UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Desenvolvimento de um teste rápido de aglutinação em látex para o diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatogênica e *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga

Anna Raquel Ribeiro dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Prof^a.Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Desenvolvimento de um teste rápido de aglutinação em látex para o diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatogênica e *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Anna Raquel Ribeiro dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof^a.Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo
2014

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Anna Raquel Ribeiro dos
S237de Desenvolvimento de um teste rápido de aglutinação em látex
para o diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatogênica e *Escherichia coli*
produtora da toxina de Shiga / Anna Raquel Ribeiro dos
Santos. -- São Paulo, 2014.
94p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Piazza, Roxane Maria Fontes

1. Imunodiagnóstico : Medicina 2. Testes de aglutinação I. T. II.
Piazza, Roxane Maria Fontes, orientador.

616.0756-9 CDD

Anna Raquel Ribeiro dos Santos

Desenvolvimento de um teste rápido de aglutinação em látex para o diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatogênica e *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza
Orientador/presidente

1°. Examinador

2°. Examinador

São Paulo, _____ de_____.

Á Deus, por iluminar e abençoar os meus passos.

Aos meus amados pais, Edjane Diniz e João Santos, pelo amor, dedicação e ensinamentos.

Aos meus irmãos, Rafael Santos e Andreia Diniz, pelo incentivo.

Ao meu querido, Luiz Milhomem, pela paciência, amor e companheirismo. A minha prima, Débora Lucena pelo grande incentivo e amizade e aos meus tios, Rejane e José pelo carinho.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, pela oportunidade, orientação, confiança, paciência, dedicação e pelo seu jeito alegre de ensinar e aconselhar.

À Dra. Letícia Barboza Rocha, pela co-orientação, conselhos científicos, paciência e pela amizade.

À Dra. Denise Horton, pelos conselhos científicos e ajuda na correção deste trabalho e ao Dr. Waldir Elias Junior, pelas sugestões científicas.

Aos amigos, Anderson Silva, Bruno Yamamoto, Bruna Caetano, Daniela Luz, Danielle Munhoz, Fernando Henrique, Inarei Júnior, Juliana Polatto, Roberto Nepomuceno, Thaís Mitsunari, pela ótima convivência, companheirismo, amizade e pela imensa ajuda nos experimentos.

Às amigas, Luanda Santos e Fernanda Andrade, pelo apoio e ajuda constante nos experimentos. Keyde Mello, Bruna Melo e Lívia Correa, pelo incentivo e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia, Ludmila, Larissa, Cyntia, Tiatira, Priscila, Afonso, Matilde, Jackeline, Vanessa e Denise pelos momentos de descontração.

Aos pesquisadores e técnicos do Laboratório de Bacteriologia pela colaboração e apoio científico.

Aos membros da banca de qualificação, pelas ótimas sugestões.

À Dra. Elizabethe Gaspari, por ter fornecido o *kit* de glutaraldeído para a realização dos testes de aglutinação.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP pelos ensinamentos e ajuda.

Ao apoio financeiro da FAPESP e CNPq.

MUITO OBRIGADA!

“Para se chegar à verdade, antes tem que se subir pelos degraus dos erros, é o que acontece com a ciência em sua constante busca, até a exatidão dos resultados”

Ivan Teorilang

RESUMO

SANTOS, A. R. R. **Desenvolvimento de um teste rápido de aglutinação em látex para o diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatogênica e *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga.** 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Globalmente ocorrem cerca de 800.000 mortes de crianças menores de cinco anos associadas à diarreia, principalmente na África subsaariana, sul da Ásia e América Latina. Dentre os patógenos causadores de diarreia, *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) é o agente etiológico bacteriano mais comum, incluindo *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* produtora da toxina de Shiga e seu subgrupo enterohemorrágica (STEC/EHEC). Os dados epidemiológicos indicam a importância do diagnóstico precoce e sua realização em locais com pouca infraestrutura. Desta forma o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um teste rápido, sensível e específico para o diagnóstico de EPEC e STEC/EHEC. Primeiramente, foram definidas diferentes condições do cultivo bacteriano: Dulbecco's modified Eagle's (DMEM), DMEM contendo 1% de triptona e DMEM pré-condicionado para o cultivo dos isolados de EPEC/EHEC e avaliação da produção/secreção das proteínas secretadas EspA e EspB, utilizando anticorpos monoclonais (MAb) e policlonais (PAb) anti-EspA ou anti-EspB por ELISA indireto. Para a avaliação da liberação das toxinas de Shiga para o sobrenadante do cultivo bacteriano de STEC/EHEC, foram testados diferentes condições de tratamento, o cultivo bacteriano foi tratado com Triton X-100 e o sedimento foi tratado com tampão de lise B-PER utilizando MAb e PAb anti-Stx1 ou anti-Stx2 por ELISA de captura. Subsequentemente, foi desenvolvido e avaliado o teste de aglutinação em látex para a detecção de EspB em isolados de EPEC/EHEC, e Stx1 e Stx2 em isolados de STEC/EHEC. EspB foi definida como biomarcador, o MAb anti-EspB como ferramenta para o diagnóstico de EPEC/EHEC, e a condição ideal para a produção/secreção de EspB foi o cultivo em DMEM. Para o diagnóstico de STEC/EHEC a condição ideal para liberação das toxinas Stx foi o tratamento do cultivo com Triton X-100. Tanto o ELISA, como a aglutinação em látex apresentaram sensibilidades e especificidades exigidas para testes diagnósticos de doenças negligenciadas em países em desenvolvimento e os testes de aglutinação em látex para a detecção destes patógenos foram precisos, rápidos e fáceis de executar, sendo portanto promissores para a utilização em laboratórios com mínima infraestrutura.

Palavras-chave: EPEC, STEC, EHEC, anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, produção/secreção de biomarcadores, diagnóstico, teste de aglutinação em látex.

ABSTRACT

SANTOS, A. R. R. **Development of a rapid latex agglutination test for the diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli***. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

There are 800,000 deaths associated with diarrhea worldwide in children under five, and these are mainly in sub-Saharan Africa, Southeast Asia and Latin America. Among the causative pathogens of diarrhea, diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) is the most common bacterial etiological agent, including enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* and its subgroup enterohemorrhagic *E. coli* (STEC/EHEC). Epidemiological data indicate the importance of early diagnosis and its realization in places with limited resources. Therefore, the objective of this work was to develop a rapid, sensitive and specific test for the diagnosis of EPEC and STEC/EHEC. First, different bacterial growth conditions were evaluated: Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) or DMEM containing 1% tryptone, and DMEM pre-conditioned with EPEC/EHEC isolates. The production/secretion of the secreted proteins EspA and EspB was determined by indirect ELISA utilizing anti-EspA or anti-EspB monoclonal (MAb) and polyclonal (PAb) antibodies. Different treatments were tested for their effect on the release of Shiga toxins into the medium of STEC/EHEC bacterial cultures. The bacterial culture supernatant was treated with Triton X-100, and the sediment was treated with B-PER lysis buffer. The toxins release was determined by capture ELISA using anti-Stx1 or anti-Stx2 MAb and PAb. Subsequently, a latex agglutination test was developed and evaluated for the detection of EspB in EPEC/EHEC isolates and of Stx1 and Stx2 in STEC/EHEC isolates. EspB was defined as the biomarker and anti-EspB MAb as the tool for the diagnosis of EPEC/EHEC. The ideal conditions for the production/secretion of EspB were cultivation in DMEM. For the diagnosis of STEC/EHEC, the ideal conditions for the release of Stx were Triton X-100 treatment. ELISA as well as latex agglutination showed the sensitivities and specificities required for diagnostic tests of neglected diseases in developing countries. The latex agglutination test for the detection of these pathogens was precise, rapid and easy to perform, thereby being promising for their utilization in laboratories with limited resources.

Key words: EPEC, STEC, EHEC, monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, production/secretion of biomarkers, diagnosis, latex agglutination test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sistema de secreção do tipo três (SST3) de EPEC.....	21
Figura 2 - Análise dos hibridomas produtores de anticorpos anti-EspA e da fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-EspA utilizando sobrenadantes dos cultivos de EPEC típica, EPEC atípica, EHEC e <i>E. coli</i> LEE-negativa por ELISA indireto.....	50
Figura 3 - <i>Immunoblotting</i> . Membrana de nitrocelulose contendo a fração proteica EspA ou EspB purificadas incubada com PAb anti-EspA e PAb anti-EspB.....	54
Figura 4 - Produção de EspA em diferentes condições de cultivo DMEM, DMEM-T e DMEM-PC.....	57
Figura 5 - Produção de EspB em diferentes condições de cultivo DMEM, DMEM-T e DMEM - PC.....	58
Figura 6 - Produção de EspB em diferentes condições de cultivo DMEM, DMEM-T e DMEM - PC em isolados LEE-positivos e isolados LEE-negativos.....	59
Figura 7 - Teste de aglutinação em látex para a detecção de EspB.....	60
Figura 8 - ELISA de captura para a detecção de Stx1 ou Stx2 nos sobrenadantes dos cultivos bacterianos nas condições I, II e III.....	62
Figura 9 - Produção de Stx1 e Stx2 em diferentes condições de tratamento do cultivo de isolados de STEC e isolados não-STEC.....	63
Figura 10 - ELISA de captura para a detecção de reatividade cruzada na identificação de Stx1 ou Stx2 no sobrenadante dos cultivos bacterianos na condição I, condição II e condição III.....	64
Figura 11 - Teste de aglutinação em látex para a detecção de Stx1 ou Stx2.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características e propriedades dos meios recomendados para o isolamento de STEC.....	29
Tabela 2 - Características do anticorpo monoclonal Anti-EspA.....	52
Tabela 3 - Características dos anticorpos monoclonais anti-EspB, anti-Stx1 e anti-Stx2.....	53
Tabela 4 - Características dos anticorpos policlonais anti-EspA e anti-EspB.....	54
Tabela 5 - Características dos anticorpos policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2.....	55
Tabela 6 - Reatividade (%) do ensaio de aglutinação em látex-EspB com isolados bacterianos.....	60
Tabela 7 - <i>Cut-off</i> obtido para as três condições para Stx1 e Stx2 por análise da curva ROC (<i>Receiver Operating Characteristics</i>) e a sensibilidade e especificidade.....	63
Tabela 8 - Reatividade (%) do ensaio de aglutinação em látex-Stx1 com isolados bacterianos.....	65
Tabela 9 - Reatividade (%) do ensaio de aglutinação em látex-Stx2 com isolados bacterianos.....	66
Tabela 10 - Isolados de STEC utilizados e os resultados dos testes de aglutinação em látex para a detecção de Stx1 ou Stx2.....	90
Tabela 11 - Isolados de EHEC utilizados e os resultados dos testes de aglutinação em látex para a detecção de EspB.....	91
Tabela 12 - Isolados de EPEC típica utilizados e os resultados dos testes de aglutinação em látex para a detecção de EspB.....	92
Tabela 13 - Isolados de EPEC atípica utilizados e os resultados dos testes de aglutinação em látex para a detecção de EspB.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/E - *Attaching and effacement*
AA - Adesão agregativa
aEAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa atípica
aEPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica atípica
BCIP - *5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate*
BFP - *Bundle-forming pilus*
BSA - *Bovine Serum Albumin*
B-PER - *Bacterial Protein Extraction Reagent*
BHI - *Brain Heart Infusion*
BPW - *Buffer-peptone water*
CH - Colite Hemorrágica
CT-SMAC - Ágar MacConkey-sorbitol-telurito-cefexima
DA - Adesão difusa
DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderente
DEC - *Escherichia coli* diarreiogênica
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMEM-T - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* contendo 1% de triptona
DMEM-PC - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* pré-condicionado
DMSO - Dimetil sulfoxido
DO - Densidade óptica
E - Especificidade
EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
EC - *E. coli*
E. coli - *Escherichia coli*
E. coli SFV - *Escherichia coli* sem fatores de virulência
Ef - Eficiência
EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica
Ehly - *Enterohemolysin*
EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasora
EIA - Ensaios imunoenzimáticos
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*
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
ExPEC - *Escherichia coli* Patogênica Extraintestinal
FAS - *fluorescent actin staining*
FBS - Soro Fetal Bovino
H - Antígeno Flagelar
Gb₃ - Globotriasilceramida
IC - Imunocromatográfico
Ig - Imunoglobulina
IPTG - *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*
K_D - Constante de dissociação
K - Antígeno capsular

LA - Adesão localizada
LAL - Adesão localizada-*like*
LB - Lúria Bertani
LEE - *Locus of enterocyte effacement*
LT - Termolábil
MAb - Anticorpo Monoclonal
MAC - Ágar MacConkey
NBT - *Nitro blue tetrazolium*
O - Antígeno somático
OPD - σ -fenilenodiamino
PAb - Anticorpo Policlonal
PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão salina-fosfato)
PBST - Tampão salina-fosfato com detergente *Tween 20*
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
Pet - *plamid-encoded toxin*
PMSF - Fluoreto de fenilmetilsufato
rpm - Rotações por minuto
ROC - *Receiver Operating Characteristic*
S - Sensibilidade
scFv - *Single-chain variable frangments*
SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SHU - Síndrome hemolítico-urêmica
SST3 - Sistema de Secreção do Tipo III
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
SMAC - Ágar MacConkey-sorbitol
tEPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica típica
TSB - *Trypticase Soy Broth* (caldo triptona de soja)
TTP - Púrpura Trombocitopenia Trombótica
Tir - *translocated intimin receptor*.
VTEC - *Escherichia coli* produtora de verotoxina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	17
1.1.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	18
1.1.2.1 Epidemiologia de EPEC	18
1.1.2.2 Mecanismo de patogenicidade e principais fatores de virulência	19
1.1.2.3 Aspectos clínicos	21
1.1.2.4 Diagnóstico de EPEC	22
1.1.3 <i>Escherichia coli</i> produtora da toxina de Shiga (STEC)	24
1.1.3.1 Epidemiologia de STEC/EHEC	24
1.1.3.2 Mecanismo de patogenicidade e principais fatores de virulência	25
1.1.3.3 Manifestações clínicas	26
1.1.3.4 Diagnóstico de STEC/EHEC	27
1.1.4 Diagnóstico utilizando partículas de látex	31
2. OBJETIVO	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Isolados Bacterianos	34
3.2 Obtenção das proteínas EspA e EspB	35
3.3 Obtenção das toxinas de Shiga	35
3.4 Anticorpos Monoclonais	36
3.4.1 Caracterização do anticorpo monoclonal anti-EspA	36
3.4.1.1 Seleção de hibridoma produtor de anticorpo anti-EspA	36
3.4.1.2 Subclonagem do hibridoma produtor de anticorpos anti-EspA	37
3.4.1.3 Congelamento dos hibridomas	38
3.4.1.4 Purificação dos anticorpos monoclonais	38
3.4.1.5 Cálculo da constante de dissociação	39
3.4.1.6 <i>Immunoblotting</i>	40
3.4.1.7 Limite de detecção	40
3.5 Anticorpos Policlonais	41
3.5.1 Obtenção da fração enriquecida em IgG anti-EspA do soro de coelho	41
3.5.2 <i>Immunoblotting</i>	42
3.5.3 Limite de detecção de PAb anti-EspA	42

3.6 Avaliação da produção e liberação das proteínas EspA e EspB.....	43
3.6.1 Meios de cultura.....	43
3.6.2 Cultivo dos isolados.....	43
3.6.3 ELISA indireto.....	44
3.7 Avaliação da produção e liberação das toxinas Stx1 e Stx2.....	44
3.7.1 Cultivo dos isolados bacterianos.....	44
3.7.2 ELISA de captura.....	45
3.8 Ensaio de aglutinação em látex.....	46
3.8.1 Sensibilização das partículas de látex.....	46
3.8.2 Testes de aglutinação.....	46
3.8.2.1 Detecção de EspB.....	46
3.8.2.2 Detecção de Stx1 ou Stx2.....	47
3.9 Avaliação da sensibilidade e especificidade do ensaio de aglutinação em látex.....	48
3.10 Análise Estatística.....	48
4 RESULTADOS.....	49
4.1 Anticorpos Monoclonais.....	49
4.2 Anticorpos Policlonais	54
4.3 Avaliação da produção/secreção das proteínas EspA/EspB.....	56
4.4 Ensaio de aglutinação em látex para a detecção de EspB.....	59
4.5 Avaliação da produção e liberação da toxina de Shiga.....	61
4.6 Ensaio de aglutinação em látex para a detecção de Stx1 ou Stx2.....	64
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS.....	89
ANEXO A - Isolados de STEC/EHEC.....	90
ANEXO B - Isolados de EPEC típica e atípica.....	92
ANEXO C - Artigo completo submetido a publicação no PLoSNTD e Premiações.....	94

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, sob a orientação da Dra. Roxane Maria Fontes Piazza com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2012/02618-9 e 2009/14845-7).

1. INTRODUÇÃO

Dados epidemiológicos mostram que a pneumonia e a diarreia são responsáveis por 29% das mortes de crianças no mundo, ocasionando mais de 2 bilhões de casos a cada ano (WHO, 2013a). Além da mortalidade, as infecções diarreicas agudas são significativa causa de morbidade, principalmente nas áreas rurais e empobrecidas de países em desenvolvimento. Globalmente ocorrem cerca de 800.000 mortes de crianças menores de cinco anos associadas à diarreia, (WHO, 2013b) e 45% dessas mortes estão relacionadas a desnutrição aguda grave (WHO, 2013c).

A doença diarreica aguda é causada por diferentes agentes etiológicos como, bactérias, vírus e parasitos. Dentre os fatores de risco para a causa de diarreia em crianças destacam-se a ingestão de água não potável, más práticas de higiene e a subnutrição. A diarreia tem tratamento barato, eficaz e acessível, no entanto, a doença mata mais crianças do que a Aids, a malária e o sarampo juntos e apenas 39% das crianças com diarreia são tratadas de forma adequada (UNICEF, 2009). Dentre os patógenos bacterianos causadores de diarreia, o mais comum é a *Escherichia coli* diarreiogênica (DEC) (O'RYAN; PRADO; PICKERING, 2005).

O diagnóstico laboratorial de *Escherichia coli* (*E. coli*) é feito a partir do isolamento de amostras fecais por semeadura em meio seletivo. A mudança de pH pela fermentação da lactose pode ser utilizada para diferenciar os isolados fermentadores, dos não fermentadores pela coloração rosa ou vermelha em meio ágar MacConkey. No entanto, características morfológicas, fenotípicas e genotípicas precisam ser pesquisadas para a identificação do patógeno (CROXEN et al., 2013). Vários métodos foram descritos para o diagnóstico de DEC, utilizando-se técnicas de cultura celular e molecular, ensaios imunoenzimáticos (EIA), teste imunocromatográfico (IC), baseando-se na detecção de antígenos em amostras de fezes ou isolados bacterianos (BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER, 2002; PARK, 2003; PIAZZA et al., 2010; LU et al., 2002; KEHL et al, 1997; NAKASONE et al., 2007). No entanto, poucos métodos são empregados na rotina dos laboratórios clínicos de países em desenvolvimento (PIAZZA et al., 2010).

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1.1 *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbio facultativo com um tipo de metabolismo que é ao mesmo tempo fermentativo e respiratório. Cepas de *E. coli* fazem parte da microbiota intestinal de uma variedade de animais, incluindo o homem, representando cerca de 10% dos micro-organismos intestinais (TORRES; ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA, 2010). É importante o monitoramento dos níveis de contaminação por *E. coli* em água e alimentos, pois as diferenças entre cepas não patogênicas e patogênicas são muitas vezes detectáveis apenas por técnicas fenotípicas e moleculares. Os métodos utilizados para a detecção de coliformes fecais ou *E. coli* em amostras de água e alimentos como indicador da qualidade sanitária, são métodos de enumeração baseados na fermentação da lactose (TORRES; ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA, 2010). A classificação baseada na determinação dos antígenos somático (O) e flagelar (H) possibilitou a classificação de cepas de *E. coli* em sorogrupos O e sorotipos H, totalizando 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).

Algumas cepas adquiriram mecanismos de patogenicidade causando doenças em humanos e animais. *E. coli* pode causar infecções entérica/diarreio gênica (DEC) ou extra-intestinal (ExPEC) em humanos. ExPEC causa infecções no trato urinário (*E. coli* uropatogênica) e sepse/ meningite (*E. coli* de meningite neonatal). As categorias de DEC são altamente diversificadas e adaptadas, sendo classificadas pelas constituições antigênicas, propriedades de virulência e traços fenotípicos em *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e seu subgrupo *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.1.2 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

Em 1955, esta foi a primeira categoria descrita como *E. coli* epidemiologicamente associada a surtos de diarreia infantil (NETER et al., 1955). Até 1970 nenhum dos métodos bioquímicos, microbiológicos ou testes em animais estavam disponíveis para diferenciação de EPEC dos isolados de *E. coli* comensais, sendo então a sorotipagem, o único método (LEVINE, 1987). Atualmente, a classificação de EPEC baseia-se na presença de genes de virulência específicos (NATARO; KAPER, 1998; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; PIAZZA et al., 2010).

1.1.2.1 Epidemiologia de EPEC

EPEC foi a principal causa de diarreia infantil em países desenvolvidos, mas ao longo dos anos, tornou-se mais prevalente em países em desenvolvimento. A população mais susceptível são crianças abaixo de 2 anos, com taxa de mortalidade significativa (10-40%) (ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA; TORRES, 2012; GOMES; GONZÁLEZ-PEDRAJO, 2010). A prevalência de infecção por EPEC varia entre as regiões geográficas e classes socioeconômicas (CROXEN et al., 2013). A diarreia causada por EPEC é raramente relatada em adultos, a razão para essa resistência não é conhecida, mas a perda de receptores específicos com a idade pode ser uma possibilidade (NATARO; KAPER, 1998). Dentre as infecções no ambiente comunitário, EPEC é a segunda maior causa de diarreia, perdendo apenas para o rotavírus (OCHOA et al., 2009).

EPEC é classificada em típica (tEPEC) ou atípica (aEPEC) baseada na presença (típica) ou ausência (atípica) do plasmídeo EAF que codifica a *bundle-forming pilus* (BFP) (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991; KAPER, 1996; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002). Estudos no México, Peru e Uruguai mostraram que aEPEC é um dos mais frequentes patótipos de DEC isolados em crianças com diarreia aguda ou persistente (GOMES; GONZÁLEZ-PEDRAJO, 2010). No Peru, foi realizado um estudo utilizando 8.003 cepas de *E. coli* isoladas de crianças com

idade inferior a 36 meses, as categorias de DEC mais prevalentes foram a EAEC com 9,9% dos isolados e EPEC com 8,5% (OCHOA et al., 2011). Em uma revisão sistemática utilizando 266 estudos publicados entre 1990 e 2002, EPEC está entre os patógenos mais importantes com uma prevalência de 8,8% no ambiente comunitário, 9,1% no ambulatório e 15,6% das internações hospitalares (LANATA; MENDOZA, 2002).

Entre 2001 e 2002, 10,1% das bactérias isoladas de crianças com diarreia aguda em Salvador eram aEPEC (FRANZOLIN et al., 2005). Em outro estudo realizado em Salvador, com 1.207 crianças com e sem diarreia aguda, o patógeno mais frequente foi EAEC (10,7%), seguindo de aEPEC (9,4%) e tEPEC detectada em apenas uma amostra (BUERIS et al., 2007). Um estudo de 1 ano realizado em dois grandes centros urbanos do estado de São Paulo, Brasil, 5,4% dos 774 casos de diarreia foram atribuídos a aEPEC (ARAUJO et al., 2007). Os seres humanos são considerados os principais reservatórios de tEPEC, já as cepas de aEPEC são isoladas de diferentes animais (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

1.1.2.2 Mecanismos de patogenicidade e principais fatores de virulência

A infecção por EPEC tem como principal mecanismo de patogenicidade, a produção da lesão histopatológica na superfície apical dos enterócitos denominada *Attaching and Effacing* (lesão A/E) (MOON et al., 1983; KNUTTON et al., 1989). Esse mecanismo de patogênese está dividido em estágios (DONNENBERG; KAPER, 1992). Primeiramente, ocorre uma adesão localizada à célula do hospedeiro e os fatores que medeiam essa adesão inicial podem ser a fimbria do tipo IV (BFP) (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1991), ou outras estruturas fimbriais e não fimbriais, bem como o flagelo (GIRÓN; HO; SCHOOLNIK, 1993). Logo após essa adesão inicial ocorre a transdução de sinal e a adesão íntima através do sistema de secreção do tipo III (SST3) (JARVIS, et al. 1995; KENNY; FINLAY, 1995) (**Figura 1**).

Os genes bacterianos responsáveis por esse sinal de transdução são codificados em uma ilha de patogenicidade de 35,5 kb chamada de *locus of enterocyte effacement* (LEE) (McDANIEL et al., 1995; McDANIEL; KAPER, 1997) que codifica o SST3, várias proteínas secretadas, intimina e o seu receptor Tir

(*translocated intimin receptor*) (JERSE et al., 1990; DENG et al., 2004; ELLIOTT et al., 2000; KENNY; WARAWA, 2001; KENNY et al., 1997b). Existe um alto grau de conservação nos genes que codificam o SST3, no entanto os genes que codificam as proteínas efetoras mostram considerável variação (MULLER et al., 2009). O SST3 é um sistema complexo com mais de 20 proteínas diferentes que atravessam a membrana interna e externa bacteriana formando um *translocon* na célula hospedeira, no qual são injetadas proteínas efetoras (GALÁN; WOLF-WATZ, 2006) (**Figura 1**).

A intimina é uma proteína de membrana externa de 94 kDa codificada pelo gene *eae*, responsável pela adesão íntima da bactéria com o enterócito. A adesão ocorre pela interação com o seu receptor Tir, uma proteína efetora que é inserida na membrana do enterócito (JERSE et al., 1990; KENNY et al., 1997b). *E. coli secreted protein* (Esp), EspA, B e D são necessárias para a transdução de sinal e a formação da lesão (NATARO; KAPER, 1998; HARTLAND et al., 2000; KNUTTON et al., 1998; KENNY et al., 1996; LAI et al., 1997).

EspA é uma proteína estrutural de aproximadamente 25 kDa, forma um canal transportador, filamentosos de aproximadamente 0.7 µm de comprimento e transfere as proteínas EspB, EspD e o receptor Tir diretamente para a célula hospedeira, deste modo, na ausência da EspA, as outras proteínas efetoras deixam de ser translocadas. EspB é uma proteína de aproximadamente 37 kDa, um efetor translocado que juntamente com a EspD de aproximadamente 40 kDa interagem e formam um poro na membrana da célula do hospedeiro após a adesão (HARTLAND et al., 2000; KNUTTON et al., 1998; KENNY et al., 1996; LAI et al., 1997) (**Figura 1**). EspB também é necessária para a indução da ativação do NF-κB, secreção de interleucina-8 e migração transepitelial de neutrófilos (TACKET et al., 2000).

Figura 1 - Sistema de secreção do tipo três (SST3) de EPEC.

MI-Membrana Interna; EP-Espaço Periplasmático; ME-Membrana Externa

Fonte: adaptado de SEKIYA et al., 2001.

1.1.2.3 Aspectos clínicos

Nas infecções por EPEC a diarreia é muitas vezes acompanhada de vômitos, febre e desidratação em crianças menores de 2 anos de idade. Geralmente a diarreia é aguda, mas em alguns casos, pode ser persistente com duração de mais de 2 semanas (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA; TORRES, 2012).

Vários estudos tem mostrado que EPEC causa diarreia abundante com muco, mas sem sangue, com perda de eletrólitos e fluidos pelas fezes. A dose efetiva de EPEC necessária para causar a diarreia em crianças ainda não foi estabelecida, no entanto, um estudo em voluntários adultos indicou que é necessário uma alta dose para induzir a diarreia (10^9 e 10^{10} de bactéria), com um período de 12 a 24 horas de incubação, mas em crianças presume-se uma dose bem menor (GOMES; GONZÁLEZ-PEDRAJO, 2010; FERGUSON; JUNE, 1952).

1.1.2.4 Diagnóstico de EPEC

O diagnóstico de EPEC em laboratórios clínicos quando é realizado, faz-se a identificação presuntiva de *E. coli* através do cultivo em um meio seletivo, por exemplo, o ágar MacConkey, no qual as colônias lactose positivas são selecionadas e identificadas pelos testes bioquímicos convencionais (PIAZZA et al., 2010). As colônias obtidas no isolamento primário em placas são testadas por aglutinação para detectar os sorogrupos clássicos de EPEC O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O127, O128, O142 e O158, no entanto, este método está completamente superado, pois há uma grande heterogeneidade nos sorogrupos de EPEC, e esses sorogrupos testados podem também compreender outras categorias de DEC (PIAZZA et al., 2010).

Em laboratórios de referência podem ser utilizadas as seguintes metodologias: 1) sorotipagem, 2) ensaios de adesão com células HEp-2, 3) teste FAS (*fluorescent actin staining*), 4) técnicas de biologia molecular que amplificam os genes de virulência e 5) ensaios imunossorológicos (PIAZZA et al., 2010; VIDAL et al., 2007). A detecção de EPEC pode ser realizada com base nas características fenotípicas que a distinguem de outras categorias de *E. coli*, como por exemplo, os ensaios de interação com linhagens celulares *in vitro*, um método sensível que, no entanto não é utilizado na rotina clínica. Os isolados de EPEC típica possuem uma adesão localizada (LA) em células HEp-2 em 3 h, com formação de microcolônias compactas na superfície da célula mediada por BFP (GIRÓN; HO; SHOOLNIK, 1993) e isolados de EPEC atípicas apresentam os padrões localizado-*like* (LAL), difuso (DA) e agregativo (AA) em 6 h, sendo esses dois últimos padrões idênticos aos que ocorrem em DAEC e EAEC, respectivamente (HERNANDES et al., 2009).

O teste FAS é uma técnica que tem sido utilizada em estudos epidemiológicos e em pesquisa. Na interação bactéria-célula ocorre um acúmulo de actina no citoplasma apical do enterócito sob a bactéria aderida. No ensaio, utiliza-se a faloidina marcada com fluorocromo, que se liga à actina intracelular e por microscopia de fluorescência é possível observar os pontos de acúmulo de actina em células infectadas por EPEC (KNUTTON et al., 1989).

Os ensaios de biologia molecular baseados em PCR podem ser executados utilizando iniciadores que amplificam o gene *eae*, responsável pela codificação da

intimina, sendo os isolados *eae* positivos e *stx* negativos considerados EPEC. A diferenciação entre tEPEC e aEPEC é baseada na presença ou ausência do gene *bfp*, respectivamente. PCR é um método bastante sensível e específico e utilizado em laboratórios de pesquisa e em estudos epidemiológicos, no entanto, na rotina clínica seu uso é limitado (ARENAS-HERNÁNDEZ; MARTÍNEZ-LAGUNA; TORRES, 2012).

Os testes imunossorológicos, que utilizam anticorpos específicos capazes de reconhecer os fatores de virulência, podem ser métodos excelentes para a detecção de EPEC. O emprego de anticorpos policlonais que reconhecem a região conservada da intimina (*Int*₃₈₈₋₆₆₇), possibilitou a detecção desse patógeno (ADU-BOBIE et al., 1998; BATCHELOR et al., 1999; KOGA et al., 2003). Por *immunoblotting*, anticorpos policlonais anti-intimina foram capazes de detectar isolados *eae*-positivos, com 97% de sensibilidade e não reconheceram isolados *eae*-negativos com 100% de especificidade (MENEZES et al., 2010). Recentemente, Caravelli et al. (2013), utilizaram o anticorpo recombinante anti-intimina (scFv-intimina) no ensaio de imunofluorescência, este anticorpo reconheceu isolados de tEPEC, aEPEC e EHEC, com 100% de sensibilidade e não detectou isolados *eae*-negativos com 100% de especificidade.

Além da intimina, as proteínas secretadas podem ser antígenos alvo para o diagnóstico de EPEC e EHEC. Lu et al. (2002) desenvolveram um método prático para identificar estes patógenos pela detecção de EspB. Os isolados foram cultivados em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) e EspB foi detectada no sobrenadante de cultura por um ensaio de aglutinação passiva reversa em látex utilizando anticorpos policlonais anti-EspB. Este mesmo grupo de pesquisadores desenvolveram um teste imunocromatográfico para a detecção de EspB em isolados de EPEC e EHEC (NAKASONE et al., 2007).

1.1.3. *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC)

Em 1982, ocorreu nos Estados Unidos dois surtos de diarreia sanguinolenta severa, chamada de colite hemorrágica (CH), ocasionada por *E. coli* O157:H7. Em seguida, estudos mostraram que essa cepa pertencente ao sorogrupo O157 produzia a toxina de Shiga (RILEY et al., 1983; O'BRIEN et al., 1983). Em 1983 e 1985, estudos no Canadá mostraram uma grande associação entre a infecção por STEC e a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), que causa insuficiência renal aguda em crianças (KARMALI, 1989). Estudos em outros países confirmaram esta ligação entre infecção por STEC e SHU, e também púrpura trombocitopenia trombótica (TTP), que ocorre mais comumente em adultos (GUTH; PRADO; RIVAS, 2010).

1.1.3.1 Epidemiologia de STEC/EHEC

Atualmente, um dos principais focos das autoridades de saúde pública dos países industrializados é a vigilância e controle de STEC. Embora a detecção principal seja de *E. coli* O157:H7, cepas não-O157 estão também envolvidas em casos esporádicos e surtos na América do Norte, Europa e Austrália (PATON; PATON, 1998). Desde a ocorrência dos surtos nos Estados Unidos na década de 80, grandes surtos causados por cepas de STEC, têm sido amplamente notificados em todo o mundo industrializado (KARMALI, 1989; O'BRIEN et al., 1983; RILEY et al., 1983). Em 2011, na Alemanha, ocorreu um surto causado por uma cepa denominada *E. coli* enteroagregativa produtora da toxina de Shiga (STEAEC) O104:H4 resultando em 3.469 casos não-SHU, 852 casos de SHU e 50 mortes (VONBERG et al., 2013).

Existem vários relatos de casos de infecção por esse patotipo na América Latina, principalmente Argentina, Uruguai e Chile (GUTH; PRADO; RIVAS, 2010). A Argentina apresenta a maior incidência mundial de casos de SHU em crianças de até 5 anos de idade e atualmente a taxa de mortalidade é de 5% (RIVERO et al., 2010). A síndrome hemolítica urêmica é responsável por 20% dos transplantes

renais na Argentina e o principal fator para a infecção em crianças é o consumo de hambúrgueres (BENTANCOR et al., 2012).

No Brasil, há poucos relatos sobre o isolamento de STEC. O primeiro caso de SHU no Brasil foi descrito por Guth et al. (2002) e o isolado pertencia ao sorotipo O26:H11. Vinte e nove isolados de STEC foram identificadas em uma coleção de 2.607 amostras isoladas de pacientes com diarreia no estado de São Paulo, em um estudo retrospectivo entre 1976 a 1999 (VAZ et al., 2004). Outro estudo realizado em São Paulo no período de janeiro de 2001 a agosto de 2005, relatou as características clínicas e microbiológicas de 13 casos de SHU e evidenciou a infecção por STEC em 92,3% dos casos estudados (SOUZA et al., 2011).

1.1.3.2 Mecanismos de patogenicidade e principais fatores de virulência

STEC ou *E. coli* produtora da Verotoxina (VTEC) é assim conhecida por sua citotoxicidade em células Vero (células de rim de macaco verde africano) (KONOWALCHUK et al., 1977). Durante a colonização, STEC apresenta mecanismos de defesa para se estabelecer no intestino. Uma característica geral de STEC do sorogrupo O157 e outros sorotipos é a resistência ao ácido gástrico (LARGE; WALK; WHITTAM, 2005), ultrapassando então essa barreira gástrica a bactéria passa pelo intestino delgado e os genes de virulência são ativados (SPEARS; ROE; GALLY, 2006). Primeiramente, ocorre a adesão nas células epiteliais do intestino e os isolados LEE-positivos (EHEC) apresentam uma adesão diferente das LEE-negativas, pois as primeiras induzem a lesão A/E, de forma semelhante ao que ocorre em EPEC, citado anteriormente (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; KNUTTON et al., 1989; JARVIS; KAPER, 1996).

Nas infecções causadas por STEC, a produção das toxinas de Shiga (Stx1 e Stx2 ou variantes) é fundamental para os mecanismos de virulência, associados a colite hemorrágica e a síndrome hemolítica urêmica (KARMALI, 1989). Stx1 e Stx2 podem ser divididas em subtipos Stx1 (Stx1a, Stx1c e Stx1d) e Stx2 (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g), sendo que STEC pode carregar uma única variante, Stx1 ou Stx2, ambas Stx1 e Stx2 ou uma combinação dos subtipos de Stx2 (SCHEUTZ et al., 2012). As moléculas de Stx tem uma estrutura do tipo AB₅, no qual

a subunidade A é composta pelo peptídeo A1 (27,5 kDa) que possui atividade enzimática e pelo peptídeo A2 que liga a subunidade A à subunidade B (7,5 kDa). A subunidade B é responsável pela ligação da toxina ao receptor globotriasilceramida (Gb3), este receptor está presente na superfície das células renais e no endotélio vascular e isso contribui para a fisiopatologia da SHU (GYLES, 2007; NATARO; KAPER, 1998).

Estudos epidemiológicos tem mostrado que nem todas as STEC que produzem a toxina são clinicamente relevantes e que outros fatores de virulência podem contribuir para a doença, como a enterohemolisina A (Ehly) codificada pelo gene *hly*, intimina codificada pelo gene *eae* e as proteínas efetoras, em destaque, EspA, EspB e EspD presente nas EHEC (BETTELHEIM, 2007; PATON; PATON, 1998; JARVIS; KAPER, 1996).

1.1.3.3 Manifestações clínicas

Infecções por STEC podem variar desde casos assintomáticos, diarreia aquosa, diarreia sanguinolenta até complicações sistêmicas, como SHU. As manifestações clínicas podem ser semelhantes entre os sorogrupos O157 e não-O157, no entanto, a gravidade pode variar entre os diferentes sorotipos (KARMALI, 1989). Estudos mostram que a diarreia causada pelo sorotipo O157:H7 apresenta uma taxa de 10-15% de risco para desenvolver SHU e que a diarreia sanguinolenta ocorre em 81% dos casos de O157:H7 e em 58% dos casos não-O157 (JELACIC et al., 2003).

A infecção ocorre após a ingestão de água ou alimentos (carne mal cozida, suco não pasteurizado, couve, espinafre, alface, dentre outros) contaminados, contato com animais ou seu ambiente e diretamente de pessoa a pessoa (GYLES, 2007). A infecção ocorre com baixa quantidade de bactérias, como observado em bactérias dos sorogrupos O157 e O111 onde a dose infecciosa é de 100 micro-organismos e o período de incubação é cerca de 3 a 4 dias (PATON; PATON, 1998). O primeiro sintoma é a diarreia que pode ser acompanhada de febre, vômitos, dor abdominal, seguindo, em cerca de 30% dos pacientes, para uma diarreia sanguinolenta ente o 5° ao 6° dia. Em alguns pacientes, os sintomas de SHU podem

aparecer entre o 5º e o 13º dia, após os sintomas iniciais. SHU envolve trombocitopenia, anemia hemolítica e insuficiência renal aguda (CROXEN et al., 2013; TARR; GORDON; CHANDLER, 2005).

1.1.3.4 Diagnóstico de STEC/EHEC

O diagnóstico de STEC em laboratório de rotina é difícil, e apenas fatores de virulências específicos como a presença da toxina de Shiga, que é comum a todas as STEC, permite diferenciar das outras *E. coli* (PATON; PATON, 1998). As fezes devem ser testadas o mais rápido possível, pois a detecção da bactéria pode ser difícil após a primeira semana da doença. A grande dificuldade em identificar e caracterizar STEC é que estes se assemelham em vários aspectos com a *E. coli* comensal, além de que, estes estão em minoria na microbiota fecal dos pacientes. Desta forma, as dificuldades encontradas pelos microbiologistas clínicos são: isolar, identificar e caracterizar a STEC em uma amostra clínica (BETTELHEIM, 2007).

Para a detecção de patógenos entéricos, as fezes devem ser cultivadas em ágar seletivo e diferencial para O157, além de simultaneamente realizar para não-O157 ensaios que detecte as toxinas de Shiga ou pesquisa dos genes que a codificam (BETTELHEIM, 2007). Para a realização dos testes de imunodetecção de Stx, a amostra deve ser cultivada em caldo ou meios de isolamento primário, pois este método apresenta uma maior sensibilidade e especificidade do que o teste direto nas fezes (CORNICK et al., 2002). O diagnóstico laboratorial rápido permite a notificação de surtos, implementação de medidas de controle e detecção de cepas emergentes de STEC (DE BOER; HEUVELINK, 2000). O diagnóstico tardio pode ocasionar a transmissão secundária e pode atrasar a detecção de surtos (ATKINSON et al., 2012).

Com a emergência de STEC, principalmente em países desenvolvidos, vários métodos de diagnósticos foram desenvolvidos para identificar este patógeno (ATKINSON et al., 2012) e os protocolos padronizados estão descritos a seguir:

- A amostra de fezes é cultivada em placas ou caldo seletivo e diferencial como o ágar MacConkey-sorbitol-telurito-cefexima [CT-SMAC], ágar MacConkey-sorbitol [SMAC] ou ágar CHROM.

- Depois de 16-24 h a 37°C de incubação as placas são examinadas e as colônias são testadas por aglutinação em látex para o sorogrupo O157 (**Tabela 1**). Se forem positivas na aglutinação, é feito a caracterização presuntiva de STEC O157, no qual é confirmado bioquimicamente como *E. coli*, já que outras bactérias entéricas Gram-negativas reagem de forma cruzada com o soro anti-O157, exemplo, *Samonella* do grupo N, *Yersinia* enterocolítica, *Citrobacter freundii* e *Escherichia hermannii*. Em seguida, é confirmado o sorogrupo, identificação do sorotipo e caracterização do isolado por PCR na detecção dos genes *stx1* e/ou *stx2*.

- Se não forem identificadas colônias O157, as fezes são cultivadas em um meio seletivo (MAC) e são utilizadas metodologias que detectem Stx, tais como métodos imunossorológicos, cultura de célula ou na pesquisa dos genes *stx* por PCR.

Para a caracterização presuntiva de STEC não-O157 é feito primeiramente a confirmação de *E. coli* por análise bioquímica, caracterização do isolado por PCR para a detecção dos genes *stx*, determinação de que seu subgrupo se enquadra entre os seis sorogrupos mais prevalentes (O26, O45, O103, O111, O121 ou O145) e a determinação do sorotipo (ATKINSON et al., 2012).

Tabela 1 - Características e propriedades dos meios recomendados para o isolamento de STEC.

Meio de cultura	Características	Propriedades	Morfologia da colônia
CT-SMAC	Seletivo e diferencial. Distingue O157 de outras <i>E. coli</i> fecais	Cefexima e telurito inibem o crescimento de <i>Proteus mirabilis</i> , STEC não-O157 e cepas que não fermentam o sorbitol	STEC O157 (coloração clara) e STEC não-O157 e outros organismos (coloração rosa)
CHROMagar O157	Seletivo e diferencial. Distingue O157 de outras <i>E. coli</i> fecais	A adição de telurito de potássio, cefexima e cefsulodina, reduzem o número de bactérias não-O157	STEC O157 (coloração roxa), STEC não-O157 (azul-esverdeadas) e outros organismos (incolores)
Rainbow agar	Seletivo e diferencial. Distingue O157 de outras <i>E. coli</i> fecais	Telurito e a novobiocina reduzem o número de bactérias não-O157	STEC O157 (coloração preta), não-O157 (violeta) e outros organismos (rosa)
SMAC	Distingue STEC O157 de outras <i>E. coli</i> fecais	O sorbitol permite o crescimento de STEC não-O157 e sais de bile e cristal de violeta inibem o crescimento de Gram-positivas	STEC O157 (coloração clara), STEC não-O157 e (coloração rosa)

Fonte: Adaptado de ATKINSON et al., 2012

O ensaio de citotoxicidade em cultura de células é o teste considerado padrão ouro para o diagnóstico de STEC, identificando a produção de Stx, independente do sorotipo da STEC. Já métodos baseados na identificação dos genes que codificam a Stx, como o PCR, multiplex PCR ou sondas de DNA, necessitam de equipamentos especializados e apresentam custo elevado (BETTELHEIM, 2007). Os métodos imunossorológicos apresentam vantagens para os laboratórios clínicos por reduzirem significativamente o tempo de análise, apresentarem excelente sensibilidade e especificidade e por serem fáceis de executar (DE BOER; HEUVELINK, 2000).

Os imunoenaios disponíveis comercialmente para a detecção da toxina de Shiga em isolados bacterianos ou cultivo pré-enriquecido, são descritos a seguir:

- a) *Duopath® Verotoxin test* (Merck, Darmstadt, Germany): detecta a toxina de Shiga, diferenciando Stx1 de Stx2, é um imunoensaio de fluxo lateral com um tempo de leitura de 20 min (PARK et al., 2003);
- b) *Immunocard STAT®EHEC* (Meridian Bioscience, Inc. Cincinnati, OH, USA): detecta a toxina de Shiga, diferenciando Stx1 de Stx2, é um imunoensaio de fluxo lateral com um tempo de leitura de 20 min (MERIDIAN BIOSCIENCE, 2014);
- c) *Premier EHEC®* (Meridian Bioscience, Inc. Cincinnati, OH, USA): detecta a toxina de Shiga, não diferencia Stx1 de Stx2, é um ensaio imunoenzimático em microplaca com um tempo de aproximadamente 3,5 h, com 100% de sensibilidade e 99,7% de especificidade (KEHL et al., 1997);
- d) *ProSpecT Shiga Toxin (STEC)* (Remel, Lenexa, KS): detecta a toxina de Shiga, não diferencia Stx1 de Stx2, é um ensaio imunoenzimático em microplaca com um tempo de aproximadamente 3 h, com 93 % de sensibilidade (GAVIN et al., 2004);
- e) *VTEC-Screen (SEIKEN - Japão)*: detecta a toxina de Shiga, diferenciando Stx1 de Stx2, é um teste de aglutinação passiva em látex com um tempo de aproximadamente 20-24 h (THERMO SCIENTIFIC, 2014).
- f) *Ridascreen* (R-biopharm, Darmstadt, Germany): detecta a toxina de Shiga, é um ensaio de ELISA de captura (BETTELHEIM; BEUTIN, 2003).

Esses ensaios comercialmente disponíveis apresentam um custo elevado para sua implementação na rotina de laboratórios clínicos de países em desenvolvimento, por este motivo, nosso laboratório emvidou esforços na obtenção de anticorpos policlonais e monoclonais contra as toxinas Stx1 e Stx2 (MENDES-LEDESMA et al., 2008; ROCHA; PIAZZA, 2007; ROCHA et al., 2012), bem como dedicou-se na padronização de um método imunocromatográfico para detecção dessas toxinas nos isolados de STEC (ROCHA, 2012).

1.1.4 Diagnóstico utilizando partículas de látex

Ensaio de aglutinação com partículas de látex utilizando antígenos e anticorpos têm sido aplicados na detecção de doenças infecciosas bacterianas (PRADUTKANACHANA; NAKARIN, 2005; SHAMEEM; VINOD; NEELAGUND, 2008), virais (ALTINDIS et al., 2004), fúngicas (GOMES; SILVA, 2011) e parasitárias (ALAM et al., 2008; BISWAS; PARIJA, 2003). Esses testes apresentam diferentes sensibilidades, especificidades e utilizaram diferentes protocolos na sensibilização das partículas de látex. Alguns testes estão disponíveis comercialmente, como o teste “KATEX”, que utiliza anticorpos antileishmania para o diagnóstico de leishmaniose visceral, com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 91,4% (ALAM et al., 2008). Para o diagnóstico do rotavírus, o teste de aglutinação apresenta uma sensibilidade de 57% e especificidade de 93% (ALTINDIS et al., 2004).

Para a detecção da toxina de Shiga no diagnóstico de STEC, o teste VTEC-Screen foi comparado ao *Premier* EHEC e houve uma concordância de 99% entre eles (CARROLL et al., 2003). No teste VTEC, as partículas de látex são sensibilizadas com anticorpos policlonais anti-Stx1 ou anti-Stx2, detectando as toxinas nos sobrenadantes do cultivo bacteriano e o limite de detecção é de 1 a 2 ng/mL de toxina de Shiga (THERMO SCIENTIFIC, 2014).

Para o diagnóstico de EPEC, foi desenvolvido um teste de aglutinação de látex passiva reversa, já citado anteriormente, no qual as partículas de látex foram sensibilizadas com anticorpos anti-EspB e a EspB foi detectada no sobrenadante do cultivo. O teste apresentou 100% de sensibilidade e especificidade (LU et al., 2002).

O diagnóstico precoce da diarreia é a chave para a conduta terapêutica, portanto o presente trabalho aborda o desenvolvimento e a avaliação do teste de aglutinação em látex, no qual as partículas de látex foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais contra a proteína secretada B (EspB) para a detecção de EPEC e EHEC e sensibilizadas com os anticorpos monoclonais contra as toxinas de Shiga 1 ou 2 para a detecção de STEC/EHEC. Os resultados obtidos nos testes de aglutinação em látex foram comparados aos resultados do ELISA indireto para EPEC/EHEC ou de captura para STEC utilizando os mesmos isolados bacterianos em diferentes condições de cultivo bacteriano ou de liberação/secreção dos fatores

de virulência, condições essas críticas para a detecção de patógenos (MENEZES et al., 2006; ROCHA; PIAZZA, 2007; ROCHA et al., 2012; VILHENA-COSTA et al., 2006).

2. OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um teste rápido, sensível e específico para o diagnóstico de EPEC e STEC/EHEC. Para alcançar o objetivo proposto foi necessário:

- Definir a condição de cultivo bacteriano para produção e liberação das proteínas EspA e EspB;
- Definir a proteína alvo para o diagnóstico de EPEC/EHEC;
- Definir a condição de tratamento do cultivo bacteriano para a liberação das toxinas de Shiga;
- Avaliar a performance do ensaio de aglutinação em látex para a detecção de EspB em isolados de EPEC e EHEC e a detecção das Stx1 e Stx2 em isolados de STEC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados Bacterianos

Neste trabalho foram utilizados os isolados de DEC, isolados de *E. coli* sem fatores de virulência para DEC e outras enterobactérias.

Para avaliação da produção e liberação das proteínas EspA e EspB foram testados por ELISA indireto e por aglutinação passiva em látex um total de 71 isolados de aEPEC (ABE et al., 2009), 31 isolados de tEPEC (MENEZES et al., 2010; NARA et al., 2010) e 23 isolados de EHEC (ROCHA et al., 2012). Como controles negativo foram testados 6 isolados de *E. coli* sem fatores de virulência para DEC (*E. coli* SFV), 6 isolados de DEC LEE-negativos (DEC/LEE-) e 17 enterobactérias. No grupo de enterobactérias testadas foram incluídas *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Providencia* spp., *Salmonella agona*, *Salmonella derby*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella infantis*, *Salmonella newport*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii* e *Shigella flexneri*. O isolado de tEPEC E2348/69 (LEVINE et al., 1985) O127:H6 foi incluído nos ensaios como controle positivo.

Para avaliação da produção e liberação das toxinas de Shiga foram testados por ELISA de captura e por aglutinação passiva em látex um total de 50 isolados que possuem o gene *stx*, confirmado por ensaios de citotoxicidade em células Vero (ROCHA et al., 2012), sendo 23 isolados produtores de Stx1, 14 produtores de Stx2 e 13 produtores de ambas. Como controles negativo foram testados, 5 isolados de *E. coli* SFV, 5 isolados de DEC não-STECS e 13 enterobactérias. No grupo de enterobactérias testadas foram incluídas *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella derby*, *Salmonella infantis*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens* e *Shigella flexneri*. O isolado protótipo EDL933 O157:H7 produtor das toxinas Stx1 e Stx2 foi incluído nos ensaios como controle positivo.

3.2 Obtenção das proteínas EspA e EspB

As proteínas recombinantes EspA e EspB foram obtidas de clones de *E. coli* BL21 contendo o plasmídeo pET28a-EspA ou pET28a-EspB. A indução, produção e purificação das proteínas recombinantes foram feitas como descrito por Knutton *et al.* (1998).

Para a expressão, 10 µL do estoque dos clones foram pré-cultivados em 10 mL de Lúria Bertani (LB) contendo 50 µg/mL de canamicina a 37 °C por 16-18 h em agitação. Posteriormente, 400 mL de LB contendo canamicina e glicose foi acrescido de 1:100 dos pré-inóculos e incubados a 37 °C em agitação. 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 30 mL de tampão de ligação (imidazol 5 mM, NaCl 0,5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 7,9) com fluoreto de fenilmetilsulfato (PMSF) a 1 mM. As células bacterianas em suspensão foram rompidas 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 de Sepharose carregada com Ni²⁺ (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Posteriormente, as proteínas foram quantificadas (*Micro BCA Protein Assay Kit*, Pierce, Rockford, IL, EUA). Como controles positivos no ELISA indireto foram utilizadas 5 µg/mL de EspA e 10 µg/mL de EspB.

3.3 Obtenção das toxinas de Shiga

As toxinas Stx1 e Stx2 foram adquiridas comercialmente da Faculdade de Medicina da Universidade de Tufts, Boston, USA. Como controles positivos no ELISA foram utilizadas 1 µg/mL das toxinas purificadas Stx1 ou Stx2.

3.4 Anticorpos Monoclonais

Os anticorpos monoclonais (MAb) anti-Stx1, anti-Stx2 (ROCHA et al., 2012) e anti-EspB (ROCHA, 2012) foram obtidos e caracterizados anteriormente. Os hibridomas anti-EspA foram obtidos por Letícia B. Rocha (dados não publicados) e caracterizados no presente trabalho.

Os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade em coluna de proteína G- sepharose após o cultivo em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY, EUA), 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de aminoácidos essenciais e 2% de piruvato de sódio em estufa a 37 °C, contendo 5% de CO₂. O grau de pureza foi determinado por SDS-PAGE em condições redutoras. A classificação quanto ao isotipo do anticorpo monoclonal anti-EspA e a constante de dissociação foram determinadas por ELISA e a reatividade foi analisada por *immunoblotting* e ELISA indireto.

3.4.1 Caracterização do anticorpo monoclonal anti-EspA

3.4.1.1 Seleção de hibridoma produtor de anticorpo monoclonal anti-EspA

Nove hibridomas K0 (primeiros clones produtores de anticorpos resultantes da fusão de linfócitos, provenientes de linfonodos poplíteos retirados do animal imunizado com a proteína purificada EspA, com células mielomatosas) produtores de anticorpos anti-EspA, designados, 3G4, 3E12, 2H1, 4H4, 3B8, 2B12, 3C12, 2H9 e 2H5 foram cultivados em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (FBS). Os sobrenadantes do cultivo foram testados com relação à produção de anticorpos anti-EspA por ELISA indireto como descrito a seguir:

Microplacas MaxiSorp™ (NUNC) foram sensibilizadas com 100 µL/poço da proteína purificada EspA na concentração de 5 µg/mL em tampão

carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,4 e com 100 µL/poço dos sobrenadantes dos cultivos bacterianos. Após a incubação a 4°C por 18 h, as placas foram lavadas com 200 µL/poço de PBS-Tween 0,05% (PBST) por quatro vezes seguindo de incubação com 200 µL/poço de PBS contendo 1% de BSA a 37 °C por 30 min. As placas foram lavadas com PBST e incubadas com 100 µL/poço do sobrenadante do cultivo dos nove hibridomas K0 a 37 °C por 1 h. Após as lavagens com PBST as placas foram incubadas com soro de coelho anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000 a 37 °C por 40 min. Novamente as placas foram lavadas com PBST e a reação foi revelada com 100 µL/poço da solução contendo 1 µg de o-fenilenodiamino (OPD) na presença de 1 µL H₂O₂ em 2 mL tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0 e a leitura foi realizada em leitor de ELISA a 492 nm (Labsystems).

Na seleção dos hibridomas utilizou-se tanto a proteína EspA purificada, como também os sobrenadantes dos cultivos de isolados de aEPEC (9), tEPEC (9), EHEC (8) e de *E. coli* LEE negativos (4).

3.4.1.2 Subclonagem do hibridoma produtor de anticorpos anti-EspA

Após a seleção do clone de hibridoma, este foi subclonado para a obtenção do clone K1 por diluição limite. Primeiramente, o clone K0 foi cultivado em garrafa de cultivo de célula contendo meio RPMI adicionado de 10% de soro fetal bovino. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e diluídas até a obtenção de aproximadamente 5 células/mL e em seguida foram distribuídas nas placas de 96 poços de maneira a se obter uma célula por poço. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa úmida contendo 5% de CO₂. Aproximadamente após 15 dias de cultivo, os sobrenadantes dos poços que continham um único clone foram testados por ELISA indireto para avaliar a produção de MAbs anti-EspA. Em seguida, os clones que apresentaram produção de anticorpos foram cultivados em garrafas de cultivo celular e congelados em nitrogênio líquido.

Após a obtenção do clone K1, o subtipo de imunoglobulina foi determinado. Microplaca MaxiSorp™ (NUNC) foi sensibilizada com 100 µL/poço de diferentes anti-

subclasses de imunoglobulinas anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgA e anti-IgM de camundongo na concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,6. Após a incubação a 4 °C por 18 h, a placa foi lavada com 200 µL/poço de PBST por quatro vezes seguindo de incubação com 200 µL/poço de PBS contendo 1% de BSA a 37 °C por 30 min e incubada com 100 µL/poço de MAb anti-EspA na concentração de 30 µg/mL, a 37 °C por 1 h. Após as lavagens com PBST a placa foi incubada com soro de coelho anti-imunoglobulina (IgG+IgA+IgM) de camundongo conjugado à peroxidase 1:1.000 (ZYMED, San Francisco, CA, 127 EUA). A reação foi revelada conforme o item 3.4.1.1.

3.4.1.3 Congelamento dos hibridomas

As células em suspensão foram retiradas da garrafa de cultura celular, centrifugada a 500 x g por 5 min e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino, em seguida foram separadas em alíquotas em tubos criogênicos e adicionado gota a gota o meio RPMI contendo 15% de DMSO (dimetilsulfóxido) em igual volume do RPMI utilizado para ressuspende o sedimento. Todas as etapas foram realizadas em fluxo laminar e em banho de gelo. Os tubos criogênicos contendo a suspensão celular foram armazenados a -80 °C por 48 h e transferidos para o nitrogênio líquido.

3.4.1.4 Purificação dos anticorpos monoclonais

Os sobrenadantes dos cultivos dos hibridomas foram filtrados em filtros de poro 0,45 µm, assim como os tampões de ligação (fosfato de sódio 20 mM, pH 7,4) e eluição (glicina 0,1 M pH 2,7) utilizados na purificação. Inicialmente, a coluna de proteína G-sepharose (GE, Healthcare) foi equilibrada com o tampão de ligação cerca de 4 vezes o volume da coluna, em seguida o sobrenadante do cultivo foi aplicado na coluna e novamente foi aplicado o tampão de ligação para retirar as

proteínas não adsorvidas na coluna. As proteínas adsorvidas foram eluídas com o tampão de eluição cerca de 4 vezes o volume da coluna e foram coletadas as frações de 2,5 mL, e adicionado Tris base 1 M pH 9,0 para neutralizar imediatamente o pH da amostra eluída para 7,0. Para as frações eluídas foi avaliada a presença de proteína utilizando o reagente de Bradford (Sigma) na proporção de 100 µL para 20 µL da fração. As frações referentes ao pico de eluição foram dialisadas a 4 °C por 48 h em tampão PBS pH 7,0. O conteúdo proteico foi quantificado pelo *kit Micro BCA Protein Assay* (Pierce) e armazenado a -20 °C. Para verificar o grau de pureza dos anticorpos, a fração eluída e dialisada foi avaliada em gel de poliacrilamida a 12% contendo SDS e corada com *Coomassie Blue* (Bio-Rad).

3.4.1.5 Cálculo da constante de dissociação

As constantes de dissociação (K_D) dos anticorpos monoclonais foram calculadas a partir dos dados obtidos por ELISA em três etapas (FRIGUET et al., 1985). Na primeira etapa foi realizado um ELISA indireto, no qual foi adicionada uma concentração fixa do antígeno EspA (5 µg/mL) e diferentes concentrações de anticorpo monoclonal (84,11 µg/mL - 82,1 ng/mL) e calculou-se a concentração ideal de anticorpo, na segunda etapa incubou-se em microtubos a concentração ideal de anticorpo obtido na primeira etapa com diferentes concentrações de antígeno (392,37 µg/mL - 0,011 ng/mL), na terceira etapa calculou-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:

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

3.4.1.6 Immunoblotting

O *immunoblotting* foi realizado para a detecção da interação da proteína EspA com o anticorpo monoclonal anti-EspA. Para isso, 5 µg de EspA foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença de SDS (SDS-PAGE) em condições redutoras e transferidos para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) a 10 V em temperatura ambiente por 40 min na presença de tampão Tris-glicina (0,025 M Tris e 0,2 M de glicina) pH 8,3 contendo 20% de metanol. Posteriormente, as membranas de nitrocelulose contendo as frações proteicas foram bloqueadas com 1% de BSA em PBS em temperatura ambiente por 1 h, e incubadas com 10 µg/mL do anticorpo, a 4 °C por 18 h. Depois de três lavagens de 5 min com PBST as membranas foram incubadas com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Invitrogen) na diluição de 1:5.000 em temperatura ambiente por 1 h. Após novas lavagens, as reações foram reveladas com 33 µL de NBT (*nitro blue tetrazolium*) e 16,5 µL de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) em 5 mL de tampão (100 Mm Tris-HCL [pH 9.0], 150 Mm NaCl, 1 mM MgCl₂) e interrompidas com adição de água destilada.

3.4.1.7 Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado por ELISA indireto. Microplacas MaxiSorp™ (NUNC) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de diferentes concentrações da proteína EspA (10 µg/mL - 9 ng/mL). Após 2 h de incubação a 37 °C, as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µL/poço de PBST e incubadas com 200 µL/poço de PBS contendo 1% de BSA a 37 °C por 30 min, em seguida as placas foram lavadas com PBST e incubadas com 100 µL/poço do MAb anti-EspA na concentração de 5 µg/mL a 37 °C por 1 h. Após as lavagens com PBST as placas foram incubadas com soro de coelho anti-IgG de camundongo conjugada à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000 e incubado a 37 °C por 40 min.

Novamente as placas foram lavadas com PBST e a reação foi revelada com 100 μ L/poço da solução contendo 1 μ g de OPD, 1 μ L de H_2O_2 em 2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0. A leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).

3.5 Anticorpos Policlonais

As frações enriquecidas em IgG, mencionadas como anticorpo policlonal (PAb) anti-Stx1, anti-Stx2 (ROCHA et al., 2012) e EspB (ROCHA, 2012) foram obtidas e caracterizadas em trabalhos anteriores e anti-EspA neste trabalho.

3.5.1 Obtenção da fração enriquecida em IgG anti-EspA do soro de coelho

A fração enriquecida em IgG (PAb) do soro de coelho imunizados com a proteína EspA foi obtida conforme metodologia descrita por McKinney e Parkinson (1987). Para tanto, o soro foi diluído em quatro volumes de tampão acetato de sódio 60 mM pH 4,0 e o pH final ajustado para pH 4,5 e adicionou-se ácido caprílico gota-a-gota, na proporção de 25 μ L por mL de solução, em temperatura ambiente sob constante agitação. Após 30 min, a solução foi centrifugada a 10.000 x g a 4 °C por 30 min. 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 de solução) a 4 °C por 1 h sob agitação. A solução foi centrifugada a 5.000 x g a 4 °C por 15 min 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 μ m e a concentração proteica foi determinada (*Micro BCA Protein Assay Kit*, Pierce).

3.5.2 Immunoblotting

O *immunoblotting* foi realizado para a detecção da interação da proteína EspA com a fração enriquecida em IgG anti-EspA. Para isso, 5 µg de EspA foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença de SDS (SDS-PAGE) em condições redutoras e transferidos para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) a 10 V em temperatura ambiente por 40 min na presença de tampão Tris-glicina (0,025 M Tris e 0,2 M de glicina) pH 8,3 contendo 20% de metanol. Posteriormente, as membranas de nitrocelulose contendo as frações proteicas foram bloqueadas com 1% de BSA em PBS em temperatura ambiente por 1 h, e incubadas com 30 µg/mL de PAb a 4 °C por 18 h. Depois de três lavagens de 5 min com PBST as membranas foram incubadas com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado à fosfatase alcalina (Invitrogen) na diluição de 1:5.000 a temperatura ambiente por 1 h. Após novas lavagens, as reações foram reveladas com 33 µL NBT e 16,5 µL BCIP em 5 mL de tampão e interrompidas com adição de água destilada.

3.5.3 Limite de detecção de PAb anti-EspA

O limite de detecção foi determinado por ELISA indireto. Microplacas MaxiSorp™ (NUNC) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de diferentes concentrações da proteína EspA (10 µg/mL - 4,8 ng/mL). Após a incubação a 37 °C por 2 h, as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µL/poço de PBST e incubadas com 200 µL/poço de PBS contendo 1% de BSA a 37 °C por 30 min, as placas foram lavadas novamente com PBST e incubadas com 100 µL/poço do PAb anti-EspA na concentração de 30 µg/mL a 37 °C por 1 h. Após as lavagens com PBST as placas foram incubadas com soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000 a 37 °C por 40 min. Novamente as placas foram lavadas com PBST e a reação foi revelada com 100 µL/poço da solução

contendo 1 µg de OPD, 1 µL de H₂O₂ em 2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0. A leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).

3.6 Avaliação da produção e liberação das proteínas EspA e EspB

3.6.1 Meios de cultura

Foram utilizadas três condições de cultivo: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), DMEM com 1% de triptona (DMEM-T) e DMEM pré-condicionado (DMEM-PC).

O meio DMEM-PC foi obtido da seguinte forma: as células HEp-2 foram cultivadas em DMEM com 10% de soro fetal bovino, após a confluência celular, as garrafas foram lavadas com PBS estéril e adicionadas DMEM sem soro a 37 °C por 2 dias em presença de CO₂. Após esse tempo o sobrenadante desse cultivo foi coletado, para posterior cultivo dos isolados bacterianos (GIRÓN et al., 2002).

3.6.2 Cultivo dos isolados

Os isolados foram cultivados partindo-se de um pré-cultivo em LB a 37 °C por 18 h. Após esse tempo os isolados foram diluídos em 1:50 em DMEM, DMEM-T e DMEM-PC sob agitação a 250 rpm a 37 °C por 6 h. Cada cultivo foi centrifugado a 13.000 x *g* por 10 min, coletado o sobrenadante e armazenados em geladeira (4 °C - 10 °C) até sua utilização.

3.6.3 ELISA indireto

ELISA indireto: microplacas MaxiSorp™ (NUNC) foram sensibilizadas com 100 µL/poço dos sobrenadantes do cultivo dos isolados. Após a incubação a 37 °C por 2 h, as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µL/poço de PBST e incubadas com 200 µL/poço de PBS contendo 1% de BSA a 37 °C por 30 min, em seguida as placas foram lavadas com PBST e incubadas com 100 µL/poço do MAb anti-EspA na concentração de 5 µg/mL ou MAb anti-EspB na concentração de 10 µg/mL ou com 30 µg/mL de PAb anti-EspA ou 30 µg/mL de PAb anti-EspB a 37 °C por 1 h. Após as lavagens com PBST as placas foram incubadas com soro de coelho anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000 ou soro de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000 e incubada a 37 °C por 40 min. Novamente as placas foram lavadas com PBST e a reação foi revelada com 100 µL/poço da solução contendo 1 µg de OPD 1 µL H₂O₂ em 2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0. A leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).

3.7 Avaliação da produção e liberação das toxinas Stx1 e Stx2

3.7.1 Cultivo dos isolados bacterianos

Os isolados de STEC e não-STECC foram pré-cultivados em 3 mL de LB a 37 °C por 18 h. Após esse período estes foram diluídos 1:100 em caldo EC contendo 5 ng/mL de ciprofloxacino e incubados a 37 °C sob agitação a 250 rpm por 4 h (ROCHA; PIAZZA, 2007). Foram realizados diferentes tratamentos no cultivo ou no sedimento, com o objetivo de definir como ocorre maior liberação das toxinas nos sobrenadantes, como descrito a seguir:

Condição I: Os cultivos bacterianos foram tratados com 2% de Triton X-100 (para cada 1,5 mL de cultivo foi adicionado 150 µL de Triton X-100 a 20%) e

incubados a 37 °C sob agitação a 250 rpm por 1 h, os sobrenadantes foram separados do sedimento por centrifugação 14.500 x *g* a 4 °C por 15 min e armazenados a - 20 °C.

Condição II: Primeiramente, 1 mL de cultura bacteriana foi centrifugada a 5.000 x *g* por 10 min e o sobrenadante foi separado do sedimento e armazenado. Posteriormente o sedimento foi lisado com 50 µL de tampão de lise (B-PER-*Bacterial Protein Extraction Reagent*, Thermo scientific), a 37 °C em agitação (250 rpm) por 1 h. Após esse tempo o sedimento lisado foi centrifugado a 15.000 x *g* por 5 min, e esse sobrenadante foi homogeneizado com o sobrenadante da cultura bacteriana obtido anteriormente e armazenado a - 20 °C

Condição III: O cultivo não foi tratado e incubado a 37 °C sob agitação a 250 rpm por 1 h, o sobrenadante foi separado do sedimento por centrifugação 14.500 x *g* a 4 °C por 15 min e armazenados a - 20 °C.

3.7.2 ELISA de captura

ELISA de captura: microplacas MaxiSorp™ (NUNC) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de PAb anti-Stx1 (10 µg/mL) ou PAb anti-Stx2 (50 µg/mL). Após a incubação a 4 °C por 18 h, as placas foram lavadas quatro vezes com 200 µL/poço de PBST e incubadas com 200 µL/poço de PBS contendo 1% de BSA a 37 °C por 30 min, as placas foram lavadas com PBST e incubadas com 100 µL/poço dos sobrenadantes do cultivo a 37 °C por 2 h. Após as lavagens com PBST as placas foram incubadas com MAb anti-Stx1 (5 µg/mL) ou MAb anti-Stx2 (5 µg/mL) a 37 °C por 1 h, as placas lavadas com PBST foram incubadas com 100 µL/poço de soro de coelho anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma) na diluição de 1:5.000 e incubadas a 37 °C por 40 min. Novamente as placas foram lavadas com PBST e a reação foi revelada com 100 µL da solução contendo 1 µg de OPD, 1 µL H₂O₂ em 2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0. A leitura foi realizada a 492 nm em leitor de ELISA (Labsystems).

3.8 Ensaio de aglutinação em látex

O ensaio de aglutinação em látex foi utilizado para a detecção de EspB em isolados de EPEC e EHEC e para a detecção das toxinas Stx1 ou Stx2 em isolados de STEC e EHEC.

3.8.1 Sensibilização das partículas de látex

Setecentos e cinquenta microlitros de uma suspensão a 2,5% de partículas de látex de 1 μm diâmetro (Polyscience, USA) foram lavadas em três tempos com PBS estéril e cada etapa foi centrifugada a $7.200 \times g$ por 6 min ou 10 min. Em seguida, a suspensão foi incubada com uma solução de glutaraldeído 8% diluída em PBS por 4 h em temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL do MAb anti-EspB na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$ diluído em PBS ou com MAb anti-Stx1 ou MAb anti-Stx2 ambos na concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, agitado lentamente por 16-18 h em temperatura ambiente, seguido do bloqueio com 1,5 mL de solução 0,2 M de etanolamina e BSA. Ambas as incubações foram feitas por 30 min sob agitação em temperatura ambiente. Após a última lavagem o sedimento foi ressuspenso em 2,5 mL de tampão de estoque (látex-MAb anti-EspB) ou em 5 mL (látex-MAb anti-Stx1 ou anti-Stx2) (Polyscience, USA) (RISTORI et al., 2006).

3.8.2 Testes de aglutinação

3.8.2.1 Detecção de EspB

Primeiramente, os isolados de EPEC, EHEC e LEE-negativos foram pré-cultivados em 3 mL de LB a 37 °C por 18 h. Após esse período estes foram semeados em placas de ágar-DMEM a 37 °C por 16-18 h. Em seguida, 20 mg dos

isolados cultivados foram diluídos em 80 µL de tampão de lise (B-PER-*Bacterial Protein Extraction Reagent*, Thermo scientific) e incubados por 15 min sob agitação em temperatura ambiente.

O teste de aglutinação foi realizado em uma placa de vidro escura por meio da adição de 20 µL de cada amostra e 20 µL de partículas de látex sensibilizadas, após 1 min e 5 min realizando movimentos circulares verificava-se a presença ou ausência de aglutinação. Os testes com isolados DEC/LEE - e com apenas o tampão de lise B-PER (controles negativo) e com o isolado E2348/69 (controle positivo) foram realizados simultaneamente aos testes com as amostra analisadas.

3.8.2.2 Detecção de Stx1 ou Stx2

Primeiramente, os isolados de STEC/EHEC e não-STECC foram pré-cultivados em 3 mL de LB a 37 °C por 18 h. Após esse período estes foram semeados em placas de ágar-*E. coli Broth* (EC, Merck, Darmstadt, Alemanha) a 37 °C por 16-18 h. Em seguida, 20 mg dos isolados cultivados foram diluídos em 80 µL de tampão de lise (B-PER-*Bacterial Protein Extraction Reagent*, Thermo scientific) e incubados por 15 min sob agitação em temperatura ambiente.

O teste de aglutinação foi realizado em uma placa de vidro escura por meio da adição de 20 µL de cada amostra e 20 µL de partículas de látex sensibilizadas, após 30 seg. e 1 min realizando movimentos circulares verificava-se a presença ou ausência de aglutinação. Os testes com isolados não-STECC e com apenas o tampão de lise B-PER (controles negativo) e com o isolado EDL933 (controle positivo) foram realizados simultaneamente aos testes com as amostra analisadas.

3.9 Avaliação da sensibilidade e especificidade do ensaio de aglutinação em látex

Avaliou-se a acurácia do ensaio de aglutinação. A acurácia é a habilidade de um teste em fornecer resultados corretos. Esta medida é dada por dois componentes: a sensibilidade e a especificidade. Sensibilidade é a probabilidade de um resultado positivo ser verdadeiramente positivo, definido pela fórmula $S = \text{verdadeiros positivos} / (\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos})$. Especificidade é a probabilidade de um resultados negativo ser verdadeiramente negativo, definido pela fórmula $E = \text{verdadeiros negativos} / (\text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos})$.

Por sua vez, a eficiência é definida pela combinação da sensibilidade e especificidade pela seguinte fórmula:

$Ef = [(\text{verdadeiros positivos} + \text{verdadeiros negativos}) / (\text{verdadeiros positivos} + \text{falsos positivos} + \text{verdadeiros negativos} + \text{falsos negativos})] \times 100$.

3.10 Análise Estatística

Os resultados foram analisados GraphPad Prism 5.01, usando o *teste t de Student* e *two-away ANOVA*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0.05$. A curva Receiver Operating Characteristic (ROC) foi empregada para determinar o *cut-off* utilizando as absorbâncias das reações obtidas por ELISA.

4. RESULTADOS

4.1 Anticorpos Monoclonais

Experiências anteriores em nosso laboratório mostraram que a seleção de hibridomas produtores de determinados anticorpos utilizando somente a proteína purificada como antígeno levava a obtenção de hibridomas produtores de MABs com especificidade variável. Sendo assim, partindo dos hibridomas produtores de MAb anti-EspA, previamente obtidos, esses foram selecionados por ELISA utilizando-se os sobrenadantes de isolados DEC LEE-positivos e *E. coli* LEE-negativos.

Dentre os hibridomas produtores de anticorpos anti-EspA comparou-se as absorbâncias na produção da proteína EspA entre os isolados LEE-positivos em relação aos LEE-negativos. Sendo assim o hibridoma 2H5 mostrou uma diferença significativa para tEPEC, aEPEC e EHEC ($p < 0,0001$, $p = 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente), o 2H9 ($p = 0,0013$, $p = 0,0443$ e $p = 0,0042$, respectivamente) e o 3C12 ($p < 0,0001$, $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Já o hibridoma 3G4 mostrou uma diferença significativa para tEPEC ($p = 0,0293$) e EHEC ($p = 0,0233$), o hibridoma 3E12 para tEPEC ($p = 0,0156$) e aEPEC ($p = 0,0229$), e para o hibridoma 3B8 essa diferença foi somente para aEPEC ($p = 0,0415$). Por outro lado, os hibridomas 2H1, 4H4 e 2B12 e a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-EspA não apresentaram diferenças significantes nas absorbâncias dos grupos analisados (**Figura 2**).

A pesquisa da reatividade desses anticorpos testados com diferentes isolados produtores e não-produtores de EspA foi importante na seleção do clone. Portanto, os hibridomas (K0) selecionados para a diluição limite foram o 3E12 e 3C12 que apresentaram diferenças significativas nas absorbâncias entre os isolados testados LEE-positivos e LEE-negativos.

Figura 2 - Análise dos hibridomas produtores de anticorpos anti-EspA e da fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-EspA utilizando sobrenadantes dos cultivos de EPEC típica, EPEC atípica, EHEC e *E. coli* LEE-negativa por ELISA indireto. As setas indicam os clones selecionados.

Após a primeira diluição limite, foram obtidos nove clones a partir do hibridoma 3E12 e um clone a partir do hibridoma 3C12, que foram testados por ELISA indireto para a avaliação da produção de anticorpos anti-EspA. O clone (K1-3C12) foi selecionado e cultivado em garrafa de cultivo celular para posterior purificação do MAb anti-EspA.

O MAb anti-EspA, foi classificado por ELISA como do isotipo IgG2a e mostrou uma interação eficiente com o seu antígeno, como uma constante de dissociação (K_D) de $1,66 \times 10^{-10}$ M e limite de detecção de 19 ng/mL. Por *immunoblotting* o anticorpo reconheceu sua proteína alvo, um componente de massa molecular aparente de 25 kDa referente a EspA (**Tabela 2**).

Os MAbs anti-EspB, anti-Stx1 e anti-Stx2 foram obtidos e caracterizados anteriormente (ROCHA et al., 2012; ROCHA, 2012). O MAb anti-EspB, obtido a partir do clone 4D9 foi classificado como do isotipo IgG2a, com K_D de 2×10^{-9} M e por *immunoblotting* o anticorpo reconheceu sua proteína alvo, um componente de massa molecular aparente de 37 kDa referente a EspB (**Tabela 3**). O MAb anti-Stx1, obtido a partir do clone 3E2 foi classificado como do isotipo IgG1, com K_D de $2,5 \times 10^{-10}$ M e por *immunoblotting* o anticorpo reconheceu a subunidade B da toxina Stx1 (**Tabela 3**). O MAb anti-Stx2, obtido a partir do clone 2E11 foi classificado como do isotipo IgG1, com K_D de $6,1 \times 10^{-10}$ M e por *immunoblotting* o anticorpo reconheceu a subunidade A da toxina Stx2 (**Tabela 3**).

Todos os anticorpos purificados apresentaram um alto grau de pureza quando foram analisados por SDS-PAGE em condições redutoras e observou-se dois componentes de massa molecular aparente de 50 kDa e 25 kDa, referentes as cadeias pesada e leve do anticorpo, respectivamente.

Tabela 2 - Características do anticorpo monoclonal Anti-EspA

Características	Anticorpo Monoclonal Anti-EspA
Nome	3C12
Isotipo IgG	IgG2a
Constante de dissociação (K_D)	$1,66 \times 10^{-10}$
Limite de detecção	19 ng/mL
Proteína alvo	EspA
Immunoblotting

Tabela 3 - Características dos anticorpos monoclonais anti-EspB, anti-Stx1 e anti-Stx2.

Características	Anticorpos Monoclonais		
	Anti-EspB	Anti-Stx1	Anti-Stx2
Nome	4D9	3E2	2E11
Isotipo IgG	IgG2a	IgG1	IgG1
Constante de dissociação (K_D)	2×10^{-9} M	$2,5 \times 10^{-10}$ M	$6,1 \times 10^{-10}$ M
Proteína alvo	EspB	Stx1	Stx2
Immunoblotting

Fonte: Adaptado de ROCHA, 2012; ROCHA et al., 2012

4.2 Anticorpos Policlonais

O título do soro de coelho anti-EspA foi de 1:10.240 e o limite de detecção de 78 ng/mL. O título do soro de coelho anti-EspB foi de 1:40.960 e o limite de detecção de 156 ng/mL (ROCHA, 2012) (**Tabela 4**). No *immunoblotting* os PABs anti-EspA e anti-EspB reconheceram as respectivas proteínas EspA e EspB (**Figura 3**).

Tabela 4 - Características dos anticorpos policlonais anti-EspA e anti-EspB

Características	Anticorpo Policlonal	
	Anti-EspA	Anti-EspB*
Título do soro	1:10.240	1:40.960
Proteína alvo	EspA	EspB
Limite de detecção	78 ng/mL	156 ng/mL

*Fonte: Adaptado de ROCHA, 2012

Figura 3 - *Immunoblotting*. Membrana de nitrocelulose contendo a fração proteica EspA ou EspB purificadas incubada com 1) PAB anti-EspA. 2) PAB anti-EspB.

As frações enriquecidas em IgG (PAbs) dos soros de coelho anti-Stx1 e anti-Stx2 (ROCHA, 2012), apresentaram títulos altos 1: 80.000 (**Tabela 5**). Por *immunoblotting* os PAbs anti-Stx1 e anti-Stx2 reconheceram ambas subunidades das respectivas toxinas Stx1 e Stx2 (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Características dos anticorpos policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2

Características	Anticorpos Policlonais	
	Anti-Stx1	Anti-Stx2
Título do soro	1:80.000	1:80.000

Proteína alvo

Stx1

Stx2

Immunoblotting

Fonte: Adaptado de ROCHA, 2012

4.3 Avaliação da produção/secreção das proteínas EspA/EspB

Em nosso laboratório testaram diferentes meios de cultura (*E. coli* Broth (Caldo EC), Trypticase Soy Broth (TSB) e Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)) para a avaliação da produção de EspB em isolados bacterianos (EPEC e EHEC), neste estudo o DMEM foi o mais eficaz na indução da produção de EspB no intervalo de 4-6 h de cultivo bacteriano (CARDOSO, 2010). Sendo assim, avaliou-se a reatividade dos anticorpos monoclonais e policlonais anti-EspA e anti-EspB em sobrenadantes de isolados de EPEC e EHEC cultivados em DMEM, DMEM contendo triptona (DMEM-T) e DMEM pré-condicionado (DMEM-PC).

Não se observou nenhuma diferença estatística na secreção de EspA nas três condições de cultivo testadas para os isolados de tEPEC e EHEC, empregando-se MAb ou PAb anti-EspA. Como mostra a figura 4 [A/tEPEC ($p=0,242$) e A/EHEC ($p=0,460$) e B/tEPEC ($p=0,565$), B/EHEC ($p=0,085$)], enquanto que a produção de EspA por aEPEC foi significativamente diferente [A/aEPEC ($p=0,0002$) e B/aEPEC ($p=0,0001$)] (**Figura 4**).

Figura 4 - Produção de EspA em diferentes condições de cultivo DMEM, DMEM-T e DMEM-PC. Os sobrenadantes foram testados por ELISA indireto, utilizando (A) anticorpo monoclonal anti-EspA e (B) a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-EspA com isolados de EPEC típica, EPEC atípica, EHEC.

Quando foi utilizado MAb anti-EspB apenas a produção de EspB por isolados de EHEC não mostrou diferença [A/EHEC ($p=0,320$)] entre as condições de cultivo, mas foi significativamente diferente para aEPEC e tEPEC [A/aEPEC ($p=0,0001$), A/tEPEC ($p=0,04$)]. Quando se utilizou PAb anti-EspB a produção de EspB foi estatisticamente diferente nas condições de cultivo para aEPEC e tEPEC [B/aEPEC ($p=0,029$), B/tEPEC ($p=0,035$)], mas não mostrou diferença para EHEC [B/EHEC ($p=0,155$)] (**Figura 5**).

Na análise comparativa da produção de EspB, observou-se que a produção de EspB foi melhor em DMEM comparando com o DMEM-T ($p<0,0001$), ou DMEM com o DMEM-PC ($p=0,003$), mas não foi observado diferença entre DMEM-T e DMEM-PC ($p=0,129$) na produção de EspB.

Figura 5 - Produção de EspB em diferentes condições de cultivo DMEM, DMEM-T e DMEM -PC. Os sobrenadantes foram testados por ELISA indireto, utilizando (A) anticorpo monoclonal anti-EspB e (B) a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-EspB com isolados de EPEC típica, EPEC atípica, EHEC.

Comparando a produção de EspB em 125 isolados LEE-positivos e 29 isolados LEE-negativos quando cultivados em DMEM, utilizando MAb anti-EspB a sensibilidade foi de 92,8% e especificidade de 93,7%, obtidos por análise da curva ROC com o *cut-off* de 0,016 e quando foi utilizado PAb anti-EspB a sensibilidade foi de 85,3% e especificidade de 88,9%, obtidos por análise da curva ROC com o *cut-off* de 0,096 (**Figura 6**). Baseados nestes dados, o anticorpo monoclonal foi escolhido para sensibilização do látex para a avaliação do teste de aglutinação.

Figura 6 - Produção de EspB em diferentes condições de cultivo DMEM, DMEM-T e DMEM -PC em isolados LEE-positivos e isolados LEE-negativos. Os sobrenadantes foram testados por ELISA indireto, utilizando **(A)** anticorpo monoclonal anti-EspB e **(B)** a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-EspB.

4.4 Ensaio de aglutinação em látex para a detecção de EspB

A EspB foi definida com biomarcador e o MAb anti-EspB foi selecionado, por apresentar excelente sensibilidade e especificidade por ELISA indireto para o

diagnóstico de EPEC e EHEC, portanto foi avaliado o ensaio de aglutinação em látex, pois este apresenta vantagens na rotina clínica. A **figura 7** representa um resultado positivo e um resultado negativo com o tempo de leitura até 5 minutos.

Figura 7 - Teste de aglutinação em látex para a detecção de EspB. **A)** Resultado positivo. **B)** Resultado negativo.

Os testes realizados com isolados de EPEC, EHEC e LEE-negativos, apresentaram uma sensibilidade de 97%, especificidade de 96,7% e eficiência de 97%. Os resultados separadamente encontram-se na **tabela 6**.

Tabela 6 - Reatividade (%) do ensaio de aglutinação em látex-EspB com isolados bacterianos

Patotipo	Número de isolados bacterianos	Presença do gene <i>espB</i>	Reatividade (%)	Total
aEPEC	71	+	98.6	70/71
tEPEC	31	+	90.3	28/31
EHEC	23	+	100	23/23
DEC/LEE ⁻	6	-	0	0/6
<i>E. coli</i> SFV	6	-	0	0/6
Enterobactérias spp.	17	-	5.9	1*/17

tEPEC (*E. coli* enteropatogênica típica); aEPEC (*E. coli* enteropatogênica atípica); EHEC (*E. coli* enterohemorrágica); DEC/LEE⁻ (*E. coli* diarreio gênica LEE-negativa); *E. coli* SFV (*E. coli* sem fatores de virulência de DEC).

**Proteus mirabilis*

4.5 Avaliação da produção e liberação da toxina de Shiga

Rocha e Piazza (2007) testaram diferentes meios de cultura como: Luria-Bertani (LB), Evans, Syncase, Penassay, Trypticase Soy Broth (TSB), Brain Heart Infusion (BHI), *E. coli* Broth (EC) e Buffer-peptone water (BPW) para a avaliação da produção das toxinas Stx1 e Stx2 em isolados de STEC. Como resultado, o cultivo por 4 h em caldo EC na presença de ciprofloxacino foi o mais eficaz na indução da produção de Stx1 e Stx2. Sendo assim, avaliou-se diferentes condições de tratamento com a finalidade de aumentar a liberação e portanto a detecção das toxinas nos sobrenadantes dos cultivos bacterianos.

No ELISA de captura para definir a produção e liberação da Stx1 nas condições de tratamento do cultivo com Triton X-100 (condição I), tratamento do sedimento com tampão de lise B-PER (condição II) e no cultivo e sedimento não tratados (condição III) utilizou-se a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-Stx1 e MAb anti-Stx1 e não se observou diferença na produção dessa toxina ($p=0,228$) entre as condições empregadas (**Figura 8 A**). Na definição da produção e liberação de Stx2 nas três condições, utilizando a fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-Stx2 e MAb anti-Stx2, observou-se diferença na produção dessa toxina ($p=0,0274$), que foi superior na condições I (**Figura 8 B**).

Figura 8 - ELISA de captura para a detecção de Stx1 ou Stx2 nos sobrenadantes dos cultivos bacterianos nas condições I, II e III. **A)** Detecção de Stx1 em isolados de STEC produtores de Stx1 e Stx1/Stx2 com MAb e PAb-anti-Stx1: sobrenadantes dos cultivos de STEC na condição I (**vermelho**), sobrenadantes dos cultivos de STEC na condição II (**verde**) e sobrenadantes dos cultivos de não-STECS na condição III (**azul**); **B)** Detecção de Stx2 em isolados produtores de Stx2 e Stx1/Stx2 com MAb e PAb-anti-Stx2: sobrenadantes dos cultivos de STEC na condição I (**vermelho**), sobrenadantes dos cultivos de STEC na condição II (**verde**) e sobrenadantes dos cultivos de STEC na condição III (**azul**).

Condição I: Tratamento do cultivo com Triton X-100;

Condição II: Tratamento do sedimento com tampão de lise B-PER;

Condição III: Cultivo e sedimento não tratados.

Comparando a liberação das toxinas em isolados de STEC produtores de Stx1 e/ou Stx2 e isolados não-STECS nas três condições (**Figura 9**), utilizando MAb e PAb anti-Stx1 ou anti-Stx2, a condição I ou seja o tratamento do cultivo com Triton X-100 resultou em melhor sensibilidade e melhor especificidade (**Tabela 7**). Desta forma, este tratamento proporcionou uma maior liberação das toxinas para o sobrenadante, possibilitando a detecção de ambas toxinas nos ensaios de ELISA de captura.

Figura 9 - A) Produção de Stx1 em diferentes condições de tratamento do cultivo de isolados de STEC produtores de Stx1 e Stx1/Stx2 e isolados não STEC. Os sobrenadantes do cultivo foram testados por ELISA de captura, utilizando MAb e PAb anti-Stx1. **B)** Produção de Stx2 em diferentes condições de tratamento do cultivo de isolados de STEC produtores de Stx2 e Stx1/Stx2 e isolados não STEC. Os sobrenadantes do cultivo foram testados por ELISA de captura, utilizando MAb e PAb anti-Stx2.

Condição I: Tratamento do cultivo com Triton X-100;

Condição II: Tratamento do sedimento com tampão de lise B-PER;

Condição III: Cultivo e sedimento não tratados.

Tabela 7 - Cut-off obtido para as três condições para Stx1 e Stx2 por análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristics*) e a sensibilidade e especificidade.

Amostras	Condição I		Condição II		Condição III	
	Stx1	Stx2	Stx1	Stx2	Stx1	Stx2
Cut-off	>0.280	>0.023	>0.281	>0.025	>0.320	>0.030
Sensibilidade	100%	100%	94,6%	88,9%	100%	77,8%
Especificidade	100%	95.6%	100%	95,6%	100%	100%

O anticorpo monoclonal anti-Stx2 reconheceu isolados produtores de apenas Stx1 quando o cultivo foi tratado com Triton X-100 e com o tampão de lise por reatividade cruzada (**Figura 10 A**), já o anticorpo anti-Stx1 não reconheceu nenhum isolado de STEC produtora de apenas Stx2 (**Figura 10 B**).

Desta forma, como o ideal é empregar uma condição única que permita à produção e liberação de ambas toxinas, e tendo visto um maior nível de produção e

liberação de Stx2 no sobrenadante do cultivo tratado com Triton X-100, decidiu-se optar por esse tratamento nos ensaios de ELISA de captura.

Figura 10 - ELISA de captura para a detecção de reatividade cruzada na identificação de Stx1 ou Stx2 no sobrenadante dos cultivos bacterianos na condição I, condição II e condição III. **A)** Reatividade cruzada em isolados de STEC produtores de Stx1, utilizando MAb e PAb-anti-Stx2: sobrenadantes dos cultivos de STEC na condição I (**verde**), sobrenadantes dos cultivos na condição II (**vermelho**) e sobrenadantes dos cultivos de STEC na condição III (**azul**). **B)** Reatividade cruzada em isolados produtores de Stx2 com MAb e PAb-anti-Stx1: sobrenadantes dos cultivos de STEC na condição I (**verde**), sobrenadantes dos cultivos na condição II (**vermelho**) e sobrenadantes dos cultivos de STEC na condição III (**azul**).

Condição I: Tratamento do cultivo com Triton X-100;

Condição II: Tratamento do sedimento com tampão de lise B-PER;

Condição III: Cultivo e sedimento não tratados.

4.6 Ensaio de aglutinação em látex para a detecção de Stx1 ou Stx2

As toxinas de Shiga foram definidas com biomarcadores e os MAb anti-Stx1 e MAb anti-Stx2 foram selecionados para o ensaio de aglutinação em látex. A **figura 11** representa um resultado positivo e um resultado negativo com o tempo de leitura até 30 seg.

Figura 11 - Teste de aglutinação em látex para a detecção de Stx1 ou Stx2. **A)** Resultado positivo. **B)** Resultado negativo.

Os testes realizados com isolados de STEC e não-STEC, quando foi utilizado MAb anti-Stx1, testando os isolados de STEC produtores de Stx1, apresentaram uma sensibilidade de 97,3%, especificidade de 85% e eficiência de 92,2%. Quando foi utilizado MAb anti-Stx2, testando isolados produtores de Stx2, apresentaram uma sensibilidade de 79,4%, especificidade de 82% e eficiência de 81%. O MAb anti-Stx1 reconheceu os isolados de STEC produtores de Stx2 com uma reatividade de 92,9% e o MAb anti-Stx2 reconheceu os isolados de STEC produtoras de Stx1 com uma reatividade de 86,9%. O tempo de leitura foi de 30 segundos e os resultados separadamente encontram-se na **tabelas 8 e 9**.

Tabela 8 - Reatividade (%) do ensaio de aglutinação em látex-Stx1 com isolados bacterianos

Patotipo	Número de isolados bacterianos	Presença do gene <i>stx</i>	Reatividade (%)	Total
STEC (Stx1 e Stx1/Stx2)	36	+	97,2	35/36
STEC (Stx2)	14	+	92,9	13/14
DEC não-STEC	5	-	20	1*/5
<i>E. coli</i> SFV	5	-	0	0/5
Enterobactérias spp.	13	-	23	3*/13

STEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga); DEC não-STEC (*E. coli* diarreiogênica não-STEC); *E. coli* SFV (*E. coli* sem fatores de virulência de DEC).

*EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), *Enterobacter cloacae*, *Providencia* e *Shigella flexneri*.

Tabela 9 - Reatividade (%) do ensaio de aglutinação em látex-Stx2 com isolados bacterianos

Patotipo	Número de isolados bacterianos	Presença do gene <i>stx</i>	Reatividade (%)	Total
STEC (Stx2 e Stx1/Stx2)	27	+	74,0	20/27
STEC (Stx1)	23	+	86,9	20/23
DEC não-STEC	5	-	0	0/5
<i>E. coli</i> SFV	5	-	20	1*/5
Enterobactérias spp.	13	-	30,8	4*/13

STEC (*E. coli* produtora da toxina de Shiga); DEC não-STEC (*E. coli* diarreio gênica não-STEC); *E. coli* SFV (*E. coli* sem fatores de virulência de DEC)

* *E. coli* SFV, *Enterobacter cloacae*, *Providencia*, *Shigella flexneri* e *Klebsiella pneumoniae*

5. DISCUSSÃO

Globalmente, ocorrem cerca de 1,7 bilhões de casos de doenças diarreicas (WHO, 2013b), e dentre os patógenos causadores de diarreia a *E. coli* diarreiogênica (DEC) é o agente etiológico bacteriano mais comum (CLEMENTS et al., 2012). Nos primeiros 5 anos de vida uma em cada dez mortes de crianças é resultante de doença diarreica (c.a. 800.000 mortes), ocorrendo principalmente na África Subsaariana, sul da Ásia e América Latina (KOTLOFF et al., 2013). Estes dados epidemiológicos mostram a importância do diagnóstico precoce e a sua realização em locais com pouca infraestrutura (URDEA et al., 2006).

O diagnóstico precoce evita o agravamento do quadro clínico do paciente, já que o tratamento com antibiótico em infecções causadas por STEC não é recomendado, pois o seu uso induz maior produção das toxinas de Shiga, permitindo assim sua disseminação (CLEMENTS et al., 2012). Além disto, o diagnóstico permite a notificação rápida de surtos, implementação de medidas de controle e detecção de cepas emergentes (DE BOER; HEUVELINK, 2000; ATKINSON et al., 2012), sendo assim, um ponto chave para a conduta terapêutica e consequentemente para o controle da doença. No entanto, o diagnóstico de DEC é bastante limitado na detecção dos fatores de virulência relacionados a cada patógeno, utilizando principalmente métodos moleculares que são inviáveis na rotina de laboratórios clínicos de países em desenvolvimento.

Neste contexto, o Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan tem como uma de suas linhas de pesquisa o desenvolvimento de métodos imunossorológicos para o diagnóstico desses patógenos. Para tanto, anticorpos policlonais e monoclonais contra alguns dos fatores de virulência foram obtidos e caracterizados (MENEZES et al., 2006; MENEZES et al., 2010; MENDES-LEDESMA et al., 2008; ROCHA; PIAZZA, 2007; ROCHA et al., 2012; 2013; ROCHA, 2012). O objetivo proposto inicialmente para este trabalho era a determinação da sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico desenvolvido e padronizado manualmente *in house* para o diagnóstico de STEC e ETEC (ROCHA, 2012). No entanto, a produção em larga escala exige equipamentos automatizados, cuja padronização e montagem das fitas em escala industrial foi idealizada em um contrato de cooperação com uma indústria de biotecnologia situada em Porto

Alegre, RS. Nos testes iniciais de padronização foram definidos alguns parâmetros, como a concentração de MAb anti-Stx1 e anti-Stx2 a serem aplicados na linha teste (3 mg/mL), a absorbância do ouro coloidal conjugado com os PABs anti-Stx1 ou anti-Stx2 (DO=50) e os limites de detecção para Stx1 e Stx2 (10 ng/mL), no entanto, surgiram alguns problemas que dificultaram a produção das fitas, como a perda da estabilidade dos anticorpos monoclonais e do ouro coloidal conjugado com os PABs, provavelmente por conta do transporte até a indústria, já que o ouro coloidal foi conjugado em São Paulo. Sendo assim, não foi possível finalizar os estudos de sensibilidade e especificidade do teste imunocromatográfico.

Como alternativa, decidiu-se utilizar os anticorpos já obtidos, padronizar e avaliar um teste de aglutinação em látex para a detecção de Stx em isolados de STEC e comparar ao ensaio de ELISA também padronizado no laboratório. Além disso, analisou-se as proteínas secretadas, EspA e EspB como possíveis alvos para o diagnóstico de EPEC e EHEC, e se definiu EspB como biomarcador para esse diagnóstico levando-nos também a padronização e avaliação de um teste de aglutinação em látex comparando-o ao ensaio de ELISA padronizado no laboratório.

Para a detecção desses patógenos, a produção dos fatores de virulência é essencial (MENEZES et al., 2006; ROCHA; PIAZZA, 2007; ROCHA et al., 2012; VILHENA-COSTA et al., 2006). Os fatores de virulência codificados pela região LEE, como a intimina e as proteínas secretadas são conservados em EPEC e EHEC, sendo excelentes alvos para o diagnóstico dessas categorias (ABE et al., 1998). A intimina foi descrita como primeiro alvo para o diagnóstico, principalmente a região conservada (*Int*₃₈₈₋₆₆₇) (ADU-BOBIE et al., 1998; BATCHELOR et al., 1999; KOGA et al., 2003; MENEZES et al., 2010; CARAVELLI et al., 2013) seguido das proteínas secretadas EspA e/ou EspB que são importantes na virulência de ambos patógenos (ABE et al., 1998).

Vários trabalhos destacam o papel de EspA e/ou EspB na patogenidade de EPEC e EHEC (ABE et al., 1998; ABE et al., 1997; CREPIN et al., 2005; JARVIS; KAPER, 1996; KENNY et al., 1997a; ROSENSHINE; RUSCHKOWSKI; FINLAY, 1996), mas, poucos avaliaram a aplicação dessas proteínas como antígenos alvo no diagnóstico desses patógenos (LU et al., 2002; NAKASONE et al., 2007). Sendo assim, no presente trabalho avaliou-se a reatividade dos anticorpos monoclonais e policlonais anti-EspA e anti-EspB frente à diferentes isolados de EPEC e EHEC e definiu-se a condição de cultivo para a secreção das proteínas EspA/EspB.

A produção e liberação dos fatores de virulência em EPEC e EHEC, assim como em outras enterobactérias são fortemente reguladas e respondem aos estímulos ambientais, tais como a osmolaridade, temperatura, pH, concentrações de íons, nutrientes e oxigenação (KENNY et al., 1997a; SCHULLER; PHILLIPS, 2010). Inicialmente, em nosso laboratório foram testados diferentes meios de cultura [*E. coli* Broth (Caldo EC), Trypticase Soy Broth (TSB) e Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)] para a avaliação da produção de EspB em isolados de EPEC e EHEC. Como resultado observou-se maior indução na produção de EspB quando os isolados bacterianos foram cultivados em DMEM no intervalo de 4-6 h de cultivo (CARDOSO, 2010).

O DMEM é composto por $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, CaCl_2 , KCl, MgSO_4 , NaCl, Na_2HPO_4 , NaHCO_3 , além de aminoácidos, vitaminas, dentre outros componentes (glicerol, fenol, HEPES e piruvato de sódio). Vários estudos investigaram qual dos componentes de DMEM induziria a produção das proteínas secretadas (EspA e EspB) (KENNY, et al., 1997a; ABE et al., 2002). Kenny et al. (1997a), mostraram que a presença de vitaminas não influenciava a produção das proteínas secretadas, mais quando foi omitido o NaCl ou CaCl_2 ou $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ a secreção foi reduzida. Em contraste, o aumento da concentração de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ levou ao aumento da secreção dessas proteínas, e, a redução na concentração de NaHCO_3 inibiu a secreção. A presença de KCl, MgSO_4 e Na_2HPO_4 foram essenciais para o crescimento bacteriano, mas não houve diferença na secreção das proteínas. Em outro estudo, foi observado que isolados de EHEC cultivados em DMEM aderem de forma mais eficiente em células Caco-2 do que quando cultivados em LB, e dentre os componentes de DMEM, somente o NaHCO_3 mostrou algum estímulo na adesão bacteriana, pois e quando o LB foi suplementado com NaHCO_3 a produção de intimina, Tir, EspA e EspB foi aumentada (ABE et al., 2002).

Kenny et al. (1997a) determinaram que a secreção das proteínas não foi dependente de CO_2 , mas este foi importante por atuar como um agente de tamponamento para o NaHCO_3 mantendo o pH aproximadamente 7.4. No entanto, altos níveis de secreção foram detectados em meios de cultivo contendo HEPES ou Tris-HCl na ausência de CO_2 . Outros estudos, mostraram que o acúmulo de CO_2 diminui o crescimento bacteriano e induz a secreção das proteínas efetoras, a explicação para essa indução não está totalmente esclarecida, mas se acredita que a difusão de CO_2 possa aumentar a quantidade de bicarbonato intracelular e

consequentemente induzir a expressão e secreção de EspB (MARTÍNEZ et al., 2012). Anteriormente, a coleção de EPEC e EHEC foi cultivada em DMEM contendo triptona na presença de CO₂ (MUNHOZ, 2012), ao comparar com os resultados obtidos neste trabalho, concluiu-se que a secreção não foi dependente de CO₂, corroborando com os resultados de Kenny et al. (1997a). A produção e liberação de proteínas efetoras podem ser induzidas *in vitro* por bactérias cultivadas em meio de cultura de células (IDE et al., 2003) e tem sido descrito que o uso de DMEM pré-condicionado induz a expressão dos fatores de virulência (GIRÓN et al., 2002). Além disso, a adição de triptona em DMEM aumentou a secreção da toxina *plasmid-encoded toxin* (Pet) por isolados de *E. coli* enteroagregativa (BETANCOURT-SANCHEZ; NAVARRO-GARCIA, 2009)

Esses dados levaram-nos a uma análise comparativa na produção das proteínas secretadas cultivando-se os isolados de EPEC e EHEC em DMEM, DMEM-triptona (DMEM-T) e DMEM pré-condicionado (DMEM-PC). Sendo, esse experimento a chave central para definição de EspB como alvo para o diagnóstico de EPEC e EHEC. Nas três condições de cultivo a produção/secreção de EspB foi significativamente maior comparando com a produção de EspA. Com o MAb anti-EspB observou-se o melhor resultado por ELISA (S=92,8% e E=93,7%) e na análise comparativa da produção de EspB, os resultados indicaram que a produção foi melhor quando os isolados foram cultivados em DMEM comparando com DMEM-T ($p<0.0001$) ou DMEM comparando com DMEM-PC ($p=0.003$), mas não foi observado diferença entre DMEM-T e DMEM-PC ($p=0.129$). Mesmo não comparando EspA com EspB, Lu et al. (2002) e Nakasone et al. (2007 e 2011) definiram a mesma condição de cultivo e EspB como antígeno alvo para o diagnóstico de EPEC/EHEC. O ELISA é um excelente método de diagnóstico que pode ser utilizado em laboratórios que dispõem de um espectrofotômetro, no entanto o ideal seria um método para laboratórios com pouca infraestrutura. Desta forma, decidiu-se padronizar e avaliar o teste de aglutinação em látex para detecção de EPEC e EHEC, utilizando partículas de látex sensibilizadas com MAb anti-EspB.

No ensaio de aglutinação em látex aqui desenvolvido os isolados foram cultivados em meio sólido, DMEM-ágar e as colônias bacterianas foram lisadas e misturadas com a suspensão de látex e o resultado visualizado em até 5 min, apresentando uma sensibilidade de 97% e especificidade de 96,7%. Na comparação do ensaio desenvolvido neste trabalho com o ensaio de aglutinação descrito na

literatura, algumas diferenças merecem ser ressaltadas, os autores cultivam os isolados bacterianos em DMEM líquido e o sobrenadante do cultivo é adicionado juntamente com as partículas de látex em placas, e a leitura é realizada entre 16 e 18 h, apresentando 100% de sensibilidade e de especificidade (LU et al., 2002).

Esse mesmo grupo de pesquisa desenvolveu um teste imunocromatográfico para a detecção da presença de EspB em isolados de EPEC e EHEC que apresentou 96,9% de sensibilidade e 100% especificidade (NAKASONE et al., 2007). Os autores desconhecem a concentração de EspB em amostras de fezes diarreicas de pacientes quando o agente etiológico é a EPEC ou a EHEC, mas acreditam que o teste realizado diretamente das fezes teria uma sensibilidade e especificidade muito baixa, sendo necessário sempre seu pré-enriquecimento. Pela aglutinação em látex apenas *Proteus mirabilis* apresentou uma reação inespecífica, no entanto, ele é facilmente diferenciado de *E. coli* por métodos bioquímicos e pela morfologia das colônias. Já algumas bactérias entéricas como o *Citrobacter* e *Escherichia albertii* tem a região LEE, portanto produzem EspB, e poderiam apresentar reatividade com o anticorpo anti-EspB, no entanto, não tem relevância epidemiológica (AGIN et al., 1996; NEWMAN et al., 1999). No teste, quatro isolados foram falso-negativos, o que pode ser explicado pelo fato de que alguns isolados produzem pouca quantidade de EspB ou não produzem (NAKASONE et al., 2011). Isso poderia ter sido contornado utilizando-se agentes lisantes, visto que relato na literatura que conta com a utilização de vários detergentes (ácido cólico, ácido deoxicólico, Triton X-100 e Nonidet P-40) adicionados ao cultivo de isolados de EPEC e EHEC em meio LB, indicam uma maior liberação de EspB, nessas condições, o que estaria relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana, facilitando a secreção das proteínas efetoras sem causar a lise bacteriana (NAKASONE et al., 2011).

Em relação a STEC, a notificação dos casos é obrigatória em vários países, no entanto, o diagnóstico de STEC em laboratório de rotina é difícil, pois se assemelham em muitos aspectos a *E. coli* comensal, além de estarem em minoria na microbiota fecal dos pacientes (cerca de 1 EHEC para cada 200-300 *E. coli*) (TORRES et al., 2010). Apenas fatores de virulências específicos como a presença da toxina de Shiga que é comum a todas as STEC permite diferencia-las das outras *E. coli* (BETTELHEIM, 2007; PATON; PATON, 1998).

Uma forma de identificar STEC em qualquer tipo de amostra é pela detecção da toxina de Shiga por diferentes ensaios imunossorológicos (ELISA, *immunoblotting* e ensaios de aglutinação) (BETTELHEIM; BEUTIN, 2003). No entanto, para a detecção desse patógeno, a produção e liberação das toxinas de Shiga são fundamentais, o que leva a indicação de pré-enriquecimento da amostra (BETTELHEIM; BEUTIN, 2003). Vários meios de enriquecimento seletivo foram descritos, tais como o TSB com novobiocina e Caldo *E. coli* com novobiocina (DE BOER; HEUVELINK, 2000). Outros estudos tem recomendado o uso de outros antibióticos que induzem a produção de Stx, tais como azitromicina, imipenem, rifampicina, gentamicina, norfloxacino (NASSAR et al., 2013) e ciprofloxacino em concentrações subinibitórias (NEUPANE et al., 2011).

Rocha e Piazza (2007) testaram diferentes meios de cultura: LB, Evans, Syncase, Penassay, TSB, BHI, EC e BPW para a avaliação da produção das toxinas Stx1 e Stx2 em isolados de STEC. Melhor indução na produção de Stx1 e Stx2 foi observada quando os isolados foram cultivados em caldo EC na presença de ciprofloxacino por 4 h. No presente trabalho avaliou-se diferentes condições de tratamento do cultivo ou do sedimento bacteriano, a reatividade dos anticorpos monoclonais e policlonais anti-Stx1 e anti-Stx2 com diferentes isolados de STEC/EHEC e validou-se o teste de aglutinação em látex para a detecção de Stx1 ou Stx2 utilizando anticorpos monoclonais.

Como alguns isolados bacterianos apresentam baixa produção de Stx, decidiu-se averiguar se o tratamento do cultivo bacteriano com Triton X-100 ou do sedimento com tampão de lise B-PER aumentaria a liberação das toxinas para o sobrenadante do cultivo, e conseqüentemente melhoraria a detecção destas toxinas. Para Stx1 não houve diferença entre o tratamento com Triton X-100 e o cultivo não tratado, pois pelo ensaio de ELISA, ambos tratamentos levaram a 100% sensibilidade e especificidade na detecção desta toxina nos diferentes isolados. Já o tratamento do sedimento bacteriano com B-PER foi menos eficaz, diminuindo a sensibilidade do ensaio para 94,6%. Também observou-se melhor liberação de Stx2 quando o cultivo bacteriano foi tratado com Triton X-100, pois pelo ensaio de ELISA, este tratamento levou a um teste 100% sensível e 95,6% específico na detecção desta toxina, condição esta semelhante para a liberação da toxina termolábil (LT) de ETEC. Uma explicação para isto, seria que alguns isolados mantêm a toxina no espaço periplasmático e secretam uma pequena quantidade de toxina, mantendo

outra parte internalizada (LASARO et al., 2006), sendo necessário assim, a lise bacteriana para que ocorra a liberação da toxina para o sobrenadante.

Nos ensaios de ELISA de captura o anticorpo monoclonal anti-Stx2 reconheceu também isolados produtores de Stx1 quando os cultivos foram tratados, esse reconhecimento de ambas toxinas é vantajoso na identificação de STEC. Já o anticorpo anti-Stx1 não reconheceu nenhum isolado de STEC produtora de Stx2, sendo que a homologia na sequência de aminoácidos entre Stx1 e Stx2 é de 55% - 57% entre as subunidades A e B, respectivamente (NATARO; KAPER, 1998).

Ao longo dos anos, vários métodos imunossorológicos tem sido desenvolvidos para a detecção de Stx e estão disponíveis comercialmente, no entanto, o preço desses ensaios impossibilita seu uso em laboratórios clínicos de países em desenvolvimento. Os testes de ELISA são bastantes utilizados, pois apresentam uma metodologia fácil, no entanto, convém ressaltar que as fezes devem ser sempre pré-enriquecidas antes da realização do ensaio. O *premier* EHEC detecta a toxina Stx1 e Stx2 e apresenta 100% de sensibilidade e 99,7% de especificidade (KEHL et al., 1997; BETTELHEIM; BEUTIN, 2003). O *Ridascreen* detecta ambas toxinas, e é um ensaio de ELISA de captura com sensibilidade e especificidade equivalente ao PCR, no entanto, mais rápido e mais prático (BETTELHEIM; BEUTIN, 2003). O *ProSpecT Shiga Toxin* detecta ambas toxinas e não diferencia Stx1 de Stx2, com uma sensibilidade de 93% (GAVIN et al., 2004). O ELISA padronizado neste trabalho apresentou 100% de sensibilidade e especificidade para Stx1 e 100% de sensibilidade e 95,6% de especificidade para Stx2, compatíveis aos testes comerciais previamente descritos.

Outro método utilizado para a detecção de Stx é a aglutinação em látex que apresenta vantagens, pois não necessita de equipamentos para a realização do teste. O *kit* comercial, denominado VTEC-Screen (teste de aglutinação passiva em látex) detecta Stx1 e Stx2 em sobrenadantes dos cultivos bacterianos tanto em meio líquido (CA-YE broth) ou em meio sólido (BHI Agar), neste segundo caso, adiciona-se uma solução de polimixina para que ocorra a liberação das toxinas do espaço periplasmático bacteriano para o sobrenadante do cultivo. No diagnóstico de STEC, quando é realizado com o VTEC-Screen tem o resultado definitivo entre 54 a 56 h (BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER, 2002; CARROLL et al., 2003; THERMO SCIENTIFIC, 2014). Este ensaio foi comparado ao teste de citotoxicidade em células Vero e ao PCR, sendo que 89,8% das amostras foram positivas utilizando o VTEC,

98,3% no teste de citotoxicidade em células Vero e 93,2% no PCR, sendo que o VTEC apresentou seis resultados falso-negativos na detecção de Stx2, podendo está relacionado a variante da toxina (BEUTIN; ZIMMERMANN; GLEIER, 2002). Carroll et al. (2003), mostraram 99% de concordância dos resultados do VTEC com o *premier* EHEC.

No teste de aglutinação em látex padronizado e avaliado no presente trabalho para detecção de STEC/EHEC, as partículas de látex foram sensibilizadas com MAb anti-Stx1 ou MAb anti-Stx2, e os isolados bacterianos foram cultivados em meio sólido (ágar-EC), pois neste meio ocorre uma maior produção dessas toxinas (ROCHA; PIAZZA, 2007). Para a liberação dessas toxinas foi adicionado o tampão de lise B-PER. Nessas condições o teste apresentou 97,3%, 85% e 92,2% de sensibilidade, especificidade e eficiência, respectivamente na detecção Stx1 e de 79,4%, 82% e 81% de sensibilidade, especificidade e eficiência, respectivamente na detecção de Stx2. No ensaio para detecção de Stx1 ocorreram quatro aglutinações não-específicas com os seguintes isolados bacterianos: EIEC, *Enterobacter cloacae*, *Providencia* e *Shigella flexinerii*, sendo que estes isolados foram negativos por ELISA de captura e por PCR (dados não mostrados), a detecção de Stx1 em EIEC e *S. flexinerii* talvez não configure um resultado inespecífico, mas provavelmente uma maior sensibilidade da aglutinação em látex em relação ao ELISA, ou uma maior massa bacteriana na amostra causa reações não específicas (CARROLL et al., 2003). Resultados falso-positivos com *Salmonella enteritidis* e *Shigella flexinerii* foram descritos em um ELISA de captura para a detecção de Stx (PARMA et al., 2012).

No ensaio para detecção de Stx2 observou-se cinco aglutinações não-específicas com os isolados, *Enterobacter cloacae*, *E. coli* sem fatores de virulência, *Providencia*, *Shigella flexinerii* e *Klebsiella pneumoniae*. Também o VTEC-screen apresentou um resultado falso-negativo com o isolado *Klebsiella pneumoniae*, provavelmente por ser uma bactéria encapsulada (CARROLL et al., 2003). É descrito na literatura que algumas enterobactérias são conhecidas por produzir Stx2, dentre elas *Citrobacter freundii* (SCHMIDT et al., 1993) e *Enterobacter cloacae* tem sido associado com a expressão transiente do gene *stx2* (PATON; PATON, 1998). O teste de aglutinação em látex neste trabalho, confirmou rapidamente a presença de STEC dos sorogrupos O26 e O111 e do sorotipo O157:H7, não apresentando

nenhum resultado falso-negativo relacionados a estes sorogrupos, o que se torna relevante, pois estes tem importância epidemiológica em nosso meio.

Tanto os ensaios de ELISA como os ensaios de aglutinação em látex para o diagnóstico de EPEC e STEC/EHEC pela detecção de EspB, Stx1 e Stx2 apresentaram sensibilidades e especificidades recomendadas para diferentes ensaios para o diagnóstico de doenças negligenciadas em países em desenvolvimento (>90%), e requisitos mínimos de infraestrutura de laboratório e o tempo ideal na realização do teste (< 1 hora) (URDEA et al., 2006).

Com base neste estudo, a indicação da aplicação dos testes de aglutinação em látex para a detecção de EspB em isolados de EPEC e EHEC e Stx1 ou Stx2 em isolados de STEC/EHEC seriam realizados da seguinte forma:

- As amostras de fezes seriam semeadas em meio de cultivo seletivo e diferencial por 16 h;
 - As colônias selecionadas seriam cultivadas em ágar DMEM (para a detecção de EspB) ou ágar EC (para a detecção de Stx1 e Stx2) e cultivadas por 16-18 h para enriquecimento;
 - Posteriormente, 20 mg do cultivo seria tratado com 80 µL de B-PER (lisado bacteriano) por 15 min sob agitação em temperatura ambiente;
 - 20 µL do lisado bacteriano e 20 µL da suspensão de látex sensibilizadas com o MAb anti-EspB ou MAb anti-Stx1 ou MAb anti-Stx2 seriam incubados e homogeneizados em movimentos circulares em temperatura ambiente;
 - As leituras e interpretações dos resultados seriam realizadas até 5 min para a detecção de EspB ou em até 30 seg. para a detecção de Stx1 ou Stx2 e os controles positivo e negativo realizados simultaneamente.
 - O resultado seria liberado entre 32 a 34 h.
- a) detecção de Stx1 ou Stx2 ou Stx1/Stx2 diagnóstico de STEC,
 - b) detecção de EspB e de Stx1 ou Stx2 ou Stx1/Stx2 diagnóstico de EHEC,
 - c) detecção de EspB diagnóstico de EPEC .

6. CONCLUSÃO

Os testes de aglutinação em látex para a detecção de EPEC e STEC/EHEC foram precisos e fáceis de padronizar e executar, sendo portanto ensaios promissores para a utilização na rotina laboratorial de laboratórios com pouca infraestrutura além de apresentarem sensibilidade e especificidade recomendadas para o diagnóstico de doenças negligenciadas.

REFERÊNCIAS

- ABE, C.M.; TRABULSI, L.R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; DAHBI, G.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; FRANZOLIN, M.R.; TADDEI, C.R.; MARTINEZ, M.B.; PIAZZA, R.M.F.; ELIAS, W.P. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae*⁺ EAF-negative *stx*⁻ genetic profile. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.64, n.4, p.357-365, 2009.
- ABE, A.; HECZKO, U.; HEGELE, R.G.; BRETT FINLAY, B. Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. **Journal of Experimental Medicine**, v.188, n.10, p.1907-1196, 1998.
- ABE, A.; KENNY, B.; STEIN, M.; FINLAY, B.B. Characterization of two virulence proteins secreted by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*, EspA and EspB, whose maximal expression is sensitive to host body temperature. **Infection and Immunity**, v.65, n.9, p.3547-3555, 1997.
- ABE, H.; TATSUNO, I.; TOBE, T.; OKUTANI, A.; SASAKAWA, C. Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunity**, v.70, n.7, p.3500-3509, 2002.
- ADU-BOBIE, J.; TRABULSI, LR.; CARNEIRO-SAMPAIO, MM.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin α and intimin β from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.66, n.12, p.5643-5649, 1998.
- AGIN, T.S.; CANTEY, J.R.; BOEDEKER, E.C.; WOLF, M.K. Characterization of the *eae* A gene from rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* strain RDEC-1 and comparison to other *eaeA* genes from bacteria that cause attaching-effacing lesions. **FEMS Microbiology Letters**, v.144, n.2/3, p.249-258, 1996.
- ALAM, M.; SHAMSUZZAMAN, A.; MUSA, A.; KHAN, A.; MAHMUD, M.; HOSSAIN, M.; AHMED, A. Antigen detection from urine of Kala-azar cases by latex agglutination test. **Mymensingh Medical Journal**, v.17, n.1, p.22-27, 2008.
- ALTINDIS, M.; YAVRU, S.; SIMSEK, A.; OZKUL, A.; CERİ, A.; KOC, H. Rotavirus infection in children with acute diarrhea as detected by latex agglutination ELISA and polyacrylamide gel electrophoresis. **Indian Pediatrics**, v.41, n.6, p.590-594, 2004.
- ARENAS-HERNÁNDEZ M.M.P.; MARTÍNEZ-LAGUNA Y.; TORRES A.G. Clinical Implications of Enteroadherent *Escherichia coli*. **Current Gastroenterology Reports**, v.14, n.5, p.386-394, 2012.
- ARAUJO, J.M.; TABARELLI, G.F.; ARANDA, K.R.; FABBRICOTTI, S.H.; FAGUNDES-NETO, U.; MENDES, C.M.; SCALETSKY, I.C. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.10, p.3396-3399, 2007.

ATKINSON, R.M.; BESSER, J.M.; BOPP, C.A.; CARLSON, C.; CRANDALL, C.; GEORGE K.; GERNER-SMIDT, P.; GOULD, L.H.; HARTLEY C.S.; MONSON, T.A.; RUTLEDGE, D.; SHEA, S.; SOMSEL, P.A.; STROCKBINE, N.A. **Guidance for public health laboratories: isolation and characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from Clinical Specimens.** Silver Spring: Centers for Disease Control and Prevention and the association of Public Health Laboratories, 2012. 62p.

BATCHELOR, M.; KNUTTON, S.; CAPRIOLI, A.; HUTER, V.; ZANIAL, M.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.12, p.3822-3827, 1999.

BENTANCOR, A.B.; AMEAL, L.A.; CALVIÑO, M.F.; MARTINEZ, M.C.; MICCIO, L.; DEGREGORIO, O.J. Risk factors for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in preadolescent schoolchildren in Buenos Aires, Argentina. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.6, n.5, p.378-386, 2012.

BETTELHEIM, K.A. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; under-rated pathogens. **Critical Reviews in Microbiology**, v.33, n.1, p.67-87, 2007.

BETTELHEIM, K.A.; BEUTIN, L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.1, p.205-217, 2003.

BETANCOURT-SANCHEZ, M.; NAVARRO-GARCIA, F. Pet secretion, internalization and induction of cell death during infection of epithelial cells by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.155, pt.9, p.2895-2906, 2009.

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. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.42, n.1, p.1-8, 2002.

BISWAS, R.; PARIJA, S.C. Latex agglutination test for the detection of cysticercus antigen in the urine for the diagnosis of neurocysticercosis. **Tropical Parasitology**, v.3, n.2, p.168-169, 2003.

BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; SANTOS, M.F.; FRANZOLIN, M.R.; MARTINEZ, M.B.; FERRER, S.R.; BARRETO, M.L.; TRABULSI, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, p.839-844, 2007.

CARAVELLI A.; LUZ D.E.; ANDRADE F.B.; MORAES C.T.; MARANHÃO A.Q.; PIAZZA R.M.F. Sensitive and specific detection of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* using recombinant anti-intimin antibody by immunofluorescence assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.77, p. 301-303, 2013.

CARROLL, K.C.; ADAMSON, K.; KORGESKI, K.; CROFT, A.; HANKEMEIER, R.; DALY, J.; PARK, C.H. Comparison of a commercial reversed passive latex agglutination assay to an enzyme immunoassay for the detection of Shiga toxin-

producing *Escherichia coli*. **European Journal Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.22, n.11, p.689-692, 2003.

CARDOSO, L.T.A. **Padronização do meio de cultivo e avaliação da expressão da proteína secretada (EspB) por *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**. São Paulo: Universidade de Santo Amaro, 2010.

CORNICK, N.A.; JELACIC, S.; CIOL, M.A.; TARR, P.I. *Escherichia coli* O157:H7 infections: discordance between filterable fecal Shiga toxin and disease outcome. **Journal Infectious Diseases**, v.186, n.1, p.57–63, 2002.

CLEMENTS A.; YOUNG J.C.; CONSTANTINOU N.; FRANKEL G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.

CREPIN, V.F.; SHAW, R.; ABE, C.M.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. Polarity of enteropathogenic *Escherichia coli* EspA filament assembly and protein secretion. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.8, p.2881-2889, 2005.

CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.4, p.822-880, 2013.

DENG, W.; PUENTE, J.L.; GRUENHEID, S.; LI, Y.; VALLANCE, B.A.; VÁZQUEZ, A.; BARBA, J.; IBARRA, J.A.; O'DONNELL, P.; METALNIKOV, P.; ASHMAN, K.; LEE, S.; GOODE, D.; PAWSON, T.; FINLAY, B.B. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.10, p.3597-3602, 2004.

DE BOER, E.; HEUVELINK, A.E. Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Symposium series (Society for Applied Microbiology)**, v.29, n.1, p.133S-143S, 2000.

DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.60, p.3953–3961, 1992.

ELLIOTT, S.J.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J.A.; SHIN, S.; MELLIES, J.L.; WAINWRIGHT, L.; HUTCHESON, S.W.; MCDANIEL, T.K.; KAPER, J.B. 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*. **Infection and Immunity**, v.68, n.11, p.6115-6126, 2000.

FRANZOLIN, M.R.; ALVES, R.C.; KELLER, R.; GOMES, T.A.; BEUTIN, L.; BARRETO, M.L.; MILROY, C.; STRINA, A.; RIBEIRO, H.; TRABULSI, L.R. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.4, p.359-363, 2005.

FERGUSON, W.W.; JUNE, R.C. Experiments on feeding adult volunteers with *Escherichia coli* 111, B4, a coliform organism associated with infant diarrhea. **American Journal of Hygiene**, v.55, n.2, p.155-169, 1952.

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. **Journal of Immunological Methods**, v.77, n.2, p.305-319, 1985.

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.

GAVIN, P.J.; PETERSON, L.R.; PASQUARIELLO, A.C.; BLACKBURN, J.; HAMMING, M.G.; KUO, K.J.; THOMSON JR., R.B. Evaluation of performance and potential clinical impact of ProSpecT Shiga toxin *Escherichia coli* microplate assay for detection of Shiga toxin-producing *E. coli* in stool samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.4, p.1652-1656, 2004.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v.85, n.1, p.45-62, 2007.

GIRÓN, J.A.; HO, A.S.Y.; SCHOOLNIK, G.K. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.22, p.7391-7403, 1993.

GIRÓN, J.A.; HO, A.S.Y.; SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v.254, n.5032, p.710-713, 1991.

GIRÓN, J.A.; TORRES, A.G.; FREER, E.; KAPER, J.B. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v.44, n.2, p.361-379, 2002.

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. cap.3, p.25-47.

GOMES, F.S.; SILVA, S.H.M. Avaliação do teste de aglutinação com partículas de látex sensibilizadas com exoantígeno bruto de *Paracoccidioides brasiliensis* no sorodiagnóstico da paracoccidioidomicose. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.2, n.1, p.99, 2011.

GUTH, B.E.C.; SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolate from a patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.5, p.535-536, 2002.

GUTH, B.E.C.; PRADO, V.; RIVAS, M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In: TORRES, A.G. **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2010. cap.5, p.65-83.

HARTLAND, E.L.; DANIELL, S.J.; DELAHAY, R.M.; NEVES, B.C.; WALLIS, T.; SHAW, R.K.; HALE, C.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. **Molecular Microbiology**, v.35, n.6, p.1483-1492, 2000.

HERNANDES, R.T.; ELIAS, W.P.; VIEIRA, M.A.; GOMES, T.A. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v.297, n.2, p.137–149, 2009.

IDE, T.; MICHGEHL, S.; KNAPPSTEIN, S.; HEUSIPP, G.; SCHMIDT, M.A. Differential Modulation by Ca^{2+} of Type III secretion of diffusely adhering enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.71, n.4, p.1725-1732, 2003.

JARVIS, K.G.; KAPER, J.B. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. **Infection and Immunity**, v.64, n.11, p.4826-4829, 1996.

JARVIS, K.G.; GIRÓN, J.A.; JERSE, A.E.; MCDANIEL, T.K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p.17, p.7996-8000, 1995.

JELACIC, J.K.; DAMROW, T.; CHEN, G.S.; JELACIC, S.; BIELASZEWSKA, M.; CIOL, M.; CARVALHO, H.M.; MELTON-CELSA, A.R.; O'BRIEN, A.D.; TARR, P.I. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. **Journal of Infectious Diseases**, v.188, n.5, p.719-729, 2003.

JERSE, A.E.; YU, J.; TALL, B.D.; KAPER, J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.87, n.20, p.7839-7843, 1990.

KARMALI, M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, n.1, p.15-38, 1989

KAPER, J.B. Defining EPEC. **Revista de Microbiologia**, v.27, suppl.1, p.130-133, 1996.

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

KEHL, K.S.; HAVENS, P.; BEHNKE, C.E.; ACHESON, D.W. Evaluation of the premier EHEC assay for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.8, p.2051-2054, 1997.

KENNY, B.; FINLAY, B.B. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, n.17, p.7991–7995, 1995.

KENNY, B.; WARAWA, J. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. **Infection and Immunity**, v.69, n.3, p.1444-1453, 2001.

KENNY, B.; LAI, L.C.; FINLAY, B.B.; DONNENBERG, M.S. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v.20, n.2, p.313-323, 1996.

KENNY, B.; ABE, A.; STEIN, M.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v.65, n.7, p.2606-2612, 1997a.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHIED, D.J.; FREY, E.A.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v.91, n.4, p.511-520, 1997b.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLAN, M.J.; NISAN, I.; NEVES, B.C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **EMBO Journal**, v.17, n.8, p.2166-2176, 1998.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P.H.; MCNEISH, A.S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.57, n.4, p.1290-1298, 1989.

KOGA, P.C.M.; MENEZES, C.A.; LIMA, F.A.; NARA, J.M.; MAGALHÃES, C.A.; CIANCIARULLO, A.M.; FERREIRA-JR., J.M.C.; TRABULSI, L.R.; MENDES-LEDESMA, M.R.B.; PIAZZA, R.M.F. Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and its use in EPEC and EHEC diagnosis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, suppl.1, p.5-7, 2003.

KOTLOFFA, K.L.; NATAROA, J.P.; BLACKWELDERA, W.C.; NASRINA, D.; FARAGA, T.H.; PANCHALINGAMA, S.; WUA, Y.; SOWE, S.O.; SURF, D.; BREIMANG, R.F.; FARUQUEH, A.S.G.; ZAIDI, A.K.M.; SAHAJ, D.; ALONSOK, P.L.; TAMBOURAE, B.; SANOGOE, D.; ONWUCHEKWAE, U.; MANNAF, B.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; OCHIENGCM, J.B.; OMOREM, R.; OUNDOM, J.O.; HOSSAINH, A.; DASH, S.K.; AHMEDH, S.; QURESHICI, S.; QUADRIL, F.; ADEGBOLAJ, R.A.; ANTONIOJ, M.; HOSSAINJ, M.J.; AKINSOLAJ, A.; MANDOMANDO, I.; NHAMPOSSAK, T.; ACÁCIOK, S.; BISWASQ, K.; O'REILLYR, C.E.; MINTZR, E.D.; BERKELEYA, L.Y.; MUHSENA, K.; SOMMERFELTT, H.; ROBINS-BROWNEV, R.M.; LEVINEA, M.M. Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. **Lancet**, v.382, n.9888, p.209-222, 2013.

KONOWALCHUK, J.; SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. Vero response to a Cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v.18, n.3, p.775-779, 1977.

LANATA, C.F.; MENDOZA, W. **Improvind diarrhoea estimates**. Lima: Instituto de Investigación Nutricional, 2002. 48p. Disponível em: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/pdfs/improving_diarrhoea_estimates.pdf. Acesso em: 15 jan. 2014.

LARGE, T.M.; WALK, S.T.; WHITTAM, T.S. Variation in acid resistance among shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.5, p.2493-2500, 2005.

LAI, L.C.; WAINWRIGHT, L.A.; STONE, K.D.; DONNENBERG, M.S. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. **Infection and Immunity**, v.65, n.6, p.2211-2217, 1997.

LASARO, M.A.; RODRIGUES, J.F.; MATHIAS-SANTOS, C.; GUTH, B.E.; RÉGUA-MANGIA, A.; PIANTINO FERREIRA, A.J.; TAKAGI, M.; CABRERA-CRESPO, J.; SBROGIO-ALMEIDA, M.E.; SOUZA FERREIRA, L.C. Production and release of heat-labile toxin by wild-type human-derived enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.48, n.1, p.123-131, 2006.

LEVINE, M.M.; NATARO, J.P.; KARCH, H.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; CLEMENTS, M.L.; O'BRIEN, A.D. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **Journal of Infectious Diseases**, v.152, n.3, p.550-559, 1985.

LEVINE M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **Journal of Infectious Diseases**, v.155, n.3, p.377-389, 1987.

LU, Y.; TOMA, C.; HONMA, Y.; IWANAGA, M. Detection of EspB using reversed passive latex agglutination: application to determination of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.43, n.1, p.7-12, 2002.

MARTÍNEZ, H.; BUHSE, T.; RIVERA, M.; PARMANANDA, P.; AYALA, G.; SÁNCHEZ, J. Endogenous CO₂ may inhibit bacterial growth and induce virulence gene expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v.53, n.1, p.49-55, 2012.

McDANIEL, T.K.; JARVIS, K.G.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 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. **Molecular Microbiology**, v.23, n.2, 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.

MERIDIAN BIOSCIENCE, Inc. Disponível em: <http://www.meridianbioscience.com/diagnostic-products/foodborne/immunocard-stat/immunocard-stat-ehec.aspx>. Acesso em: 10 fev. 2014.

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*. **Microbiology and Immunology**, v.52, n.10, p.484-491, 2008.

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. Identification of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, n.3, p.878-887, 2010.

MENEZES, C.A.; IMAMURA, S.Y.; TRABULSI, L.R.; FERNANDES-FILHO, A.; MARTINEZ, M.B.; GUTH, B.E.; GIRÃO, D.M.; PIAZZA, R.M. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.8, p.875-880, 2006.

MOON, H.W.; WHIPP, S.C.; ARGENZIO, R.A.; LEVINE, M.M.; GIANNELLA, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v.41, n.3, p.1340-1351, 1983.

MUNHOZ, D.D. Padronização de condições de cultivo de EPEC e EHEC: avaliação da expressão de EspB e sua utilização como ferramenta para imunodiagnóstico. São Paulo. Universidade Presbiteriana Mackenzie, 2012.

MÜLLER, D.; BENZ, I.; LIEBCHEN, A.; GALLITZ, I.; KARCH, H.; SCHMIDT, M.A. Comparative analysis of the locus of enterocyte effacement and its flanking regions. **Infection and Immunity**, v.77, p.3501-3513, 2009.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NARA, J.M.; CIANCIARULLO, A.M.; CULLER, H.F.; BUERIS, V.; HORTON, D.S.; MENEZES, M.A.; FRANZOLIN, M.R.; ELIAS, W.P.; PIAZZA, R.M. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, n.1, p.35-43, 2010.

NAKASONE, N.; TOMA, C.; LU, Y.; IWANAGA, M. Development of a rapid immunochromatographic test to identify enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* by detecting EspB. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.57, n.1, p.21-25, 2007.

NAKASONE, N.; TOMA, C.; HIGA, N.; KOIZUMI, Y.; OGURA, Y.; SUZUKI, T. Detergents enhance EspB secretion from *Escherichia coli* strains harboring the locus

for the enterocyte effacement (LEE) gene. **FEMS Microbiology Letters**, v.315, n.2, p.109-114, 2011.

NETER, E.; WESTPHAL, O.; LUDERITZ, O.; GINO, R.M.; GORZYNSKI, E.A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, v.16, n.6, p.801–808, 1955.

NEWMAN, J.V.; ZABEL, B.A.; JHA, S.S.; SCHAUER, D.B. *Citrobacter rodentium* *espB* is necessary for signal transduction and for infection of laboratory mice. **Infection and Immunity**, v.67, n.11, p.6019-6025, 1999.

NASSAR, F.J.; RAHAL, E.A.; SABRA, A.; MATAR, G.M. Effects of subinhibitory concentrations of antimicrobial agents on *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin release and role of the SOS response. **Foodborne Pathogens and Diseases**, v.10, n.9, p.805-812, 2013.

NEUPANE, M.; ABU-ALI, G.S.; MITRA, A.; LACHER, D.W.; MANNING, S.D.; RIORDAN, J.T. Shiga toxin 2 overexpression in *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with severe human disease. **Microbial Pathogenesis**, v.51, n.6, p.466-470, 2011.

OCHOA, T.J.; MERCADO, E.H.; DURAND, D.; RIVERA, F.P.; MOSQUITO, S.; CONTRERAS, C.; RIVEROS, M.; LLUQUE, A.; BARLETTA, F.; PRADA, A.; RUIZ, J. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénicas en niños peruanos con y sin diarrhea. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v.28, n.1, p.13-20, 2011.

OCHOA, T.J.; ECKER, L.; BARLETTA, F.; MISPIRETA, M.L.; GIL, A.I.; CONTRERAS, C.; MOLINA, M.; AMEMIYA, I.; VERASTEGUI, H.; HALL, E.R.; CLEARY, T.G.; LANATA, C.F. Age-related susceptibility to infection with diarrheagenic *Escherichia coli* among Infants from periurban areas in Lima, Peru. **Clinical Infectious Diseases**, v.49, n.11, p.1694–1702, 2009.

O'BRIEN, A.D.; LIVELY, T.A.; CHANG, T.W.; GORBACH, S.L. Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. **Lancet**, v.322, n.8349, p.573, 1983.

O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L.K. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v.16, n.2, p.125-136, 2005.

PARK, C.H. Evaluation of the duopath verotoxin test for detection of Shiga toxins in cultures of human stools. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.6, p.2650-2653, 2003.

PATON, J.C.; PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis os Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.3, p.450-479, 1998.

PARMA, Y.R.; CHACANA, P.A.; LUCCHESI, P.M.; ROGÉ, A.; GRANOBLES VELANDIA, C.V.; KRÜGER, A.; PARMA, A.E.; FERNÁNDEZ-MIYAKAWA, M.E. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by sandwich enzyme-linked

immunosorbent assay using chicken egg yolk IgY antibodies. **Frontiers in Cellular and Infectious Microbiology**, v.18, n.2, p.84, 2012.

PIAZZA R.M.F.; ABE C.M.; HORTON D.S.P.Q.; MILIWEBSKY E.; CHINEN I.; VAZ T.M.I.; IRINO K. Detection and subtyping methods of diarrheagenic *Escherichia coli* Strains. In: TORRES, A.G. **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2010. cap.7, p.95-115.

PRADUTKANCHANA, S.; NAKARIN, J. The use of latex agglutination for the diagnosis of acute human leptospirosis. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v.88, n.10, p.1395-1400, 2005.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **New England Journal of Medicine**, v.308, n.12, p.681-685, 1983.

RIVERO, M.A.; PASSUCCI, J.A.; RODRIGUEZ, E.M.; PARMA, A.E. Role and clinical course of verotoxigenic *Escherichia coli* infections in childhood acute diarrhoea in Argentina. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, pt.3, p.345-352, 2010.

RISTORI, C.A.; ROWLANDS, R.E.G.; JAKABI, M.; GELLI, D.S.; SCOLA, M.C.G.; GASPARI, E.N. Detecção de *vibrio cholerae* O1 em ostras utilizando anticorpo monoclonal em ensaio de aglutinação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.65, n.2, p.127-132, 2006.

ROBINS-BROWNE, R.M.; HARTLAND, E.L. Advances in pediatric gastroenterology and hepatology. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.17, p.467-475, 2002.

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)**. São Paulo, 2012. 178p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.

ROCHA, L.B.; LUZ, D.E.; MORAES, C.T.P.; CARAVELLI, A.; FERNANDES, I.; GUTH, B.E.C.; HORTON, D.S.P.Q.; PIAZZA, R.M.F. Interaction between Shiga toxin and monoclonal antibodies; binding characteristics and *in vitro* neutralizing abilities. **Toxins**, v.4, n.9, p.729-747, 2012.

ROCHA L.B.; OZAKI C.Y.; HORTON D.S.; MENEZES C.A.; SILVA A.; FERNANDES I.; MAGNOLI F.C.; VAZ T.M.; GUTH B.E.; PIAZZA R.M. Different assay conditions for detecting the production and release of heat-labile and heat-stable toxins in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates. **Toxins**, v. 5, n. 12, p. 2384-2402, 2013.

ROCHA, L.B.; PIAZZA, R.M. Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* (STEC) in broth media: from divergence to definition. **Letters Applied Microbiology**, v.45, n.4, p.411-117, 2007.

ROSENSHINE, I.; RUSCHKOWSKI, S.; FINLAY, B.B. Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth

phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.64, n.3, p.966-973, 1996.

SCHÜLLER, S.; PHILLIPS, A.D. Microaerobic conditions enhance type III secretion and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to polarized human intestinal epithelial cells. **Environmental Microbiology**, v.12, n.9, p.2426-2435, 2010.

SCHEUTZ, F.; TEEL, L.D.; BEUTIN, L.; PIÉRARD, D.; BUVENS, G.; KARCH, H.; MELLMANN, A.; CAPRIOLI, A.; TOZZOLI, R.; MORABITO, S.; STROCKBINE, N.A.; MELTON-CELSA, A.R.; SANCHEZ, M.; PERSSON, S.; O'BRIEN, A.D. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. **Journal Clinical Microbiology**, v.50, n.9, p.2951–2963, 2012.

SCHMIDT, H.; MONTAG, M.; BOCKEMÜHL, J.; HEESEMANN, J.; KARCH, H. Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. **Infection and Immunity**, v.61, n.2, p.534-543, 1993.

SEKIYA, K.; OHISHI, M.; OGINO, T.; TAMANO, K.; SASAKAWA, C.; ABE, A. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.98, n.20, p.11638-11643, 2001.

SHAMEEM, S.; VINOD KUMAR, C.S.; NEELAGUND, Y.F. Bacterial meningitis: rapid diagnosis and microbial profile: a multicentered study. **Journal of Communicable Diseases**, v.40, n.2, p.111-120, 2008.

SOUZA, R.L.; CARVALHAES, J.T.A.; NISHIMURA, L.S.; ANDRADE, M.C.; GUTH, B.E.C. Hemolytic uremic syndrome in pediatric intensive care units in São Paulo, Brazil. **Open Microbiology Journal**, v.5, p.76-82, 2011.

SPEARS, K.J.; ROE, A.J.; GALLY, D.L. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. **FEMS Microbiology Letters**, v.255, n.2, p.187-202, 2006.

TACKET, C.O.; SZTEIN, M.B.; LOSONSKY, G.; ABE, A.; FINLAY, B.B.; MCNAMARA, B.P.; FANTRY, G.T.; JAMES, S.P.; NATARO, J.P.; LEVINE, M.M.; DONNENBERG, M.S. Role of EspB in experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Infection and Immunity**, v.68, n.6, p.3689-3695, 2000.

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

TARR P.I; GORDON C.A; CHANDLER W.L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. **Lancet**, v.365, p.1073-1086, 2005.

THERMO SCIENTIFIC. **Toxin Detection Kits**. Disponível em: http://www.oxoid.com/uk/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=TD0960&org=71&c=uk&lang=EN. Acesso em: 10 fev. 2014.

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

TORRES, A.G.; ARENAS-HERNÁNDEZ, M.M.P.; MARTÍNEZ-LAGUNA, Y. Overview of *Escherichia coli*. In: TORRES, A.G. **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Sharjah: Bentham Science Publishers, 2010. cap.1, p.1-7.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoea: why children are still dying and what can be done**. 2009. Disponível em: http://www.unicef.org/brazil/pt/media_16165.htm. Acesso em: 10 jan. 2014.

URDEA, M.; PENNY, L.A.; OLMSTED, S.S.; GIOVANNI, M.Y.; KASPAR, P.; SHEPHERD, A.; WILSON, P.; DAHL, C.A.; BUCHSBAUM, S.; MOELLER, G.; HAY BURGESS, D.C. Requirements for high impact diagnostics in the developing world. **Nature**, v.444, suppl.1, p.73-79, 2006.

VIDAL, J.E.; CANIZÁLEZ-ROMÁN, A.; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, J.; NAVARRO-GARCÍA, F. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. **Salud Pública de México**, v.49, n.5, p.376-386, 2007.

VAZ, T.M.; IRINO, K.; KATO, M.A.; DIAS, A.M.; GOMES, T.A.; MEDEIROS, M.I.; ROCHA, M.M.; GUTH, B.E. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.2, p.903-905, 2004.

VILHENA-COSTA, A.B.; PIAZZA, R.M.; NARA, J.M.; TRABULSI, L.R.; MARTINEZ, M.B. Slot blot immunoassay as a tool for plasmid-encoded toxin detection in enteroaggregative *Escherichia coli* culture supernatants. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.55, n.2, p.101-106, 2006.

VONBERG, R.P.; HÖHLE, M.; AEPFELBACHER, M.; BANGE, F.C.; BELMAR CAMPOS, C.; CLAUSSEN, K.; CHRISTNER, M.; CRAMER, J.P.; HALLER, H.; HORNEF, M.; FICKENSCHER, H.; FRAEDRICH, K.; KNOBLOCH, J.K.; KÜHBACHER, T.; MANNS, M.P.; NITSCHKE, M.; PETERS, G.; PULZ, M.; ROHDE, H.; ROSELAND, R.T.; SAYK, F.; SCHAUMBURG, F.; SCHÖCKLMANN, H.O.; SCHUBERT, S.; SOLBACH, W.; KARCH, H.; SUERBAUM, S. Duration of fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 in patients infected during the 2011 outbreak in Germany: a multicenter study. **Clinical Infectious Diseases**, v.56, n.8, p.1132-1140, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ending preventable deaths from pneumonia and diarrhea by 2025**. 2013a. Disponível em: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/news_events/news/2013/gappd_launch/en/. Acesso em: 10 jan. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoeal disease. Fact Sheet 330**. 2013b. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/>. Acesso em: 10 jan. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Children: reducing mortality**. Fact Sheet 178. 2013c. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/>. Acesso em: 8 fev. 2014.

ANEXOS

ANEXO A - Isolados de STEC/EHEC

Tabela 10 - Isolados de STEC utilizados e os resultados dos testes de aglutinação em látex para a detecção de Stx1 ou Stx2.

STEC		Teste de aglutinação em látex		Presença do gene
Isolados*	Número de Isolados	Stx1	Stx2	<i>stx</i>
OR:NM	1	+	-	<i>stx1</i>
ONT:H49	1	+	+	<i>stx2</i>
ONT:H49	1	+	-	<i>stx2</i>
O48:H7	1	+	+	<i>stx1/stx2</i>
O26:H11	7	+	+	<i>stx1</i>
O26:H11	1	+	-	<i>stx1</i>
O157:H7	5	+	+	<i>stx1</i>
O157:H7	3	+	+	<i>stx2</i>
O157:H7	2	+	+	<i>stx1/stx2</i>
O157:H43	1	+	-	<i>stx2</i>
O93:H19	1	+	-	<i>stx1/stx2</i>
O55:H19	1	+	+	<i>stx1</i>
O103:H2	1	+	+	<i>stx1/stx2</i>
O118:H16	1	+	+	<i>stx1</i>
O111:H8	2	+	+	<i>stx1</i>
O111:NM	2	+	+	<i>stx1</i>
ONT:NM	1	+	+	<i>stx2</i>
O98:H4	1	+	-	<i>stx1/stx2</i>
O181:H4	1	+	+	<i>stx1/stx2</i>
O87:H16	1	+	+	<i>stx2</i>
O98:H17	2	+	+	<i>stx1/stx2</i>
ONT:H16	1	+	+	<i>stx2</i>
O105:H18	1	+	+	<i>stx1/stx2</i>
O22:H16	1	+	+	<i>stx2</i>
ONT:H38	1	-	+	<i>stx1/stx2</i>
O112:H21	1	+	+	<i>stx2</i>
O93:H19	1	+	+	<i>stx2</i>
ONT:H8	1	+	-	<i>stx1</i>
O112:H2	1	+	+	<i>stx1</i>
O172:NM	1	+	+	<i>stx2</i>
ONT:H16	1	-	-	<i>stx2</i>
O75:H8	1	+	-	<i>stx1/stx2</i>
O146:H21	1	+	-	<i>stx1/stx2</i>
O26:H12	1	+	+	<i>stx1</i>

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

*Fonte: ROCHA et al.,2012

Tabela 11 - Isolados de EHEC utilizados e os resultados dos testes de aglutinação em látex para a detecção de EspB.

EHEC		Teste de aglutinação em látex	Presença do gene
Isolados*	Número de isolados	EspB	<i>eae/espB</i>
O26:H11	5	+	+
O26:H12	1	+	+
O157:H7	12	+	+
O103:H2	1	+	+
O118:H16	1	+	+
O111:H8	2	+	+
O111:NM	1	+	+

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

*Fonte: ROCHA et al., 2012

ANEXO B - Isolados de EPEC típica e atípica

Tabela 12 - Isolados de EPEC típica utilizados e os resultados dos testes de aglutinação em látex para a detecção de EspB.

EPEC típica		Teste de aglutinação em látex	Presença do gene
Isolados*	Número de isolados	EspB	<i>eae/espB</i>
O55:H6	3	+	+
O55:H6	1	-	+
O86:H34	5	+	+
O111ab:H-	1	+	+
O111ab:H2	5	+	+
O111ab:H2	1	-	+
O119:H6	2	+	+
O119:H6	1	-	+
O114:H2	2	+	+
O127:H6	4	+	+
O127:H40	3	+	+
O142:H34	3	+	+

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

*Fonte: MENEZES et al., 2010; NARA et al., 2010.

Tabela 13 - Isolados de EPEC atípica utilizados e os resultados dos testes de aglutinação em látex para a detecção de EspB.

EPEC atípica		Teste de aglutinação em látex	Presença do gene
Isolados*	Número de isolados	EspB	<i>eae/espB</i>
O76:H19	1	+	+
O2:H16	1	+	+
ON:H9	1	+	+
O23:H16	1	+	+
O55:H7	1	+	+
O33:H7	1	+	+
ONT:H19	1	+	+
O35:H19	2	+	+
O51:H40	2	+	+
O55:H7	1	+	+
O111:H40	1	+	+
O119:H2	2	+	+
O157:H16	1	+	+
O5:H2	1	+	+
O88:H25	1	+	+
O111:H-	1	+	+
O111:H15	1	+	+
O55:H7	1	+	+
ONT:H6	1	+	+
O34:H45	1	+	+

EPEC atípica		Teste de aglutinação em látex	Presença do gene
Isolados	Número de Isolados	EspB	<i>eae/espB</i>
O115:H8	1	+	+
O111:H38	2	+	+
O131:H4	2	+	+
O80:H26	1	+	+
O51:H40	1	+	+
ONT:H10	2	+	+
O171:H48	1	+	+
ONT:H5	3	+	+
O26:H11	1	+	+
O26:H11	1	-	+
O105:H7	1	+	+
O9:H33	1	+	+
O153:H11	1	+	+
ONT:H19	3	+	+
O119:H11	1	+	+
O101:H33	1	+	+
O113:H19	1	+	+
O34:H6	1	+	+
O88:H25	2	+	+
O34:H-	1	+	+
O110:H-	1	+	+
O145:H2	1	+	+
O104:H2	1	+	+
O124:H11	1	+	+
ONT:H38	2	+	+
O119:H19	1	+	+
ONT:H45	1	+	+
O114:H25	1	+	+
O88:H-	1	+	+
O1:H16	1	+	+
O20:H-	1	+	+
O64:H23	1	+	+
O4:H45	1	+	+
O51:H48	1	+	+
O108:H25	1	+	+
O55:H7	1	+	+
ONT:H25	1	+	+
O125:H6	1	+	+
O111:H25	1	+	+

Resultado positivo: +

Resultado negativo: -

*Fonte: ABE et al., 2009.

ANEXO C - Artigo completo submetido a publicação no PLoSNTD e Premiações

Artigo completo submetido a publicação no PLoSNTD

Development of a rapid agglutination latex test for diagnosis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in developing world: defining the biomarker, antibody and method. Letícia B. Rocha[#], **Anna R.R. Santos[#]**, Danielle D. Munhoz, Lucas T.A. Cardoso, Daniela E. Luz, Fernanda B. Andrade, Denise S.P.Q. Horton, Waldir P. Elias, and Roxane M.F. Piazza.

[#]These authors contributed equally to the present work

Premiações

Rapid test for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diagnosis. Rocha LB, **Santos ARR**, Horton DSPQ, Piazza RMF. **“PRIMEIRO PRÊMIO INOVAÇÃO INSTITUTO BUTANTAN - IPLYMPICS®”**. Prêmio: elaboração do documento de patente. XV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 04 a 06 de dezembro de 2013, São Paulo (SP).

Avaliação do desempenho do teste ELISA para o diagnóstico de *Escherichia coli* produtora da toxina de Shiga (STEC). **Santos ARR**, Rocha LB, Piazza RMF. **1º Lugar no concurso de Temas Livres do 12º Congresso de Farmácia e Bioquímica de Minas Gerais**, 18 a 20 de julho de 2013, Belo Horizonte (MG).