg/mL de gentamicina. O tecido adiposo foi retirado e os linfonodos macerados sobre peneira de malha fina, para a obtenção da suspensão de linfócitos. As células assim obtidas foram centrifugadas e ressuspensas em 10 mL de meio RPMI. Paralelamente, as células mielomatosas foram lavadas por centrifugação a 250 x g por 5 min por 3 vezes com meio RPMI sem soro fetal bovino e ressuspensas em 10 mL do mesmo meio. O número de células, linfócitos e células mielomatosas foi determinado em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram misturadas na proporção de dois linfócitos para uma célula mielomatosas e a mistura de células foi novamente centrifugada a 250 x g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foi adicionado 1 mL de PEG 1500 (Sigma) contendo 50 µL de dimetil sulfoxido (DMSO) sob agitação manual a 37 °C por 1 min. Em seguida, as células foram deixadas em repouso a 37 °C por 1 min. Logo após, 2 mL de meio RPMI foram adicionados sob agitação por mais 1 min e 20 mL de RPMI em 4 min. Após um novo repouso de 4 min, as células foram centrifugadas e ressuspensas em 40 mL de meio RPMI contendo 15% de SFB e HAT (2% de hipoxantina e timidina e 1% de aminopterin). A suspensão foi distribuída em placas de 96 poços contendo as células peritoneais de camundongo previamente aderidas. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. O meio de cultivo celular foi renovado três dias após a fusão e a seguir, a cada dois dias. A seleção dos hibridomas foi feita em meio RPMI com HAT por uma semana e RPMI com HT por mais duas semanas. Após este período, os hibridomas foram cultivados em meio RPMI com 10% de SFB.

B.2.2 Avaliação da produção de anticorpos monoclonais anti-Stx2

Os hibridomas produtores de MAb anti-Stx2 foram avaliados com relação à produção de anticorpos por ELISA de captura: microplacas TM (Nunc) foram

sensibilizadas com 150 µg/mL de IgG de coelho anti-Stx2 em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6. Após incubação a 4 °C por 18 h as microplacas foram lavadas com PBST e incubadas a 37 °C por 30 min com PBS contendo 1% de BSA. Posteriormente, as placas foram incubadas com 1 µg/mL de Stx2 ou sobrenadante da STEC EDL933 a 37 °C por 2 h. Após novas lavagens, os sobrenadantes dos hibridomas foram adicionados e novamente incubados a 37 °C por 1 h. Em seguida, depois das lavagens, foi acrescentado soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000 e incubado por 30 min a 37 °C. A reação foi revelada com solução de 0,5 mg/mL de OPD adicionado de H₂O₂ e interrompida com adição de HCl 1 N. A absorbância foi mensurada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).

Para avaliar a reatividade dos MAbs com isolados produtores e confirmar a ausência de reatividade com isolados não produtores da toxina de Shiga, sobrenadantes dos clones produtores de anticorpos anti-Stx2 – previamente selecionados e expandidos em placa de 24 poços – foram testados por ELISA de captura utilizando 1 µg/mL de Stx2, sobrenadante de três isolados produtores (EDL933, 1 e 9) e quatro isolados não-produtores de Stx2 (597, DH5a, E2348/69 e H10407 – **Quadro A.1 do ANEXO A**).

B.2.3 Subclonagem e classificação dos hibridomas

Após seleção e nova expansão, os hibridomas foram subclonados por diluição limite em meio RPMI contendo 10% de SFB em placas de 96 poços. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e diluídas de maneira a se obter aproximadamente 5 células por mL. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 10 a 15 dias, os sobrenadantes que teoricamente continham um só clone foram testados por ELISA indireto para detecção da produção de anticorpos anti-Stx2.

Posteriormente, obtidos os subclones (K1), os sobrenadantes foram avaliados quanto aos isotipos de imunoglobulina. Para isso, microplacas Maxisorp™ (Nunc) foram sensibilizadas a 4 °C por 18 h com 10 µg/mL das diferentes subclasses de imunoglobulinas anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, IgG3 de camundongo e reveladas com soro de coelho anti-imunoglobulinas (IgG+IgA+IgM) de camundongo conjugado à peroxidase 1:1.000 (ZYMED, San Francisco, CA,

EUA). Os clones selecionados como produtores de anticorpos anti-Stx2 foram expandidos em garrafas de cultura e congelados em nitrogênio líquido.

B.2.4 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 10% 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 identificados e armazenados a -80° C por 48 h e depois transferidos para o nitrogênio líquido.

B.2.5 Purificação dos anticorpos monoclonais

Os hibridomas produtores de anticorpos monoclonais anti-Stx1, anti-Stx2 e anti-LT foram cultivados em estufa a 37 °C contendo 5% de CO₂. Seus respectivos sobrenadantes de cultura foram coletados, centrifugados a 2.000 x g e estocados a -20 °C até o uso. Para purificação, os sobrenadantes das culturas dos hibridomas foram descongelados e filtrados em filtros de poro 0,45 µm.

Primeiramente, a coluna de proteína A-Sepharose (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Suécia) foi equilibrada com tampão Tris (50 mM, pH 7,0) e o sobrenadante do hibridoma aplicado. Posteriormente, a coluna foi lavada com tampão Tris para retirada das proteínas não adsorvidas. Em seguida, as proteínas ligadas a matriz da coluna (anticorpos) foram eluídas com glicina (0,1 M, pH 3,0). Imediatamente, o pH da amostra coletada na eluição foi neutralizado com solução de Tris (1 M, pH 9,0). A amostra correspondente ao pico de eluição foi dialisada contra PBS, e posteriormente concentrada na presença de PEG 6000. O conteúdo proteico foi dosado (*Micro BCA Protein Assay*, Pierce) e armazenados a -20 °C. Para verificar o grau de pureza dos anticorpos, 10 µg do conteúdo proteico foram submetidas à SDS-PAGE 12% e os géis corados com *Comassie Blue* (Bio-Rad).

Os anticorpos monoclonais foram testados por *immunoblotting* para comprovar a reatividade com seus respectivos antígenos seguindo a metodologia descrita para os anticorpos policlonais. Empregando-se 30 µg/mL dos MAbs anti-Stx1, anti-Stx2 e anti-LT.

B.2.6 Cálculo da constante de dissociação

As constantes de dissociação (K_D) 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 por meio da seguinte fórmula:

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

ANEXO B.3 – Expressão da toxina termolábil produzida por *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

B.3.1 Cultivo e expressão de LT

Primeiramente, o isolado ETEC H10407 foi cultivado em 3 mL de TSB a 37 °C por 18 h. Posteriormente, diluições de 1:100 do cultivo bacteriano foram incubadas nos seguintes meios: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil), *E. coli* Broth (EC, Merck, Darmstadt, Alemanha), Evans (EVANS et al., 1973), Syncase e Trypticase Soy Broth (TSB, Merck) (**Quadro B.1**)

Quadro B.1 - Composição dos meios de cultivo utilizados (%).

Composição/ Meios	DMEM	EC	EVANS	Syncase	TSB
Triptona	-	-	-	0,5	-
Extrato de levedura	-	-	0,15	-	-
Caseína	-	2	-	1	3
NaCl	0,64	0,5	0,25	-	0,5
KH ₂ PO ₄	-	0,15	0,871	-	-
MnCl ₂ .4H ₂ O	-	-	0,0005	0,0004	-
MgCl ₂ .6H ₂ O	-	-	-	0,0042	-
MgSO ₄	0,02	-	0,005	-	-
FeCl ₃ .6H ₂ O	-	-	0,0005	0,0005	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-	0,0089	-
K ₂ HPO ₄	-	0,4	-	0,5	0,25
NH ₄ Cl	-	-	-	0,118	-
CaCl ₂ .H ₂ O	0,0265	-	-	-	-
Fe(NO ₃) ₃ .H ₂ O	0,00001	-	-	-	-
KCl	0,04	-	-	-	-
NaHCO ₃	0,37	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	0,0125	-	-	-	-
Sais de Bile	-	0,15	-	-	-
Lactose	-	0,5	-	-	-
Piruvato	0,011	-	-	-	-
Glicose	0,45	-	-	0,25	0,25
Aminoácidos (diversos)	diversos	-	-	-	-
Vitaminas (diversas)	diversas	-	-	-	-
Vermelho de fenol	0,0015	-	-	-	-

Durante o período de 8 h de cultivo, alíquotas de 1 mL das culturas foram retiradas a cada hora e centrifugadas a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. As alíquotas finais foram retiradas após 24 h e processadas da mesma forma. Todos os sobrenadantes foram armazenados a -20 °C até o momento de uso.

A expressão de LT foi avaliada por ELISA de captura, para tanto, microplacas de ELISA (MaxisorpTM, Nunc) foram sensibilizadas com 30 µg/mL da fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-LT e incubadas a 4 °C por 16-18 h. Posteriormente, as microplacas foram lavadas 4 vezes consecutivas com PBST e bloqueadas com leite desnatado 5% em PBS a 37 °C por 30 min. Após nova lavagem, as microplacas foram incubadas a 37 °C por 2 h com os sobrenadantes bacterianos previamente obtidos. Em seguida, as microplacas foram lavadas e incubadas com 74 µg/mL de anticorpo MAb anti-LT a 37 °C por 30 min. Após lavagem, as microplacas foram novamente incubadas a 37 °C por 30 min com soro de coelho anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:10.000 em solução de bloqueio. Depois da lavagem, a reação foi revelada com adição de

0,5 mg/mL OPD (Sigma) e 0,5 μ L/mL de H₂O₂ e interrompida com adição de 50 μ L de HCl 1 N por poço. A absorbância foi mensurada a 492 nm em leitor Multiskan EX ELISA (Labsystems).

B.3.2 Cultivo bacteriano em meio contendo antibióticos

O isolado protótipo H10407 foi cultivado em 3 mL de TSB a 37 °C por 16-18 h. Posteriormente, diluições de 1:100 do cultivo bacteriano foram incubadas a 37 °C (250 rpm) por 16-18 h em caldo EC sem antibiótico e caldo EC com 5 ng/mL de ciprofoxacina ou 0,1 mg/mL de lincomicina.

B.3.3 Tratamento do cultivo bacteriano

Dentre os diferentes ensaios de expressão, verificou-se também em qual das frações e quais tipos de tratamentos seriam eficazes para a liberação das toxinas. Para tanto, alíquotas de 1 mL dos cultivos foram coletadas e submetidas a diferentes tratamentos. A presença de LT foi pesquisada no sobrenadante após centrifugação a 10.000 x g por 10 min a 4 °C e estocado a -20 °C até o uso. O sedimento resultante e cultivo bacteriano (não centrifugado) foram submetidos ao tratamento com um dos seguintes compostos: polimixina 0,1 mg/mL, EDTA 0,1 M e Triton X-100 2%. Após incubação a 37 °C por 1 h em agitação, 250 rpm, cada material foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4 °C e os sobrenadantes resultantes, armazenados a -20 °C até o uso. Na sequência, 40 isolados produtores de LT e LT/ST (**Quadro A.1** do **ANEXO A**) foram testados quanto à expressão das toxinas nas mesmas condições estabelecidas para a cepa protótipo.

APÊNDICES

APENDICE A – Estratégias empregadas na pesquisa para a futura detecção de ETEC utilizando a toxina termoestável (ST) como alvo

Como para a detecção de ETEC utilizando a toxina LT todos os parâmetros foram definidos e estão descritos no capítulo principal dessa tese, nesse apêndice descreveremos a estratégia utilizada para a padronização do teste imunocromatográfico para detecção de ST e quais os desafios e perspectivas para a finalização deste.

Quando a linha de imunodiagnóstico se iniciou no Laboratório de Bacteriologia, a toxina ST era vendida comercialmente pela Sigma. Na época adquiriu-se alguns lotes e também purificou-se mais toxina a partir do isolado ETEC 3321-4, produtor somente de ST. Como a toxina comercial foi descontinuada e o processo de purificação é extremamente trabalhoso e com rendimento muito pequeno, a quantidade que se dispunha foi suficiente somente para a imunização de camundongos e consequente obtenção de hibridomas secretores de anticorpos anti-ST.

Antes da imunização dos camundongos conjugou-se previamente a toxina a albumina de camundongo por método químico, pois ST é um hapteno e, portanto não imunogênica. Na fusão dos linfonodos poplíteos com as células mielomatosas obteve-se um grande número de hibridomas (MENEZES, 2002), sendo assim foi realizada a seleção desses hibridomas e obteve-se um MAb caracterizado como IgG1. Esse anticorpo identificou por *immuno-dot* e *colony immunoblot* amostras de ETEC produtoras desta toxina e as distinguiu das amostras não produtoras por *immuno-dot*, no entanto, a sensibilidade destes métodos foi de 60% (PIAZZA, R. M. F. – comunicação pessoal). Por esse motivo, no presente trabalho empregou-se diversas estratégias na obtenção de ST e de anticorpos policlonais contra essa toxina, descritas a seguir.

A.1 Metodologia

A.1.1 Obtenção de ST

A toxina ST-I (referida como ST) foi obtida a partir do isolado ETEC 3321-4. O isolado foi cultivado em 3 L de meio Staples (asparagina) sob agitação de 180 rpm a 37 °C por 16-18 h. O cultivo foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min e o precipitado descartado. O sobrenadante foi dialisado contra acetato de amônio 40

mM utilizando membrana de diálise com porosidade de 3,5 kDa. Após a diálise, o tampão contendo as frações proteicas menores de 3,5 kDa foi coletado e liofilizado. Um pequeno volume de PBS foi adicionado ao liofilizado e o conteúdo proteico quantificado (*Micro BCA Protein Assay Kit*, Pierce). Essa preparação contendo a toxina ST foi acoplada à albumina de coelho. Para isso, 1,5 mg dessa preparação foi adicionada a 2,16 mg de albumina e 75 mg de EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (Sigma) em tampão fosfato de sódio (0,2 M, pH 5,5) em um volume final de 1 mL. A reação ocorreu à temperatura ambiente, no escuro, por 18 h em agitação lenta (LOCKWOOD; ROBERTSON, 1984).

A.1.2 Anticorpos policlonais anti-ST

Os anticorpos policlonais foram obtidos a partir da imunização de coelho da raça Nova Zelândia de aproximadamente 60-65 dias de idade. Antes do início da imunização, o animal foi submetido à coleta de sangue para obtenção do soro pré-imune. O protocolo de imunização consistiu de três doses administradas no 1º dia, 15º dia e 35º dia. Todas as doses foram injetadas por via intramuscular contendo 0,75 mg de ST acoplada a albumina adsorvida a 2,5 mg de Al^{3+} . As sangrias de prova foram realizadas pela veia central da orelha no 14º dia após cada dose administrada.

Para verificar a reatividade dos soros, microplacas Maxisorp™ (Nunc) foram sensibilizadas com 15 µg/mL de ST. Todas as etapas do ELISA foram realizadas conforme item **B.1.3** do **ANEXO B**, porém utilizando soros anti-ST. Após verificação da produção de anticorpos, a sangria foi realizada no 50º dia por punção cardíaca. O sangue coletado foi armazenado a 37 °C por 30 min e 4 °C por 18 h. Posteriormente, o soro foi separado da fração celular por centrifugação a 500 x g por 5 min e armazenado a -20 °C até o uso.

A fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-ST foi obtida de acordo com seção **B.1.1**, **ANEXO B**) e a verificação da reatividade com o antígeno ST foi realizada por *immunoblotting*. O conteúdo proteico contendo ST para utilização no *immunoblotting* foi obtido do isolado 3321-4 cultivado em placas de CFA após tratamento com solução de 1 mg/mL de polimixina por 30 min sob agitação. Posteriormente o lisado bacteriano foi centrifugado a 10.000 x g por 15 min e o sobrenadante aplicado em gel específico para proteínas de baixo peso, ou seja,

tricina-SDS-PAGE (SCHÄGGER; JAGOW, 1987). A transferência eletroforética foi realizada em membrana PVDF na presença de tampão Tris-glicina (0,025 M Tris e 0,2 M de glicina) contendo 40% de metanol, pH 8,3. Em seguida, a membrana foi incubada com 30 µg/mL da fração IgG do soro de coelho anti-ST ou 0,2 mg/mL do MAb anti-ST e o restante do ensaio foi realizado conforme item **B.1.2, ANEXO B**).

A.1.3 Expressão de ST

Como anteriormente mencionado cepas de ETEC produzem isoladamente ou simultaneamente dois tipos de enterotoxinas, a toxina termolábil (LT) e a toxina termoestável (ST), que diferem em estrutura e mecanismo de ação (LEVINE et al., 1983).

A expressão da toxina ST foi testada na cepa protótipo de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC, H10407; **Quadro A.1, ANEXO A**) nos seguintes meios: Dulbecco's Modified Eagle's Medium, caldo *E. coli*, meio de Evans, caldo Syncase e caldo de triptona de soja (**Quadro B.1, seção B.3, Anexo B**). A presença dessa toxina foi avaliada por ELISA e os métodos empregados nos cultivos, expressão e liberação das toxinas e proteína secretada estão detalhados no **anexo B**. Posteriormente, a expressão de ST foi avaliada em 40 isolados bacterianos produtores de ST (**Quadro A.1, ANEXO A**) comparando condições de cultivo com e sem a presença de antibióticos. Os resultados encontrados foram analisados por análise de variância com auxílio do programa *GraphPad Prism5®* e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

A1.4 Padronização do teste IC para detecção de ST

Os protocolos utilizados na padronização e desenvolvimento do teste imunocromatográfico estão descritos na seção **4.5**.

A.2 Resultados

A.2.1 Anticorpos policlonal e monoclonal

O *immunoblotting* com a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-ST não apresentou reatividade na altura da banda esperada para ST (abaixo do padrão de massa molecular de 8,5 kDa) (**Figura A.1A**). Este resultado, em conjunto com a fraca reatividade no ensaio de ELISA, após o aquecimento do antígeno, indica que as ligações dos anticorpos policlonais anti-ST com a toxina baseiam-se em epítomos conformacionais. Diferentemente, o MAb anti-ST reconheceu ST na sua forma desnaturada por *immunoblotting* indicando se tratar de epítopo sequencial (**Figura A.1B**).

Figura A.1 - *Immunoblotting* do PAb e MAb anti-ST.

Lisado bacteriano do isolado 3321-4 submetido a eletroforese em gel de poliacrílamida e transferido para membrana de PVDF. **A)** reatividade com 30 µg/mL do PAb anti-ST; **B)** reatividade com 30 µg/mL do MAb anti-ST.

Fonte: Rocha (2012).

A.2.2 Análise da expressão da toxina ST

A expressão de ST na fração do sobrenadante bacteriano após cultivo do isolado H10407 em caldo EC foi superior quando comparada aos outros meios testados (**Gráfico A.1**). A expressão da toxina foi semelhante nos tempos de 8 h e 24 h.

Gráfico A.1 - Expressão de ST em ETEC H10407 em diferentes meios de cultivo.

A expressão foi medida por ELISA a 492 nm na fração do sobrenadante de cultivo bacteriano.
 Fonte: Rocha (2012)

Após seleção do caldo EC como meio para expressão de ST e LT, o isolado H10407 foi cultivado na presença ou ausência de lincomicina ou ciprofloxacina conforme já mencionado para LT (seção **B.3.2** do **ANEXO B**). Verificou-se que a lincomicina provocou um pequeno aumento na expressão de ST quando comparado o meio sem antibiótico. Por outro lado, o uso de ciprofloxacina diminuiu a expressão de ST em relação ao meio sem antibióticos (**Gráfico A.2**).

Gráfico A.2 - Expressão de ST em ETEC H10407 na presença ou ausência de antibióticos.

Sobrenadante do isolado H10407 cultivado na ausência (azul) ou presença de lincomicina (vermelha) ou ciprofloxacina (verde). A expressão foi medida por ELISA a 492 nm na fração do sobrenadante bacteriano.
 Fonte: Rocha (2012)

Assim como para LT investigou-se a liberação de ST após tratamento com diversos compostos (EDTA, polimixina B e Triton X-100) no isolado protótipo H10407 (**seção B.3.3** do ANEXO B.3). A expressão de ST foi avaliada não somente no sobrenadante e sedimento bacteriano como também no cultivo bacteriano, como forma de abranger tanto o sobrenadante quanto o sedimento bacteriano como descrito por Ristaino, Levine e Young (1983). Esses autores observaram que o tratamento direto do cultivo bacteriano com polimixina B incrementava a quantidade de LT liberada. O tratamento com EDTA e Triton X-100 possibilitou maior liberação de ST, no cultivo, em relação ao tratamento com polimixina (**Gráfico A.3**).

Gráfico A.3 - Expressão de ST em ETEC H10407 após tratamento com diferentes compostos.

A expressão foi medida por ELISA a 492 nm no sobrenadante (azul), sobrenadante do sedimento tratado (vermelho) e cultivo bacteriano tratado (verde).

Fonte: Rocha (2012).

Durante os ensaios realizados observou-se que alguns isolados de ETEC expressaram ST na presença de ciprofloxacina, outros na presença de lincomicina, outros ainda expressaram na presença dos dois antibióticos. Dessa forma, padronizou-se a adição dos dois antibióticos ao meio EC para expressão de ST para o teste de um número maior de isolados. Os resultados indicaram que o cultivo em caldo EC na presença de ciprofloxacina e lincomicina após tratamento com Triton X-100 possibilitou o aumento da produção de ST, que obteve média de expressão

significativamente diferente quando comparada ao meio sem antibióticos ($p < 0,05$) (**Gráfico A.4**).

Gráfico A.4 - Expressão de ST isolados ETEC após cultivo na presença ou ausência de antibióticos.

Sobrenadante de cultivo de isolados produtores de ST cultivados na ausência (azul) ou presença (vermelho) de lincomicina e ciprofloxacina e tratamento com Triton X-100. A expressão foi medida por ELISA a 492 nm na fração de cultivo bacteriano.

Fonte: Rocha (2012).

A.2.3 Teste IC para detecção de ST

Para verificar a combinação mais eficiente dos MABs e PABs no ensaio IC na zona de conjugado ou nitrocelulose (linha teste) testou-se as fitas empregando MAB-Au e PAB-Au anti-ST na linha teste e vice-versa (**Figura A.2**). Como amostra teste utilizou-se solução da fração proteica contendo ST em PBS.

A combinação de MAB-Au e PAB na linha teste não originou uma linha, porém, a combinação inversa resultou em uma linha de intensidade mais fraca do que a linha controle (**Figura A.3**, fita 2). No teste utilizando a combinação de PAB-Au anti-ST e MAB anti-ST na linha teste para avaliação dos sobrenadantes de cultivo de isolado produtor (3321-4) e não produtor de ST (EDL933), a linha resultante para o isolado 3321-4 foi de intensidade inferior à obtida para a linha controle. Além disso, também visualizou-se uma linha de fraca intensidade para o sobrenadante do isolado não produtor, indicando pouca especificidade (**Figura A.3**, fitas 1 e 2).

Figura A.2 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-ST.

Montagem das fitas: **1)** MAb-Au anti-ST, 4 mg/mL de PAb anti-ST na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de camundongo na linha controle (C); **2)** PAb-Au anti-ST, 4 mg/mL de MAb anti-ST na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min numa solução de 20 µg/mL da fração proteica contendo ST em PBS.

Fonte: Rocha (2012)

Figura A.3 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-ST na presença de sobrenadante de isolados.

Montagem das fitas: PAb-Au anti-ST, 4 mg/mL de MAb anti-ST na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min no sobrenadante de isolados: 1) Isolado 3321-4 (ST); 2) Isolado EDL933 (Stx1, Stx2).

Fonte: Rocha (2012).

A3 - Desafios e perspectivas na padronização do teste IC para detecção de ETEC utilizando como alvo a toxina ST

Testes com variações das concentrações de anticorpos na linha teste foram realizados, porém, nenhum avanço foi obtido no aumento da sensibilidade (dados não mostrados). Revisando a literatura, verificou-se que para detecção de moléculas de baixa massa molecular ou com único determinante antigênico, a maioria dos testes IC utiliza o formato competitivo (NGOM et al., 2010). No formato competitivo o analito é conjugado a uma proteína (albumina) e fixado na linha teste da nitrocelulose e um anticorpo anti-analito é conjugado ao ouro coloidal e fixado na porção do conjugado. Quando o teste é realizado, o analito presente na amostra

liga-se ao anticorpo conjugado ao ouro e migra na fita. O teste é considerado positivo, quando somente a linha controle aparece, já que o anticorpo conjugado está ligado ao analito não é capturado na linha teste. Por outro lado, o teste é considerado negativo quando as duas linhas (teste e controle) aparecem na fita, uma vez que o anticorpo estará livre para ligar-se ao analito presente na linha teste (NGOM, et al., 2010).

Diferentemente, o formato “sanduíche” ou captura, é indicado para analitos que apresentam vários epítomos e deve-se empregar dois anticorpos diferentes, sendo um conjugado ao ouro e outro na linha teste, conforme padronizado para Stx1, Stx2 e LT. A desvantagem deste formato é que o analito deve permitir a ligação simultânea do anticorpo de detecção e do anticorpo de captura imobilizado (FAN; HE, 2012; QIAN; BAU, 2004). Estas informações explicariam o motivo do insucesso do teste IC para ST, ou seja, por ser um peptídeo composto de 18 a 19 aminoácidos, os anticorpos produzidos possuem poucas regiões de ligação, desfavorecendo ensaios de captura. O teste disponível no mercado para detecção de STa é um ELISA de competição (E. COLI ST EIA, Oxoid Ltda, Basingstoke, Inglaterra) que se baseia na presença de ST fixado na fase sólida e posteriormente incubado com a amostra em teste (sobrenadante de cultura) e anticorpo MAb anti-ST conjugado a peroxidase. A amostra é negativa quando a densidade óptica (A_{492}) está acima de 0,5 e positiva quando está abaixo de 0,5. Com estes parâmetros, este método possui um limite de detecção de 10 ng/mL.

Levando em consideração as informações descritas sobre o tamanho de ST e o emprego de testes de competição, decidiu-se então testar um ensaio IC de competição para ST. Para este teste, o MAb foi selecionado devido à característica de maior especificidade em relação ao PAb (**Figura A.1**). Após realização dos testes utilizando a fração proteica contendo ST conjugada a albumina na linha teste, verificou-se que todas as fitas apresentaram resultado negativo, mesmo aquelas ensaiadas com controles positivos (dados não mostrados). Supondo que aparentemente se tratava de um problema de aumentar a concentração de ST na linha teste, a fração ST conjugada albumina foi concentrada e aplicada novamente. Da mesma forma, o resultado foi negativo para amostras positivas.

Como não foi possível determinar a concentração de ST presente na fração proteica, já que outras proteínas contaminantes também estavam presentes, não podemos afirmar a influência destas outras proteínas no ensaio. E é por esta razão

também que não foi possível a determinação da titulação do soro de coelho anti-ST e o cálculo da K_D do MAb anti-ST. Desta forma, para a padronização segundo os testes descritos é necessária a obtenção da toxina ST purificada.

Os protocolos de purificação de ST descritos na literatura utilizam diferentes etapas de purificação, que envolvem: biorreator para cultivo de grande volume da bactéria, filtração, cromatografia em coluna contendo resina hidrofóbica formada por um copolímero de poliestireno de ligação cruzada (Amberlite XAD-2 BAC), fracionamento com acetona, cromatografia por gel filtração, cromatografia por troca iônica (STAPLES et al., 1980), passagem em resina de metacrilato e cromatografia em fase reversa (AREF; SAEED, 2012). No entanto, nosso objetivo era padronizar protocolos mais simples como: a cromatografia de afinidade utilizando o MAb anti-ST acoplado matriz de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio, HPLC (*High Performance/Pressure Liquide Chromatography*), centrifugações do sobrenadante de isolado produtor em membrana de corte tipo Amicon (Millipore) e retirada do peptídeo diretamente do gel de poliacrilamida. Mas infelizmente todas essas tentativas de purificação foram infrutíferas. Portanto, utilizaremos no futuro, protocolos tradicionais para a obtenção de ST purificada.

Alternativamente, conforme já descrito, realizou-se a imunização de coelho com sobrenadante concentrado de isolado produtor de ST. Com base nos resultados expostos, há um desafio e busca de futuras estratégias para desenvolvimento do teste IC para ST. Um caminho seria o teste com alguns novos sistemas de imunoensaios que podem detectar de forma não competitiva, pequenas moléculas (FAN; HE, 2012). Os novos formatos são baseados em modificações químicas dos analitos, anticorpos não convencionais (anti-idiotipo, anti-metatipo ou anti-fragmento), passos especiais de separação (eletroforese de capilaridade, coluna de afinidade ou membrana) ou mutagenese sito-dirigida nos anticorpos recombinantes anti-ST obtidos, para que esses reconheçam diferentes epítomos (SILVEIRA, 2012).

APENDICE B – Estratégias empregadas na pesquisa para futura detecção de EPEC

Como anteriormente mencionado o principal mecanismo de patogenicidade de EPEC e EHEC é a lesão A/E, que é resultado da ação conjunta das proteínas codificadas na região LEE (McDANIEL et al., 1995; McDANIEL; KAPER, 1997). Dentre todas as proteínas codificadas nos diversos operons da região LEE a adesina intimina (ABE et al., 1999; DEAN; MARESCA; KENNY, 2005; DENG et al., 2004; ELLIOTT et al., 1998, 1999, 2000; JARVIS et al., 1995; JERSE et al., 1990; KENNY et al., 1997; YOUNIS et al., 2010) e as proteínas secretadas de EPEC (Esps), principalmente EspA e EspB são imunogênicas (LOUREIRO et al., 1998; RAGIONE et al., 2006) e portanto, candidatas ao seu uso como antígeno vacinal ou no diagnóstico desses patótipos.

Nesse sentido, o primeiro alvo de escolha para o imunodiagnóstico de EPEC e EHEC foi a intimina, pois a proteína apresenta uma região conservada presente nos diferentes subtipos (ADU-BOBIE et al., 1998, BATCHELOR et al., 1999; KOGA et al., 2003). O soro policlonal anti-intimina e a sua fração enriquecida em IgG foi utilizado como ferramenta para detecção desses patótipos e reconheceu os subtipos de intimina α , β , γ , δ e ϵ em amostras de EPEC e EHEC por *immunoblotting*, imunofluorescência e imuno-marcação com ouro coloidal. Várias tentativas de padronização de ensaios imunoenzimáticos mostraram que a conformação da parte conservada da intimina – inserida na membrana externa da bactéria, com uma pequena porção exteriorizada – impede a perfeita interação do anticorpo a intimina na bactéria *in natura*.

Na sequência comparou-se por *immunoblotting* a reatividade da fração enriquecida em IgG do anticorpo de coelho anti-intimina, do soro de rato anti-intimina e do MAb IgG2b em isolados de EPEC e EHEC; todos os anticorpos utilizados apresentaram 100% de especificidade não reconhecendo nenhum dos isolados *eae* negativos. A sensibilidade do ensaio variou de acordo com o soro empregado, assim a fração enriquecida em IgG do anticorpo de coelho anti-intimina que reconheceu o maior espectro de tipos de intimina com 97% de sensibilidade seguida do soro de rato com 92% e do MAb com 78% de sensibilidade (MENEZES et al., 2010).

Ainda na tentativa de se padronizar um teste imunossorológico utilizando-se a intimina como antígeno alvo, vários protocolos foram testados a fim de remover esta proteína da membrana para ser detectada no sobrenadante após centrifugação. Dentre estes protocolos, a lise por: ureia, polimixina, EDTA, aquecimento e detergentes, porém nenhum processo foi eficiente o bastante para detecção da intimina por ELISA ou *immuno dot*. A explicação para este fato seria a hipótese de após rompimento celular, por ser transmembrânica, grande porção de intimina ficaria presa nas porções celulares lisadas e não liberada para o sobrenadante; ou quando liberada, aparece em quantidades insuficientes. O *immunoblotting* utilizou o lisado bacteriano total, por esta razão foi possível detectar intimina neste tipo de teste.

Esse conjunto de resultados nos convenceu que a intimina não poderia ser o fator de virulência alvo para o diagnóstico de EPEC e EHEC. Assim decidiu-se investigar as proteínas secretadas (EspS) cujos genes são codificados na região LEE como possíveis candidatos, dentre elas a EspA e a EspB. Na literatura há somente descrições do emprego de EspB no diagnóstico desses patótipos, sendo que, o teste de aglutinação (LU et al., 2002) e o ensaio imunocromatográfico (NAKASONE, et al., 2007) apresentaram 96,9 e 100% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Para obtenção dos anticorpos policlonais e monoclonais anti-EspA e anti-EspB utilizou-se as proteínas recombinantes His-EspA e His-EspB a partir dos clones de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pET28a-EspA ou pET28a-EspB gentilmente cedidos pelo Dr. Gad Frankel do *Imperial College*, UK (KNUTTON et al., 1998).

B.1 Metodologia

B.1.1 Obtenção das proteínas EspA e EspB

Para a expressão de His-EspA e His-EspB (referidas como EspA e EspB), 10 µL do estoque dos clones armazenados a -80 °C foram pré-cultivados em 10 mL de caldo Luria Bertani (LB) contendo 50 µg/mL de canamicina a 37 °C por 16-18h em agitação (150 rpm). Posteriormente, 400 mL de LB contendo canamicina (50 µg/mL) e glicose (0,2%) foi acrescido de 1:100 dos pré-inóculos e incubados a 37 °C em agitação (300 rpm). Após atingir a densidade óptica ($A_{600\text{ nm}}$) de 0,6, adicionou-se 1 mM de IPTG para promover a indução da expressão de EspA ou EspB. Após 4 h da

indução, os cultivos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 min e os sedimentos ressuspensos em 20 mL de tampão de ligação (imidazol 5 mM, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,9) com fluoreto de fenilmetilsufato (PMSF) a 1 mM. As células bacterianas em suspensão foram rompidas por pressão em *French Pressure* (Thermo Scientific, Needham Heights, MA, EUA) a 2.000 psi e os lisados celulares centrifugados a 3.200 x g por 30 min a 4 °C em centrífuga 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os sobrenadantes dos lisados celulares foram armazenados a -20 °C até o uso.

As proteínas recombinantes foram purificadas por cromatografia de afinidade a metal, utilizando uma coluna contendo o volume de 5 mL de Sepharose carregada com Ni²⁺ (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) com fluxo de 1 mL/min. A purificação foi realizada aplicando todo o sobrenadante à coluna previamente equilibrada com tampão de ligação. A seguir, a coluna foi lavada com os seguintes tampões: imidazol 30 mM, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,9 e imidazol 100 mM, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,9. A eluição foi realizada com tampão imidazol 500 mM, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,9. Depois de eluídas, as frações proteicas foram dialisadas contra 50 volumes de PBS 0,2 M, pH 7,2 por dois dias e duas trocas de tampão por dia. Posteriormente, as proteínas foram concentradas na presença de polietilenoglicol 4.000 (PEG 4.000) e quantificadas (*Micro BCA Protein Assay Kit*, Pierce, Rockford, IL, EUA). As proteínas purificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12 % (SDS-PAGE) e reveladas por impregnação de nitrato de prata.

B.1.2 Anticorpos policlonais anti-EspA e anti-EspB

Os anticorpos policlonais foram obtidos a partir da imunização de coelhos da raça Nova Zelândia de aproximadamente três meses de vida. Antes do início da imunização, os animais foram submetidos à coleta de sangue para obtenção do soro pré-imune. A primeira dose com 100 µg de EspA ou EspB adsorvidas a 2,5 mg de Al³⁺ foi injetada por via intramuscular. Uma segunda dose nas mesmas condições foi injetada após 15 dias. Trinta dias após a primeira imunização, uma sangria de prova foi realizada pela veia central da orelha e soro testado por ELISA (seção **B.1.3** do **ANEXO B**) para avaliar a produção de anticorpos. Após verificação da produção de anticorpos, a sangria foi realizada no 35º dia por punção cardíaca. O sangue

coletado foi armazenado a 37 °C por 30 min e 4 °C por 18 h. Posteriormente, o soro foi separado da fração celular por centrifugação a 500 x g por 5 min e armazenado a -20 °C até o uso. E a fração enriquecida em IgG de cada um dos soros de coelhos imunizados com EspA ou EspB foi obtida conforme metodologia descrita na seção **B.1.1** do **Anexo B**. Para verificar a reatividade com seu respectivo antígeno, os soros foram testados por *immunoblotting* conforme seção **B.1.2** do **Anexo B**, porém utilizando as diluições de 1:250 do soro anti-EspA e 1:200 do soro anti-EspB. Em seguida, utilizou-se o soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina na diluição de 1:10.000. A reação foi revelada com NBT (*Nitro blue tetrazolium*) (50 mg/mL) e BCIP (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*) (50 mg/mL) (Promega, EUA), que identificaram os componentes de massa molecular relativa reconhecidos pelo soro.

B.1.3 Anticorpos monoclonais anti-EspA e anti-EspB

Camundongos BALB/c fêmeas com 4 a 6 semanas de idade fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan foram imunizados com as proteínas EspA ou EspB purificadas. O protocolo de imunização consistiu de uma primeira dose de 10 µg de EspA ou EspB adsorvidas a 250 µg de hidróxido de alumínio, via coxim plantar. Após 15 dias, os animais receberam a primeira injeção de reforço, na concentração de 10 µg para ambas proteínas. Após 15 dias do reforço, o sangue dos animais foi coletado pelo plexo orbital para sangria de prova e a verificação da produção de anticorpos foi medida por ELISA (seção **B.1.3** do **ANEXO B**) utilizando como antígeno: 5 µg/mL EspA ou 1 µg/mL EspB. Três dias antes da fusão, os camundongos que apresentaram maior título de anticorpos contra seu respectivo antígeno receberam 10 µg de EspA ou EspB diluídos em PBS.

A detecção de anticorpos anti-EspA ou anti-EspB foi realizada por ELISA (seção **B.1.3** do **ANEXO B**). Os clones produtores de anticorpos anti-EspA ou anti-EspB foram transferidos para uma placa de 24 poços e novamente testados quando o crescimento celular ocupava uma área superior a 50%.

Os sobrenadantes dos clones produtores de anticorpos anti-EspA e anti-EspB foram testados por *immuno dot* com sobrenadantes dos isolados bacterianos produtores e não-produtores de EspA e EspB. Aqueles que possuíam maior

reatividade com sobrenadantes positivos e menor reatividade com sobrenadantes negativos foram selecionados.

Para isso, 200 µL do sobrenadante de isolados negativos e isolados positivos cultivados em meio DMEM e aplicados por ação de vácuo em cada poço do aparelho *Hybri-dot* (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD, UEA) em membrana de nitrocelulose. Após bloqueio a temperatura ambiente por 1 h em solução de leite desnatado 5% em PBS, as membranas foram incubadas por 2 h com o sobrenadante dos hibridomas. Depois de três lavagens com PBST, as membranas foram novamente incubadas por 1 h com soro de coelho anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (SAB, 1:3.000). Após as lavagens, o ensaio foi revelado com solução de PBS contendo 0,033 mg/mL de DAB (Sigma) e 5 µL/mL de H₂O₂. A reação foi interrompida com adição de água destilada.

Os anticorpos monoclonais anti-EspB foram purificados em cromatografia de afinidade em coluna de proteína A-Sepharose após a obtenção dos hibridomas secretores, seleção, subclonagem e expansão. O grau de pureza foi determinado por SDS-PAGE em condições redutoras, a classificação quanto ao isotipo e a constante de dissociação foram determinadas por ELISA e a reatividade avaliada por ELISA e por *immunoblotting* (**seção B.2 do ANEXO 2**).

B.1.4 Cultivo e expressão de EspB

O isolado protótipo de EPEC E2348/69 foi cultivado em 3 mL de TSB a 37 °C por 16-18 h. Posteriormente, diluições de 1:100 do cultivo bacteriano foram incubadas a 37 °C por 24 h (250 rpm) em meio DMEM (Cultilab), TSB (Merck) e EC (Merck). Alíquotas de 1 mL de cada cultura de isolado foram retiradas em intervalos de 30 min até a 5^a h de cultivo e a cada hora entre a 6^a e 8^a h. As alíquotas foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min. A alíquota final foi retirada após 24 h e processada da mesma forma. O sobrenadante de cada alíquota foi armazenado a -20 °C até o uso.

A avaliação da expressão de EspB foi realizada por ELISA indireto conforme (seção **B.1.3 do ANEXO B**), porém utilizando 30 µg/mL do PAb anti-EspB na etapa de incubação com soro e soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Sigma) diluído 1:5.000 na etapa do conjugado.

Após a definição do meio ideal para a expressão de EspB a cepa protótipo foi cultivada a 37 °C sem agitação em meio DMEM com ou sem adição de ciprofloxacina 5 µg/mL e triptona 1% na presença ou não de 5% de CO₂. Os tempos de incubação foram de 5, 18 e 24 h. Para a liberação da proteína alíquotas de 1 mL do cultivo bacteriano foram coletadas e submetidas ao tratamento com 0,1 M de EDTA e 2% de Triton X-100 a 37 °C por 30 min em agitação (250 rpm). Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e os sobrenadantes resultantes, armazenados a -20 °C até o uso.

Após a padronização das condições de cultivo, expressão e liberação da proteína EspB essas condições foram testadas em 35 isolados de EPEC típica, 72 EPEC atípica, 22 EHEC, 29 *E. coli* sem a região LEE e 10 enterobactérias. Após 24 h de incubação os cultivos foram centrifugados e os sobrenadantes avaliados por ELISA para verificar a expressão da proteína. Os gráficos e análise estatística foram realizados com auxílio do programa *GraphPad Prism 5*.

B.1.5 Padronização do teste IC para detecção de EspB

Os protocolos utilizados na padronização e desenvolvimento do teste imunocromatográfico estão descritos na seção 4.5.

B.2 Resultados

B.2.1 Anticorpos policlonais e monoclonais anti-EspA e anti-EspB

Os perfis de purificação das proteínas EspA (**Figura B.1A**) e EspB (**Figura B.1B**) mostram um predominante componente de massa molecular relativa de 25 ou 37 kDa, referente as essas proteínas EspA e EspB, respectivamente.

Figura B.1 - Perfil eletroforético das proteínas His-EspA e His-EspB purificadas.

Gel de poliacrilamida 12% submetido a eletroforese impregnado com nitrato de prata. Padrão de massa molecular 97-14,4 kDa (LMW, GE). **A)** 1) BL21 com pET-EspA não induzido; 2) BL21 com pET-EspA induzido; 3) 10 µg da proteína His-EspA purificada; **B)** 1) BL21 com pET-EspB não induzido; 2) BL21 com pET-EspB induzido; 3) 1 µg da proteína His-EspB purificada.

Fonte: Rocha (2012).

Apesar da imunização dos coelhos ter sido realizada com as proteínas purificadas alguns contaminantes da cepa hospedeira do clone recombinante (BL21) sempre aparecem na reatividade dos soros por *immunoblotting* (**Figura B.2A e B.2B**). Por esse motivo antes de seu uso as frações enriquecidas em IgG dos soro imunes são adsorvidas para evitar-se possíveis reações cruzadas. No perfil de reatividade desses anticorpos policlonais com as respectivas proteínas observa-se predominantemente uma reação majoritária com os antígenos alvo (**Figura B.2A e B.2B**).

Figura B.2 - Immunoblotting dos soros anti EspA ou anti-EspB.

Proteínas submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose: **A)** Proteína His-EspA e reatividade com soro de coelho anti-EspA; **B)** Proteína His-EspB e reatividade com soro de coelho anti-EspB. Padrão de massa molecular 97-14,4 kDa (GE).
Fonte: Rocha (2012).

A reatividade com diferentes Isolados produtores e não produtores de EspA foi avaliada por *immunoblotting* utilizando o soro de coelho anti-EspA. O anticorpo policlonal reconheceu somente a cepa protótipo (E2348/69) a qual foi utilizada como molde para sequência genética da proteína EspA. O polimorfismo antigênico de EspA, ou seja, o soro policlonal contra essa proteína produzida pela cepa E2348/69 (EPEC) não reconhece EHEC O157:H7 e vice-versa, e também não apresenta reatividade cruzada antigênica entre as EPEC (CREPIN et al., 2005; NEVES et al., 2003).

Adicionalmente, dez hibridomas produtores de MAb anti-EspA foram selecionados por *immuno-dot* utilizando o sobrenadante de isolados produtores e não produtores de EspA cultivados em DMEM. Desta forma, alguns MAb reconheceram fracamente os isolados positivos, outros reconheceram somente a cepa E2348/69 e outros ainda reconheceram isolados negativos (dados não mostrados). Yu et al. (2007) obtiveram três hibridomas produtores de MAb anti-EspA de EHEC O157:H7, porém não foram realizados estudos de reatividade com outros isolados EHEC ou EPEC. Infelizmente não há outros trabalhos de MAb anti-EspA descritos na literatura para análise comparativa dos resultados. Com base no exposto para PAb e MAb anti-EspA, os dados obtidos naquele momento não foram

promissores, levando-nos, a descartar o uso de EspA como proteína candidata para diagnóstico de EPEC/EHEC. No entanto, outros ensaios realizados recentemente, utilizando o mesmo protocolo de produção e liberação padronizado para EspB, mostraram por ELISA indireto que temos alguns hibridomas bastante promissores para uso no imunodiagnóstico e que merecem ser melhor analisados.

Em contra partida, dos 64 hibridomas que secretavam anticorpos contra a proteína EspB obtidos, 17 foram selecionados por *immuno-dot* devido a reatividade com controles positivos a baixa ou nenhuma reatividade com os controles negativos (**Figura B.3**). Em função desses resultados os 17 clones (indicados pelas setas na **Figura B.3**) foram transferidos para garrafa de cultivo celular para posterior congelamento e/ou prosseguimento dos experimentos.

O clone 4D9 (representado pela seta vermelha no *immuno-dot* da **figura B.3**) foi selecionado para a etapa de diluição limite, por apresentar reatividade com os controles positivos e baixa reatividade com os controles negativos. Após ocuparem mais de 50% da área dos poços, os anticorpos produzidos pelos clones da diluição limite (K1) originários de 4D9 foram avaliados por ELISA indireto. Os clones positivos foram transferidos para placa de 24 poços para expansão e os anticorpos produzidos novamente avaliados por ELISA indireto.

Figura B.3 - Immuno-dot utilizando MAbs anti-EspB dos 64 clones produtores.

Membrana de nitrocelulose contendo os sobrenadantes de isolados produtores de EspB (3451-3, C54-58, EDL933 e 2 µg de EspB purificada) e não produtores de EspB (H10407, DH5a e JM109). As setas indicam os 17 clones selecionados.

NOTA - * A última fita da figura refere-se ao controle positivo, o qual foi utilizado PAb na etapa de incubação com MAb.

Fonte: Rocha (2012).

Observou-se que os anticorpos produzidos pelo clone K1 originado de 4D9 reagiram com o sobrenadante da maioria dos isolados produtores de EspB, e não reagiram com o sobrenadante dos isolados não produtores (**Figura B.1**).

Gráfico B.1 - Reatividade do MAb 4D9 (K1) anti-EspB.

Placas de ELISA sensibilizadas com sobrenadante de isolados produtores de EspB (azul) e não produtores de EspB (vermelho), incubados com sobrenadante do hibridoma K1 anti-EspB originados de 4D9, seguido de incubação com soro de cabra anti-IgG de camundongo PO (1:5.000). Como solução cromógena foi utilizada OPD com adição de H₂O₂ e a leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).

Fonte: Rocha (2012).

O MAb anti-EspB apresentou alto nível de pureza quando analisado por SDS-PAGE em condições redutoras, observando-se dois componentes de massa molecular aparente de 50 kDa e 25 kDa, referentes as cadeias pesada e leve do anticorpo, respectivamente. A reatividade deste anticorpo por *immunoblotting* frente a sua proteína pode ser visualizado na **figura B.4**. Esse anticorpo foi classificado com IgG2a e apresentou uma constante de dissociação de 2×10^{-9} M

Figura B.4 - *Immunoblotting* do MAb anti-EspB.

Proteína His-EspB submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e transferida para membrana de nitrocelulose. Reatividade com MAb anti-EspB 4D9. Padrão de massa molecular 97-14,4 kDa (GE).

Fonte: Rocha (2012).

B.2.2 Análise da expressão de EspB

A expressão da proteína secretada, EspB foi avaliada no isolado protótipo de EPEC, E2348/69, cultivado nos meios DMEM, TSB e caldo EC. A expressão de EspB foi maior em DMEM, seguida de caldo EC (**Gráfico B.2**). Apesar de não representados nos gráficos, a expressão de EspB após 24 h de cultivo manteve-se estável e semelhante a de 8 h. Não foi possível detectar a expressão dessa proteína após o cultivo no meio TSB.

Gráfico B.2 - Expressão de EspB pelo isolado E2348/69 em diferentes meios.

A expressão foi medida por ELISA nos sobrenadantes dos cultivos.
Fonte: Rocha (2012).

A adição de ciprofloxacina em uma concentração subinibitória no meio DMEM prejudicou a expressão da proteína (dados não mostrados). Em presença de 5% de CO₂ há um aumento da expressão de EspB no cultivo de EPEC e EHEC (HAIGH et al., 1995). Além disso, o tratamento dos isolados com dois diferentes agentes de lise bacteriana demonstrou que 0,1 M EDTA foi eficiente no aumento da liberação de EspB nos testes avaliados. DMEM contendo triptona a 1% incrementou a expressão de *Plasmid-encoded toxin* (Pet) produzida por *E. coli* enteroagregativa (BETANCOURT-SANCHEZ; NAVARRO-GARCIA, 2009). Desta forma, considerando esses estudos investigou-se o cultivo em meio DMEM contendo triptona em presença de 5% de CO₂ e o tratamento com EDTA sobre a expressão de EspB em de EPEC e EHEC após 24 h de cultivo (**Gráfico B.3**).

Gráfico B.3 - Expressão de EspB por isolados após cultivo e tratamento padronizados.

Sobrenadante de cultivo de isolados produtores ou não produtores de EspB em meio DMEM contendo 1% de triptona e tratamento com 0,1 M de EDTA. A expressão foi medida por ELISA. Fonte: Rocha (2012).

Os dados mostraram que houve diferença significativa da produção e liberação da proteína quando se compararam os isolados produtores e não produtores de EspB ($p < 0,001$), o que indica o emprego destas condições de cultivo e tratamento para expressão e liberação desta proteína e essas condições podem ser aplicadas na detecção de EspB.

B.2.3 Teste IC para detecção de EspB

Para verificar a combinação mais eficiente dos anticorpos monoclonais e policlonais no ensaio IC testou-se as fitas empregando MAb-Au anti-EspB e PAb na linha teste e vice-versa (**Figura B.5**). Como amostra teste utilizou-se solução de EspB em PBS. Somente na combinação de MAb-Au anti-EspB e PAb anti-EspB na

linha teste ocorreu a captura de EspB e visualização do resultado positivo (**Figura B.5**, fita 1).

Figura B.5 - Teste IC para definição da posição dos anticorpos anti-EspB.

Montagem das fitas: **1)** MAb-Au anti-EspB, 1 mg/mL de PAb anti-EspB na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de camundongo na linha controle (C); **2)** PAb-Au anti-EspB, 1 mg/mL de MAb anti-EspB na linha teste (T), 0,5 mg/mL de anticorpo anti-IgG de coelho na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min numa solução de 10 µg/mL de EspB em PBS.
Fonte: Rocha (2012).

Diferentes concentrações de PAb na linha teste foram avaliadas, porém, mesmo na maior concentração testada não foi possível a obtenção de intensidade mais acentuada da linha (**Figura B.6**, fita 1).

Figura B.6 - Teste IC para definição da concentração de PAb anti-EspB na linha teste (T).

Montagem das fitas: MAb-Au anti-EspB; diferentes concentrações de PAb anti-EspB na linha teste : **1)** 4 mg/mL; **2)** 2 mg/mL; **3)** 1 mg/mL; **4)** 0,5 mg/mL; **5)** 0,25 mg/mL; 0,5 mg de anticorpo anti-IgG de camundongo na linha controle (C). Após montagem, as fitas foram imersas por 20 min em 10 µg/mL de EspB em PBS.
Fonte: Rocha (2012).

B.3 Desafios e perspectivas na padronização do teste IC para detecção de EPEC/EHEC

Ao se testar o limite de detecção do teste IC, a linha teste não foi visualizada em concentrações abaixo de 10 µg/mL (dados não mostrados), o que inviabilizaria o diagnóstico nestas condições, já que exigiria altas concentrações de antígeno na amostra. Mesmo assim, simulou-se o teste com isolados produtores de EspB, e, não foi possível visualizar a linha teste, indicando que: ou a sensibilidade foi muito baixa ou os dois anticorpos competem pelo mesmo epítipo. Para testar essas hipóteses, diferentes alternativas foram testadas a fim de melhorar o teste:

- a) testou-se por ELISA de captura as combinações de PAb e MAb e se constatou que as maiores absorbâncias (próximas de 2,0) foram observadas quando o anticorpo MAb anti-EspB foi utilizado na sensibilização da placa e o PAb anti-EspB na captura do antígeno. Estes dados confirmam a posição no teste IC, já que o antígeno primeiramente entra em contato com o MAb para depois ser apresentado ao PAb e descartam a possibilidade de competição pelo mesmo epítipo. Comparando-se estes dois tipos de ensaios, aparentemente tratava-se de um problema de suporte, onde um é em microplacas de poliestireno e outro em membrana de nitrocelulose. O poliestireno da microplaca de ELISA interage com o anticorpo por meio de ligações hidrofóbicas e iônicas (GIBS, 2001). No caso da nitrocelulose, o dipolo do nitrato éster da membrana interage com o dipolo das ligações peptídicas do anticorpo por mecanismos eletrostáticos (CHIAO et al., 2004);
- b) O MAb anti-EspB empregado foi purificado a partir do sobrenadante do hibridoma do clone 4D9. Na tentativa de aumentar o nível de detecção do teste IC para EspB, outros clones produtores de MAb anti-EspB (1C12, 1H12, 3A12, 4G5 e 4B4) foram testados preliminarmente por ELISA de captura. Dentre eles, o MAb 4B4, quando empregado na sensibilização das placas de ELISA de captura, teve boa reatividade com sobrenadantes de isolados positivos e baixa reatividade com isolados negativos. Porém, assim como o MAb 4D9, o teste IC empregando o MAb 4B4 conjugado ao

outro coloidal também não aumentou a sensibilidade do teste (dados não mostrados).

- c) Testes ICs utilizando o mesmo anticorpo policlonal na detecção e captura, também foram negativos. O mesmo ocorreu quando se empregou o mesmo anticorpo MAb em ambas posições. Estes experimentos foram testados, baseando-se no trabalho existente de IC para EspB, o qual utilizou anticorpo policlonal de coelho tanto na detecção quanto na captura (NAKASONE et al., 2007). Após ensaio com 34 isolados positivos para o gene *eae*, o teste apresentou 96,9% de sensibilidade e o limite de detecção de 4 ng/mL da proteína purificada, todavia, quando a proteína EspB foi artificialmente suplementada as fezes, este limite aumentou para 60 ng/mL. Contudo, por motivos desconhecidos, este teste não foi comercializado. Após todas as tentativas descritas, infelizmente até o final deste trabalho não foi possível desenvolver o teste IC com maior sensibilidade.
- d) Testes preliminares de IC de competição foram realizados utilizando MAb ou PAb. Porém, as amostras positivas apresentaram resultados falso-negativos, comprometendo a sensibilidade do teste.

Baseado nos resultados descritos será necessário uma pesquisa mais aprofundada e um maior número de ensaios em busca de soluções para minimizar os problemas apontados. Mesmo assim, de acordo com os resultados promissores de ELISA para detecção de EspB ou EspA, como anteriormente mencionado, será possível o desenvolvimento de um método rápido para diagnóstico de EPEC.

APÊNDICE C – ARTIGO DE PERIÓDICO

Interaction between Shiga toxin and monoclonal antibodies: binding characteristics and in vitro neutralizing abilities, doi:10.3390/toxins40x000x) no fascículo especial *Toxin-antibody interaction*, *Toxins*, 2012 (no prelo).

Article

Interaction between Shiga Toxin and Monoclonal Antibodies: Binding Characteristics and *in vitro* Neutralizing Abilities

Letícia B. Rocha ¹, Daniela E. Luz ¹, Claudia T. P. Moraes ¹, Andressa Caravelli ¹, Irene Fernandes ², Beatriz E. C. Guth ³, Denise S. P. Q. Horton ¹ and Roxane M. F. Piazza ^{1,*}

- 1 Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil; E-Mails: leticiarochoa@butantan.gov.br (L.B.R.); daniedaluz@butantan.gov.br (D.E.L.); claudiatrigo@butantan.gov.br (C.T.P.M.); andressacaravelli@butantan.gov.br (A.C.); dhorton@butantan.gov.br (D.S.P.Q.H.)
- 2 Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil; E-Mail: irenefernandes@butantan.gov.br
- 3 Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; E-Mail: bec.guth@unifesp.br

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: roxane@butantan.gov.br

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: Monoclonal antibodies (MAbs) have been employed either for diagnosis or treatment of infections caused by different pathogens. Specifically for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), numerous immunoassays have been developed for STEC diagnosis, showing variability in sensitivity and specificity when evaluated by reference laboratories, and no therapy or vaccines are currently approved. Thus, the aim of this work was the characterization of the interaction between MAbs against Stx1 and Stx2 toxins and their neutralizing abilities to enable their use as tools for diagnosis and therapy. The selected clones designated 3E2 (anti-Stx1) and 2E11 (anti-Stx2) were classified as IgG1. 3E2 recognized the B subunit of Stx1 with an affinity constant of 2.5×10^{-10} M, detected as little as 6.2 ng of Stx1 and was stable up to 50 °C. In contrast, 2E11

recognized the A subunit of Stx2, was stable up to 70 °C, had a high dissociation constant, 6.1×10^{-10} M, and detected as little as 12.5 ng of Stx2. Neutralization tests showed that 160 ng of 3E2 MAb inhibited 80% of Stx1 activity and 500 µg 2E11 MAb were required for 60% inhibition of Stx2 activity. These MAb amounts reversed 25 to 80% of the cytotoxicity triggered by different STEC isolates. In conclusion, these MAbs showed suitable characteristics for their use in STEC diagnosis and are promising tools for fighting this pathogen.

Keywords: Stx1; Stx2; monoclonal antibodies; binding; stability; detection; neutralizing ability; specificity

1. Introduction

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains and their subset the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strains contain a large pathogenicity island called the locus of enterocyte effacement and carry a 90-kb plasmid [1-3]. Not only O157:H7 serotype, but also some other STEC serotypes have been associated mainly with food-linked outbreaks of Stx-mediated disease with the possibility of a complication such as the hemolytic uremic syndrome (HUS), which is characterized by hemolytic anemia, thrombocytopenia, and renal failure.

Shiga toxins (Stxs) are known to act systemically and therefore must cross from the site of STEC colonization in the gastrointestinal tract to the circulatory system [3]. There are two main subtypes of Stxs, Stx/Stx1 and Stx2. Stx and Stx1 are practically identical, with only one amino acid difference in the A subunit. The A and B subunits of Stx1 and Stx2 differ at the amino acid level by 32 and 27%, respectively, although their crystal structures show high similarity [4,5].

Stxs have the AB₅ structure, where the active domain (A – 32 kDa) contains an *N*-glycosidase. This enzyme depurinates the 28S rRNA of the 60S ribosomal subunit and irreversibly inhibits protein synthesis, resulting in cell death. Subunit B consists of five identical 7.7-kDa monomers that form a pentamer, which allows the C terminus domain of the A2 peptide to traverse it. The B pentamer binds to the eukaryotic receptor globotriaosylceramide (Gb3Cer/CD77) or globotetraosylceramide (Gb4Cer) in the case of Stx2e [6-10], present on plasma membrane of enterocytes and other cells, for example glomerular endothelial cells [10].

The Vero cell toxicity test detects functionally active toxin and is often used as the gold standard to evaluate diagnostic immunoassays [11,12]. Among the several commercially available immunoassays using monoclonal and/or polyclonal antibodies are VTEC-Screen (Seiken, Japan), Premier EHEC (Meridian Bioscience, US), Ridascreen Verotoxin (R-Biopharm, Germany), ProSpecT Shiga Toxin (Alexon-Trend, US), Immunocard STAT! EHEC (Meridian Diagnostics, US) and Duopath Verotoxins Gold Labeled Immunosorbent

Assay (Merck, Germany). Some of them differentiate between Stx1 and Stx2 while others do not. The reported sensitivities and specificities of these immunoassays vary by test format and manufacturer. The standard by which each manufacturer evaluates its tests also varies; therefore, but, a direct comparison of performance characteristics of various immunoassays has not been performed [13].

Outbreaks of STEC infections can be contained by sanitary measures and by monitoring the water and food supply. Hence, immunization of the general population cannot be justified given the safety restrictions of a vaccine. Treatment of infected patients is needed to prevent progression of the infection to HUS [14]. However, despite remarkable advances in understanding STEC pathogenesis, the clinical options for treatment remain limited to mainly supportive strategies. The use of antimicrobials is controversial; mainly reflected by the effect of specific antimicrobial agents on phage induction and subsequent Stx gene expression and transcription [15], thereby allowing the undesirable release of verotoxin Stx, and thus being usually avoided [16,17,18].

There is no current approved treatment to combat or prevent illness from STEC, but several promising options for the future are under investigation. These options include several vaccine candidates such as Stx1 and Stx2 genetic toxoids, a plant-based Stx2 toxoid and a chimeric StxA2/StxB1 toxoid that elicits a neutralizing antibody response and provides protection against a lethal challenge of both Stx1 and Stx2 [19-21]. Passive immunization with monoclonal antibodies rose against Stx1 and Stx2 has been shown to be effective in animal models [22-30], and urtoxazumab, a humanized monoclonal antibody against Shiga-like toxin 2 is undergoing clinical trials [31].

Therefore, these compelling, important aspects of STEC infection relative to diagnosis and therapy encouraged us to produce monoclonal antibodies against Stx1 and Stx2. In the present study, we demonstrated their interactions and neutralization of Shiga toxins, and the results obtained support their use as tools in STEC diagnosis and therapy.

2. Material and Methods

2.1. Toxins, chemicals, reagents, antibodies and supplies

Purified Stx1 and Stx2 were purchased from Tufts University School of Medicine, Boston, MA, USA. A Protein A affinity chromatography column was bought from GE Healthcare. Bovine serum albumin (BSA), polyethylene glycol 1500, goat anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibodies, goat anti-mouse IgG-FITC conjugated, o-phenylenediamine (OPD) and 3'3'-diaminobenzidine (DAB) were acquired from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA). Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse-IgG+A+M purchased from Zymed (San Francisco, CA, USA). HAT – (10 mM hypoxanthine, 40 μ M aminopterin and 1.6 mM thymidine) and fetal bovine serum (FBS) were acquired from GibcoBRL (Itapevi, SP, Brazil). Nitrocellulose membrane Hybond C-Extra was acquired from Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK). For ELISA assays, we employed MaxiSorp microplates from Nunc

(Rochester, NY, USA) and assay measurements were done in a Multiskan EX ELISA reader from Labsystems (Milford, MA, USA).

2.2. *Bacterial isolates*

In this study, 45 STEC isolates from human and animal sources, belonging to different serotypes previously characterized by the presence of *stx* gene by polymerase chain reaction (PCR) [32-34] were used for MAbs characterization against Stx1 and Stx2. EDL933 was included in the assays as a positive control of the strain producing Stx1/Stx2. All strains were cultivated as described by Rocha and Piazza [33] to enhance expression of Stx by bacterial isolates and for Vero cell cytotoxicity assay (VCA)/neutralization assay.

2.3. *Stx1 and Stx2 toxins and toxoids*

Toxins were converted to toxoids by either formaldehyde or glutaraldehyde treatment using the protocol described by Donohue-Rolfe et al. [35] and Brown et al. [36], respectively, before mice immunization.

2.4. *Anti-Stx1 and anti-Stx2 monoclonal antibody (MAb) production*

Four to six week-old female BALB/c mice were immunized via the footpad with 10 µg Stx1 or 3 µg Stx2 toxoid adsorbed to 250 µg aluminum hydroxide. The immunization protocols consisted of three booster injections of the toxoid (10 µg) in 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) at four-week intervals for Stx1 toxoid, and two booster injections (15 µg) with a 15-day interval for Stx2 toxoid. The experiments were conducted in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and they were approved by the Ethical Committee for Animal Research of Butantan Institute (469/08).

The mouse with the highest antibody titer was boosted with 10 µg Stx1 or 15 µg Stx2 toxoid three days prior to cell fusion. Serum samples were obtained just before the first immunization by the retro-orbital sinus method to be used as the negative control in specific antibody evaluation. Serum samples were also obtained ten days after the last antigen injection and subsequently analyzed by ELISA.

The popliteal lymphnode cells were fused with SP2/O-Ag14 mouse myeloma cells (2:1) using polyethylene glycol 1500 [37], with modifications. Hybrids were selected in RPMI 1640 medium plus 3% HAT containing 10% FBS at 37°C and 5% CO₂. The supernatant fluids were screened for species-specific antibodies by indirect ELISA.

For ELISA, hybridoma supernatant (100 µL) was added to wells of a 96-well plate previously coated with 0.1 µg-purified toxins to screen cultures for antibody production. Antibody-secreting cells were expanded and cloned twice at limiting dilution. Hybridomas secreting MAbs were selected using STEC and other non-producing Stx isolates by capture ELISA.

2.5. MAb characterization

2.5.1 MAb isotyping and purification

The microplate was coated overnight at 4°C with 1 µg goat anti-mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM and IgE in 0.05 M sodium carbonate- bicarbonate buffer (pH 9.6). Hybridoma supernatants were incubated with each of the isotype followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse-IgG+A+M (1:1,000). The supernatants from selected clones were filtered (0.45 µm) and purified by protein A affinity chromatography. MAb purity was determined by 15% polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) [38,39] staining with Coomassie blue R-250.

2.5.2. Interaction of MAbs with toxin: definition of detection limit, affinity and stability

Anti-Stx1 and Stx2 MAbs features were determined by ELISA. The detection limit was established using toxin concentrations from 100 to 0.09 ng coated on microplates in a PBS solution at 4°C for 16-18 h. After blocking (1% BSA at 37°C for 30 min), toxins were incubated with 0.2 µg anti-Stx1 or anti-Stx2 monoclonal antibody diluted in blocking buffer at 37°C for 1 h, followed by incubation with goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibody diluted 1:5,000, at 37°C for 1 h. The reaction was developed with 0.5 mg/mL OPD plus hydrogen peroxide (H₂O₂), and stopped by the addition of 1 N HCl. The absorbance was measured at 492 nm in a Multiskan EX ELISA reader.

Three-step ELISA described by Friguet et al. [40] was employed to determine the dissociation constants (K_D) of antigen-antibody interactions under equilibrium conditions. Briefly, dilutions of different MAbs, selected in the linear part of the ELISA titration curves (determined by linear regression) were incubated overnight at 4°C with various concentrations of antigen. The concentration of free MAb was determined by ELISA, where aliquots (100 µL) of incubation medium were transferred to the wells of microtiter plates previously coated with Stx1 or Stx2. Dissociation constants were deduced from Scatchard plots.

The stability of anti-Stx1 and Stx2 MAbs was determined by indirect ELISA in which MAb solutions were kept at room temperature, or at 37°C, 50°C, 60°C, 80°C, 90°C and 100°C for 10 min. Tests were performed at different times up to 2 h.

2.5.3. Stx1 and Stx2 characterization by immunoblotting

The reactivity of antibodies to purified Stx1 and Stx2 toxins was tested by immunoblotting using the monoclonal antibodies. Briefly, 10 µg per slot of toxins were submitted to 15% SDS-PAGE. After electrophoresis, the separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane at 150 mA for 18 h at 4°C. The membrane was blocked with 1% BSA for 2 h and incubated with anti-Stx1 or anti-Stx2 monoclonal antibodies (50 µg) at room temperature for 2 h and at 4°C for 18 h. Next, the membrane was washed and incubated at room temperature

for 1 h with peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (1:5,000). After washing, DAB plus H₂O₂ were added and the reaction was stopped after 15 min by the addition of distilled water.

2.5.4. MAb reactivity to Shiga toxin-producing *E. coli*

MAb reactivity to the toxins expressed by STEC isolates was determined by capture ELISA using microplates coated with IgG-enriched fraction of anti-Stx1 (1 µg) or anti-Stx2 (3 µg) rabbit polyclonal serum [35,36] at 4° C for 16–18 h. After blocking with 1% BSA at 37°C for 30 min, 100 µL of isolates supernatants were incubated at 37°C for 2 h followed by incubation with either 0.5 µg MAb anti-Stx1 or 0.5 µg MAb anti-Stx2. Antigen-antibody binding was detected by the addition of goat anti-mouse IgG-peroxidase conjugate (1:5,000) and OPD (0.5 mg/ml) and H₂O₂ as enzyme substrates, and the peroxidase reaction was stopped by the addition of 1 N HCl. The absorbance was measured at 492 nm in a Multiskan EX ELISA reader. MAb reactivity to Stx expressed by STEC isolates was arbitrarily defined as low (1 – 30 ng), medium (31 – 60 ng) and high (61 – 100 ng) compared to the absorbance obtained with the reactivity of 100 ng of purified toxins, which we considered a high reactivity level.

2.6. Vero cell toxin assays

Vero cells (1x10⁵ cells/mL) were grown in 96-well plates in Dulbecco's medium (DMEM) in the presence of 10% FBS for 24 h for Vero cell assay (VCA) and neutralization assays. Cells were also cultivated under the same conditions in 24-well plates containing 13 cm diameter coverslips for immunofluorescence assay.

2.6.1. VCA

Half-maximal cytotoxic doses (CD₅₀) of the toxins were determined by VCA. Log₁₀ dilutions from 10 µg to 0.001 pg of each toxin was incubated with Vero cells at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere for 72 h. This activity was determined as described by Gentry and Dalrymple [41]. Cell viability was determined using a spectrophotometer after staining the cells with crystal violet, and the percentage of cytotoxicity was calculated using the formula: control A₅₉₅ nm minus sample A₅₉₅ nm, divided by control A₅₉₅ nm. Cell monolayer in presence of medium and without toxins was employed as control of cell viability. These assays were performed twice in duplicate.

2.6.2. Monoclonal antibody neutralizing assays

Neutralizing ability of anti-Stx1 or anti-Stx2 monoclonal antibodies was determined by incubating each toxin at the CD₅₀ with different MAb concentrations from 500 µg to 6.4 ng. Culture supernatants of STEC producing Stx1 and/or Stx2 were incubated at 1:10 dilution with 30 µg anti-Stx1 and 500 µg anti-Stx2 monoclonal antibodies at 37°C for 2 h. Stx1- and Stx2-specific rabbit antisera were employed as neutralizing activity controls [33,34]. After

incubation, these mixtures were tested as described by Beutin et al. [42]. These assays were performed three times in duplicate.

2.6.3. Immunofluorescence and confocal analysis

The immunofluorescence assay was performed as described by Dorsey et al. [43]. Toxins and cells were incubated at 37°C for 24 h using 0.1 pg Stx1 or 640 pg Stx2. After this period, cells were washed with DMEM containing 2% FBS and then fixed with 4% ρ -formaldehyde for 16 - 18 h at 4°C. The cells were washed three times with PBS and 1% glycine in PBS was added to quench excess aldehyde groups. After blocking with PBS containing 1% BSA and incubation with 100 μ g anti-Stx1 or 200 μ g anti-Stx2 diluted in blocking buffer at 37°C for 1 h, the antigen-antibody reaction was detected by the addition of anti-mouse IgG-FITC (1:100). The reaction was visualized with an epifluorescence microscope and confocal laser-scanning microscope (LSM 510 META). The image obtained with the confocal microscope was analyzed by Zeiss LSM image browser, and the cut-off was defined as the control reaction of Vero cells with MAbs plus anti-mouse IgG-FITC in the absence of toxin.

2.6.4. Statistical analysis

The differences between isolates with regard to cytotoxicity and their corresponding neutralization by the MAbs was analyzed by GraphPrism® 5.01, using Student's *t*-test and two-away ANOVA. The differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Interaction of monoclonal antibodies with Stx1 and Stx2

The detoxification process was employed to reduce Stx1 and Stx2 toxicity to less than 1% for mouse immunization. The immunization protocols used for Stx1 or Stx2 in BALB/c mice generated high IgG antibody titers for both toxins. The mean optical density at 492 nm was 1.0 up to 3,200-fold serum dilution in mice immunized with the two toxins.

Secretory hybridomas of antibodies against Stx1 and Stx2 were obtained and subcloned by limiting dilution. Anti-Stx1 and anti-Stx2 MAbs produced by the selected clones (3E2 and 2E11, respectively), were classified as IgG1 and showed reactivity with their respective toxins by immunoblotting: anti-Stx1 MAb bound to the B subunit (Figure 1A) with a dissociation constant of 2.5×10^{-10} M (Table 1), while anti-Stx2 MAb bound to the A subunit (Figure 1B) with a dissociation constant of 6.1×10^{-10} M (Table 1).

Figure 1. Nitrocellulose membranes containing purified toxins Stx1 and Stx2. Immunoblotting reaction was carried out using anti-Stx1 MAb (A) and anti-Stx2 MAb (B). Apparent molecular weights found showed that the MAbs recognized their corresponding toxin. Arrows indicate toxins subunits.

Table 1. Features of anti-Stx1 and anti-Stx2 MAbs.

MAb characteristic	Anti-Stx1	Anti-Stx2
Hybridomas	3E2	2E11
Dissociation constant (K_D)	2.5×10^{-10} M	6.1×10^{-10} M
Detection limit (200 ng)	6.2 ng	12.5 ng
Thermostability	50° C	70° C
Total loss of immunoreactivity (80 °C)	1 min	5 min
Partial loss of immunoreactivity	60°C and 70°C	80°C and 90°C.

Both MAbs were able to identify the presence of both toxins in Vero cells by immunofluorescence (Figure 2A, B, D and E). By confocal microscopy we observed that fluorescence emission with the homologous toxin was more intense. The presence of either Stx1 or Stx2 was observed along the cell when anti-Stx1 was employed (Figure 2A and B). The pattern of recognition by the anti-Stx2 MAbs with either Stx1 or Stx2 was limited to cell border (Figure 2D and E). Assay specificity was assured by interaction of monoclonal antibodies with Vero cells in the absence of toxin (Figure 2C and F).

Using 200 ng MAbs to determine their ability to bind to the respective toxin, the detection limit was 6.2 ng for anti-Stx1 and 12.5 ng for anti-Stx2, using an optical density of 0.1 as cut-off (Table 1). The MAb stability parameters were quite different for both of them. Anti-Stx2 MAb was stable up to 70°C, while anti-Stx1 lost stability at 50°C (Table 1). Moreover, higher temperature and more time were necessary for anti-Stx2 MAb to lose immunoreactivity compared to anti-Stx1 MAb (Table 1).

Figure 2. Immunofluorescence assay after Stx1 (A and E) or Stx2 (B and D) interaction with Vero cells. After permeabilization, the reaction was carried out by incubating the cells with anti-Stx1 (A, B and C) or anti-Stx2 (D, E and F).

Reactivity of anti-Stx1 or anti-Stx2 MAb with cells, in the absence of toxins, and the anti-IgG mouse FITC was used as the negative control; this reaction was used as zero for the fluorescence (C and F). Reactivity was visualized with a confocal laser-scanning microscope (LSM 510 META). Cells labeled with FITC displayed an apple green fluorescence, showing that MAbs were able to recognize the toxins after cell interaction.

MAb reactivity with STEC isolates was determined by capture ELISA. Data from this experiment showed not only MAb reactivity but also allowed us to infer which toxins were produced by STEC isolates, thus anti-Stx1 and anti-Stx2 MAbs detected the toxins expressed even at low levels (Table 2), demonstrating the diagnostic sensitivity of the MAbs. Furthermore, the reactivity of the MAbs matched the presence of the *stx1* and *stx2* genes, confirming their specificity. Just in one case (isolate O36, O75:H8), *stx2* was amplified but the respective protein was not detected by anti-Stx2 MAb. However, *stx1* was detected in the same isolate, and anti-Stx1 MAb recognized the respective toxin.

Table 2. Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* characteristics.

Strain number	Serotype	Gene presence	Reactivity to MAbs	
			Anti-Stx1	Anti-Stx2
597	OR:NM	<i>stx1</i>	H	-
1132	ONT:H49	<i>stx2</i>	-	H
1189	ONT:H49	<i>stx2</i>	-	H
3003	O48:H7	<i>stx1/stx2</i>	M	M
4123	O26:H11	<i>stx1</i>	M	-
D360/4/1	O26:H11	<i>stx1</i>	M	-
1557-77	O26:H11	<i>stx1</i>	H	-
H30	O26:H11	<i>stx1</i>	M	-
H19	O26:H11	<i>stx1</i>	M	-
EPEC199	O26:H11	<i>stx1</i>	M	-
3529	O26:H11	<i>stx1</i>	M	-
82	O157:H7	<i>stx1</i>	H	-
46240	O157:H7	<i>stx1/stx2</i>	M	H
3104-88	O157:H7	<i>stx1/stx2</i>	M	H
3077-88	O157:H7	<i>stx1</i>	M	-
C7-88	O157:H7	<i>stx1</i>	L	-
C1520-77	O157:H7	<i>stx1/stx2</i>	H	H
1	O157:H7	<i>stx2</i>	-	H
2	O157:H7	<i>stx2</i>	-	H
4	O93:H19	<i>stx1/stx2</i>	H	L
5	O55:H19	<i>stx1</i>	L	-
9	O103:H2	<i>stx1/stx2</i>	H	H
11	O118:H16	<i>stx1</i>	M	-
16	O26:H11	<i>stx1</i>	L	-
20	O111:H8	<i>stx1</i>	L	-
23	O111:H8	<i>stx1</i>	L	-
26	O111:NM	<i>stx1</i>	M	-
27	O111:NM	<i>stx1</i>	M	-
41	ONT:NM	<i>stx2</i>	-	M
44	O98:H4	<i>stx1/stx2</i>	M	H
45	O181:H4	<i>stx1/stx2</i>	M	H
53	O98:H17	<i>stx1/stx2</i>	L	H
55	O98:H17	<i>stx1/stx2</i>	M	H
59	ONT:H16	<i>stx2</i>	-	L
66	O105:H18	<i>stx1/stx2</i>	H	H
79	O22:H16	<i>stx2</i>	-	H
81	ONT:H38	<i>stx1/stx2</i>	H	H
82	O112:H21	<i>stx2</i>	-	H
96	O93:H19	<i>stx2</i>	-	M
O1	ONT:H8	<i>stx1</i>	L	-
O17	O112:H2	<i>stx1</i>	L	-
O3	O172:NM	<i>stx2</i>	-	H
O22	ONT:H16	<i>stx2</i>	-	L
O36	O75:H8	<i>stx1/stx2</i>	M	-
O55	O146:H21	<i>stx1/stx2</i>	H	L
EDL 933	O157:H7	<i>stx1/stx2</i>	H	H

- MAb reactivity lower than 0.99 ng; L – low level of MAb reactivity (1 – 30 ng); M – medium level of MAb reactivity (31 – 60 ng); H – high level of MAb reactivity (61 – 100 ng). Arbitrary classification based on the obtained

absorbance with 100 ng purified Stx1 or Stx2, which was considered high level of reactivity by capture ELISA.

3.2. Neutralizing ability of monoclonal antibodies

The CD_{50} of each toxin was determined prior to neutralization assays using anti-Stx1 and anti-Stx2 MAbs. CD_{50} was defined as 10 ng and 500 ng for Stx1 and Stx2, respectively. Concentrations of anti-Stx1 MAb ranging from 160 ng to 20 μ g neutralized between 70 and 80% of Stx1 cytotoxic activity (Figure 3A). Anti-Stx1 MAb showed cross-reactivity (Figure 3B), i.e., it inhibited both Stx1 and Stx2 activity to the same extent. It is important to mention that 100 μ g anti-Stx1 MAb caused cell damage. On the other hand, 100 or 200 μ g anti-Stx2 MAb were necessary to neutralize ca. 35% of Stx2 activity and 60% of neutralization was only achieved using 500 μ g MAb, (Figure 3C) without apparent cell damage.

Figure 3. Neutralization of each toxin by different MAb concentrations (CD_{50}). A and B - anti-Stx1 MAb showed cross-reactivity and was able to inhibit between 70 and 80% of both toxins [(A) Stx1 and (B) Stx2]. Higher concentrations of anti-Stx2 MAb (100 to 500 μ g) were necessary to neutralize Stx2 activity (C), but not Stx1 (data not shown).

After determining the neutralization point for both MAbs, their ability to neutralize the cytotoxic activity of the STEC strains, belonging to several serotypes and showing either *stx1*, *stx2* or *stx1/stx2* genes was investigated. We observed that Stx activity was neutralized (from 25 to 80%) by the MAbs in all isolates (Figure 4). Besides, using both MAbs, we were able to neutralize Stx1 and Stx2 expressed by isolates. Cellular integrity was maintained at these MAb concentrations in the absence of toxins. Means and variances were significantly different ($p < 0.0001$) by Student's *t*-test and 2-way ANOVA, comparing the cytotoxicity and neutralization groups (Figure 4).

Figure 4. VCA and neutralization assays with culture supernatant of 46 STEC isolates producing Stx1 and/or Stx2 incubated with or without anti-Stx1 and anti-Stx2 MAbs followed by cell incubation. Cytotoxicity and neutralization were determined after staining the cells with crystal violet and measuring absorbance at 595 nm. Means and variances were significantly different ($p < 0.0001$) by Student's *t*-test and 2-way ANOVA comparing cytotoxicity and neutralization groups. Each dot corresponds to one isolate.

4. Discussion

A number of anti-Stx MAbs showing different features have been described in the literature [19,23,24,30,35,44-49], including their use for diagnosis but just for Stx1 and for O157:H7 recognition [49]. Thus, raising monoclonal antibodies takes remarkable effort and developing them as tools for diagnosis or therapy is a major struggle.

Anti-Stx1 and anti-Stx2 MAbs obtained in the present study were produced against toxins converted to toxoids by either formaldehyde or glutaraldehyde treatment [35,36]. The 3E2 clone was obtained in the first fusion after Stx1 treatment by glutaraldehyde and using the immunization and fusion protocols already described by our group either for the MAbs IgG2b anti-LT or IgG2b anti-intimin [50-52]. In contrast, the 2E11 clone was merely obtained after ten fusions, through different tested protocols either for toxoid conversion or route and schedule immunization. Among the 6 clones obtained, only 2E11 produced antibodies that were reactive to Stx-producing strains with high affinity and showed no reactivity with non-Stx-expressing strains (data not shown).

Anti-Stx1 and anti-Stx2 were classified as IgG1, as in case of MAbs already produced by other research groups as a consequence of the long schedule of mouse immunization with Stx toxoids [23,24,45]. Furthermore, these MAbs showed an efficient interaction with their

respective toxin as indicated by their high dissociation constants and their ability to detect low levels of both purified toxins as well as low-producer isolates. In fact, among the described MAbs in few studies the affinity constant was cited. The studies by Tanikawa et al. [53] and Kimura et al. [26] showed for anti-Stx1 MAb the K_D of 2.6×10^{-10} M and for anti-Stx2A MAb the K_D of 2.3×10^{-9} M, respectively; which are similar to our described MAbs.

Another important characteristic was the stability of MAbs at high temperatures. 3E2 reacted with the B subunit of Stx1, while the 2E11 recognized the A subunit of Stx2 by immunoblotting. This variation in reactivity is very common, and has been shown by other groups with anti-Stx1 MAbs that either reacts with A subunit [28] or B subunit [24] or are conformational [30]. MAbs against Stx2 reacting with either the A or B subunit have also been described [23,44,45,47].

In our case, both MAbs recognized only their specific denatured toxin by immunoblotting. Although, when native protein was used by *in vitro* interaction assay, both MAbs showed cross-reactivity, despite different recognition patterns. These cross reactions were confirmed by the fact that anti-Stx1 MAb neutralizes the binding of Stx1 and Stx2 to Vero cells, since it recognizes the B subunit of the toxin, consequently inhibiting toxin binding to the cell receptor. On the other hand, anti-Stx2 binds to the A subunit and inhibits only the cytotoxic activity of Stx2, thus allowing the toxin to bind to Vero cells.

The correlation between subunit reactivity and neutralizing ability is also variable. For example, Smith et al. [30] characterized a conformational MAb that neutralizes the Stx2 B subunit. The opposite was observed by Sheoran et al. [47] since the two MAbs tested failed to neutralize Stx2c *in vitro* due to their stronger reactivity with the B subunit than with the A subunit of Stx2 by immunoblotting.

The clinical options for treatment of STEC still remain limited to mainly supportive strategies despite researchers' efforts in understanding this pathogen. No MAb is currently approved for clinical use, but promising options for the future are under investigation, including urtoxazumab against Stx2, which is undergoing clinical trials and appears to be safe, making it a potential candidate for the prevention of HUS in pediatric patients [31]. Also, another human monoclonal antibody [27,28] protected mice against lethal challenge with Stx2 and Stx2 variants [47]. Preclinical evaluation in a piglet model of infection showed protection against Stx2-induced fatal neurological symptoms, even when the antibody was administered after the onset of diarrhea and oral STEC challenge [54].

Given that STEC can produce any combination of Stx1, Stx2, and/or variants [55], an ideal therapeutic formulation should include MAbs specific for all them, which could provide broad-spectrum protection against Stx1 and/or Stx2 [27,28,47]. Our results suggest that the manipulation by site-directed mutagenesis of the single chain fragment variable (ScFv) of MAbs should be interesting to improve their affinity and allow the large-scale production of recombinant antibodies with desirable sensitivity and specificity. This is currently under way in our laboratory.

Moreover, the previously described IgG-enriched fraction of anti-Stx1 or anti-Stx2 rabbit polyclonal antiserum [33,34] together with anti-Stx1 or anti-Stx2 MAbs, showed high

sensitivity in detecting Stx even in low-producer isolates by capture ELISA. Therefore, both MAbs can be used as tools for diagnosis of STEC in view of their described features. Since antibody neutralizing efficiency *in vivo* usually correlates with its ability to protect HeLa cells against Stx-mediated toxicity [56], the *in vitro* neutralizing abilities of the described MAbs against the Shiga toxins make them promising tools for STEC therapy.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grants awarded to R.M.F.P. LBR, DEL and AC are recipients of a FAPESP fellowship. We thank Aleksader Seixas de Souza for his help with confocal microscopy. Dr. Albert Leyva helped with English editing of the manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Tzipori, S.; Wachsmuth, I.K.; Chapman, C.; Birden, R.; Brittingham, J.; Jackson, C.; Hogg, J. The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *J. Infect. Dis.* **1986**, *154*, 712–716.
2. Tzipori, S.; Karch, H.; Wachsmuth, K.I.; Robins-Browne, R.M.; O'Brien, A.D.; Lior, H.; Cohen, M.L.; Smithers, J.; Levine, M.M. Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect. Immun.* **1987**, *55*, 3117–3125.
3. Levine, M.M. Immunoprophylaxis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection and disease: strengths and weaknesses of various strategies, In J. B. Kaper and A. D. O'Brien (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. *ASM Press*, Washington, D.C. **1998**, 405–408.
4. Fraser, M.E.M.; Chernaia, M.M.; Kozlov, Y.V.; James, M.N. Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **1994**, *1*, 59–64.
5. Fraser, M.E.M.; Fujinaga, M.M.; Cherney, A.R.; Melton-Celsa, E.M.; Twiddy, A.D.; O'Brien, M.N.; James, M.N. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 27511–27517.

6. Ling, H.; Boodhoo, A.; Hazes, B.; Cummings, M.D.; Armstrong, G.D.; Brunton, J.L.; Read, R.J. Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry* **1998**, *37*, 1777–1788.
7. Shimizu, H.R.A.; Field, S.W.; Homans, S.W.; Donohue-Rolfe, A. Solution structure of the complex between the B-subunit homopentamer of verotoxin VT-1 from *Escherichia coli* and the trisaccharide moiety of globotriaosylceramide. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11078–11082.
8. Thompson, G.S.; Shimizu, H.; Homans, S. W.; Donohue-Rolfe, A. Localization of the binding site for the oligosaccharide moiety of Gb3 on verotoxin 1 using NMR residual dipolar coupling measurements. *Biochemistry* **2000**, *9*, 13153–13156.
9. Hunt, J.M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Clin. Lab. Med.* **2010**, *30*, 21–45.
10. Zoja, C.; Buelli, S.; Morigi, M. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr. Nephrol.* **2010**, *25*, 2231–40.
11. Bettelheim, K.A.; Beutin, L. Rapid laboratory identification and characterization of Verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 205–220.
12. Gerritzen, A.; Wittke, J. W.; Wolff, D. Rapid and sensitive detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* directly from stool samples by real-time PCR in comparison to culture, enzyme immunoassay and Vero cell cytotoxicity assay. *Clin. Lab.* **2011**, *57*, 993–998.
13. [CDC] U.S. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections by Clinical Laboratories. *MMWR* **2009**, *58*, 1–12.
14. Kitov, I.P.; Paszkiewics, E.; Sadowska, J.M.; Deng, Z.; Ahmed, M.; Narain, R.; Griener, T.P.; Mulvey, G.L.; Armstrong, G.D.; Bundle, D.R. Impact of the nature and size of the polymeric backbone on the ability of heterobifunctional ligands to mediate shiga toxin and serum amyloid P component ternary complex formation. *Toxins* **2011**, *3*, 1065–1088.
15. Zhang, X.; McDaniel, A.D.; Wolf, L.E.; Keusch, G.T.; Waldor, M.K.; Acheson, D.W. **2000**. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J. Infect. Dis.* **181**: 664–670.
16. Wong, C.S.; Jelacic, S.; Habeeb, R.L.; Watkins, S.L.; Tarr, P.I. The risk of the hemolytic-uraemic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 1930–1936.
17. Tarr, P.I.; Gordon, C.A.; Chandler, W.L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **2005**, *365*, 1073–1086.
18. Smith, K.E.; Wilker, P.R.; Reiter, P.L.; Hedican, E.B.; Bender, J.B.; Hedberg, C.W. Antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157 infection and the risk of hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2012**, *31*, 37–41.

19. Smith, M.J.; Teel L.D.; Carvalho H.M.; Melton-Celsa A.R.; O'Brien A.D. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. *Vaccine* **2006**, *24*, 4122–4129.
20. Wen, S. X.; Teel, L.D.; Judge, N.A.; O'Brien, A.D. A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2006**, *103*, 7082–7087.
21. Wen, S.X.; Teel, L.D.; Judge, N.A.; O'Brien, A.D. Genetic toxoids of Shiga toxin types 1 and 2 protect mice against homologous but not heterologous toxin challenge. *Vaccine* **2006**, *24*, 1142–1148.
22. Edwards, A.C.; Melton-Celsa, A.R.; Arbuthnott, K.; Stinson, J.R.; Schmitt, C.K.; Wong, H.C.; O'Brien, A.D. Vero cell neutralization and mouse protective efficacy of humanized monoclonal antibodies against *Escherichia coli* toxins Stx1 and Stx2. In J. B. Kaper and A. D. O'Brien (ed.), *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. *ASM Press*, Washington, D.C. **1998**, 388–392.
23. Nakao, H.; Kiyokawa, N.; Fujimoto, J.; Yamasaki, S.; Takeda, T. Monoclonal antibody to Shiga toxin 2 which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. *Infect. Immun.* **1999**, *67*, 5717–5722.
24. Nakao, H.; Kataoka, C.; Kiyokawa, N.; Fujimoto, J.; Yamasaki, S.; Takeda, T. Monoclonal antibody to Shiga toxin 1, which blocks receptor binding and neutralizes cytotoxicity. *Microbiol. Immunol.* **2002**, *46*, 777–780.
25. Yamagami, S.; Motoki, M.; Kimura, T.; Izumi, H.; Takeda, T.; Katsuura, Y.; Matsumoto, Y. Efficacy of postinfection treatment with anti-Shiga toxin (Stx) 2 humanized monoclonal antibody TMA-15 in mice lethally challenged with Stx-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **2001**, *184*, 738–742.
26. Kimura, T.; Co, M.S.; Vasquez, M.; Wei, S.; Xu, H.; Tani, S.; Sakai, Y.; Kawamura, T.; Matsumoto, Y.; Nakao, H.; Takeda, T. Development of humanized monoclonal antibody TMA-15 which neutralizes Shiga toxin 2. *Hybrid Hybridomics* **2002**, *21*, 161–168.
27. Mukherjee, J.; Chios, K.; Fishwild, D.; Hudson, D.; O'Donnell, S.; Rich, S.M.; Donohue-Rolfe, A.; Tzipori, S. Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 612–619.
28. Mukherjee, J.; Chios, K.; Fishwild, D.; Hudson, D.; O'Donnell, S.; Rich, S.M.; Donohue-Rolfe, A.; Tzipori, S. Production and characterization of protective human antibodies against Shiga toxin 1. *Infect. Immun.* **2002**, *70*, 5896–5899.
29. Dowling, T.C.; Chavaillaz, P.A.; Young, D.G.; Melton-Celsa, A.; O'Brien, A.; Thuning-Roberson, C.; Edelman, R.; Tacket, C.O. Phase 1 safety and pharmacokinetic study of chimeric murine-human monoclonal antibody c_Stx2 administered intravenously to healthy adult volunteers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 1808–1812.
30. Smith, M.J.; Carvalho H.M.; Melton-Celsa A.R.; O'Brien A.D. The 13C4 antibody that neutralizes Shiga toxin type 1 (Stx1) recognizes three regions on the Stx1 B subunit and prevents Stx1 from binding to its eukaryotic receptor globotriaosylceramide. *Infect. Immun.* **2006**, *74*, 6992–6998.

31. Lopez, E.L.; Contrini, M.M.; Glatstein, E.; Ayala, S.G.; Santoro, R.; Allende, D.; Ezcurra, G.; Teplitz, E.; Koyama, T.; Matsumoto, Y.; Sato, H.; Sakai, K.; Hoshide, S.; Komoriya, K.; Morita, T.; Harning, R.; Brookman, S. Safety and pharmacokinetics of urtoxazumab, a humanized monoclonal antibody, against Shiga-like toxin 2 in healthy adults and in pediatric patients infected with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 239–243.
32. Vaz, T.M.; Irino, K.; Kato, M.A.; Dias, A.M.; Gomes, T.A.; Medeiros, M.L.; Rocha, M.M.; Guth, B.E. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 903–905.
33. Rocha, L.B.; Piazza, R.M.F. Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* (STEC) in broth media: from divergence to definition. *Lett. Appl. Microbiol.* **2007**, *45*, 411–417.
34. Mendes-Ledesma, M.R.; Rocha, L.B.; Bueris, V.; Krause, G.; Beutin, L.; Franzolin, M.R.; Trabulsi, L.R.; Elias, W.P.; Piazza, R.M. Production and characterization of rabbit polyclonal sera against Shiga toxins Stx1 and Stx2 for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.* **2008**, *52*, 484–491.
35. Donohue-Rolfe, A.; Keusch, G.T.; Edson, C.; Thorley-Lawson, D.; Jacewicz, M. Pathogenesis of *Shigella diarrhea*. IX. Simplified high yield purification of Shigella toxin and characterization of subunit composition and function by the use of subunit-specific monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **1984**, *160*, 1767–1781.
36. Brown, J.E.; Griffin, D.E.; Rothman, S.W.; Proctor, B.P. Purification and biological characterization of Shiga toxin from *Shigella dysenteriae*. *Infect. Immun.* **1982**, *36*, 996–1005.
37. Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Biotechnology* **1975**, *24*, 524–526.
38. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.
39. Studier, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* **1973**, *79*, 237–248.
40. Friguet, B.; Chaffotte, 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* **1985**, *2*, 305–319.
41. Gentry, M.K.; Dalrymple, J.M. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. *J. Clin. Microbiol.* **1980**, *12*, 361–66.
42. 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.* **2002**, *42*, 1–8.
43. Dorsey, F.C.; Fischer, J.F.; Fleckenstein, J.M. Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* **2006**, *8*, 1516–1527.

44. Strockbine, N.A.; Marques, L.R.; Holmes, R.K.; O'Brien, A.D. Characterization of monoclonal antibodies against Shiga-like toxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1985**, *50*, 695–700.
45. Perera, L.P.; Marques, L.R.; 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.* **1988**, *26*, 2127–2131.
46. Downes, F.P.; Barrett, T.J.; Green, J.H.; Aloisio, C.H.; Spika, J.S.; Strockbine, N.A.; Wachsmuth, I.K. Affinity purification and characterization of Shiga-like toxin II and production of toxin-specific monoclonal antibodies. *Infect. Immun.* **1988**, *56*, 1926–1933.
47. Sheoran, A.S.; Chapman, S.; Singh, P.; Donohue-Rolfe, A.; Tzipori, S. Stx2-specific human monoclonal antibodies protect mice against lethal infection with *Escherichia coli* expressing Stx2 variants. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 3125–3130.
48. Mohawk, K.L.; Melton-Celsa, A.R.; Robinson, C.M.; O'Brien, A.D. Neutralizing antibodies to Shiga toxin type 2 (Stx2) reduce colonization of mice by Stx2-expressing *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine* **2010**, *28*, 4777–4785.
49. Li, G.; Hong, J.; Huo, G.; Ren, X. Monoclonal antibodies against Stx1B subunit of *Escherichia coli* O157:H7 distinguish the bacterium from other bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* **2010**, *51*, 499–503.
50. Menezes, C.A.; Gonçalves, D.S.; Amianti, J.; Fernandes, I.; Taddei, C.R.; Koga, P.C.M.; Trabulsi, L.R.; Martinez, M.B.; Piazza, R.M.F. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. *Braz. J. Microbiol.* **2003**, *34*, 11–13.
51. Menezes, C.A.; Imamura, S.Y.; Trabulsi, L.R.; Fernandes-Filho, A.; Martinez, M.B.; Guth, B.E.; Girão, D.M.; Piazza, R.M.F. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2006**, *101*, 875–880.
52. Menezes, M.A.; Rocha, L.B.; Koga, P.C.; Fernandes, I.; Nara, J.M.; Magalhães, C.A.; Abe, C.M.; Ayala, C.O.; Burgos, Y.K.; Elias, W.P.; Castro, A. F.; Piazza, R.M.F. Identification of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *108*, 878–887.
53. Tanikawa, T.; Ishikawa, T.; Maekawa, T.; Kuronane, K.; Imai, Y. Characterization of monoclonal immunoglobulin A and G against Shiga toxin binding subunits produced by intranasal immunization. *Scand. J. Immunol.* **2008**, *68*, 414–422.
54. Sheoran, A.S.; Chapman-Bonofiglio, S.; Harvey, B.R.; Mukherjee, J.; Georgiou, G.; Donohue-Rolfe, A.; Tzipori, S. Human antibody against Shiga toxin 2 administered to piglets after the onset of diarrhea due to *Escherichia coli* O157:H7 prevents fatal systemic complications. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 4607–4613.
55. Friedrich, A.W.; Bielaszewska, M.; Zhang, W.L.; Pulz, M.; Kuczius, T.; Ammon, A.; Karch, H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J. Infect. Dis.* **2002**, *185*, 74–84.

56. Jeong, K.I.; Chapman-Bonofiglio, S.; Singh, P.; Lee, J.; Tzipori, S.; Sheoran, A. S. In vitro and in vivo protective efficacies of antibodies that neutralize the RNA N-glycosidase activity of Shiga toxin 2. *BMC Immunol.* **2010**, *24*, 11–16.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).