

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

Anticorpos anti-intiminas α , β , e γ de *Escherichia coli* em soros e colostros de adultos saudáveis da Grande São Paulo

Lucy Beatriz Zapata Quintanilla

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Solange Barros Carbonare

19.551
São Paulo
2009

DEDALUS - Acervo - CQ



30100015288

Ficha Catalográfica

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

Zapata Quintanilla, Lucy Beatriz
Z35an Anticorpos anti-intiminas α , β e γ de *Escherichia coli* em soros
e colostros de adultos saudáveis da Grande São Paulo / Lucy Beatriz
Zapata Quintanilla. -- São Paulo, 2009.
134p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas.

Orientador: Carbonare, Solange Barros

1. Imunologia clínica : Medicina I. T. II. Carbonare, Solange
Barros, orientador

616.079 CDD

Lucy Beatriz Zapata Quintanilla

Anticorpos anti-intiminas α , β , e γ de *Escherichia coli* em soros e colostros de adultos saudáveis da Grande São Paulo

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Solange Barros Carbonare
orientador/presidente

Solange B. Carbonare
1º. examinador

Profa. Dra. Tania Aparecida Tardelli Jones do Amaral
2º. examinador

Profa. Dra. Waldi Pereira Elias Junior
3º. examinador

Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Marzari
4º. examinador

Profa. Dra. Sílvia Palmeira
5º. examinador

São Paulo, 16 de abril de 2009.

Trabalho realizado no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan

Suporte financeiro

*CNPq processo nº 141302/2005-4
FAPESP processo nº 03/13250-3*

*À razão da minha vida,
minha amada filhinha Isabel
que desde o começo da sua vida
esteve presente na realização deste trabalho*

*Ao meu amado esposo Rolando
pelo seu apoio e compreensão*

*Ao meu amado pai Edgar,
que sempre me incentivou a crescer na vida*

*À minha amada mãe Aylcé
pelo seu sacrifício, desprendimento e
infinito amor*

*À minha orientadora
Dra. Solange Barros Carbonare,
pelo apoio, carinho e compreensão,
que sem sua ajuda este trabalho não
seria realizado.*

Agradecimentos

À Dra. Milene Tino de Franco, pela amizade e grande ajuda na correção do texto.

À Sílvia Nuñez, pela grande amizade que surgiu durante a realização deste doutorado, e pela ajuda nos ensaios de absorção.

À Dra. Cristiane Carbonare, pela colaboração na super-expressão e purificação das intiminas e pela disponibilidade que sempre teve para me ajudar nos ensaios experimentais.

À Amanda, Priscila, Simone e Thalita, pela amizade e companhia no laboratório.

À Flávia Lima pela ajuda constante nos ensaios com as bactérias recombinantes.

À Dra. Wafa Cabrera que me ensinou a realizar o ensaio de PCR.

À Rosana Rezende Oliveira pela ajuda constante nos ensaios de Biologia Molecular.

*À Dra. Cecília Abe que me ensinou a realizar ensaios de adesão de *E. coli* a células HEp-2.*

À Ana Dantas, secretária do Departamento de Análises Clínicas, ao Jorge e à Elaine, secretários da Pós-graduação da Faculdade de Farmácia da USP, pelas informações e constante disponibilidade.

À Dra. Olga Ibañez e toda sua equipe do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan especialmente a Andrea, Luciana, Marcelo e Vinicius do laboratório de Imunogenética que sempre estiveram dispostos a me ajudar na utilização de equipamentos de Biologia Molecular.

Ao laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan que gentilmente cederam as bactérias recombinantes.

À Dra. Patrícia Palmeira, pela amizade e disponibilidade.

À Tânia, Marinaíva e Neusa, pela manutenção e preparo de materiais do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan.

Ao Dr. Orlando da Costa Ferreira Junior e Dra. Márcia Bernardino Polite do Serviço de Hemoterapia do Hospital "Albert Einstein", que gentilmente cederam as amostras de soro utilizadas neste trabalho.

Ao Serviço de Obstetrícia do Hospital Universitário da USP, que permitiu a coleta das amostras de colostro.

À Rosana Prisco do Serviço de Estatística do ICB da USP pela análise estatística dos resultados.

À Dra. Tânia Gomes pela doação das bactérias EPFC e pelos seus bons conselhos.

Ao Dr. Luis R. Trabulsi pela doação das bactérias EFEC.

À Zaira Palomino pelo apoio, carinho e ajuda incondicional.

À Kátia Yuahasi pela grande amizade e ajuda na realização da Ficha Catalográfica.

À Rosa Chura pela grande amizade e ajuda dos ensaios de Biologia Molecular.

A minhas queridas amigas Margoth, Paola, Vicky, pelo carinho e apoio neste período.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com este trabalho.

RESUMO

A diarreia é um importante problema de saúde pública no mundo inteiro e a *Escherichia coli* é um dos mais freqüentes microorganismos causadores desta doença. A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), um dos principais agentes etiológicos das diarreias infantis no nosso país, é genética e fenotipicamente relacionada com a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que além de provocar diarreia é responsável por complicações como síndrome hemolítica urêmica (HUS) e colite hemorrágica (HC). Embora a EHEC seja considerada emergente pela OMS, no Brasil poucos casos de complicações como HUS e HC foram reportados. O mecanismo de patogenicidade comum entre EPEC e EHEC é conhecido como a lesão "attaching and effacing" nos microvilos do enterócito. Esta lesão é mediada por um conjunto de fatores de virulência, dentre eles a intimina. A intimina é uma proteína de membrana externa, responsável pelo íntimo contato da bactéria com o enterócito, possui uma região N-terminal que é altamente conservada e uma região C-terminal que é variável. De acordo com a região variável, existem vários subtipos de intimina, dentre eles as intiminas α , β e γ . Uma infecção por EPEC ou EHEC induz a uma resposta de anticorpos anti-intimina no soro e no colostro. No presente trabalho, foram determinados os anticorpos contra as regiões variáveis α , β e γ e a região conservada em 100 amostras de soro e em 54 colostros de adultos saudáveis da Grande São Paulo. As concentrações de IgG sérico e de IgA secretora foram determinadas por ELISA utilizando como antígeno proteínas purificadas obtidas de bactérias recombinantes de cada intimina e os resultados foram submetidos a análise estatística. Foram também realizadas absorções com as bactérias recombinantes e ensaios de inibição de adesão. Primeiramente observamos que nossa população apresenta anticorpos séricos e secretores reativos com a região conservada e as regiões variáveis das intiminas α , β e γ , e que existe uma correlação positiva entre os diferentes grupos de dados, mostrando assim uma reatividade cruzada parcial entre os anticorpos anti-intiminas; este fato foi confirmado com as absorções e com os ensaios de adesão. A concentração de anticorpos IgA no colostro é mais alta que IgG no soro e a concentração de anticorpos anti-região conservada da intimina no soro se encontra elevada quando comparada com as outras três determinações. Em ensaio de adesão em células HEp-2, foi verificado que anticorpos anti-região variável inibem a adesão de EPEC O127:H6 numa porcentagem maior que os anticorpos anti-região conservada. A presença de anticorpos anti-região variável da intimina γ sugere mais uma vez a possível proteção contra a EHEC. Em conjunto, nossos resultados corroboram com a idéia de que nossa população desenvolve uma imunidade natural resultante da exposição a linhagens de *E. coli* ou outras bactérias presentes no ambiente, que confere uma proteção contra EHEC, mesmo não sendo esta bactéria tão freqüente no nosso meio.

Antibodies reactive with α , β and γ intimins of *Escherichia coli* in serum and colostrum samples of healthy adults living in São Paulo, Brazil.

ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a leading cause of infantile diarrhea in developing countries, and has many genetic and antigenic similarities with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). EHEC can cause a variety of human illnesses ranging from uncomplicated diarrhea to haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome. EHEC strains share with EPEC the ability to induce the attaching and effacing lesion (A/E) onto the human enterocyte membrane mediated by virulence factors codified by the pathogenicity island LEE, as the type III secretion system, Esps, intimin and Tir. The infection with EPEC and EHEC induces the production of antibodies reactive with these virulence factors. Intimin is an outer membrane protein that mediates intimate attachment in the host cells, upon interaction with its translocated receptor Tir. This protein shows high conservation in the N-terminal region and variability in the last C-terminal 280 amino acids. Many subtypes of intimins, like α , β and γ , were described according to the variable region. In this work we determined the concentration of IgG antibodies in 100 serum samples and IgA antibodies in 54 colostrum samples reactive with the variable regions α , β and γ intimins and the conserved region in healthy Brazilian adults, living in São Paulo. The concentrations of seric IgG and secretor IgA anti-intimin antibodies were determined by ELISA with purified proteins obtained from recombinant bacteria expressing the conserved and the variable regions, and then the results were submitted to statistical analysis. Some absorptions and adhesion assays were performed with the aim of investigate cross reactions among the various antibodies. Firstly we observed that our population has seric and secretory antibodies reactive with conserved and variable regions of α , β and γ intimins, and there are a positive correlation among these antibodies in serum and colostrum, showing a partial cross reactivity among anti-intimins antibodies. This was confirmed by the absorptions and adhesion assays. IgA antibodies in colostrum were higher than IgG in serum, what could be related with the protective effect of breastfeeding against EPEC infection in infants. The seric antibodies anti-conserved region were higher compared to the other three determinations. The results obtained in the adhesion assays showed that the percentage of inhibition adhesion to EPEC O127:H6 serotype with anti-variable regions antibodies was higher than anti-conserved regions. The presence of anti- γ variable region suggests the possible protection against EHEC. Taken together, our results suggest that our population develop a natural immunity as a result of the direct contact with *E. coli* strains or other bacteria present in the environment, which confers protection against EHEC, although it is not frequent in our population.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.....	21
Figura 2.....	23
Figura 3.....	26
Figura 4.....	34
Figura 5.....	39
Figura 6.....	41
Figura 7.....	46
Figura 8.....	48
Figura 9.....	53
Figura 10.....	55
Figura 11.....	57
Figura 12.....	58
Figura 13.....	61
Figura 14.....	61
Figura 15.....	63
Figura 16.....	63
Figura 17.....	65
Figura 18.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....	33
Tabela 2.....	35
Tabela 3.....	35
Tabela 4.....	47
Tabela 5.....	47
Tabela 6.....	50
Tabela 7.....	51
Tabela 8.....	52
Tabela 9.....	56
Tabela 10.....	59
Tabela 11.....	59
Tabela 12.....	60
Tabela 13.....	62
Tabela 14.....	64
Tabela 15.....	67
Tabela 16.....	67
Tabela 17.....	68
Tabela 18.....	69
Tabela 19.....	69
Tabela 20.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E: lesão "Attaching and Effacing"
a-EPEC: EPEC atípica
BCA: "Bicinchoninic Acid"
BFP: "bundle-forming pillus"
cesT: "Tir specific chaperone"
cons: intimina conservada
DAB: Diaminobenzidina
DAEC: *Escherichia coli* difusamente aderente
DO: Densidade óptica
DP: Desvio padrão
eae: "*E. coli* attaching and effacing", gene que codifica a intimina
EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa
EAF: plasmídeo de virulência que codifica o BFP
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasora
ELISA: "enzyme linked immunosorbent assay", Ensaio imunoenzimático
EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica
esc: "*E. coli* secretion"
esp: "EPEC secreted proteins", gene que codifica as proteínas secretadas de EPEC
EspA: Proteína secretada do tipo A
EspB: Proteína secretada do tipo B
EspD: Proteína secretada do tipo D
EspF: Proteína secretada do tipo F
EspG: Proteína secretada do tipo G
EspH: Proteína secretada do tipo H
ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica
HeLa: células de câncer cervical
HEp-2: Célula de cultura proveniente de carcinoma de laringe
HIV: Vírus da imunodeficiência humana
Hly-A: Enterohemolisina
HTLV I/II: Vírus t-linfotrópico humano I/II
HUS: Síndrome Hemolítica Urêmica
IB: "Immunoblotting"
IBD: Domínio de ligação da intimina
IgA: Imunoglobulina A
IgG: Imunoglobulina G
IgM: Imunoglobulina M
Int: Intimina
katP: catalase-peroxidase gene
kDa: Kilo Daltons
LEE: "locus of enterocyte effacement"
LifA: Linfotatina
Ln: logaritmo natural
LPF: "long polar fimbriae"
LPS: Lípolíssacarídeo
LT: Termo-lábil
Lys: Aminoácido lisina

map: "mitochondrial associated protein"
N-WASP: "neural Wiscott-Aldrich syndrome protein"
OmpA: "outer membrane protein of *Escherichia coli* O157:H7"
OPD: Orto-feniletileno diamina
PBS: Solução salina tamponada com fosfatos
per: "plasmid-encoded regulator"
PM: Peso Molecular
REPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica de coelho
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
SlgA: IgA secretora
SLT: "Shiga like toxin"
ST: Termo-estável
STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga.
Stx1: Shiga toxina 1
Stx2: Shiga toxina 2
TccP: "Tir cytoskeleton coupling protein"
t-EPEC: EPEC típica
Tir: "translocated intimin receptor", proteína secretada.
TSA: "Tryptic Soy Agar"
TSB: "Tryptic Soy Broth"
TTSS: "type three secretion system"
v α : Intimina variável α
v β : Intimina variável β
v γ : Intimina variável γ
V: Volt
Val: Aminoácido valina
VT: Verotoxina
WASP: "Wiscott-Aldrich syndrome protein"

SUMÁRIO

Introdução	16
1. <i>Escherichia coli</i>	16
2. EPEC.....	17
3. EHEC.....	18
4. Patogenicidade.....	20
5. Intimina.....	25
6. Abordagens imunológicas.....	27
Objetivos	31
Material e Métodos	32
1. Amostras de soro humano.....	32
2. Amostras de colostro humano.....	32
3. IgA purificada.....	33
4. Linhagens de <i>E. coli</i>	33
5. Obtenção de Intiminas Recombinantes.....	33
5.1. Reação de polimerização em cadeia.....	34
5.2. Eletroforese de DNA em gel de agarose.....	35
5.3. Seqüenciamento de clones de intimina 1alfa, 1beta, 1 gama e 4alfa.....	36
5.4. Expressão e purificação das intiminas.....	36
5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	37
5.5.1. Corrida eletroforetica.....	38
5.6. Determinação da concentração de proteína.....	38
6. ELISA para a determinação de anticorpos IgG no soro e IgA no colostro reativos com as intiminas.....	38
7. Análise estatística.....	41
8. Ensaio de “Immunoblotting” (IB) com as intiminas purificadas.....	41
9. Absorção do “pool” de soro e da IgA purificada com as intiminas recombinantes.....	42
10. Inibição da adesão de <i>E. coli</i> a células HEp-2.....	43
Resultados	46
1. Análise do gel de agarose como resultado do PCR	46
2. Análise do seqüenciamento.....	46
3. Expressão e purificação das intiminas recombinantes.....	47

4. Determinação da concentração de anticorpos anti-intiminas nas amostras de soro e colostro.....	49
5. Análise estatística.....	52
5.1. Coeficientes de correlação de Spearman.....	55
6. Determinação do “cut off”.....	59
7. Ensaio de “immunoblotting” (IB).....	60
8. Absorção do “pool” de soro e da IgA purificada com as intiminas recombinantes.....	62
8.1. Absorções do “pool” de soro com as intiminas recombinantes.....	62
8.2. Absorções de IgA purificada com as intiminas recombinantes.....	64
9. Inibição da adesão.....	66
Discussão.....	71
Conclusões.....	82
Referências Bibliográficas.....	83
Apêndice.....	101
Artigo submetido para publicação na revista “Emerging Infectious Disease”.....	101
Relação de reagentes utilizados na pesquisa.....	116
Relação de equipamentos utilizados na pesquisa.....	127
Anexos.....	128
Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Doutorado.....	128
Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	129
Ficha de Aluno.....	132

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A diarreia aguda é uma das mais comuns causas de morbidade e mortalidade no mundo inteiro e é considerada responsável por 2 a 3 milhões de mortes por ano, ocorrendo mais em crianças menores de 2 anos em países subdesenvolvidos (DENNEHY, 2005; KOSEK et al., 2003).

Denominamos diarreia aguda a condição clínica em que ocorre perda anormal de água e eletrólitos por via intestinal, decorrente do rompimento do equilíbrio das funções fisiológicas do tubo digestivo (digestão, absorção e secreção). Caracteriza-se por alteração do hábito intestinal com aumento do número de evacuações e diminuição da consistência das fezes, que pode ser acompanhada por vômitos e febre (GRISI et al., 2000). Todos estes sintomas podem estar associados à má nutrição e a uma deficiência imunológica de cada indivíduo (FAGUNDES-NETO & SCALETSKY, 2000).

Dentre as principais responsáveis por esta doença estão as bactérias da espécie *Escherichia coli*, que fazem parte da microbiota intestinal humana, mas quando apresentam alguns fatores de virulência podem causar infecção diarreica em crianças e adultos (FAGUNDES-NETO & SCALETSKY, 2000; GOMES et al., 1991).

1. *Escherichia coli*

A *E. coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo que coloniza o trato gastrointestinal de crianças nas primeiras horas de vida e coexiste com o ser humano ao longo do tempo em uma total simbiose. Estas amostras comensais raramente causam doença, exceto em hospedeiros imunocomprometidos ou quando a barreira gastrointestinal é rompida (NATARO & KAPER, 1998).

Existem clones de *E. coli* altamente adaptados que adquiriram atributos de virulência específicos, conferindo assim a habilidade de adaptar-se a novos nichos e tornando-se capaz de produzir um amplo espectro de doenças. De acordo com os fatores de virulência, estas bactérias podem afetar especificamente o trato intestinal causando diarreia, ou outros sítios extra-intestinais, provocando infecção do trato urinário, sepse ou meningite. As diferentes cepas de *E. coli* patogênicas são classificadas de acordo com seus antígenos O (lipopolissacarídeo-LPS) que define o sorogrupo e H (flagelar). A combinação dos antígenos O e H definem o sorotipo (KAPER et al., 2004).

A detecção e caracterização dos fatores de virulência são essenciais para a identificação do patógeno intestinal assim como para o desenvolvimento de medidas preventivas de infecções por qualquer linhagem patogênica (LEVINE, 1987; NATARO & KAPER, 1998).

Entre as *E. coli* diarreio gênicas foram descritas seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Cada uma destas categorias foi estabelecida de acordo com os sítios de infecção, manifestações clínicas provocadas, presença de fatores de virulência e padrão de adesão em culturas de células (LEVINE, 1987; NATARO & KAPER, 1998). Sua patogenicidade consiste na colonização da mucosa intestinal, evasão das defesas do hospedeiro, multiplicação e dano celular (KAPER et al., 2004).

2. EPEC

Dentro da família das *E. coli* patogênicas, a EPEC foi a primeira a ser identificada como responsável por surtos de diarreia infantil nos anos 1940 (BRAY, 1945). Esses surtos de diarreia de verão ocorreram em países desenvolvidos até a década de 1960 e tiveram como consequência altos níveis de mortalidade (SMITH et al., 1996). Após esse período, e devido à melhora nos hábitos de higiene, ao melhor tratamento das infecções em hospitais e um eficiente controle nas medidas de saúde pública, as cepas de EPEC já não eram um importante agente de diarreia nos países desenvolvidos (NATARO & KAPER, 1998; SMITH et al., 1996). Mesmo assim, a EPEC foi ainda responsável por surtos ocasionais em crianças (BOWER et al., 1989; PANLOZZI et al., 1989). Nos países em desenvolvimento, nas décadas de 80 e 90 a EPEC continuou sendo a maior causa de diarreia infantil, responsável por vários surtos (DONNENBERG & KAPER, 1992; LEVINE, 1987).

Estudos feitos em países como México (CRAVIOTO et al., 1988 e 1996), África do Sul (ROBINS-BROWNE et al., 1982) e Bangladesh (ALBERT, 1996) mostraram que 30 a 40% de casos de diarreia infantil eram devidos a uma infecção por EPEC, que foi responsável por centenas de milhares de mortes de crianças por ano (NATARO & KAPER, 1998).

Este quadro também foi observado no Brasil, particularmente na Grande São Paulo, onde a EPEC é uma das principais causas de diarreia em crianças até um ano de idade (GOMES et al., 1991 e 1996).

Em 1995, durante o segundo Simpósio Internacional sobre EPEC em São Paulo, foi estabelecida a classificação da EPEC, sendo denominada EPEC típica (t-EPEC) quando carrega o plasmídeo EAF ("EPEC adherence factor"), e atípica (a-EPEC) quando não apresenta este plasmídeo (KAPER, 1996). Por muitas décadas a EPEC típica foi a principal bactéria enteropatogênica em crianças em países em desenvolvimento, mas recentes estudos no nosso país mostraram uma queda no seu isolamento. Atualmente uma maior atenção está sendo dada às cepas de EPEC atípicas em centros urbanos (BUERIS et al., 2007; FRANZOLIN et al., 2005; GOMES et al. 2004; REGUA-MANGIA et al., 2004; TRABULSI et al., 2002).

Os sorogrupos de EPEC mais comuns, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), são doze e pertencem aos sorogrupos O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142 e O158, estes sorogrupos incluem cepas típicas e atípicas (CAMPOS et al., 2004; SCOTLAND et al., 1996).

A infecção por EPEC é transmitida de pessoa para pessoa, porém pode ser adquirida pela ingestão desses microrganismos em água e alimentos contaminados, sendo o problema agravado quando há subnutrição (FAGUNDES-NETO & SCALETSKY, 2000; NATARO & KAPER, 1998).

3. EHEC

No ano de 1983, as bactérias da classe STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga) foram reconhecidas como distintas da classe das EPEC. Em dois surtos de diarreia foram observados casos que apresentavam uma complicação denominada como colite hemorrágica (HC) (RILEY et al., 1983). No mesmo ano, casos esporádicos de síndrome hemolítica urêmica (HUS) foram associados com uma toxina produzida pela *E. coli* presente nas fezes dos pacientes (KARMALI, 1989). Estas duas observações levaram ao reconhecimento de uma nova classe de patógeno entérico, responsável por doenças entéricas e renais. Desta maneira, passou-se a denominar STEC qualquer cepa de *E. coli* que produz a toxina shiga (Stx), e o termo EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica) passou a designar um subgrupo das STEC que, além de produzir a Stx, também possuem o gene *eae* e podem

provocar uma diarreia com complicações como HC e HUS, causando dano renal e trombocitopenia.

Nos países desenvolvidos têm sido relatados com frequência casos de HC e HUS como complicações posteriores ao contato com EHEC, principalmente por aquelas do sorotipo O157:H7 (PATON & PATON, 1998). Estima-se que 5 a 10% das pessoas que sofrem uma infecção por EHEC podem desenvolver HUS. Deste grupo, aproximadamente 10% podem chegar a morrer ou ficar com um dano renal permanente e mais de 50% podem ficar com algum prejuízo renal (THORPE, 2004). Existem outros sorotipos de EHEC, particularmente os sorogrupos O111, O113, O26 e O145, que também causam diarreia e são mais frequentes que a O157:H7 em muitos outros países (CAPRIOLI et al., 2005; KAPER et al., 2004).

No Brasil já foi detectada a presença de linhagens de EHEC, incluindo algumas do sorotipo O157:H7, em fezes de animais (CERQUEIRA et al., 1999; LEOMIL et al., 2003; SARIDAKIS et al., 1997; MOREIRA et al., 2003; TRISTÃO et al., 2007) e em amostras de carne bovina (CERQUEIRA et al., 1997; GUTH et al., 2003; IRINO et al., 2005), sendo esta última considerada como a maior fonte de STEC patogênica em humanos (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007). Desde a década de 80 foram isoladas também outras EHEC de fezes de pacientes com diarreia, dentre as quais os sorotipos O26:H11, O113:H2 e O111:H8[H-] foram identificados na maioria dos casos (GUTH et al., 2002, 2005; VAZ et al., 2004 e 2006).

Apesar das precárias condições de saneamento no Brasil, são raros os relatos de casos de diarreias por EHEC em humanos (IRINO et al., 2002). A frequência do isolamento de EHEC em casos de diarreias é a mesma que em outros países, porém quase não existem casos de HC ou HUS associados à EHEC. Até agora somente foram relatados dois casos comprovados de HUS associado à EHEC no Brasil, ambos em crianças, um no ano de 2002 (GUTH et al., 2002) e o outro em 2005 (SOUZA et al., 2007). Esta aparente contradição talvez possa ser explicada por vários fatores que resultam na baixa ocorrência desta doença em nosso meio, como por exemplo, as características peculiares do clima tropical, os hábitos alimentares da população com baixo consumo de derivados de carne e leite bovinos, principais fontes de infecção nos países ricos, e dificuldades no diagnóstico.

Os surtos causados pela EHEC foram devidos principalmente a alimentos de origem animal (PATON & PATON, 1998). Embora a ingestão de comida mal cozida derivada de animais seja a principal via de transmissão de EHEC em humanos, há

evidências de que estas infecções assim como aquelas por EPEC possam ser adquiridas por transmissão de pessoa-pessoa (GRIFFIN & TAUXE, 1991). Recentemente numerosos surtos foram associados à água para beber em lugares de recreação, e também por contato com animais de zona rural (HEUVELINK et al., 2002).

4. Patogenicidade

Existem semelhanças entre os mecanismos de patogenicidade de EPEC e EHEC cuja característica é a produção da lesão denominada como “attaching and effacing” (A/E) na mucosa intestinal (JERSE et al., 1990). Primeiramente ocorre uma primeira interação da bactéria com o epitélio intestinal, seguida pela destruição das microvilosidades do enterócito, íntima aderência da bactéria, ruptura do citoesqueleto no sítio da ligação e finalmente a formação de um pedestal e acúmulo de actina polimerizada e outros elementos do citoesqueleto no sítio de adesão da bactéria (NATARO & KAPER, 1998; TRABULSI et al., 2002). Esta lesão também é produzida em células de mamíferos cultivadas em meio de cultura (KNUTTON et al., 1989).

A habilidade de induzir a lesão A/E é codificada pelos genes cromossomais de uma ilha de patogenicidade denominada “locus of enterocyte effacement” (LEE) de 35 kb (Mc DANIEL, 1995). Os genes presentes no LEE estão organizados em cinco operons. Resumidamente, os operons LEE1, LEE2 e LEE3 contêm os genes *esc* e *sep* que codificam para o sistema de secreção tipo III também chamado TTSS (“type three secretion system”), o operon LEE4 codifica para as proteínas Esp (“*E. coli* secreted protein”), translocadoras (EspA, EspB e EspD) e efetoras (EspF, EspG e Map), e o LEE5 contêm os genes que intermedeiam a íntima ligação da bactéria à célula epitelial, que são o gene *eae* (“*E. coli* Attaching and Effacing”), que codifica a intimina; o gene *tir*, que codifica o receptor de intimina Tir (“translocated intimin receptor”) e o gene *cesT*, que codifica a chaperonina requerida para a secreção do Tir (ELLIOT et al., 1999; GIRARD et al., 2005; GOOSNEY et al., 2000; JARVIS et al., 1995; MCDANIEL et al., 1995; MCDANIEL & KAPER, 1997).

A figura 1 contém uma representação esquemática do material genético de EHEC e EPEC.

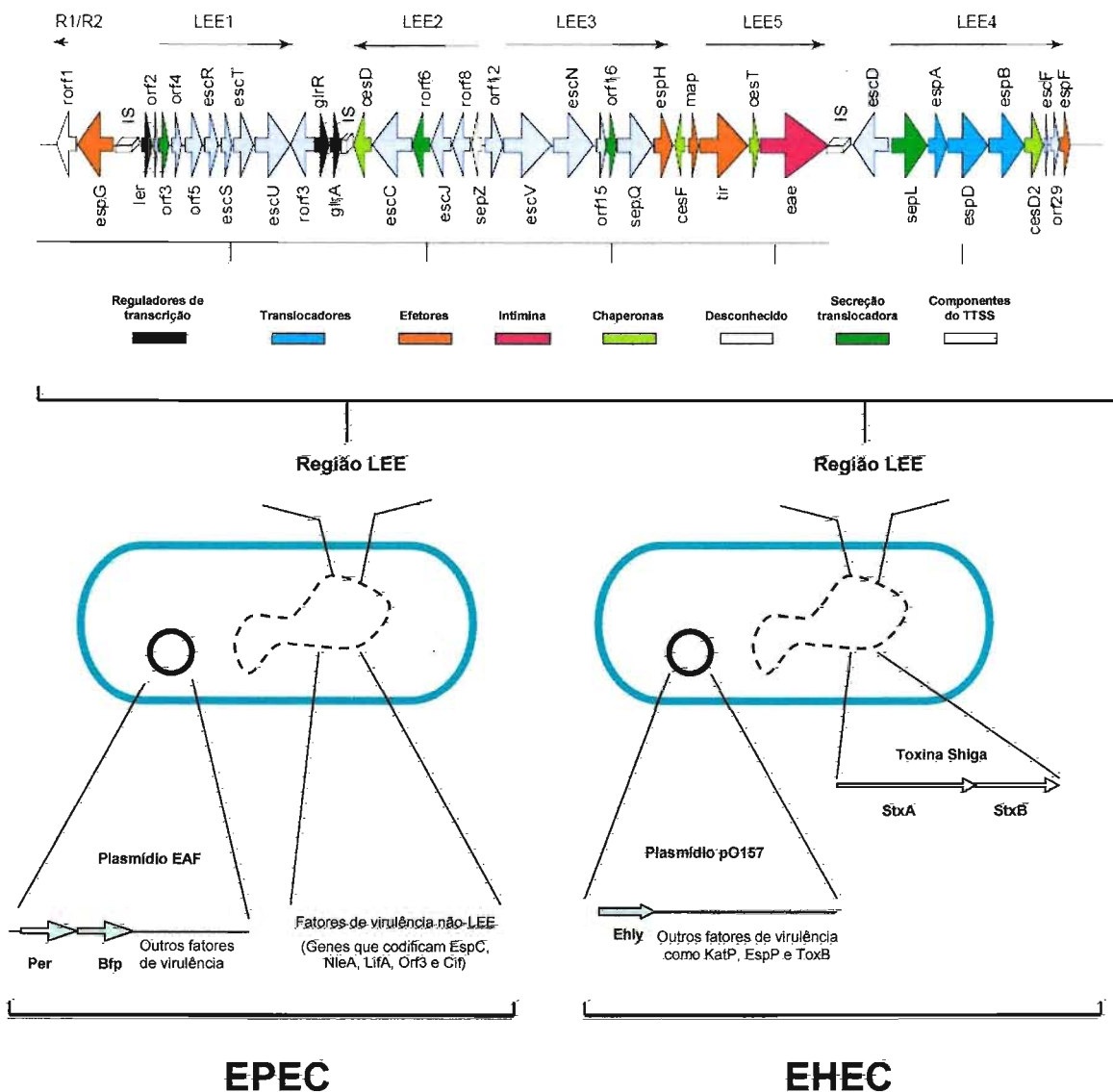


Figura 1. Esquema simplificado mostrando o material genético de EPEC e EHEC enfocando os principais fatores de virulência. Adaptado a partir de CAPRIOLI et al., 2005 e DEAN et al., 2005.

Os genes do LEE são bem conservados e podem ser encontrados também em outros patógenos tais como *Citrobacter rodentium* que produz a hiperplasia de cólon em camundongos (KAPER et al., 2004) e em cepas de REPEC (“rabbit EPEC”) causadoras de diarreia em coelhos (CANTEY et al., 1977). A lesão A/E também é produzida por *E. coli* em cães (JANKE et al., 1989), gado bovino (GUNNING et al., 2001; PEARSON et al., 1999), porcos (HIGGINS et al., 1997), ovelhas (COOKSON et al., 2002; WOODWARD et al., 2003), carneiros (DUHAMEL et al., 1992) e galinhas (SUEYOSHI et al., 1997).

O TTSS é um sistema injetor que introduz várias proteínas bacterianas na célula intestinal. A EspA forma um tubo entre a bactéria e a superfície celular do

hospedeiro (KNUTON et al., 1998) por onde passam EspB e EspD que são inseridas na membrana celular, formando poros, por onde são translocadas as proteínas efetoras e as moléculas de Tir. As proteínas efetoras ativam a sinalização celular, causando alterações no citoesqueleto da célula do hospedeiro, resultando em despolimerização da actina e perda das microvilosidades (CLARKE et al., 2003). Ao serem translocadas, as moléculas de Tir são inseridas na membrana da célula intestinal (GOOSNEY et al., 2000; KENNY et al., 1997; VALLANCE & FINLAY, 2000) e são fosforiladas em resíduos de tirosina (KENNY et al., 1997; ROSENSHINE et al., 1996; BACKERT & SELBACH, 2005). Duas moléculas de intimina se ligam ao Tir explicando a íntima adesão característica da infecção por EPEC (LUO et al., 2000) e EHEC (LEBLANC, 2003; NATARO & KAPER, 1998). A proteína EspE codificada pela região LEE de EHEC é equivalente à proteína Tir de EPEC (DEIBEL et al., 1998; EBEL et al., 1998).

A fosforilação do Tir permite a ligação direta ou indireta da Nck, uma proteína adaptadora do hospedeiro característica de EPEC, que recruta a WASP (“Wiscott-Aldrich syndrome protein”) ou N-WASP (“neural Wiscott-Aldrich syndrome protein”) para a área de adesão, sendo esta essencial para o efeito de A/E (CAMPELLONE et al., 2002; GRUENHEID et al., 2001; KALMAN et al., 1999; LOMMEL et al., 2001). No caso da EHEC₁₅₇, a proteína que desempenha o papel da Nck é a EspF_U (CAMPELLONE et al., 2004) ou também denominada como TccP (“Tir cytoskeleton coupling protein”) (GARMENDIA et al., 2004).

WASP ou N-WASP é ativada através do recrutamento e ativação do complexo Arp 2/3 (“actin-related proteins 2 and 3”), que faz a nucleação dos filamentos de actina e inicia a formação do pedestal característico (GRUENHEID et al., 2001; KALMAN et al., 1999; KAPER et al., 2004; VALLANCE & FINLAY, 2000). Outras proteínas do citoesqueleto como a vinculina, cortactina, talina e α -actina são recrutadas para a formação do pedestal (SANGER et al., 1996; BACKERT & SELBACH, 2005). A figura 2 ilustra como é que se produz a lesão A/E num modelo de EPEC.

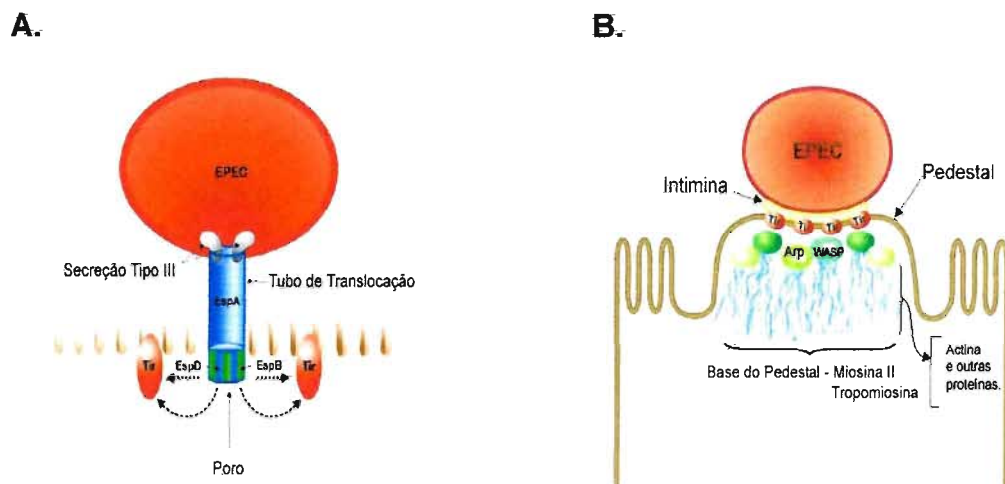


Figura 2. Patogênese da EPEC. A. Formação do poro entre a bactéria e a célula epitelial do hospedeiro e translocação das Esps. B. Formação do pedestal. (Adaptado de VALLANCE & FINLAY, 2000).

Resumidamente pode-se dizer que a lesão A/E resulta na redução da capacidade de absorção da mucosa intestinal, a qual inevitavelmente leva ao rompimento do balanço eletrolítico e subseqüentemente a diarreia (CLARKE et al., 2003).

Tanto EPEC como EHEC dependem de plasmídeos que desempenham um importante papel na sua patogenicidade (TZIPORI et al., 1989). A EPEC contém um plasmídeo que é denominado EAF (“EPEC adherence factor”) (TOBE et al., 1999) que codifica a fimbria tipo IV denominada BFP (“bundle-forming pilus”) (GIRON et al., 1991). Ele também contém o locus *per* (“plasmid-encoded regulator”) cujos produtos regulam o *bfp* e a maioria dos genes do LEE. As cepas de EPEC que além de possuir o LEE contém o plasmídeo EAF são denominadas típicas, e aquelas que contêm o LEE e não contêm o plasmídeo EAF são chamadas atípicas (KAPER, 1996). Os sorotipos da EPEC típica não foram encontrados em animais, sugerindo que o reservatório dessas bactérias seja somente humano em contraste com a maioria dos sorotipos de EPEC atípicas (BLANCO et al., 2005; CORTÉS et al., 2005; ORDEN et al., 2003; TRABULSI et al., 2002).

A EHEC O157:H7 possui um plasmídeo de 92,72 Kb chamado pO157 contendo genes que codificam uma enterohemolisina (Hly-A) (BURLAND, 1998), uma potente adesina (OmpA) (TORRES & KAPER, 2003) que atua na adesão a células HeLa, mas cujo papel *in vivo* ainda não é claro, além de outros genes que estão relacionados com a patogenicidade da bactéria como *katP* e *espP* (BRUNDER et al., 1996 e 1997).

Além dos fatores de virulência codificados pela região LEE, a EPEC possui uma proteína de alta massa molecular aproximadamente 385 kDa denominada linfostatina (LifA) que inibe a ativação dos linfócitos (KLAPPROTH et al., 2000). Esta proteína também está presente em algumas cepas de EHEC com nome de Efa1, onde se lhe atribui uma propriedade adesiva (NICHOLLS et al., 2000).

Existem dois operons para fimbria (*lpf* e *lpfA*) (TORRES et al., 2002, 2004), que estão presentes em EHEC O157, mas não em EPEC (HAYASHI et al., 2001; PERNA et al., 2001) e tem homologia com a longa fimbria polar LPF presente em *Salmonella* (BAUMLER et al., 1996). Outra fimbria denominada como F9 foi identificada em duas cepas de EHEC, sendo necessária pra a colonização pela bactéria em gado (VAN DIEMEN et al., 2005).

Uma das características das EHEC que está ausente nas EPEC é a capacidade de produção de toxinas Stx. Anteriormente chamadas de verotoxinas (VT) devido a sua toxicidade para células Vero passaram a ser denominadas de Shiga like toxin (SLT) devido a sua semelhança com toxinas Shiga de *Shigella dysenteriae*. Existem dois tipos de toxinas, denominadas Stx1 e Stx2, que são sorologicamente distintas, mas possuem ação biológica semelhante (PATON & PATON, 1998).

A Stx é produzida pelas bactérias no cólon e chega até o rim pela corrente sanguínea danificando a célula renal e produzindo uma oclusão da microvasculatura através da combinação da toxicidade e indução da produção local de citocinas e quimiocinas, resultando numa inflamação renal (ANDREOLI et al., 2002). Este dano pode conduzir a HUS que é caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e a falha renal aguda. A Stx também induz apoptose do enterócito (KAPER et al., 2004).

Embora mais de 200 sorotipos de *E. coli* possam produzir Stx, a maioria destes sorotipos não contém a ilha de patogenicidade LEE e não estão associadas a doenças humanas. Por este motivo passou-se a utilizar STEC como um termo geral para qualquer *E. coli* que produza Stx e o termo EHEC para aquelas cepas que além de produzir a Stx também tenham a região LEE (KAPER et al., 2004).

No ano 1996, Whittam & Mc Graw estudaram uma coleção de cepas de EPEC e EHEC e as classificaram em quatro grupos genéticos usando uma técnica denominada "multilocus enzyme electrophoresis" que caracteriza os genótipos cromossomais, estes grupos são: EPEC1 (cepas O55:H6, O127:H6, O142:H6 e

O142:H34), EPEC2 (O26:H2, O111:H2, O114:H2, O119:H2, O119:H6 e O128:H2), EHEC1 (cepas O55:H7 e O157:H7) e EHEC2 (cepas O26:H11 e O111ac:H-), onde o grupo das EPEC2 está próximo das EHEC (ADU-BOBIE et al., 1998).

5. Intimína

A Intimína é uma adesina muito bem caracterizada que possui massa molecular de 94-97 kDa, sendo constituída por 939 aminoácidos (aa) altamente conservados na região N-terminal (aa 330 a 659) (YU & KAPER, 1992), e variáveis nos últimos 280 aminoácidos da região C-terminal (Int280). Além da função de adesão na célula epitelial, a intimína também estimula a resposta Th1 e a hiperplasia da crípta intestinal (HIGGINS et al., 1999; KAPER et al., 2004).

Estudos com diferentes intimínas de EPEC e EHEC mostraram que o sítio de ligação com o receptor está localizado na região Int280 (FRANKEL et al., 1994). Alguns estudos afirmam que a ligação da intimína pode ocorrer diretamente na célula do hospedeiro (AN et al., 1997; FRANKEL et al., 1994) ou através do receptor Tir (DEIBEL et al., 1998; HARTLAND et al., 1999; KENNY, 1997). A ligação direta à célula hospedeira depende de pontes de dissulfeto (HARTLAND et al., 1999). Mesmo assim, quando a intimína é expressa na superfície da EPEC ambas as ligações são requeridas para a adesão e a formação da lesão A/E (FITZHENRY et al., 2001). Em 2002 foi descrito que a intimína presente na cepa EHEC O157:H7, não só reconhece o Tir como receptor, mas também reconhece a proteína nucleolína que está localizada na superfície de células em cultura como as HEP-2 (SINCLAIR & O'BRIEN, 2002). Em 2006 além da participação da nucleolína, observaram a participação da integrina $\beta 1$ na formação do pedestal (SINCLAIR, et al., 2006).

Um estudo que verifica o papel fundamental da intimína na adesão a célula foi realizado por Hernandez e cols. (2008) que utilizaram duas cepas, a primeira uma aEPEC1551-2, cujo único fator de adesão era intimína, que mostrou uma adesão localizada e a segunda, uma cepa mutante carente da expressão de intimína 1551-2 (*eae::pRT2*), mas que apresentou aderência de tipo difuso. Este resultado mostrou que a presença da intimína é essencial na formação de microcolonias compactas aderidas a células HeLa/HEP-2 como resultado da acumulação de actina característica da lesão A/E.

Os vários tipos de intimína, designados por letras gregas, foram determinados pela variação antigénica existente no sítio de ligação da intimína expressada por

diferentes cepas de EPEC e EHEC humanas. Inicialmente foram determinados os tipos α , β , γ e δ como sendo principais tipos relacionados a doenças humanas (ADUBOBIE et al., 1998a). A Intimina α é característica das EPEC1, a intimina β está associada tanto com a EPEC2 e a EHEC2 enquanto que a intimina γ é encontrada nas EHEC1 que inclui as cepas EHEC O157 e EPEC O55:H7 (TRABULSI et al., 2002; WHITTAM et al., 1996). Em estudos genéticos realizados posteriormente em diferentes sorotipos tanto de EPEC como de EHEC humanas e animais, foram descritos outros tipos e subtipos de intimina, que são: 1α , 2α , 1β , 2β , 1γ , $2\gamma/\theta$, δ/κ , ϵ , ζ , η , λ , μ , ι , ν , ξ e \omicron (BLANCO et al., 2004; GARRIDO et al., 2006; OSWALD et al., 2000; ZHANG et al., 2002).

Considerando-se a molécula total (939 aa), existe identidade de aproximadamente 80% entre as seqüências de aminoácidos das intiminas α , β e γ . Quando são consideradas apenas as porções finais das regiões N-terminais (330 a 659 aa), a identidade é de 90%. Esses dados indicam pequena variação entre as regiões Int280 dessas intiminas (AGIN & WOLF, 1997).

A figura 3 ilustra o complexo intimina-Tir onde se vê que cada molécula de intimina compõe-se de cinco domínios funcionais: um domínio N-terminal ancorado na membrana externa da bactéria, incluindo os aminoácidos inseridos na região periplasmática e transmembrânica, e quatro domínios extracelulares denominados D0 (559-657), D1 (658-751), D2 (752-841) e D3 (842-939), este último é o domínio de ligação da intimina com Tir (IBD) (LUO et al., 2000).

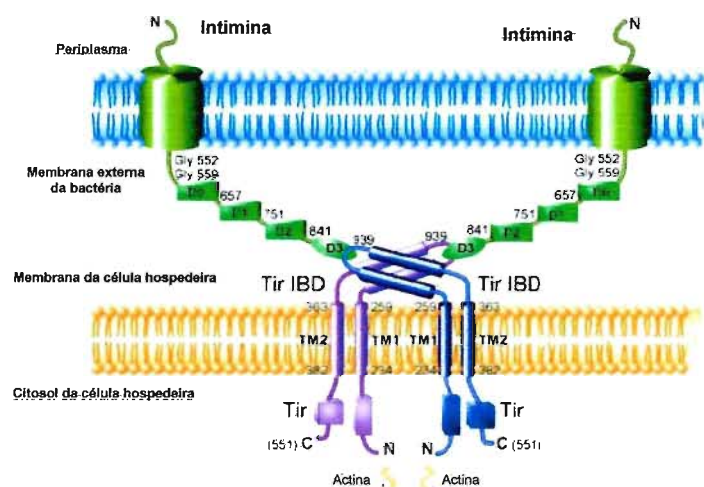


Figura 3. Esquema do complexo formado pelo fragmento C-terminal da intimina e o domínio de ligação com Tir. A intimina em verde tem os domínios D0, D1 e D2 em retângulos e o domínio de ligação ao Tir em oval (D3). O Tir é um dímero (em rosa e azul) na membrana da célula hospedeira. O domínio N-terminal do Tir está ancorado aos componentes do citosol da célula do hospedeiro, como a actina, que são necessários para a formação da lesão A/E. (Adaptado de LUO et al., 2000).

De acordo com estudos realizados em cultura de órgãos, existem diferenças na adesão da bactéria à célula hospedeira dependendo do subtipo de intimina. Enquanto EPECs que expressam a intimina α ou β aderem ao intestino delgado, a EHEC O157:H7 que expressa a intimina γ adere na região terminal do íleo, onde a lesão A/E provocada se restringe ao epitélio associado ao folículo (FAE). Isto foi demonstrado através da mutagênese de aminoácidos específicos na região C-terminal da intimina, onde a troca de valina por uma alanina na posição 911 resultou na mudança do fenótipo da intimina α "like" a intimina γ "like" (FITZHENRY et al., 2002; PHILLIPS, 2002).

Outros estudos de mutagênese sitio-dirigida mostraram evidências de que o resíduo de triptofano na posição 240 da Int280 é imprescindível para a formação de pedestais de actina na célula epitelial, já que quando era alterado evitava a interação intimina-Tir (BATCHELOR et al., 2000). Outros estudos indicaram que a Cys-937 é essencial para a ligação da intimina às células HEP-2 (FRANKEL et al., 1996; HICKS et al., 1998). Mutantes expressando intimina desprovida dos dois últimos aminoácidos, Val-938 e Lys-939, mostraram-se negativos no teste de FAS, porém quando desprovido apenas do Lys-939 induzia a polimerização de actina no sítio de adesão da bactéria à célula e assim formando a lesão A/E (FRANKEL et al., 1998). Estes fenômenos podem ser reflexos da diminuição da afinidade da intimina ao receptor ou de uma instabilidade funcional-conformacional do domínio de ligação à célula (LIMA, 2004).

6. Abordagens imunológicas

A aquisição de anticorpos dirigidos a antígenos de EPEC por crianças saudáveis da Grande São Paulo foi estudada por Carbonare e cols. (2003). Neste estudo foi verificado que, a partir do segundo ano de vida, o repertório de anticorpos séricos é muito semelhante ao do adulto e representado por anticorpos dirigidos a inúmeras frações antigênicas da bactéria, entre elas os principais fatores de virulência de EPEC: intimina, BFP, EspA e EspB. Anticorpos reativos com estes fatores de virulência também foram encontrados em soros de crianças brasileiras após infecção por EPEC (MARTINEZ et al., 1999).

O aleitamento materno protege lactantes de infecções em geral, principalmente diarreias causadas por EPEC (VICTORA et al., 1987). Estudos

realizados com colostro humano mostraram a presença de anticorpos secretores reativos com vários fatores de virulência de *E. coli* diarreio gênicas (NOGUERA-OBENZA et al., 2003) como EPEC (CAMARA et al., 1994; LOUREIRO et al., 1998), EIEC (CARBONARE et al., 1995), EAEC (FERNANDES et al., 2001) e EHEC (PALMEIRA et al., 2005). Vários destes trabalhos mostraram que anticorpos secretores da classe IgA do colostro humano são capazes de inibir a adesão de bactérias a células HEp-2 em cultura. Com relação à EPEC foi ainda verificada esta inibição promovida por anticorpos IgA anti-intimina (CARBONARE et al., 1997).

No trabalho de Lima (2004), diferentes regiões dos subtipos α , β , δ , γ e ϵ de intiminas em *E. coli* foram clonadas e animais foram imunizados com as proteínas obtidas. Demonstrou-se que os anticorpos séricos dirigidos contra o terço C-terminal das intiminas reduzem com mais eficiência a adesão de EPEC às células HEp-2 e que os títulos de anticorpos IgG anti-porção variável ou conservada dos vários subtipos de intimina são altos tanto em coelhos quanto em camundongos. Foi feita a detecção específica de anticorpos reativos com a porção 280 C-terminal da intimina em amostras de colostro de gado bovino na Argentina, e o resultado mostrou que 77% das amostras apresentavam estes anticorpos (VILTE et al., 2008).

A presença de anticorpos anti-intimina em amostras individuais de colostro de mulheres da Grande São Paulo bem como a sua capacidade inibitória da adesão de EPEC a células epiteliais indicam que este deve ser um importante mecanismo protetor do lactente contra infecções por EPEC, promovido pelo aleitamento materno (CARNEIRO-SAMPAIO et al., 1996). Outro estudo mostra que o colostro de mulheres da Grande São Paulo também apresenta anticorpos reativos com fatores de virulência de EHEC, incluindo intimina, sendo que todas as amostras de colostro analisadas mostraram alta capacidade inibitória da adesão de EHEC a células HEp-2 (PALMEIRA et al., 2004).

Anticorpos anti-intimina também estão presentes em praticamente todas as amostras de soro de adultos e de crianças acima de um ano de idade, período em que praticamente já não existe a infecção por EPEC na população, que se restringe a crianças com até 12 meses de idade (CARBONARE et al., 2003). Crianças infectadas com EHEC também apresentam uma resposta de anticorpos anti-intimina (JENKINS, et al., 2000; LI et al., 2000). Anticorpos reativos com intimina e contra fatores de virulência de EPEC podem, em principio mudar o curso da infecção e agir

na proteção da mucosa intestinal, desempenhando um papel na proteção contra a infecção.

Outro importante fator de virulência destas bactérias é o LPS, presente em todas as bactérias gram negativas. Pacientes infectados com *E. coli* O157 desenvolvem anticorpos contra o LPS O157 (CHART et al., 1999; DALWAI & CHART, 2004) e a detecção sorológica destes anticorpos pode ser indicativa de uma infecção, mesmo quando não se consegue o isolamento de *E. coli* O157 nas fezes (CHART & ROWE, 1992; GREATOREX & THORNE, 1994).

Em nosso trabalho anterior, anticorpos anti-bactérias totais EHEC O157:H7 e O111:H- e EPEC O111:H- e anticorpos anti LPS O157, O111 e O55 foram detectados por ELISA em 100 amostras de soro de adultos saudáveis na população da Grande São Paulo. Os resultados mostraram que, apesar da baixa prevalência da EHEC O157:H7 no nosso meio, indivíduos saudáveis apresentam anticorpos contra esta cepa e contra seu LPS, provavelmente por uma imunidade cruzada com a EPEC ou por contacto direto com a EHEC. Nos ensaios de "immunoblotting" realizados com algumas amostras foi também detectada a banda de 94 kDa correspondente a intimina (ZAPATA-QUINTANILLA et al., 2006). Anticorpos anti-LPS também são importantes na proteção aos recém nascidos, conferida por anticorpos IgA do colostro (PALMEIRA et al., 2005) e IgG transferidas pela placenta (PALMEIRA et al., 2007).

Não se sabe exatamente qual a origem dos anticorpos dirigidos aos fatores de virulência das *E. coli* diarreiogênicas nos indivíduos saudáveis, seja em sangue de adultos e crianças ou colostro de mulheres saudáveis. Estes anticorpos poderiam ser resultantes do contato do hospedeiro com bactérias potencialmente patogênicas, entre estas bactérias podem estar as *E. coli* que produzem a lesão A/E em animais onde a intimina é um dos fatores de virulência mais importantes.

Foi demonstrada por AGIN & WOLF (1997) a grande homologia entre as porções N-terminais das intiminas das linhagens de RDEC-1 (EPEC de coelho) e outras linhagens de *E. coli* humanas como EPEC ou EHEC. Este trabalho também mostrou que as diferentes intiminas podem apresentar variações antigênicas, principalmente nas regiões C-terminais, entretanto com a mesma função. Nas cidades de São Paulo e Campinas foram isoladas *E. coli* de fezes de cães onde as linhagens identificadas apresentavam diferentes subtipos de intimina, entre elas dos subtipos α , β e γ característicos de cepas de EPEC típica e atípica e EHEC

(NAKAZATO et al., 2004). De acordo com Ramachandran e cols. (2003), por exemplo, os ruminantes são considerados como fonte importante da diversidade sorológica e genética de cepas de *E. coli* que contém a intimina. Com estes dados pode-se supor que o contacto direto ou indireto com as fezes de animais que apresentam alguma bactéria que produza a lesão A/E possa induzir uma resposta de anticorpos em humanos sem produzir a doença, sendo portanto uma das fontes importantes do desenvolvimento da resposta imunológica.

Nos últimos anos nosso grupo de trabalho vem investigando a presença de anticorpos contra as *E. coli* patogênicas na população brasileira, tanto em crianças como em adultos. Após a determinação das concentrações de anticorpos totais séricos e secretores contra os principais sorotipos de EPEC e EHEC, focalizamos nossa pesquisa na determinação de anticorpos contra um dos principais fatores de virulência destes dois patogrupos que é o LPS. Em continuação a esta linha de pesquisa, decidimos avaliar a resposta imunológica específica para a principal adesina responsável pela adesão da bactéria à célula epitelial que é a intimina. Baseados nos vários trabalhos que verificam a presença de anticorpos anti-intimina em humanos, e no fato de que estes anticorpos têm um importante papel protetor, pesquisamos a reatividade à região conservada e regiões variáveis de três subtipos de intimina α , β e γ , característicos de EPEC e EHEC, em amostras de soro e colostro. Assim, nossa pesquisa complementa o conhecimento da natureza da resposta imune a estas bactérias, avalia as possíveis reatividades cruzadas entre as diferentes intiminas pesquisadas, entre as bactérias EPEC e EHEC, bem como a diferenciação das concentrações de anticorpos para fins de diagnóstico.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Determinar a concentração de anticorpos reativos com a porção conservada e as regiões variáveis das intiminas α , β e γ característicos da EPEC (típica e atípica) e EHEC em amostras de soro de adultos, doadores de sangue e colostro de mulheres saudáveis da Grande São Paulo.
- Avaliar se há reações cruzadas entre os anticorpos reativos com a porção conservada e as regiões variáveis das intiminas α , β e γ .
- Avaliar o efeito dos anticorpos reativos com a porção conservada e as regiões variáveis das intiminas α , β e γ na adesão de *E. coli* a células HEp-2.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras de soro humano

Foram obtidas 200 amostras de soros de adultos saudáveis da Grande São Paulo. Estas amostras foram processadas no laboratório do Banco de Sangue do Hospital "Albert Einstein" seguindo-se os critérios de triagem de doadores: adultos saudáveis de 18 a 60 anos, ambos os sexos, com reações sorológicas negativas para HIV, HTLV I/II, hepatites B e C, doença de Chagas e sífilis. Cem destas amostras foram utilizadas para a formação de um "pool" que foi utilizado como controle em todos os experimentos. A coleta destas amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Farmácia da USP e já foram utilizadas no trabalho anterior (ZAPATA-QUINTANILLA et al., 2006).

2. Amostras de colostro humano

Amostras de colostro foram obtidas de puérperas saudáveis selecionadas na Maternidade do Hospital Universitário da USP, seguindo os seguintes critérios: idade entre 18 e 35 anos, ausência de doenças sistêmicas como diabetes e hipertensão, reações sorológicas negativas para hepatite, HIV e sífilis, idade gestacional entre 38 a 41 semanas, com recém-nascidos saudáveis com peso adequado para a idade gestacional. Cada mãe foi informada dos objetivos do projeto e qual seria o destino da sua amostra. Após o seu consentimento, a coleta foi efetuada por ordenha manual, sempre no período da manhã, no intervalo entre duas mamadas, nas primeiras 72 horas após o parto. Foram coletadas 74 amostras e após serem centrifugadas e delipidadas, foi formado um "pool" com 4 mL de cada uma de 20 amostras. O "pool" foi centrifugado novamente, aliquotado e congelado a -20°C. As 54 amostras restantes a serem utilizadas individualmente também foram estocadas e congeladas a -20°C.

A coleta das amostras recebeu aprovações dos comitês de ética consultados (pareceres anexos). Estas amostras fazem parte da coleção do laboratório e foram utilizadas no projeto FAPESP 99/05214-0 (PALMEIRA et al., 2005).

3. IgA purificada

A IgA purificada a partir de colostro e leite humanos, foi obtida pela Dra. Cristiane B. Carbonare, para sua tese de doutorado, e os processos de obtenção e purificação se encontram detalhados em Carbonare et al., 2005.

4. Linhagens de *E. coli*

As linhagens de bactérias utilizadas neste trabalho estão relacionadas na tabela 1.

Tabela 1. Linhagens de *E. coli* utilizadas no trabalho

Cepa bacteriana (linhagem)	Características	Origem ou referência
<i>E. coli</i> M15-pFL1 α	Bactéria transformada com o plasmídeo recombinante capaz de expressar a região variável da intimina α	Lima (2004)
<i>E. coli</i> M15-pFL1 β	Bactéria transformada com o plasmídeo recombinante capaz de expressar a região variável da intimina β	Lima (2004)
<i>E. coli</i> M15-pFL1 γ	Bactéria transformada com o plasmídeo recombinante capaz de expressar a região variável da intimina γ	Lima (2004)
<i>E. coli</i> M15-pFL4 α	Bactéria transformada com o plasmídeo recombinante capaz de expressar a região conservada da intimina α	Lima (2004)
EPEC O127:H6 (E2348/69)	Intimina α	Levine (1978)
EPEC O111:H- (0041-1/85)	Intimina β	Hospital Menino Jesus São Paulo - SP -
EHEC O157:H7 (3077/88)	Intimina γ ; toxina Stx2	Levine (1987); cepa proveniente do Canadá
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>SupE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> -	Bethesda Research Laboratories Gaithersburg, Md.

A bactéria EPEC O111:H- foi gentilmente cedida pela Dra. Tânia Gomes da Escola Paulista de Medicina, as outras bactérias foram cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. A bactéria DH5 α foi utilizada como controle nos ensaio de PCR. As bactérias foram selecionadas a partir da obtenção de colônias lisas em sucessivos plaqueamentos em meio TSA-BHI e estocadas a -20°C em meio contendo 15% de glicerol.

5. Obtenção das Bactérias Recombinantes

As bactérias recombinantes que contem os fragmentos do gene *eae* que expressam as regiões variáveis α , β e γ ($v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$) e a região conservada (*cons*) da intimina foram cedidas pelo Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. O conjunto de procedimentos que inclui a extração do DNA genômico das bactérias

selvagens de EPEC O127:H6 portadora da intimina α , O111ab:H2 da intimina β e O55:H6 da intimina γ , a clonagem das diferentes regiões do gene *eae* no vetor pQE30 e a transformação bacteriana na *E. coli* M15, estão descritos em Lima (2004). O clone da região conservada foi obtido a partir da EPEC O127:H6 portadora da intimina α . A figura 4 ilustra as regiões da intimina codificadas a partir do gene *eae* na obtenção dos clones.

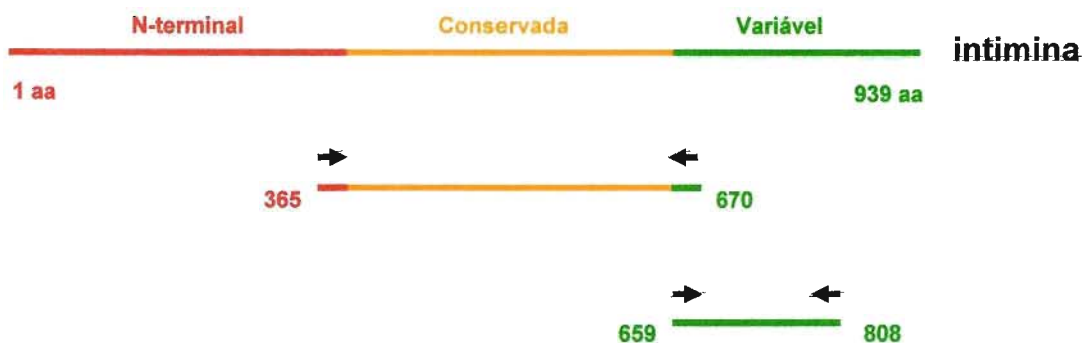


Figura 4. Diferentes regiões da intimina codificadas pelo gene *eae*. Região conservada [aminoácidos 365 a 670] e variável [659 a 808]. Adaptado a partir de Lima, 2004.

As bactérias recombinantes foram analisadas por PCR para confirmação da presença do inserto e os produtos foram seqüenciados (itens 5.1 a 5.3).

Para a obtenção das intiminas, as bactérias foram cultivadas e induzidas para expressão das proteínas que foram isoladas e purificadas por cromatografia e posteriormente analisadas (item 5.4 a 5.6).

5.1. Reação de polimerização em cadeia

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi feita para confirmar a presença do inserto na clonagem do vetor plasmidial.

A preparação do DNA de cada bactéria recombinante foi realizada da seguinte maneira: em 5 mL de meio LB com 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina foram repicados 50 μL da bactéria recombinante conservada em glicerol, seguindo-se um período de incubação de 16 horas a 37°C sob agitação. Após a incubação, 1 mL do crescimento foi colocado em microtubo, centrifugado a 3000 g por três minutos e o “pellet” obtido foi ressuspensão em 1 mL de salina estéril. Este procedimento foi repetido duas vezes. O “pellet” obtido na última centrifugação foi ressuspensão em 500 μL de água filtrada estéril, fervido durante 10 minutos, rapidamente colocado em banho de gelo e estocado a -20°C.

Na realização da PCR, foram utilizados “primers” específicos para cada fragmento do gene *eae*, construídos a partir da seqüência de nucleotídeos existentes no GenBank. As seqüências de nucleotídeos dos “primers”, bem como o tamanho do produto amplificado e o ciclo de amplificação utilizado para cada par de “primers”, encontram-se descritos nas tabelas 2 e 3, respectivamente. Em todas as PCR utilizou-se a amostra *E. coli* DH5 α , que não possui o gene *eae* e água deionizada como controle negativo.

Tabela 2. Seqüência dos “primers” utilizados para a amplificação dos subtipos do gene *eae*.

Nome	Seqüência dos “primers”
G011	5' ACT TGG ATC CGC TAG CAA GYT GCA GTC GAA TCC TGG
G012	5' ACT TGG ATC CGC TAG CAG CAT TAC TGA GAT TAA GGC
G013	5' ACT TAA GCT TCG ATC GCT GCC GTT GTT TTA TCA GCC
G014	5' ACT TAA GCT TCG ATC GCA GAA GCA TCM ACM GAA GC
G019	5' ACT TAA GCT TCG ATC GCT GAT GCA TCG ACA GTC GC

Tabela 3. Pares de “primers” utilizados, ciclos de amplificação e tamanho dos fragmentos amplificados.

Subtipo e região da Intimina	Par de “primers” utilizado	Ciclo de amplificação	Tamanho do fragmento (pb)
$v\alpha$	G012 ^a e G014 ^b	30X (94°C/1', 50°C/1', 72°C/1')72°C/8'	447 pb
$v\beta$	G012 ^a e G014 ^b	30X (94°C/1', 50°C/1', 72°C/1')72°C/8'	447 pb
$v\gamma$	G012 ^a e G019 ^b	30X (94°C/1', 50°C/1', 72°C/1')72°C/8'	447 pb
cons	G011 ^a e G013 ^b	30X (94°C/1', 50°C/1', 72°C/1')72°C/8'	915 pb

^a, primer forward; ^b, primer reverse

Para cada reação de polimerização foram utilizados 0,2 mM de cada um dos pares de “primers”, 1,5 U de “Platinun Taq DNA polymerase” (Invitrogen, EUA), 1,5 mM de MgCl₂, 1,0 mM da mistura de dNTPs (0,2 mM de dATP, dCTO, dGTP e dTTP) (Gibco-BRL, EUA), tampão de PCR concentrado 1X no volume final de 25 μ L (Gibco-BRL, EUA). Em cada reação foi utilizado 1,0 μ L do DNA molde.

5.2. Eletroforese de DNA em gel de agarose

A análise dos fragmentos de DNA foi feita através de eletroforese horizontal em gel de agarose. O gel foi preparado a partir da fusão da agarose 1% (Gibco-BRL, EUA) em tampão TBE acrescentando-se 4,5 μ L de brometo de etídio para cada 100

mL de TBE. Para a análise dos fragmentos de DNA, a cada produto da PCR foram adicionados 2 μ L de tampão de amostra para DNA contendo Ficoll 400 20%, Na₂EDTA 0,1 M pH 8,0, SDS 1%, azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, obtendo-se um volume final de 10 μ L, os quais foram aplicados nas canaletas do gel. Foi utilizado o marcador de peso molecular "1 KB DNA ladder" (Gibco-BRL, EUA), preparado em tampão de amostra de DNA. A corrida eletroforética foi realizada sob voltagem máxima e constante de 90 V em tampão TBE. Os géis foram observados em transiluminador de luz ultravioleta para análise visual e registro fotográfico.

5.3. Seqüenciamento dos fragmentos do gene *eae*

Os quatro produtos da PCR foram purificados com a utilização do Gel Extraction Kit (Quiagen). Foi realizada uma corrida eletroforética em gel agarose (1%) para determinar a concentração dos produtos já purificados, em comparação com o marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Com essa análise os produtos foram ajustados para a concentração de 20 ng/ μ L, segundo recomendação do Centro do Genoma Humano da Universidade de São Paulo, onde foram realizados os seqüenciamentos, os "primers" utilizados foram os mesmos da tabela 3. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante do aparelho MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences), utilizando o seqüenciador DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (com Thermo SequenaseTM II DNA Polimerase).

A análise de seqüências foi realizada através do programa BLAST, disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov. Os alinhamentos foram realizados entre as seqüências dos fragmentos dos genes *eae* inseridos nos clones amplificados por PCR e a seqüência de nucleotídeos presentes no genBank.

As amostras seqüenciadas também foram comparadas entre si através do programa LALIGN oferecido no sitio www.expasy.ch.

5.4. Expressão e purificação das intiminas

As bactérias recombinantes contendo os diferentes insertos, foram incubados por 18 horas em 10 mL de meio LB suplementado com 25 μ g/mL de kanamicina e 100 μ g/mL de ampicilina, a 37°C, sob agitação. Após o crescimento, 5 mL de cada

uma destas culturas foram transferidos para um frasco contendo 100 mL de LB também suplementado com 25 µg/mL de kanamicina e 100 µg/mL de ampicilina, em seguida incubados a 37°C sob agitação de 350 rpm, até atingir a densidade ótica (DO) entre 0,5 a 0,7 em espectrofotômetro de luz visível com filtro de 600 nm.

Ao atingir a DO desejada, foi adicionado a este crescimento 1 mM de IPTG (isopropil-β-d-tiogalactopiranosideo) para a indução da expressão de proteína. A cultura foi colocada novamente a 37°C sob agitação de 350 rpm durante cinco horas. Após este período, a cultura foi centrifugada a 4.000 g em uma temperatura de 4°C durante 20 minutos.

O “pellet” foi ressuspensão em 30 mL de solução de lise (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Imidazol 10 mM, PMSF 1 mM, pH 8.0) em banho de gelo e estocado a -70°C até o dia seguinte, quando foi descongelado por imersão em água fria e submetido à pressão para o rompimento das células em um “French Pressure” três ou quatro vezes. Após o rompimento das células a amostra foi centrifugada a 10.000 g por 30 minutos a uma temperatura de 4°C.

Para proceder à cromatografia de afinidade, o sobrenadante produto da centrifugação anterior foi recuperado e, para cada 4 mL deste adicionou-se 1 mL da agarose Ni-NTA (Qiagen). A mistura foi mantida sob agitação constante (200 rpm) durante uma hora em banho de gelo, para permitir a ligação da proteína com a resina e em seguida foi colocada numa coluna.

Após a sedimentação da resina, a coluna foi lavada duas vezes com tampão de lavagem (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Imidazol 20 mM, pH 8.0), utilizando-se um volume quatro vezes maior que o volume do sedimento. Em seguida a proteína foi eluída com a adição do tampão de eluição (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Imidazol 250 mM, pH 8.0) em quatro etapas, usando-se 500 µL de tampão em cada uma. A proteína eluída foi acondicionada em microtubo contendo 0,5 mM de PMSF e estocadas a -20°C.

Em todas as etapas foram coletadas alíquotas para dosagem de proteínas e análise em SDS-PAGE.

5.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Este ensaio foi realizado tanto para acompanhar as etapas da purificação das intiminas como para fazer a transferência em membrana de nitrocelulose para posterior ensaio de “imunoblotting” (IB).

5.5.1. Corrida eletroforética

A corrida foi realizada em aparelho Mini Protean II (BioRad). O mini-gel foi preparado com 15% de acrilamida, com pente de 10 ou 15 dentes para a análise das etapas de purificação das intiminas, e com pente preparativo para o ensaio de IB (item 8), segundo método descrito por Carbonare e cols. (1995). O padrão de peso molecular (PM) usado foi um kit de calibração para electroforese de baixo PM contendo: fofoforilase b (PM = 94 kDa), albumina bovina (PM = 67 kDa), ovoalbumina (PM = 43 kDa), anidrase carbônica (PM = 30 kDa), inibidor de tripsina (PM = 20,1 kDa) e α -lactalbumina (PM = 14,4 kDa) (Pharmacia Biotech). A corrida foi realizada com voltagem constante (100 V), até a linha de frente do corante azul de bromofenol chegar ao final do gel. Os géis foram corados com GelCode[®] Blue Stain Reagent (Pierce).

5.6. Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração das diferentes preparações de proteínas purificadas foi realizada pelo método do ácido bicinonínico utilizando o kit BCA, Pierce.

6. ELISA para a determinação de anticorpos IgG no soro e IgA no colostro reativos com as intiminas

A determinação da concentração relativa de anticorpos anti-intiminas foi baseada na técnica descrita por Fomsgaard (1990).

A finalidade deste ensaio foi a determinação da concentração de anticorpos específicos anti-intiminas, através da relação com as concentrações de IgG e IgA totais no nosso "pool" de soro e colostro respectivamente. A determinação da concentração de IgG total do "pool" de soro foi realizada por nefelometria e a da IgA por ELISA utilizando um padrão comercial (SIGMA I-0633).

O protocolo resume-se em dosar na mesma placa, a imunoglobulina (IgG para o soro ou IgA para o colostro) e cada um dos anticorpos anti-intimina. A concentração de anticorpo de captura anti-IgG (SIGMA I-1136) ou anti-IgA (SIGMA I-884) e a concentração de cada intimina purificada deve ser a mesma, mesmas condições de incubação, concentração do conjugado e solução de substrato.

Quatro colunas de uma placa de poliestireno (Costar, USA) foram sensibilizadas com anti-IgG ou anti-IgA humano numa concentração de 2,5 μ g/mL

diluídas em PBS 7,4, e duas colunas foram sensibilizadas com cada uma das quatro intiminas purificadas na mesma concentração, também diluídas em PBS 7,4 durante 16 horas a 4°C. As placas foram lavadas por quatro vezes com PBS-Tween 0,1% e foi realizado o bloqueio com 5% de leite em pó desnatado em PBS 7,4 por uma hora à temperatura ambiente. Após novas lavagens, o “pool” foi diluído em tampão de diluição PBS-Tween 0,2% acrescido de 5% de leite em pó desnatado e seguindo-se um período de incubação de duas horas a 37°C. Nesta etapa, como pode se observar na figura 5, as diluições seriadas do “pool” de soro ou colostro utilizadas tanto para a determinação de IgG ou IgA total e as intiminas não foram as mesmas, tendo sido padronizadas previamente (para determinação de IgG total: 1/50.000; de IgA total: 1/20.000 e de IgG e IgA anti-intiminas 1/10).

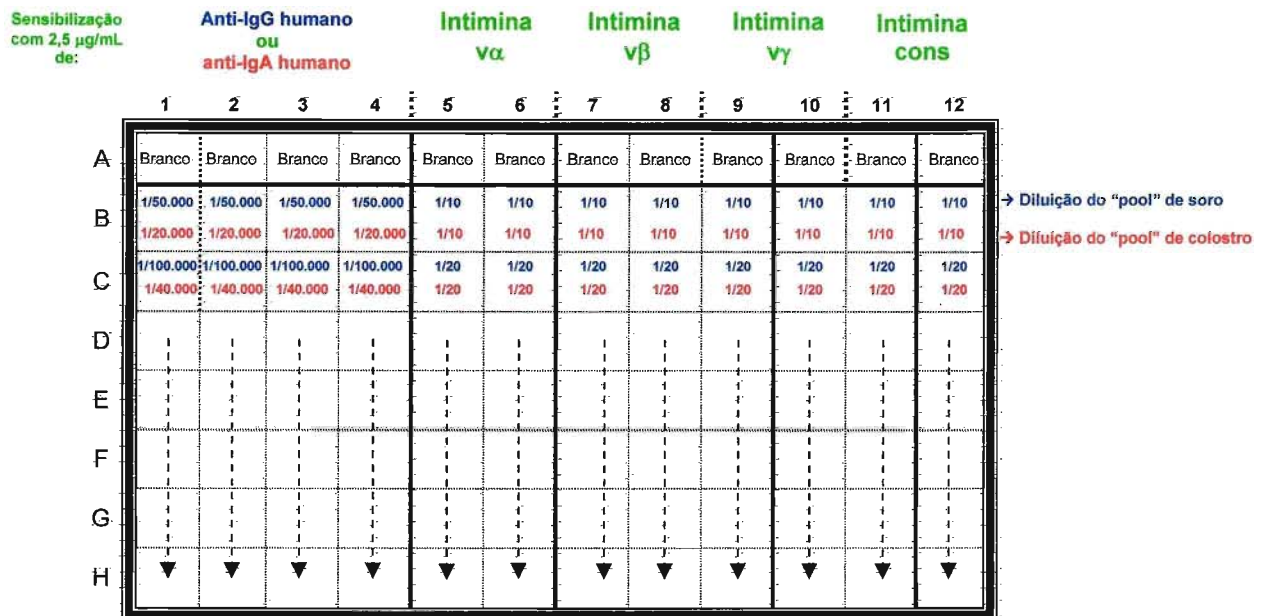


Figura 5. Esquema da sensibilização da placa de ELISA e as diferentes diluições seriadas do soro (azul) ou colostro (vermelho) para a determinação da concentração relativa de IgG e IgA anti-intiminas em função da IgG ou IgA totais.

Após incubação, as placas foram lavadas e os respectivos conjugados anti-IgG ou IgA marcados com peroxidase (diluição 1/2.000) foram adicionados diluídos no tampão de diluição, seguindo-se nova incubação por duas horas a 37°C. Posteriormente novas lavagens foram realizadas e a solução de substrato peróxido de hidrogênio 0,01% em solução de OPD 0,4 mg/mL em tampão citrato-fosfato, pH 5,0 foi colocada. Após 30 minutos de incubação, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µL de ácido sulfúrico 2,5 N. A absorbância foi lida em leitor para microplacas no comprimento de onda de 492 nm (Labsystems Multiscan

MS, Finland). Os valores foram calculados para cada teste com o programa Excel da Microsoft.

Os resultados das concentrações de IgG e IgA anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada do "pool" de soro e colostro respectivamente, foram calculados empregando-se a curva de regressão linear da DO em função do Log_{10} da concentração conhecida de IgG ou IgA total. As DOs obtidas para as intiminas foram comparadas com essa curva e o valor da concentração foi determinado pela equação da reta e posteriormente multiplicado pela diluição realizada. Este ensaio foi realizado repetidas vezes com o objetivo de testar a reprodutibilidade e de se estabelecer um valor de concentração padrão para nosso "pool". Assim obteve-se uma média dessas concentrações e dessa maneira obtivemos o resultado final da concentração de anti-intiminas em $\mu\text{g/mL}$ relativo a os valores totais de IgG e IgA do "pool" de soro e colostro.

Para a determinação individual de anticorpos anti-intiminas nas 100 amostras de soro e nas 54 amostras de colostro, cada uma das placas foram sensibilizadas com $2,5 \mu\text{g/mL}$ de cada intimina purificada. Após incubação, em cada placa foram processados o "pool" em duplicata, utilizado como referência, junto a 10 amostras de soro ou de colostro. As diluições do "pool" e das amostras foram seriadas e iniciaram se a partir de 1/10 (figura 6). O conjugado anti-IgG ou IgA foi utilizado na diluição 1/2000, as condições do ensaio foram as mesmas que do ensaio da determinação da concentração de anti-intiminas no "pool".

N° AMOSTRA		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS
A	Branco	Branco										1/10
B	POOL 1/10	POOL 1/10										1/20
C	POOL 1/20	POOL 1/20										1/40
D	POOL 1/40	POOL 1/40										1/80
E	POOL 1/80	POOL 1/80										1/160
F	POOL 1/160	POOL 1/160										1/320
G	POOL 1/320	POOL 1/320										1/640
H	POOL 1/640	POOL 1/640										1/1280

Figura 6. Esquema das diluições do “pool” de soro ou colostro e das amostras individuais.

Para obter os resultados em concentração, foi feita uma curva de regressão linear da concentração conhecida de IgG e IgA anti-intiminas no “pool” de soro e colostro respectivamente em função das DOs para cada diluição. As DOs obtidas para cada amostra individual, foram comparadas com essa curva e o valor foi posteriormente determinado pela equação da reta e multiplicado pela diluição realizada. O resultado de cada amostra expresso em $\mu\text{g/mL}$ é relativo a os valores de IgG e IgA anti-intimina em cada “pool” de soro e colostro.

7. Análise estatística

Os resultados das determinações de concentrações de anticorpos anti-intiminas foram submetidos às seguintes análises: análise descritiva (Box-plot), análise de variância (Testes de Tukey e Kruskal Wallis), testes de correlação de Spearman e distribuição de frequências.

8. Ensaios de “Immunoblotting” (IB) com as intiminas purificadas

Foi feita uma preparação das intiminas $\alpha\alpha$, $\nu\beta$, $\nu\gamma$ e conservada utilizadas como antígeno na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$, com quantidade suficiente para $100 \mu\text{L}$ de tampão de amostra contendo 2% de SDS, $6 \mu\text{L}$ de β -mercaptoetanol e $2 \mu\text{L}$ de azul de bromofenol. As misturas foram homogeneizadas e posteriormente aquecidas a 100°C por 10 minutos e estocadas a -20°C até o momento de uso.

A partir do gel de poliacrilamida preparado como descrito no item 5.5, foram feitas corridas eletroforéticas com as amostras protéicas e posteriormente foi realizada a transferência preparando um “sanduíche” com papéis filtro, o gel e a membrana de nitrocelulose embebidos em tampão de transferência (TOWBIN et al., 1979). A corrida foi feita fixando-se a voltagem em 14 volts por 45 minutos em aparelho Trans-Blot Semi-Dry (Bio Rad).

Após a transferência, o sanduíche foi aberto e a membrana de nitrocelulose corada com corante de Ponceau S a 0,5% por 30 minutos e depois descorada com água destilada até aparecerem as bandas tanto dos padrões quanto dos antígenos. Após a secagem entre papéis de filtro, a membrana foi identificada e guardada na geladeira até o momento de uso.

Cada membrana foi cortada em tiras de 4 mm e cada uma das tiras foi colocada em uma canaleta de cuba de IB, bloqueada com tampão Tris salina 0,01 M acrescido de 5% de leite em pó desnatado e mantida em agitador basculante por duas horas à temperatura ambiente. O tampão de bloqueio foi desprezado e foram adicionadas as amostras de soro diluídas 1/10 ou 1/50 no caso dos colostros, em tampão de amostra (Tris salina 0,01M acrescido de 5% de leite em pó desnatado e 0,05% de Tween 20). A cuba foi então agitada por 16 horas à temperatura ambiente. Após a incubação, as tiras foram submetidas a seis lavagens de dez minutos cada, com tampão de lavagem (tampão Tris 0,01 M acrescido de Tween 20 a 0,1%). A seguir o conjugado anti-IgG ou anti-IgA humano marcado com peroxidase (SIGMA) diluído a 1/200 ou 1/500 respectivamente, em tampão de amostra foi adicionado em cada canaleta, a cuba foi agitada por duas horas a temperatura ambiente.

Após este período, as tiras foram lavadas novamente seis vezes. Foi então adicionado o substrato preparado no momento do uso e ao abrigo da luz, contendo diaminobenzidina (SIGMA) a 0,05% em tampão Tris salina 0,05% e peróxido de hidrogênio. A cuba foi deixada em repouso até revelação das bandas e a reação interrompida com a adição de água destilada.

9. Absorção do “pool” de soro e da IgA purificada com as intiminas recombinantes

As absorções foram realizadas com as bactérias recombinantes que expressam cada uma das intiminas em estudo. O crescimento de cada uma das bactérias recombinantes foi realizado de acordo com o item 5.4. com a seguinte

diferença: no segundo dia, 5 mL da cultura foram transferidos para 500 mL do meio LB contendo os antibióticos kanamicina e ampicilina nas mesmas concentrações. A cultura foi incubada sob agitação de 350 rpm a 37°C, até atingir uma DO_{600nm} entre 0,5 a 0,7. Após este crescimento foi adicionado 1 mM de IPTG à cultura e esta colocada novamente em incubação sob agitação a 37°C durante cinco horas.

Após esse período a cultura foi centrifugada a 4.000 g a 4°C por 20 minutos. O pellet obtido foi ressuspenso em tampão contendo “pool” de soro ou IgA purificada diluídos previamente 1/2 em PBS 7.4, numa proporção de 1 g de bactérias/mL de amostra diluída. A suspensão foi incubada a 37°C sob agitação de 350 rpm por duas horas. Posteriormente foram deixadas em repouso 16 a 18 horas a 4°C e centrifugadas a 10.000 g por 20 min a 4°C. Os sobrenadantes foram colhidos e estocados a -20°C até o momento do uso em ensaios de ELISA, IB e inibição da adesão bacteriana. Realizaram-se absorções sucessivas e absorções únicas que são descritas a seguir, e os materiais absorvidos foram designados por letras:

- P0 - “pool” de soro não absorvido
- P1 - “pool” de soro absorvido com $v\alpha$ e $v\beta$
- P2 - “pool” de soro absorvido com $v\beta$ e cons
- P3 - “pool” de soro absorvido com $v\beta$
- A0 - IgA não absorvida
- A1 - IgA absorvida com $v\beta$, $v\gamma$ e cons
- A2 - IgA absorvida com $v\alpha$, $v\gamma$ e cons
- A3 - IgA absorvida com $v\alpha$, $v\beta$ e cons
- A4 - IgA absorvida com $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$
- B1 - IgA absorvida com $v\alpha$
- B2 - IgA absorvida com $v\beta$
- B3 - IgA absorvida com $v\gamma$
- B4 - IgA absorvida com cons

10. Inibição da adesão de *E. coli* a células HEp-2

Os ensaios de inibição da adesão com as bactérias EPEC O127:H6, EPEC O111:H- e EHEC O157:H7 foram realizados empregando-se células HEp-2 (células de carcinoma de laringe humano, ATCC CCL 23).

A cultura de células HEp-2 foi mantida em garrafas de 75 cm² (Nunc), em meio DMEM (SIGMA), contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 1% de solução de L-glutamina (2mM) e gentamicina (50 µg/mL) (SIGMA), em incubadora Revco-Ultima, com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após formação de monocamada

confluente, as células foram descoladas com ATV (solução de tripsina e EDTA) e ressuspensas no mesmo meio em uma concentração de 8×10^4 células/mL.

Lamínulas redondas de 1 cm de diâmetro (previamente lavadas individualmente com álcool e autoclavadas) foram colocadas em cada poço de uma placa para cultura de células de 24 poços (Costar, USA). Foi distribuído 1 mL da suspensão de células em cada poço, e a placa foi incubada por 48 horas a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ até a formação da monocamada de células.

As diferentes bactérias foram inoculadas, inicialmente em 3 mL de caldo BHI e incubadas a 37°C por 16 horas. A partir deste cultivo foram transferidos 200 µL para 10 mL do mesmo caldo e incubado pelo mesmo tempo. Após 16 horas de incubação, um novo inóculo de 200 µL de cada cultura foi semeado em tubo contendo 5 mL do mesmo caldo e incubado em banho a 37°C com agitação. O crescimento bacteriano foi monitorado por leitura de D.O. em espectrofotômetro Eppendorf em comprimento de onda de 600 nm até atingir um valor de 0,8 para EPEC O111:H⁻ e 1,2 para EPEC O127:H6 e EHEC O157:H7, correspondentes a um crescimento bacteriano em fase logarítmica.

Foram feitas misturas de reação contendo 50 µL de bactéria, amostras de soro nos volumes de 25, 50, 100 ou 200 µL ou colostro nos volumes de 10, 25 ou 50 µL e o meio de adesão (DMEM contendo 2% de soro fetal bovino e 1% de D-manose) completando-se para um volume final de 500 µL. Estas misturas foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente.

No momento do ensaio, o meio de cultura das células foi desprezado, e cada um dos poços da placa foi lavado 6 vezes com 1 mL de PBS. Em cada poço foram colocados 500 µL da reação descrita anteriormente.

Em cada ensaio foram utilizados dois controles, um de célula onde foi colocado apenas o meio de adesão, e um controle de adesão, onde se colocou uma suspensão de 10% de bactéria no meio de adesão, que foi incubada junto com as misturas. Após este procedimento a placa foi incubada por 30 minutos no caso da EPEC O111:H⁻ e por três horas no caso da EPEC O127:H6 e EHEC O157:H7 em estufa a 37°C.

Após este período cada poço da placa foi lavado 6 vezes, e 1 mL do meio de adesão foi adicionado. A placa foi então incubada por três horas em estufa a 37°C. Em seguida a placa foi lavada quatro vezes com PBS, as células fixadas com

metanol 70% por 30 minutos e coradas com May-Grüwald e Giemsa por 5 e 20 minutos, respectivamente. Depois de lavadas com água comum, as lamínulas foram retiradas da placa e montadas em lâmina normal com Entellan (Merck).

As lâminas foram observadas em microscópio ótico comum com aumento de 100X, sendo contadas 300 células, somente sendo consideradas com adesão as células que possuíam em sua superfície mais de seis bactérias. O resultado foi expresso em porcentagem de células com bactérias em relação ao número total de células contadas (% de adesão). A porcentagem de inibição da adesão foi calculada considerando-se como 100% de adesão o valor obtido no ensaio controle.

$$\% \text{ de inibição} = 100 - \frac{\% \text{ de adesão na amostra} \times 100}{\% \text{ de adesão no controle}}$$

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Análise do gel de agarose como resultado do PCR

Com o objetivo de verificar a presença do inserto nas bactérias resultantes da clonagem dos fragmentos do gene *eae* que codificam as íntiminas α , β e γ variáveis e a região conservada, foi realizada uma PCR. O par de “primers” utilizado para cada fragmento foi o mesmo que foi usado para amplificar o gene da amostra selvagem. Após eletroforese em gel de agarose a presença da banda correspondente ao fragmento, com número de pares de bases (pb) esperado para cada amplicon foi confirmado. Na figura 7 pode se observar a presença de bandas correspondentes a 447 pb no caso de $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$ e 915 pb correspondente a região conservada da íntimina.

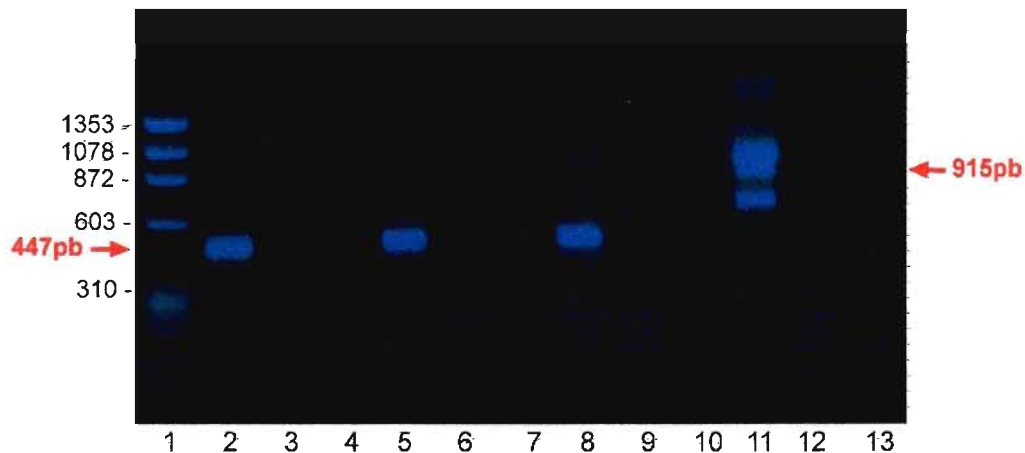


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose 1% - Fragmentos dos genes *eae* amplificados por PCR a partir dos clones recombinantes: marcador de peso molecular (1 kb) na canaleta 1, segmentos que codificam as íntiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada nas canaletas 2, 5, 8 e 11, controles negativos utilizando a bactéria DH5 α nas canaletas 3, 6, 9 e 12 e controles negativos utilizando água deionizada nas canaletas 4, 7, 10 e 13, respectivamente.

2. Análise do seqüenciamento

Os produtos da PCR também foram utilizados para a análise de seqüenciamento de nucleotídeos. Um dos objetivos desta análise foi verificar se cada um dos fragmentos do gene *eae* clonados e inseridos na bactéria hospedeira correspondiam ao fragmento da bactéria selvagem da qual foram obtidos (LIMA,

2004). Os resultados dos seqüenciamentos das nossas amostras confirmaram que cada inserto foi clonado no sentido correto para que ocorresse sua transcrição.

A tabela 4 mostra a relação das seqüências de nucleotídeos obtidas no trabalho e as seqüências presentes no GenBank, esta relação foi realizada através do programa BLAST. Os resultados em todos os casos revelam 98% de identidade.

Tabela 4. Relação dos fragmentos cujo seqüenciamento foi comparado com seqüências depositadas no GenBank correspondente a sorotipos de EPEC humana.

Segmentos seqüenciados	Seqüência do GenBank	Correspondente à cepa	Sorotipo de EPEC
$v\alpha$	AF022236.1	E2348/69	O127:H6
$v\beta$	U62655.1	E2430/78	O111ab:H2
$v\gamma$	AF081184.1	DEC 5d Orskov 586-65	O55:H7
cons	AF022236.1	E2348/69	O127:H6

O segundo objetivo da análise foi a comparação entre si das seqüências dos segmentos das porções variáveis $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$ utilizadas neste trabalho. O resultado desta análise é mostrado em porcentagem de identidade de acordo com a quantidade de nucleotídeos sobrepostos (tabela 5). A comparação foi realizada entre as seqüências “forward” e entre as “reverse”.

Tabela 5. Comparação entre as seqüências de nucleotídeos dos segmentos $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$.

Segmentos comparados	Porcentagem de identidade (%)	Nucleotídeos sobrepostos
$v\alpha$ (fw) X $v\beta$ (fw)	64,5	440 (1-434:2-440)
$v\alpha$ (fw) X $v\gamma$ (fw)	65,9	451 (1-442:1-444)
$v\beta$ (fw) X $v\gamma$ (fw)	61,2	446 (2-440:1-436)
$v\alpha$ (rev) X $v\beta$ (rev)	65,5	429 (7-433:2-427)
$v\alpha$ (rev) X $v\gamma$ (rev)	66,8	446 (1-436:1-437)
$v\beta$ (rev) X $v\gamma$ (rev)	62,6	431 (8-427:12-434)

fw - forward; rev - reverse

3. Expressão e purificação das intiminas recombinantes

Este conjunto de procedimentos foi realizado da mesma maneira para cada intimina. As proteínas recombinantes His-intimina foram expressas após a adição de IPTG ao meio de cultura contendo as amostras bacterianas recombinantes em fase

log de crescimento. Antes da adição de IPTG, e ao final do período de indução, foram retiradas alíquotas da cultura para controle negativo e confirmação da expressão da proteína por SDS-PAGE.

Posteriormente procedemos à purificação da proteína por cromatografia de afinidade através da interação dos resíduos de 6xHis presentes na região N-terminal de cada proteína, com o níquel (Ni-NTA) ligado à matriz de Sepharose CL-6B. Ao final de cada período também retiramos alíquotas que depois foram analisadas por SDS-PAGE. No caso das intiminas $v\beta$ e $v\gamma$ pode-se observar a presença de uma banda correspondente a 16,5 kDa (figuras 8B e 8C), no caso da conservada (figura 8D) a banda corresponde a 33,6 kDa. A banda observada na figura 8A da intimina $v\alpha$ é muito grossa e é devido a que na verdade se trata de duas bandas que se juntaram pela quantidade de proteína obtida. Estas duas bandas foram observadas ao longo do processo de obtenção de proteína e uma delas corresponde a 16,5 kDa.

A alíquota referente à banda mais intensa observada no gel para cada intimina foi selecionada e separada para realizar a determinação da concentração de proteína através do método de BCA. No caso da intimina conservada foram selecionadas duas alíquotas. Os valores obtidos em mg/mL são apresentados junto com a figura 8.

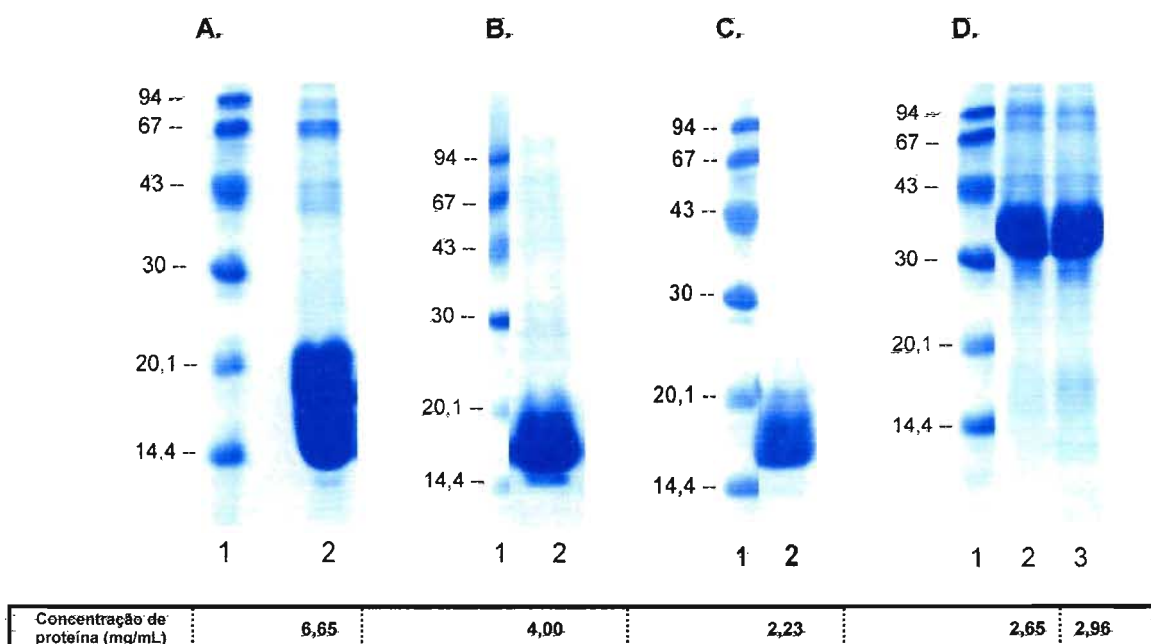


Figura 8. SDS-PAGE em gel a 15% de poliacrilamida com preparações protéicas das amostras obtidas do processo de purificação das intiminas $v\alpha$ (2A), $v\beta$ (2B), $v\gamma$ (2C) e conservada (2D e 3D). 1 – PM. Abaixo estão as concentrações de proteínas obtidas (mg/mL).

Baseadas nas concentrações de proteína foram realizadas as diluições das preparações para a sensibilização de placas de ELISA e para a preparação das membranas para os IBs.

4. Determinação da concentração de anticorpos anti-intiminas nas amostras de soro e colostro

As concentrações de anticorpos anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada realizadas com todas as amostras de soro (IgG) e colostro (IgA) a partir do ELISA com antígenos purificados estão relacionados nas tabelas 6 e 7 respectivamente.

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística, com o objetivo de avaliar o estado da resposta de anticorpos IgG e IgA destes dois grupos de amostras frente as intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada.

Tabela 6. Concentração de anticorpos IgG anti-intimina das 100 amostras de soro, detectados pelo ELISA ($\mu\text{g/mL}$).

NºAm	Anti- $\nu\alpha$	Anti- $\nu\beta$	Anti- $\nu\gamma$	Anti-cons
Pool	2,65	1,76	1,87	5,40
1	3,19	0,38	7,74	6,63
2	3,06	2,15	0,92	2,47
3	1,51	0,93	0,74	2,48
4	1,81	0,97	0,39	2,56
5	6,40	6,47	2,69	5,56
6	1,11	1,04	0,18	1,22
7	5,69	3,14	3,51	2,95
8	0,92	0,49	0,40	1,62
9	8,44	2,29	7,55	6,80
10	3,22	2,10	0,66	3,74
11	1,70	0,98	1,68	7,66
12	1,60	1,09	2,19	2,85
13	0,66	0,26	0,46	3,67
14	6,56	4,03	3,49	4,22
15	1,60	1,46	1,53	3,44
16	6,40	5,21	3,97	5,23
17	2,43	1,10	1,33	6,45
18	0,10	0,30	0,17	1,00
19	1,64	0,34	2,84	2,44
20	2,49	0,76	0,28	5,72
21	0,65	0,24	0,21	2,38
22	2,30	1,45	4,02	3,09
23	1,58	0,85	0,74	2,61
24	0,63	0,35	0,26	1,62
25	0,59	1,16	1,36	3,52
26	1,39	0,72	8,44	3,24
27	1,71	1,17	0,57	1,60
28	1,76	1,09	8,41	5,27
29	0,97	0,13	0,31	4,28
30	1,74	0,36	0,68	2,65
31	5,03	2,16	11,24	5,45
32	1,17	0,44	0,84	1,48
33	0,87	0,52	0,49	1,49
34	0,64	0,57	1,69	1,72
35	2,75	2,93	4,46	1,81
36	0,58	0,36	0,81	6,02
37	2,74	1,48	3,62	6,68
38	4,07	2,73	4,32	4,15
39	1,43	2,32	1,57	2,64
40	1,34	0,61	1,46	5,41
41	0,72	0,14	0,36	2,57
42	1,25	0,22	0,26	3,24
43	0,60	0,78	0,40	1,62
44	0,97	1,14	1,24	2,01
45	7,02	4,83	1,35	14,04
46	2,01	0,82	1,42	4,79
47	1,86	1,06	1,86	3,65
48	1,22	1,15	0,74	2,33
49	6,85	1,71	0,94	2,90
50	2,06	1,10	1,07	6,63
51	7,21	3,52	0,68	2,65
52	0,74	0,25	0,40	2,13
53	4,34	5,77	0,77	3,42
54	0,24	0,07	0,39	0,32
55	0,83	0,93	0,59	4,57
56	0,95	0,44	0,16	4,27
57	5,01	3,45	10,01	5,46
58	0,59	0,57	0,33	3,22
59	17,26	8,64	11,24	9,22
60	1,35	0,90	0,62	2,12
61	0,93	1,78	0,66	6,24
62	1,14	0,84	1,13	2,12
63	9,52	6,64	11,36	4,33
64	1,13	0,77	0,28	2,70
65	1,11	1,08	2,01	2,35
66	1,57	1,26	0,25	0,91
67	4,96	1,84	0,34	6,48
68	1,62	1,75	1,26	3,24
69	7,96	2,69	0,74	4,32
70	1,39	0,58	0,59	3,54
71	1,05	0,69	1,09	3,25
72	3,51	3,39	3,23	3,99
73	4,09	0,60	0,55	8,15
74	1,07	0,72	1,40	5,20
75	1,03	1,21	0,28	4,18
76	8,73	7,22	11,31	11,81
77	2,01	1,14	0,82	5,29
78	3,92	2,90	2,23	41,13
79	2,04	0,68	0,08	12,20
80	0,86	1,40	0,81	5,21
81	1,08	1,24	0,28	4,49
82	2,73	2,09	2,54	12,15
83	2,74	2,18	9,75	5,17
84	1,80	0,55	0,93	2,05
85	3,25	0,44	0,53	12,90
86	5,22	2,31	3,39	4,08
87	2,44	1,24	1,98	1,88
88	1,88	0,89	1,36	8,52
89	1,61	1,19	2,11	4,65
90	2,92	2,16	1,54	2,51
91	1,27	0,39	0,79	3,39
92	2,40	1,56	0,84	5,98
93	1,23	1,16	1,89	1,88
94	0,69	0,11	0,64	7,86
95	0,35	0,31	0,91	2,03
96	0,68	1,02	1,09	4,97
97	1,83	0,77	1,05	5,40
98	1,81	1,38	1,24	2,38
99	1,78	2,78	1,39	4,65
100	1,44	0,78	0,35	1,17

Tabela 7. Concentrações de anticorpos IgA anti-intiminas nas 54 amostras de colostro, detectados pelo ELISA ($\mu\text{g/mL}$).

NºAm	Anti- α	Anti- $\nu\beta$	Anti- $\nu\gamma$	Anti- cons
Pool	27,75	35,41	13,93	24,09
1	5,34	6,98	6,27	15,20
2	57,85	55,73	29,47	78,94
3	22,26	10,10	21,98	26,46
4	9,22	35,35	8,76	105,90
5	6,34	7,31	13,57	6,26
6	4,79	3,47	3,84	5,97
7	449,69	808,25	27,57	493,91
8	474,55	868,12	775,36	121,52
9	52,31	75,79	25,33	34,55
10	51,07	39,21	10,88	7,55
11	97,80	130,77	11,70	101,89
12	186,27	336,08	25,51	30,97
13	129,86	200,40	25,34	19,74
14	5,32	3,82	1,05	3,05
15	1329,64	2169,58	281,53	860,61
16	290,96	247,84	18,65	82,28
17	10,80	5,18	1,38	31,04
18	9,57	5,04	3,10	4,60
19	13,07	4,69	0,98	3,11
20	933,25	1248,92	84,98	834,19
21	9,51	5,04	4,43	11,02
22	16,57	17,82	11,04	12,92
23	38,05	31,77	1,65	81,08
24	31,51	29,32	13,09	38,10
25	85,29	100,43	245,05	92,98
26	3,68	7,37	4,18	3,92
27	7,56	10,63	7,24	4,15
28	8,65	1,18	0,30	4,92
29	8,56	14,27	2,43	9,50
30	15,75	12,46	9,63	4,04
31	7,28	7,57	7,05	6,72
32	5,01	5,60	0,26	76,67
33	66,93	68,90	31,64	30,02
34	3,57	4,10	1,56	3,14
35	88,06	227,16	237,91	105,11
36	6,50	5,69	0,87	2,69
37	12,82	14,61	6,91	6,54
38	9,57	3,61	5,22	4,34
39	9,89	2,47	3,25	14,18
40	4,92	6,90	4,55	9,16
41	7,01	2,92	2,48	5,17
42	26,28	7,91	11,13	26,78
43	8,97	4,88	5,24	9,16
44	6,85	10,98	1,73	11,82
45	24,78	60,79	32,59	15,53
46	12,59	5,98	7,03	11,08
47	1,19	0,90	0,92	6,02
48	16,89	15,58	17,72	21,08
49	304,49	35,95	7,73	1023,97
50	135,37	102,83	98,97	151,17
51	11,22	13,54	6,39	3,84
52	14,31	12,30	5,30	32,55
53	27,97	18,69	21,69	19,13
54	10,55	1,40	1,31	6,85

5. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística para comparar a resposta de anticorpos do grupo de indivíduos estudados, em relação às intiminas.

Inicialmente foi feita uma análise descritiva (tabela 8) que foi em seguida representada no gráfico “Box-Plot” (figura 9). Também foi feita a análise de variância para comparar os diferentes grupos.

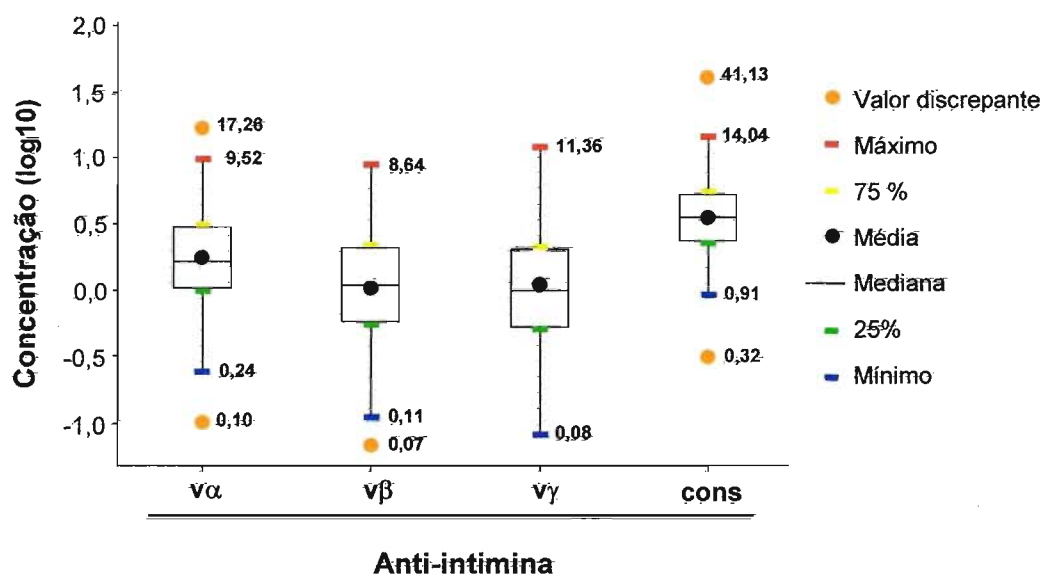
Finalmente foi realizada a análise da distribuição de freqüências das amostras agrupadas em faixas de concentração de anticorpos e comparação destas distribuições nos vários grupos de dados (figura 10).

Tabela 8. Valores da análise estatística dos resultados das concentrações de anticorpos anti-intiminas da classe IgG nas 100 amostras de soros e da classe IgA nas 54 amostras de colostro.

	Soro (IgG anti-intimina)				Colostro (IgA anti-intimina)			
	$v\alpha$	$v\beta$	$v\gamma$	cons	$v\alpha$	$v\beta$	$v\gamma$	cons
Média	2,56	1,58	2,08	4,65	96,08	132,11	41,66	87,65
Mediana	1,67	1,09	1,00	3,59	12,95	12,38	7,14	14,69
Desvio Padrão	2,56	1,61	2,78	4,56	232,33	365,01	118,65	214,11
Variância	6,57	2,60	7,75	20,76	53.979,33	133.229,78	13.842,18	45.841,79
Erro padrão	0,26	0,16	0,28	0,46	32,62	49,67	16,01	29,14

O gráfico “Box-Plot” realizado no programa estatístico Minitab 14 utilizando os resultados do ELISA está representado na figura 9, mostrando a dispersão de dados das concentrações de anticorpos IgG e IgA anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada nos 100 soros e 54 colostros, aonde ressaltam-se os valores máximos, valores mínimos, os percentis 25 e 75 delimitando a caixa, as médias, medianas e dados discrepantes. Este gráfico permite uma melhor comparação entre as concentrações para os quatro grupos de dados e entre as duas classes de imunoglobulinas pesquisadas.

A.



B.

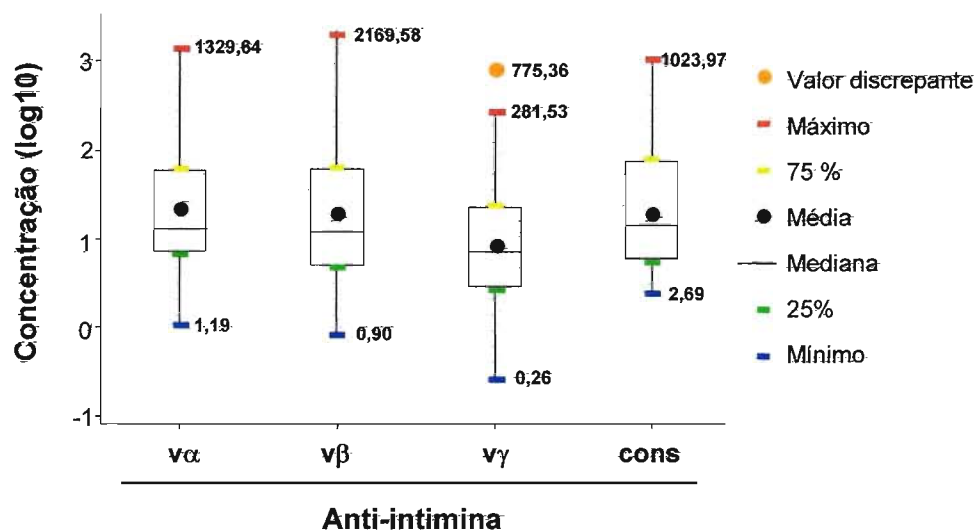


Figura 9. Comparação da resposta de anticorpos IgG (A) nos soros e IgA (B) nos colostros, contra as intiminas v α , v β , v γ e conservada. "Box plots" mostram o valor máximo e mínimo, a média e mediana, os percentis 25 e 75 e os valores discrepantes.

A primeira observação feita frente aos resultados mostrados até o momento é que, de maneira geral, a concentração de anticorpos no colostro é mais alta que a do soro (tabelas 6, 7 e 8, e figura 9).

A análise descritiva das concentrações de anticorpos nos soros mostrados na figura 9A sugere que existe uma concentração mais elevada de anticorpos anti-

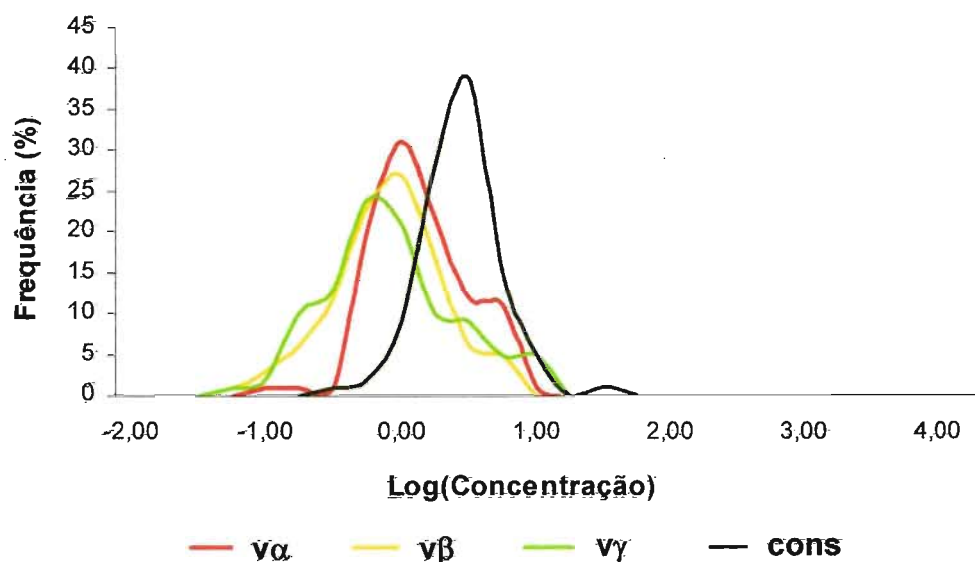
intimina conservada quando comparada com as concentrações dos outros três grupos (anti- intiminas $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$), os anticorpos anti- $v\alpha$ se encontram mais elevados que os anti- $v\beta$ e anti- $v\gamma$ e estes dois últimos são semelhantes de acordo com a amplitude de variação, médias e medianas. Este resultado foi confirmado com a análise de variância realizado pelo teste Kruskal-Wallis que mostrou que a concentração de anticorpos anti-intimina conservada é maior que a $v\alpha$, esta maior que $v\beta$, e que esta última é considerada igual à $v\gamma$. Este teste não paramétrico foi escolhido já que nossos conjuntos de dados não apresentam uma distribuição normal.

Diferentemente dos anticorpos séricos IgG, os resultados dos quatro grupos de dados das concentrações de IgA anti-intiminas nos colostros são diferentes entre si (tabela 8 e figura 9B). A análise de variância neste caso foi realizada pelo teste paramétrico de Tukey uma vez que este grupo de dados apresenta uma distribuição normal. Este teste, com 95% de confiança, mostrou que a concentração de anticorpos anti-intimina $v\alpha$, $v\beta$ e conservada na nossa população são semelhantes entre si e que os anticorpos anti-intimina $v\gamma$ estão em níveis mais baixos que os três anteriores.

A análise da distribuição de freqüências foi realizada com o logaritmo (Log_{10}) da concentração de anticorpos. Esses valores de Log das concentrações foram agrupados de acordo com faixas e foi verificada a porcentagem de amostras de cada faixa. Os resultados estão representados nos gráficos da figura 10.

Na figura 10A observamos que as distribuições de freqüências das concentrações de IgG nos soros contra as intiminas $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$ são semelhantes e a curva de freqüência para a conservada se encontra aumentada quando comparada com as outras três, isto quer dizer que existe uma maior quantidade de amostras com concentração elevada de anticorpos. A distribuição de freqüências dos anticorpos nos colostro (figura 10B) não apresentou diferenças significativas. Nota-se também que os anticorpos IgA presentes no colostro se encontram em uma concentração mais elevada que os anticorpos IgG presentes no soro.

A.



B.

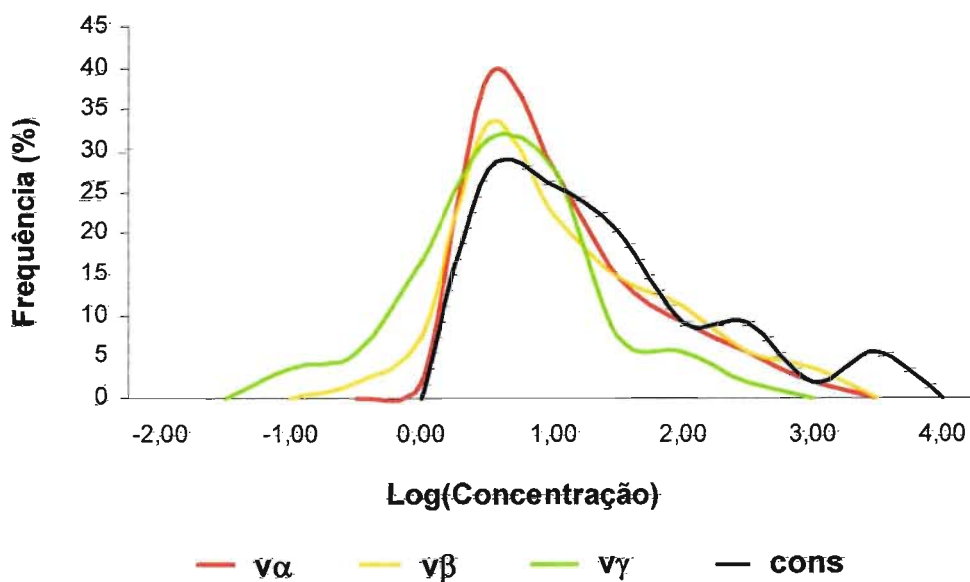


Figura 10. Distribuição de frequências (%) das concentrações de anticorpos IgG nas 100 amostras de soro (A) e IgA nas 54 amostras de colostro (B) contra as intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada.

5.1. Coeficientes de correlação de Spearman

Todos os grupos de dados foram submetidos ao teste de correlações de Spearman. Foram comparadas as concentrações de anticorpos IgG no soro e IgA no colostro para as quatro intiminas. A tabela 9 e as figuras 11 e 12 apresentam os coeficientes de correlação das comparações.

Os valores dos coeficientes são negativos quando não há correlação entre os grupos de dados. Se há correlação, os coeficientes são positivos, e quanto mais próximos de 1 (um), maior a correlação entre os grupos de dados. O valor entre parêntesis é o (p), que quanto mais próximo de 0 (zero) maior a correlação entre os grupos de dados, para um dado intervalo de confiança. Um $p < 0,05$ indica correlação estatisticamente significativa, com um intervalo de confiança de 95%.

Todos os coeficientes de correlação foram positivos e os maiores valores observados foram entre as concentrações de anticorpos anti- $v\alpha$ e anti- $v\beta$ para soro e entre anti- $v\beta$ e anti- $v\gamma$ para colostro.

Tabela 9. Teste de correlação de Spearman entre os anticorpos reativos com diferentes intiminas, avaliados em duplas, em amostras de soros (IgG) e colostros (IgA). Valores de coeficientes e de (p).

Anticorpos anti-intiminas			IgG em soros	IgA em colostros
$v\alpha$	X	$v\beta$	0,7234 (0,0000)	0,8388 (0,0000)
$v\alpha$	X	$v\gamma$	0,5435 (0,0000)	0,7831 (0,0000)
$v\alpha$	X	cons	0,4622 (0,0000)	0,7424 (0,0000)
$v\beta$	X	$v\gamma$	0,5692 (0,0000)	0,8475 (0,0000)
$v\beta$	X	cons	0,2885 (0,0041)	0,7398 (0,0000)
$v\gamma$	X	cons	0,3126 (0,0019)	0,6453 (0,0000)

No caso dos soros observamos que as correlações mais altas foram entre as concentrações dos anticorpos para as porções variáveis: anti-intiminas $v\alpha$ X $v\beta$, $v\alpha$ X $v\gamma$, $v\beta$ X $v\gamma$ com um $p = 0,0000$. Na comparação das concentrações de anticorpos para a porção conservada com as variáveis, ou seja, anti-intiminas $v\alpha$ X cons, $v\beta$ X cons e $v\gamma$ X cons, também se obtiveram correlações positivas, porém mais baixas que as outras três comparações, sendo o p das duas últimas de 0,0041 e 0,0019 respectivamente. Os resultados de correlação para colostro foram todos positivos e altos mostrando um $p = 0,0000$ em todos os casos. Um alto coeficiente de correlação pode ser indicativo de reação cruzada entre os anticorpos para ambos os antígenos dos grupos pareados.

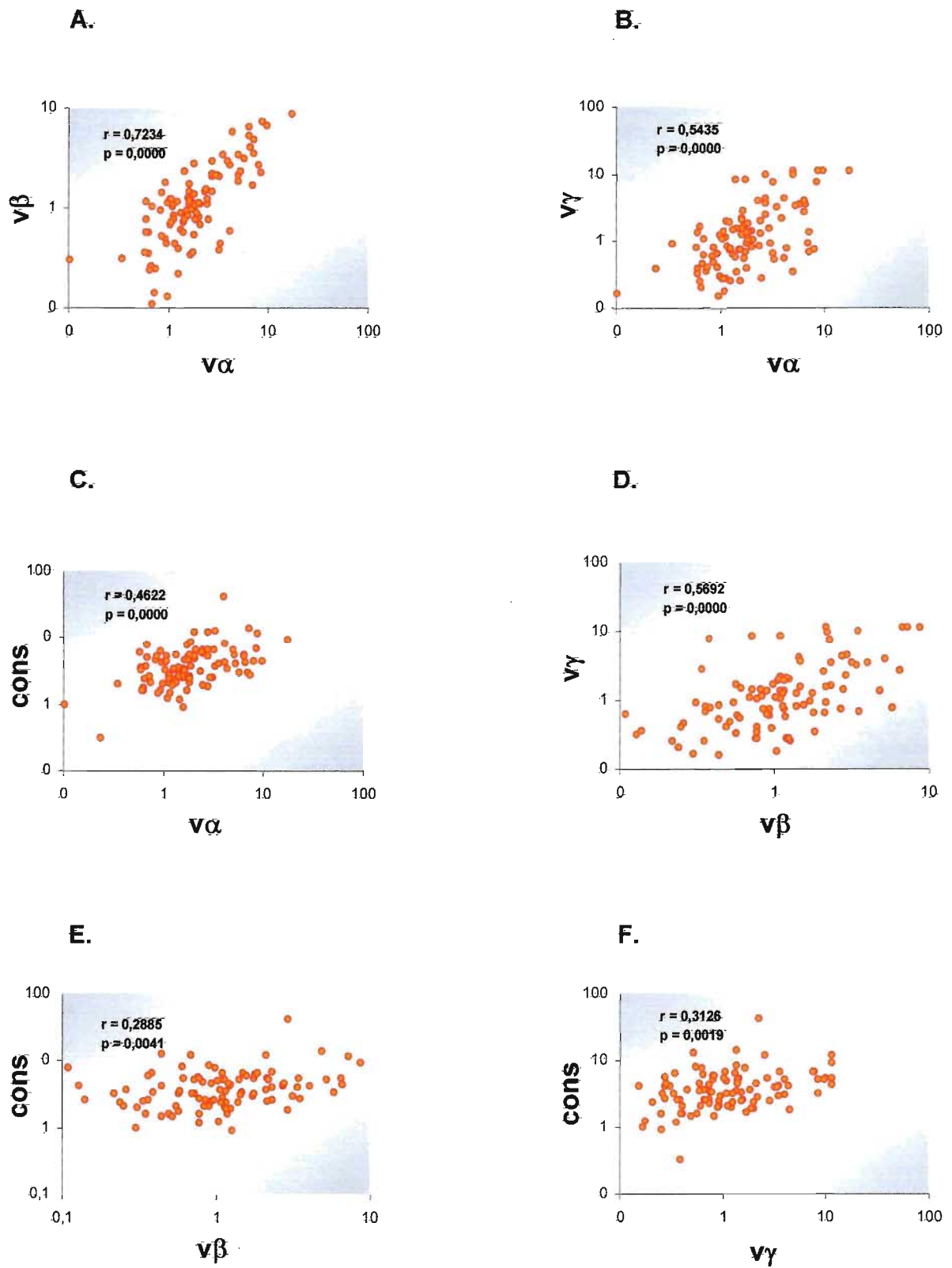


Figura 11. Comparação entre as concentrações de IgG anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada presentes em 100 amostras de soro (r = coeficiente de correlação de Spearman).

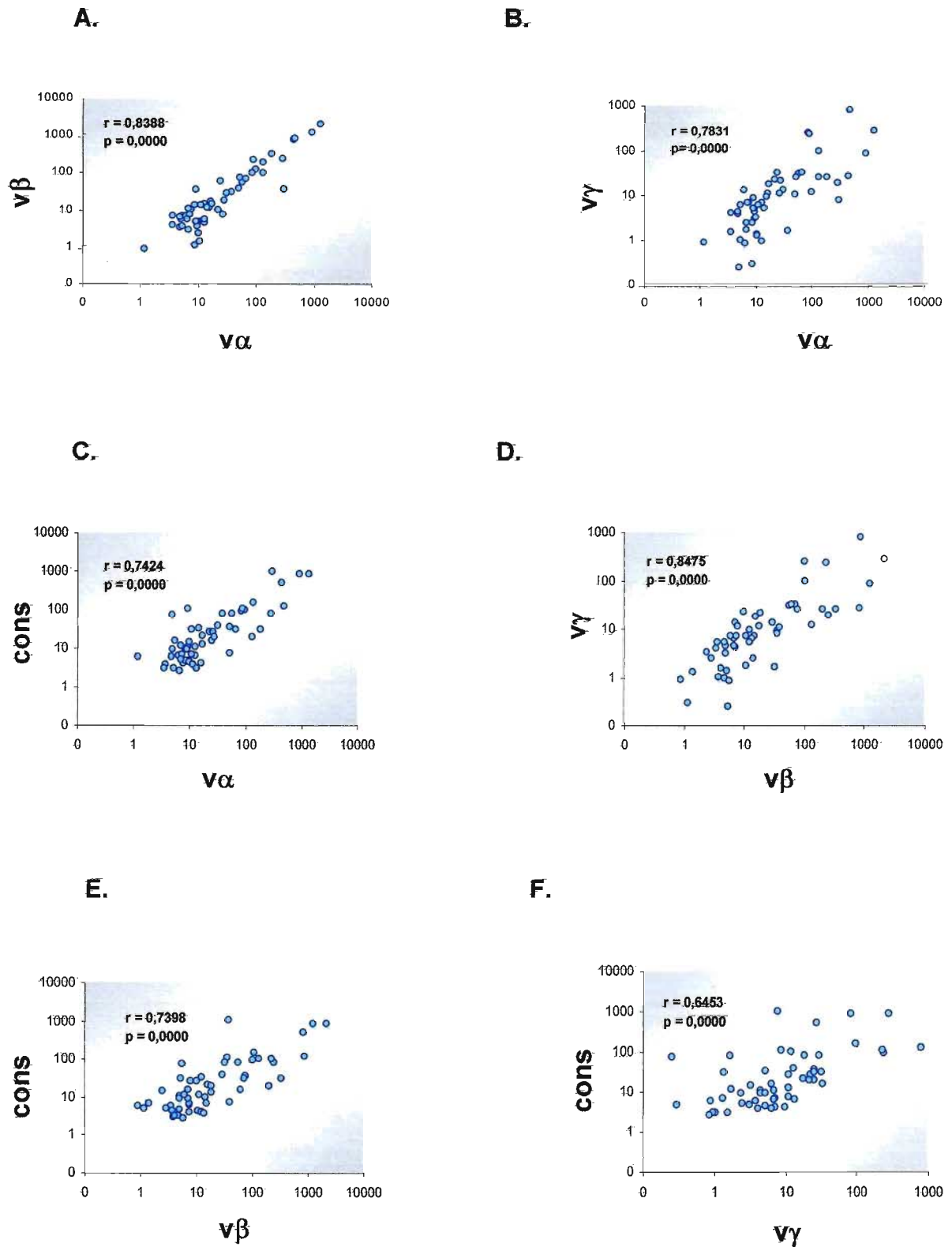


Figura 12. Comparação entre as concentrações de IgA anti-intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada presentes em 54 amostras de colostro (r = coeficiente de correlação de Spearman).

6. Determinação de cut-off

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho foram determinados valores de “cut-off” considerando três desvios padrões (DP) acima das médias. A tabela 10 mostra estes valores e o número de indivíduos que em cada grupo de dados estaria acima da média mais três DP.

Tabela 10. Média, desvio padrão e cut-off considerando três desvios padrões acima da média para IgG e IgA dos anticorpos anti-intiminas (concentração em $\mu\text{g/mL}$).

Anticorpo	Média	DP	“cut off” (Média + 3DP)	Nº de indivíduos acima do cut-off
IgG anti-intimina $\nu\alpha$	2,56	2,56	10,24	1
IgG anti-intimina $\nu\beta$	1,58	1,61	6,41	4
IgG anti-intimina $\nu\gamma$	2,08	2,78	10,42	4
IgG anti-intimina cons	4,65	4,56	18,33	1
IgA anti-intimina $\nu\alpha$	96,08	232,33	793,07	2
IgA anti-intimina $\nu\beta$	132,11	365,01	1227,14	2
IgA anti-intimina $\nu\gamma$	41,66	118,65	397,61	1
IgA anti-intimina cons	87,65	214,11	729,98	3

De acordo com a tabela 10 pode se observar que existem indivíduos que se encontram acima do “cut-off” determinado através da média + 3DP. Como esses valores se encontram muito acima dos demais, foi realizado um recálculo da média e DP eliminando estes indivíduos do grupo (tabela 11).

Tabela 11. Recálculo da média, desvio padrão para IgG e IgA dos anticorpos anti-intiminas (concentração em $\mu\text{g/mL}$).

Anticorpo	Média	DP	cut off “corrigido” (Média + 3DP)
IgG anti-intimina $\nu\alpha$	2,42	2,10	8,72
IgG anti-intimina $\nu\beta$	1,35	1,13	4,74
IgG anti-intimina $\nu\gamma$	1,72	2,09	7,99
IgG anti-intimina cons	4,25	2,69	12,32
IgA anti-intimina $\nu\alpha$	56,25	104,40	369,45
IgA anti-intimina $\nu\beta$	71,46	169,85	581,01
IgA anti-intimina $\nu\gamma$	26,80	59,43	205,09
IgA anti-intimina cons	39,50	74,82	263,96

7. Ensaíos de “immunoblotting” (IB)

Os ensaios de IB foram realizados utilizando-se como antígeno as proteínas purificadas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada (item 5.4. de Material e Métodos) para a avaliação de IgG dos soros e IgA dos colostros. Com base nos resultados da concentração de anticorpos IgG e IgA pelo ensaio de ELISA, foi feita uma seleção de três amostras com alta concentração de anticorpos IgG e IgA para cada uma das quatro intiminas. Com estas amostras foram formados quatro “pools” de soro e quatro de colostro. A tabela a seguir mostra a relação de amostras utilizadas.

Tabela 12. “Pools” formados com três amostras com alta concentração de anticorpos frente às intiminas em estudo.

Anticorpos IgG anti-intimina	Amostras de soro que formam o “pool”
$v\alpha$	59, 63 e 76
$v\beta$	5, 59 e 63
$v\gamma$	31, 63 e 76
Cons	45, 78 e 85
Anticorpos IgA anti-intimina	Amostras de colostro que formam o “pool”
$v\alpha$	15, 20 e 49
$v\beta$	8, 15 e 20
$v\gamma$	8, 15 e 35
Cons	7, 15 e 49

Note-se que no caso dos soros, a amostra 63 tem alta concentração de anticorpos para $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$; a amostra 59, para $v\alpha$ e $v\beta$ e a amostra 76, para $v\alpha$ e $v\gamma$. Nos colostros, a amostra 15 tem alta concentração de anticorpos para as quatro intiminas, a amostra 20, para $v\alpha$ e $v\beta$ e a amostra 8, para $v\beta$ e $v\gamma$.

Uma possível reatividade cruzada dos anticorpos anti-intimina $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada, contidos nos “pools” descritos acima, contra antígenos homólogos e heterólogos foi verificada em ensaios de IB. (figuras 13 e 14).

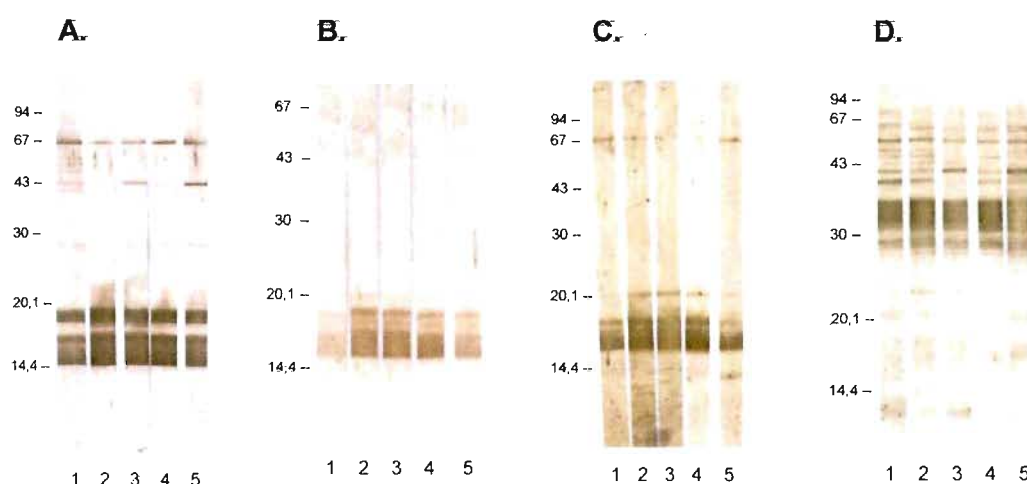


Figura 13. IB com as intiminas A. $v\alpha$, B. $v\beta$, C. $v\gamma$ e D. conservada. Amostras de **soro** diluídas 1/10 e conjugado anti- IgG humano diluído 1/200. 1- "Pool" de 100 amostras de soro (controle), 2, 3, 4 e 5 "pool" de três amostras com concentração elevada de anticorpos anti-intimina $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada respectivamente. PM - Padrão de PM à esquerda.

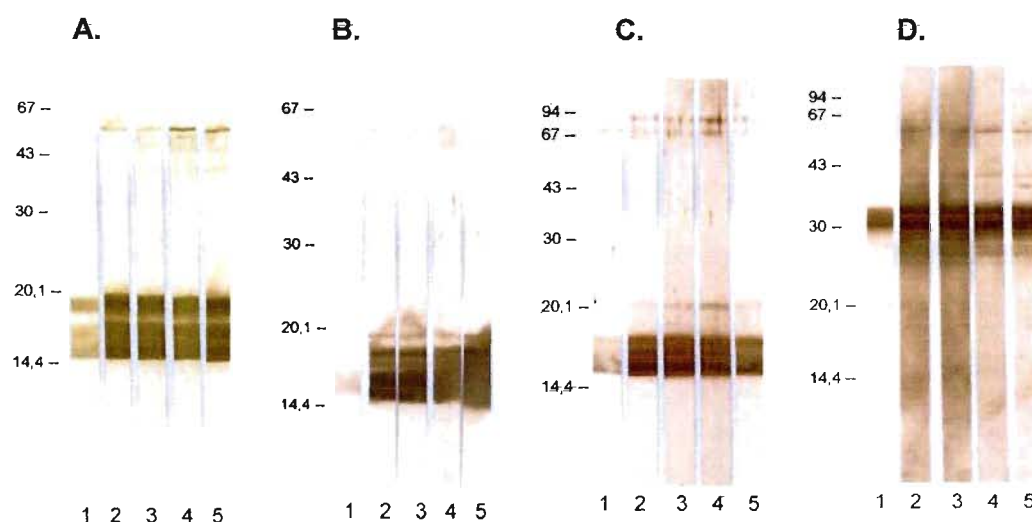


Figura 14. IB com as intiminas A. $v\alpha$, B. $v\beta$, C. $v\gamma$ e D. conservada. Amostras de **coloostro** diluídas 1/50 e conjugado anti- IgA humano diluído 1/500. 1- "Pool" de 20 amostras de colostro (controle), 2, 3, 4 e 5 "pool" de três amostras com concentração elevada de anticorpos anti-intimina $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada respectivamente. PM - Padrão de PM à esquerda.

Nas figuras 13 e 14, pode-se observar bandas fortemente reativas que mostram a resposta de anticorpos anti-intiminas tanto nos "pools" de soro como nos de colostro. A resposta anti-intimina $v\beta$ e $v\gamma$ está representada na banda correspondente a 16,5 kDa e da anti-intimina conservada na banda correspondente a 33,6 kDa. No caso da anti-intimina $v\alpha$ pode-se observar que as amostras reconheceram duas bandas que já foram observadas na realização do gel de poli-acrilamida (figura 8A). A intensidade das bandas produzidas pelos "pools" de amostras foi semelhante em todos os ensaios, mostrando assim uma possível

reação cruzada da resposta contra as intiminas. Este resultado está de acordo com as altas correlações entre as concentrações de anticorpos para os diferentes tipos de intimina (tabela 9 e figuras 11 e 12).

8. Absorção do “pool” de soro e da IgA purificada com as intiminas recombinantes

Ainda para a verificação de uma possível reação cruzada dos anticorpos dirigidos contra os diferentes subtipos de intimina, também foram realizadas absorções com as bactérias recombinantes ativadas previamente com IPTG.

8.1. Absorções do “pool” de soro com as intiminas recombinantes

O “pool” de soro foi absorvido com três das bactérias recombinantes. Estas bactérias foram escolhidas de acordo com os resultados da correlação observados na tabela 9, onde a correlação mais alta foi entre as intiminas $v\alpha$ e $v\beta$ (0,7234) e a mais baixa entre $v\beta$ e conservada (0,2885). Assim o “pool” de soro foi absorvido com as bactérias recombinantes que expressam intiminas $v\alpha$, $v\beta$ e conservada em diferentes combinações. Posteriormente as concentrações de IgG do “pool” sem absorver e dos produtos das absorções foram determinadas por ELISA. Estas amostras também foram analisadas por IB.

Tabela 13. Concentração de anticorpos IgG reativos com intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada do “pool” de soro e dos produtos das absorções com as bactérias recombinantes ($\mu\text{g/mL}$).

Amostras	Anti- $v\alpha$	Anti- $v\beta$	Anti- $v\gamma$	Anti-cons
P0. “Pool” de soro	2,65	1,76	1,87	5,4
P1. “Pool” absorvido com int. $v\alpha$ e $v\beta$	0,04	0,04	0,06	0,02
P2. “Pool” absorvido com int. $v\beta$ e cons	0,01	0,06	0,03	0
P3. “Pool” absorvido com int. $v\beta$	0,06	0,01	0,09	0,26

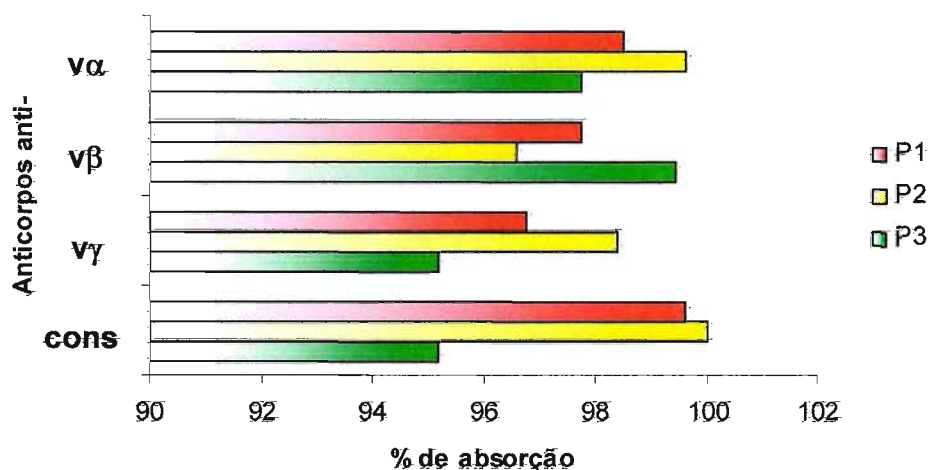


Figura 15. Porcentagem de absorção dos anticorpos IgG reativos com intimina v α , v β , v γ e conservada detectados por ELISA em um "pool" de soro após absorção com as bactérias recombinantes.

- P1: "pool" de soro absorvido com v α e v β
 P2: "pool" de soro absorvido com v β e conservada
 P3: "pool" de soro absorvido com v β

Pode-se observar que todas as absorções foram eficientes, tanto aquelas que foram realizadas duas vezes com duas bactérias como aquela que foi absorvida só uma vez com a bactéria da intimina v β .

Nos IBs foram avaliados somente os anticorpos anti-intiminas v α , v β e conservada, do "pool" de soros, após as absorções descritas na tabela 13.

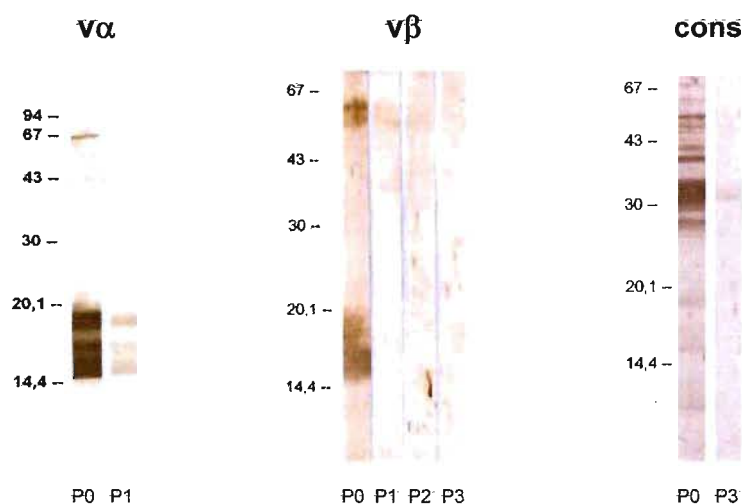


Figura 16. IB com as intiminas v α , v β , conservada, amostras de soro diluídas 1/10 e conjugado anti IgG humano diluído 1/200. P0- "Pool" de soro controle, P1- "pool" de soro absorvido com v β e v α , P2- "pool" absorvido com v β e conservada e P3- "pool" absorvido com v β . Padrão de PM à esquerda.

8.2. Absorções de IgA purificada com as intiminas recombinantes

Pelo fato da IgA purificada possuir uma concentração de anticorpos muito mais elevada que o “pool” de colostro optou-se por proceder as absorções com este material. Neste caso, também foram realizadas absorções seriadas e individuais. A IgA purificada e os produtos após as absorções foram analisados por ELISA, IB e ensaio de inibição da adesão.

Tabela 14. Concentração de anticorpos IgA reativos com intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada da amostra de IgA purificada e dos produtos das absorções com as bactérias recombinantes ($\mu\text{g/mL}$).

Amostras de IgA purificada	Concentração de anticorpos ($\mu\text{g/mL}$)			
	Anti- $v\alpha$	Anti- $v\beta$	Anti- $v\gamma$	Anti-cons
A0. IgA não absorvida	224,14	118,74	150,66	179,11
A1. IgA absorvida com int. $v\beta$, $v\gamma$ e cons	2,36	0,73	0,18	2,37
A2. IgA absorvida com int. $v\alpha$, $v\gamma$ e cons	0	6,63	0	2,19
A3. IgA absorvida com int. $v\alpha$, $v\beta$ e cons	0,47	1,17	6,2	4,59
A4. IgA absorvida com int. $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$	0,05	6,57	3,8	32,52
B1. IgA absorvida com int. $v\alpha$	0,92	25,86	58,94	67,58
B2. IgA absorvida com int. $v\beta$	137,05	21,64	87,89	87,08
B3. IgA absorvida com int. $v\gamma$	127,57	44,62	9,64	58,70
B4. IgA absorvida com int. cons	95,37	13,53	11,09	11,84

Foram realizadas três absorções seqüenciais com o propósito de isolar o anticorpo específico contra cada uma das intiminas. Por exemplo, para isolar os anticorpos IgA anti-intimina $v\alpha$, a IgA purificada foi absorvida com as bactérias recombinantes que expressam as intiminas $v\beta$, $v\gamma$ e conservada e posteriormente foi determinada a concentração de anticorpos para os quatro tipos de intiminas para compará-las com as mesmas concentrações antes da absorção. O mesmo procedimento foi repetido com novas alíquotas de IgA com outras bactérias recombinantes de acordo com a tabela 14 (amostras A1 a A4). Paralelamente avaliamos a diminuição da concentração de anticorpos após absorção com apenas uma bactéria recombinada, por exemplo, a IgA absorvida com a bactéria recombinada da intimina $v\alpha$ e em seguida feita a determinação da concentração de anticorpos para todas as intiminas. O mesmo procedimento foi repetido para os demais tipos de intiminas de acordo com a tabela 14 (amostras B1 a B4).

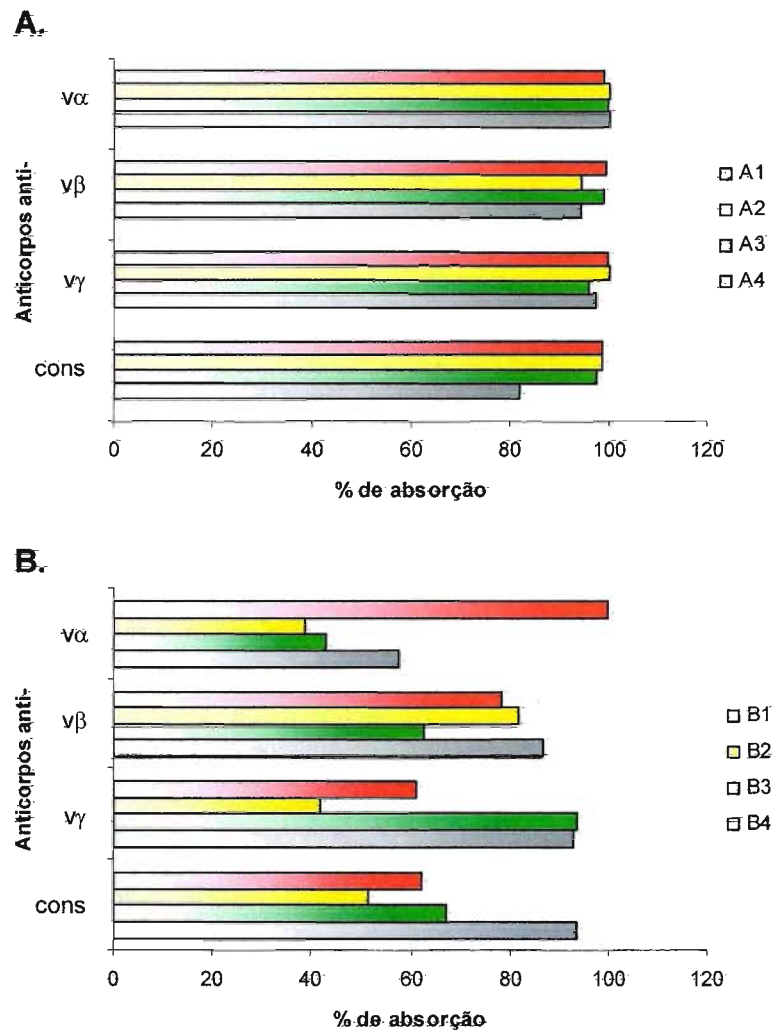


Figura 17. Porcentagem de absorção dos anticorpos IgA reativos com intimina vα, vβ, vγ e conservada detectados por ELISA em uma amostra de IgA purificada após absorção. A. absorção com três bactérias recombinantes e B. absorção com uma bactéria recombinante.

- | | |
|--|-----------------------------------|
| A.1. IgA absorvida com vβ, vγ e conservada | B.1. IgA absorvida com vα |
| A.2. IgA absorvida com vα, vγ e conservada | B.2. IgA absorvida com vβ |
| A.3. IgA absorvida com vα, vβ e conservada | B.3. IgA absorvida com vγ |
| A.4. IgA absorvida com vα, vβ e vγ | B.4. IgA absorvida com conservada |

Os resultados dos IBs confirmaram o resultado do ELISA e mostraram uma diferença muito nítida na reação de anticorpos feita com os produtos das três absorções sequenciais e os produtos da absorção específica (figura 18). Por exemplo: a concentração de anti-vα da IgA absorvida com as intiminas vβ, vγ e conservada é maior quando comparada com as determinações da concentração anti-vβ e vγ, enquanto que a concentração de anti-vα da IgA absorvida com a intimina vα é menor que a concentração de anti-vβ, anti-vγ e anti-conservada na

mesma amostra. Foram obtidos resultados semelhantes para os anticorpos anti-intimina $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$.

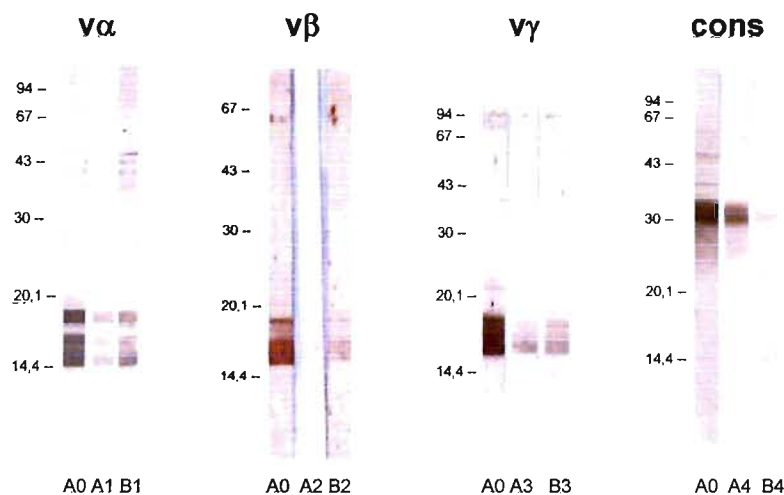


Figura 18. IB das amostras de IgA purificada antes e após absorção com as intiminas $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada, nos vários esquemas. Amostras diluídas 1/50 e conjugado anti IgA humano diluído 1/500. PM à esquerda, A0 - IgA não absorvida.

- | | |
|---|-----------------------------------|
| A1 - IgA absorvida com $v\beta$, $v\gamma$ e conservada | B1 - IgA absorvida com $v\alpha$ |
| A2 - IgA absorvida com $v\alpha$, $v\gamma$ e conservada | B2 - IgA absorvida com $v\beta$ |
| A3 - IgA absorvida com $v\alpha$, $v\beta$ e conservada | B3 - IgA absorvida com $v\gamma$ |
| A4 - iga absorvida com $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$ | B4 - IgA absorvida com conservada |

Pode se observar na figura 18 que a reatividade com as intiminas $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$ é semelhante, ou seja, as bandas nas fitas A1, A2 e A3 que correspondem às absorções seqüenciais são mais fracas que as bandas nas fitas B1, B2 e B3 que correspondem a uma única absorção. O contrário é observado com a conservada que mostra que apesar da IgA ter sido absorvida seqüencialmente com $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$ (A4 da figura 18), mostra mais reatividade que aquela que foi absorvida com a própria conservada.

9. Inibição da adesão

Primeiramente foram realizados ensaios de inibição da adesão de bactérias EPEC O111:H- às células HEp-2, utilizando diferentes "pools" formados por amostras com concentração alta e baixa de anticorpos anti- $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada no soro e no colostro. Como controles foram utilizados o "pool" de soro formado por 100 amostras e o "pool" de colostro formado por 20 amostras. Os resultados dos ensaios de adesão são mostrados nas tabelas 15 e 16.

Tabela 15. Porcentagem da inibição da adesão (%) da bactéria EPEC O111:H⁻ com 200µL de amostras de soro.

Amostras de soro	% Inibição da adesão
"Pool" de 100 amostras	58
"Pool" de três amostras com concentração:	
alta de anti- $\nu\alpha$ (59, 63, 76)	85
alta de anti- $\nu\beta$ (59, 5, 63)	78
alta de anti- $\nu\gamma$ (31, 63, 76)	70
alta de anti-cons (78, 45, 85)	62
baixa de anti- $\nu\alpha$ (36, 54, 52)	60
baixa de anti- $\nu\beta$ (24, 36, 91)	70
baixa de anti- $\nu\gamma$ (100, 60, 61)	60
baixa de anti-cons (54, 100, 18)	60

Tabela 16. Porcentagem da inibição da adesão (%) da bactéria EPEC O111:H⁻ com 25µL de amostras de colostro.

Amostras de colostro	% Inibição da adesão
"Pool" de 20 amostras	86
"Pool" de três amostras com concentração:	
alta de anti- $\nu\alpha$ (15, 20 e 49)	93
alta de anti- $\nu\beta$ (8, 15 e 20)	94
alta de anti- $\nu\gamma$ (8, 15 e 35)	98
alta de anti-cons (7, 15 e 49)	99
baixa de anti- $\nu\alpha$ (6, 13 e 47)	93
baixa de anti- $\nu\beta$ (6, 28 e 54)	91
baixa de anti- $\nu\gamma$ (19, 31 e 47)	84
baixa de anti-cons (14, 26 e 36)	85

O objetivo deste ensaio foi verificar se pela diferença na concentração de anticorpos ou pelo uso de diferentes "pools", haveria uma diferença nas porcentagens de inibição. Como podem se observar nas tabelas 15 e 16, de maneira geral as porcentagens de inibição com os "pools" de colostro são mais altas que com os "pools" de soro. Note-se que, mesmo utilizando uma quantidade menor de colostro (25 µL) em relação ao soro (200 µL), a atividade inibitória é maior. Observa-se também que independente de qual "pool" seja utilizado, não existe variação nas porcentagens de inibição, o que significa que aparentemente não houve relação entre as concentrações de anticorpos anti-intiminas e a capacidade inibitória da adesão.

Para se verificar a quantidade mínima de amostra necessária para inibir a adesão das três bactérias EPEC O127:H6, EPEC O111:H⁻ e O157:H7 (portadoras

das intiminas α , β e γ respectivamente) foram realizados ensaios de adesão com diferentes quantidades de soro, colostro e IgA purificada (tabela 17).

Tabela 17. Porcentagem da inibição da adesão (%) da bactéria EPEC O127:H6, EPEC O111:H- e EHEC O157:H7 com diferentes quantidades de amostras de soro, colostro e IgA.

Amostras (μL /ensaio)	EPEC O127:H6	EPEC O111:H-	EHEC O157:H7
"Pool" de 100 amostras de soro			
200 μL	97	58	98
100 μL	94	24	96
50 μL	90	---	95
25 μL	78	---	87
"Pool" de 20 amostra de colostro			
50 μL	100	94	100
25 μL	100	86	100
10 μL	90	17	98
IgA purificada			
50 μL	100	98	100
25 μL	100	84	100
10 μL	98	11	94

Neste ensaio pode-se observar também que foi necessária uma quantidade maior de soro que de colostro e IgA para atingir uma mesma porcentagem de inibição de adesão para as três bactérias, notando-se que a inibição para a EPEC O127:H6 e EHEC O157:H7 foi maior que para EPEC O111:H-.

As tabelas 18 e 19 apresentam os resultados do ensaio de inibição da adesão com diferentes quantidades de "pools" de três amostras de soro e colostro. Estes são os mesmos "pools" formados pelas três amostras com altas e baixas concentrações de soro e colostro anti-intimina $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ e conservada de acordo com a tabela 15 para soros e tabela 16 para colostros.

Cada um destes "pools" foi colocado em ensaios de adesão com a bactéria homóloga em relação ao tipo de intimina, ou seja, a EPEC O127:H6 com os "pools" anti- $v\alpha$ e conservada, EPEC O111:H- com os "pools" anti- $v\beta$ e a O157:H7 com os "pools" anti- $v\gamma$, como descrito nas tabelas 18 para soros e 19 para colostros.

Tabela 18. Porcentagens de inibição da adesão (%) com “pools” de três amostras de soro com concentrações altas e baixas de anticorpos anti- $v\alpha$ e conservada com a EPEC O127:H6, anti- $v\beta$ com a EPEC O111:H- e anti- $v\gamma$ com a EHEC O157:H7.

SORO	Bactéria utilizada no ensaio de adesão			
	EPEC O127:H6	EPEC O111:H-	EHEC O157:H7	EPEC O127:H6
	“Pools” de soros com alta concentração de anticorpos			
Volume do “pool”	anti- $v\alpha$	anti- $v\beta$	anti- $v\gamma$	anti-cons
200 μ L	100	78	99	100
100 μ L	100	58	96	98
50 μ L	96	---	89	97
25 μ L	88	---	78	66
“Pools” de soros com baixa concentração de anticorpos				
Volume do “pool”	anti- $v\alpha$	anti- $v\beta$	anti- $v\gamma$	anti-cons
200 μ L	100	70	98	99
100 μ L	90	18	95	66
50 μ L	89	---	87	39
25 μ L	88	---	80	0

Tabela 19. Porcentagens de inibição da adesão (%) com “pools” de três amostras de colostro com concentrações altas e baixas de anticorpos anti- $v\alpha$ e conservada com a EPEC O127:H6, anti- $v\beta$ com a EPEC O111:H- e anti- $v\gamma$ com a EHEC O157:H7.

COLOSTRO	Bactéria utilizada no ensaio de adesão			
	EPEC O127:H6	EPEC O111:H-	EHEC O157:H7	EPEC O127:H6
	“Pools” de colostros com alta concentração de anticorpos			
Volume do “pool”	anti- $v\alpha$	anti- $v\beta$	anti- $v\gamma$	anti-cons
50 μ L	100	99	100	100
25 μ L	100	94	100	100
10 μ L	99	3	100	86
“Pools” de colostros com baixa concentração de anticorpos				
Volume do “pool”	anti- $v\alpha$	anti- $v\beta$	anti- $v\gamma$	anti-cons
50 μ L	100	98	100	99
25 μ L	99	91	100	89
10 μ L	33	89	100	0

Os resultados obtidos neste ensaio mostraram que não houve muita diferença na capacidade inibitória entre os “pools” com concentração alta ou baixa de anticorpos, tanto de soro como de colostro.

As amostras de IgA purificada absorvidas com as bactérias recombinantes expressando intimina $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ ou conservada também foram analisadas pelo ensaio de inibição de adesão com três bactérias. Os resultados estão descritos na

tabela 20. Só foi observada diminuição da capacidade inibitória da adesão da EPEC O111.

Tabela 20. Porcentagens de inibição da adesão (%) das bactérias EPEC O127:H6, EPEC O111:H- e EHEC O157:H7 com 25 μ L/ensaio de IgA purificada absorvida com as bactérias recombinantes da intimina $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ ou conservada.

Amostras (25 μ L/ensaio)	EPEC O127:H6	EPEC O111:H-	EHEC O157:H7
A0. IgA não absorvida	100	84	100
IgA absorvida com intimina:			
A1. $v\beta$, $v\gamma$ e cons	99	24	---
A2. $v\alpha$, $v\gamma$ e cons	---	64	100
A3. $v\alpha$, $v\beta$ e cons	99	16	100
A4. $v\alpha$, $v\beta$ e $v\gamma$	100	49	100
B1. $v\alpha$	99	34	96
B2. $v\beta$	98	34	96
B3. $v\gamma$	100	70	98
B4. cons	100	17	99

Este último ensaio mostrou mais uma vez a possível reação cruzada na resposta imune contra as intiminas. Os resultados não são evidentes para a EPEC O127:H6 e para a EHEC O157:H7 (variação de 98 a 100%), mas sim para EPEC O111:H- onde ocorreu uma queda na porcentagem de inibição da IgA purificada depois de ser absorvida com as bactérias recombinadas (tabela 20). Visto que a IgA purificada foi absorvida com a intimina $v\alpha$, $v\gamma$ e conservada, restaram somente os anticorpos anti-intimina $v\beta$. Esses anticorpos seriam responsáveis pela inibição da adesão em uma porcentagem maior (64%) que as outras absorções, reagindo especificamente com a EPEC O111:H-.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A resposta imunológica do organismo humano frente a uma infecção causada por EPEC e EHEC tem sido estudada na nossa população e no mundo inteiro. Na Grande São Paulo, por ser uma área endêmica de EPEC, já foi determinada a presença de anticorpos anti-EPEC séricos e secretores em adultos e crianças (CÂMARA et al., 1994; CARBONARE et al., 2003; LOUREIRO et al., 1998; MARTINEZ et al., 1999). Por outro lado, também existe a produção de anticorpos secretores contra EHEC nesta mesma população, mesmo esta bactéria não sendo tão freqüente como EPEC no nosso meio (PALMEIRA, et al., 2005).

No trabalho de mestrado confirmamos a presença de anticorpos séricos anti-EPEC O111:H-, anti-EHEC O157:H7 e O111:H- na nossa população. Os anticorpos detectados foram reativos com vários antígenos bacterianos como LPS e outros componentes expostos na superfície das bactérias íntegras detectadas por ELISA, além de outras frações antigênicas e fatores de virulência detectados pelo IB. Neste último ensaio foi observado o reconhecimento de uma banda intensa em torno de 94 kDa que poderia ser correspondente à intimina (ZAPATA-QUINTANILLA et al., 2006).

A intimina é um fator de virulência presente tanto em EPEC como em EHEC (ADU-BOBIE et al., 1998a; OSWALD et al., 2000) e tem um papel muito importante na adesão da bactéria à célula (LEVINE, 1987) além de ser considerada por vários autores como altamente imunogênica (ADU-BOBIE et al., 1998 a; JENKINS et al., 2000; LOUREIRO et al., 1998). Sendo assim, decidimos pesquisar a presença de anticorpos específicos contra a região conservada e as regiões variáveis dos subtipos de intimina α , β e γ em amostras de indivíduos saudáveis da nossa população.

A escolha destes três subtipos de intimina foi motivada pelo fato de que as intiminas α e β são características das EPEC tanto típicas como atípicas e a intimina γ de algumas cepas de EPEC atípicas (TRABULSI et al., 2002). A intimina γ também esta presente no sorotipo de EHEC O157:H7 (DONNENBERG et al., 1993; HICKS et al., 1998; PHILLIPS et al., 2000) altamente patogênico, que provoca complicações como HC e HUS (KARMALI, 1989; RILEY et al., 1983) e que tem sido responsável por surtos no primeiro mundo (ESPIE et al., 2008; OZEKY et al., 2003; SARTZ et al., 2007; SHIMOOKY et al., 2006).

No presente trabalho, a super-expressão e purificação das intiminas foi eficiente, obtendo-se quantidades de proteínas suficientes para serem utilizadas como antígenos no ELISA e no IB. O produto da purificação da intimina α analisado por SDS-PAGE (figura 8A) mostra a presença de uma banda larga que é o resultado da junção de duas bandas, uma de 16,5 kDa correspondente a região variável da intimina e uma outra que se encontra na região de 20,0 kDa. Estas duas bandas já foram observadas anteriormente no trabalho de Lima (2004), que verificou que ambas correspondiam a intimina recombinante α -6xHis. Através de um IB, foi observado que as duas bandas foram reconhecidas pelo anticorpo anti-His (Quiagen, EUA), indicando que a banda de aproximadamente 20,0 kDa não era uma contaminação. O fato dessa segunda banda possuir peso molecular um pouco maior praticamente descarta a possibilidade de que esta proteína seja produto de desnaturação da proteína de 16,5 kDa (LIMA, 2004).

Por meio do ELISA foram determinadas as concentrações de anticorpos séricos IgG e secretores IgA contra as intiminas em estudo. Nos ensaios preliminares com o “pool” de soro controle, realizamos determinações de IgM anti-intiminas, mas as concentrações obtidas foram muito baixas (dados não mostrados). Este resultado pode ser explicado por estarmos trabalhando com uma população de indivíduos saudáveis, ao passo que níveis mais altos de IgM seriam esperados em uma infecção aguda ou recente causada por uma bactéria que expressasse intimina. Além disso, a intimina é um antígeno protéico e timo-dependente, e a resposta predominante esperada é de imunoglobulina IgG, ao contrário do que observamos anteriormente com relação ao LPS que é um antígeno timo-independente, induzindo predominantemente anticorpos IgM (ZAPATA-QUINTANILLA et al., 2006).

Nossa primeira observação é a de que anticorpos reativos com as regiões variáveis e conservada da intimina α , β e γ se encontram presentes nas 100 amostras de soro de adultos saudáveis e nos 54 colostros de puérperas sadias, ambos os grupos de amostras colhidos da população da Grande São Paulo.

Nos soros, a concentração de anticorpos IgG contra a região conservada se encontra elevada em comparação com a concentração de anticorpos contra as regiões variáveis das intiminas. Este resultado pode ser explicado porque esta região é comum a todos os subtipos de intimina, de modo que os anticorpos reativos com a porção conservada estariam presentes em indivíduos que entraram em

contato com qualquer subtipo de intimina das bactérias presentes no nosso meio. As intiminas α , β , γ e δ foram as mais encontradas em estudo realizado com amostras de São Paulo, Rio de Janeiro e Ribeirão Preto, ao lado de grande número de amostras não tipáveis (GOMES et al., 2004). As intiminas α e β são comuns em EPEC típicas e atípicas, a intimina γ está presente em EPEC atípicas, como nos sorotipos O55:H[7] e O111ac:H[8] que foram isolados em São Paulo (TRABULSI et al., 2002) e na EHEC O157:H7 que é rara, mas que já também foi detectada na nossa população (BASTOS et al., 2006; GUTH et al., 2002). A intimina ϵ (epsilon) já foi identificada nos sorotipos de EHEC O111:H38 e no ONT:H19 presentes em amostras de crianças brasileiras sem diarreia (NUNES et al., 2003).

Bactérias do gênero *Yersinia*, como *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*, possuem uma invasina que tem homologia com a região N-terminal da intimina, mas divergente nos últimos 280 aa da região C-terminal (FRANKEL et al., 1994). Um contato prévio com algumas destas espécies bacterianas, mesmo sendo pouco frequentes no nosso meio, poderia levar a formação de anticorpos reativos também com a região conservada da intimina.

Parte da região conservada da intimina que é objeto do nosso estudo já foi utilizada por outras equipes na detecção de anticorpos para fins de diagnóstico. Um estudo realizado em Londres por Jenkins e cols. (2000) utilizou uma proteína da região 387-666 da intimina α (Int280₃₈₇₋₆₆₆) de EPEC O127:H6, em ensaios de IB. Foi observado que dez de quatorze amostras de soro de pacientes com cultura positiva para EHEC O157 nas fezes foram reativos mostrando uma banda correspondente a 38 kDa. No ELISA, 36 de 60 pacientes com cultura negativa para EHEC O157 e com anticorpos anti-LPS O157, foram reativos com a Int280₃₈₇₋₆₆₆. Neste trabalho foi mostrado que esta região da intimina é imunogênica e que a detecção de anticorpos contra ela e contra outros fatores de virulência como LPS, EspA e a região de ligação a intimina do Tir poderiam ajudar no diagnóstico de uma infecção por *E. coli* que produz a lesão A/E, mas com resultado negativo na cultura de fezes (JENKINS et al., 2000).

A região conservada da intimina também foi utilizada na detecção de algumas cepas de EPEC e EHEC. Koga e cols. (2003) obtiveram um soro policlonal imunizando coelhos com a molécula da intimina Int₃₈₈₋₆₆₇. Esse anti-soro foi utilizado em ensaios como imunofluorescência e "immunodot", para reconhecer diversos

subtipos de intimina característicos dos sorotipos de *E. coli* O127:H6 (α), O128:H2 (β), O157:H7 (γ), O86:H34 (δ) e O103:H2 (ϵ), sugerindo assim uma maneira de detectar estes patógenos.

Hajra e cols. (2007) desenvolveram um ensaio de aglutinação com látex para detecção direta de EHEC O157:H7. Os autores sensibilizaram partículas de látex com um anti-soro policlonal produzido em coelho imunizado com bactérias inteiras e que, após absorção, reconhecia a molécula de intimina γ . Este teste mostrou vários benefícios como alta especificidade (aproximadamente de 98%), custo relativamente baixo e facilidade de execução, sendo, portanto adequado para levantamentos epidemiológicos.

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram a presença de anticorpos reativos com as porções variáveis das três intiminas em todas as amostras testadas. Nos soros, os níveis de IgG anti- $\nu\alpha$ foram ligeiramente mais altos que anti- $\nu\beta$ e anti- $\nu\gamma$, estes últimos equivalentes entre si. No entanto, nos colostros, não houve diferença significativa entre os vários grupos. Esta aparente discrepância pode ser explicada pela natureza diferente entre os anticorpos séricos IgG, que normalmente apresentam especificidade mais alta na ligação com o antígeno, em relação à moléculas de SIgA.

A detecção de anticorpos contra as regiões variáveis da intimina também já foi feita em outros trabalhos. Li e cols. (2000) trabalharam com amostras de soros de cinco pacientes com diarreia aguda causada pela EHEC O157:H7 colhidas aos 8 e 60 dias após a infecção. Todas as amostras apresentaram uma resposta contra os 280 aa da região C-terminal da intimina, mesmo sendo esta resposta mais baixa que para a Tir.

Adu-bobie e cols. (1998b) pesquisaram a reatividade de anticorpos IgA presentes em amostras de colostro, com porções da região C-terminal das intiminas α e β . Foi observado que as amostras de colostro continham IgA contra as duas intiminas, porém com uma reatividade individual variável, o que poderia ser explicado por diferenças no seu histórico de exposição a diferentes sorotipos de EPEC e EHEC. Neste mesmo trabalho, determinaram exatamente quais eram os epítomos imunodominantes destas duas intiminas e mostraram a existência de seqüências de aminoácidos conservadas. Estes resultados mostram que apesar da alta variabilidade na região C-terminal das diferentes intiminas, existem epítomos

semelhantes que poderiam favorecer uma reação cruzada entre anticorpos reativos com diferentes subtipos de intimina.

Nossos resultados mostraram uma alta correlação entre os anticorpos anti- $\nu\alpha$ e $\nu\beta$ (característicos de EPEC) presentes no soro e no colostro. Apesar da baixa incidência de infecções causadas por EHEC no nosso meio, anticorpos anti- $\nu\gamma$ também estão presentes, tendo uma correlação positiva com os outros grupos. Dados epidemiológicos recentes têm mostrado um aumento na presença de EPEC atípicas (ARAUJO et al., 2007, BUERIS et al., 2007), muitas delas portadoras de intimina γ (JENKINS et al., 2006; TRABULSI et al., 2002). Este fato pode explicar a presença de anticorpos anti-intimina γ em nossas amostras.

Para explicar a variação nas diferentes intiminas, MacGraw e cols. (1999) levantaram a hipótese de que, ao longo do tempo, os genes componentes do LEE das *E. coli* que produzem a lesão A/E sofreram macro e micro recombinações e como consequência aconteceu uma mudança na estrutura da intimina; a divergência desta estrutura esta restrita ao domínio extracelular, ou seja, a região variável da intimina, e tem sido acelerada por recombinação e seleção diversificante (TARR & WHITTAM, 2002). Este fenômeno explicaria o surgimento de novos subtipos de intiminas com homologias elevadas (ZHANG et al., 2002).

Os altos valores de coeficientes de correlação podem ser explicados pela presença de epítomos comuns entre as várias moléculas de intimina, que seriam reconhecidas pelos mesmos anticorpos. De acordo com a literatura, existem variados graus de homologia dentre diferentes subtipos de intimina (ZHANG et al., 2002), ocorrendo regiões homólogas mesmo nas porções variáveis das moléculas.

Em nosso trabalho avaliamos a homologia existente entre as regiões variáveis das intiminas α , β e γ através da comparação das seqüências de nucleotídeos de cada uma delas. O pareamento de nucleotídeos revelou porcentagens de identidade altas e semelhantes, de 61,2% a 66,8%, em todos os casos (tabela 5). Este resultado é indicativo da existência de epítomos comuns entre as regiões variáveis dos três subtipos de intiminas, justificando assim a existência de anticorpos que reconhecem estes epítomos comuns. Este fato está de acordo com os elevados coeficientes de correlação observados na comparação da resposta de anticorpos contra as porções variáveis das intiminas encontradas neste nosso estudo, e sugere assim a possível origem da reação cruzada entre os anticorpos reativos com as

diferentes intiminas. Como os anticorpos adquiridos naturalmente são policlonais, é esperado que haja a ocorrência de anticorpos reativos com epítomos comuns a vários domínios da molécula de intimina, tanto nas regiões conservadas como nas variáveis.

No presente trabalho indicamos valores de “cut-off”, apenas como uma forma de analisar os dados da nossa amostragem. Foi realizado o cálculo de média mais 3DP e não da média menos 3DP, o que resultaria em valores negativos em todos os nossos grupos de dados pelo fato dos valores de DP serem muito altos.

Considerando um valor de “cut-off” igual à média + 3DP, nos diferentes grupos de dados teremos de 1 a 4 de indivíduos que estariam acima do “cut-off”. Como não temos conhecimento do histórico destes indivíduos, questionamos se eles não teriam tido alguma infecção anterior que provocasse o desenvolvimento de altos níveis de anticorpos. Se isso fosse confirmado, talvez alguns destes indivíduos não pudessem ser considerados como componentes do grupo de adultos saudáveis.

Em vista disso, na tabela 11 mostramos um recálculo da média e desvio padrão eliminando aqueles indivíduos com níveis de anticorpos acima do “cut off” calculado na tabela 10. Assim, os valores diminuíram, mas continuaram equivalentes entre cada grupo de dados. Cabe notar que este recálculo causou maior diferença para os colostros do que para os soros. Esta diferença pode ser explicada porque nos colostros havia uma maior dispersão nos valores, com valores de desvio padrão e variância mais altos que no caso dos soros.

Os resultados obtidos no presente trabalho ainda são insuficientes para se estabelecer um “cut-off” definitivo dos níveis de anticorpos IgG nos soros e IgA nos colostros para as intiminas estudadas. Para tanto, seria necessário aumentar o número de amostras estudadas e também comparar os resultados de indivíduos saudáveis com amostras de pacientes que tiveram contato direto comprovado com as bactérias estudadas. Desta forma poderíamos estabelecer uma faixa de valores que poderiam ser considerados normais, e um limite a partir do qual as concentrações seriam indicativas de infecção.

Os resultados obtidos nos ensaios de IB também são sugestivos da existência de reação cruzada entre as intiminas e estão de acordo com os altos coeficientes de correlação observados nos níveis de anticorpos tanto de soro como de colostro. Algumas das amostras utilizadas na formação dos “pools” de três amostras utilizados nos ensaios de absorção apresentaram altas concentrações de anticorpos

para várias intiminas (tabela 12), o que tornou difícil conseguir amostras que fossem reativas com apenas um tipo de intimina.

Tomando por base os valores dos coeficientes de correlação, realizamos absorções do “pool” de 100 amostras de soro com as bactérias recombinantes que expressam os diferentes tipos de intiminas. O objetivo destas absorções foi o de isolar os anticorpos reativos com apenas um tipo de intimina, eliminar os anticorpos que reagem cruzadamente e avaliar sua capacidade em inibir a adesão de EPEC a células em cultura.

No entanto, no caso do “pool” de soro, todas as absorções foram muito eficientes em retirar os anticorpos reativos com todas as intiminas e não foi possível isolar anticorpos exclusivos para cada tipo (figura 15 e tabela 13). Em vista disso, decidimos realizar as absorções em preparações de IgA purificada devido à disponibilidade de maiores quantidades deste anticorpo e sua alta eficiência na capacidade inibitória da adesão bacteriana em células HEp-2.

Os resultados obtidos destas absorções confirmaram a existência de reação cruzada entre as intiminas. No caso da absorção com três intiminas, ocorreu diminuição acentuada da concentração de anticorpos reativos com as intiminas homólogas às usadas na absorção, mas também ocorreu diminuição da concentração dos anticorpos reativos com a intimina que não foi usada na absorção. Este padrão de resultado se repetiu em todas as absorções de IgA (figura 17A e tabela 14).

A absorção de IgA com apenas com uma bactéria recombinante diminuiu significativamente a concentração de anticorpos reativos com a intimina homóloga. No entanto, as concentrações de anticorpos também diminuíram para as outras intiminas. O mesmo aconteceu com as outras absorções individuais, confirmando a existência de anticorpos que reagem cruzadamente com várias intiminas (figura 17B).

Os ensaios de IB realizados com os materiais resultantes das absorções corroboram mais uma vez a existência de reação cruzada na resposta contra as porções variáveis das três intiminas, pois as absorções seqüenciais foram mais eficientes em retirar os anticorpos que as absorções com apenas uma delas. O contrário é observado com a porção conservada, o que era esperado, pois as seguidas absorções com as intiminas variáveis não foram tão eficientes em reduzir a

reatividade com a região conservada como foi a absorção com a própria região conservada, devido à diferença entre estas moléculas.

A intimina é uma proteína fundamental na adesão da bactéria à célula (HERNANDES et al., 2008) e vários trabalhos indicam a importância de anticorpos anti-intimina na inibição da adesão (CAMARA et al., 1994; CARVALHO et al., 2005; COOK et al., 2007; PALMEIRA et al., 2006). Com o objetivo de verificar se haveria especificidade na inibição da adesão, o passo seguinte foi avaliar a capacidade inibitória de “pools” de soro, colostro e das preparações de IgA absorvidas, em ensaios de adesão das três bactérias em células HEp-2 em cultura.

Os ensaios de inibição de adesão realizados com as bactérias EPEC O127:H6, EPEC O111:H- e EHEC O157:H7 e com os vários “pools” de soro e colostro com concentração alta ou baixa de anticorpos reativos com as diferentes intiminas mostraram que não houve muita diferença na capacidade inibitória destes “pools”.

De maneira geral, as porcentagens de inibição com os “pools” de colostro são mais altas que com os “pools” de soro, mesmo utilizando menor volume de colostro (25 μ L) em relação ao soro (200 μ L). Observa-se também que independente de qual “pool” seja utilizado, não existe variação nas porcentagens de inibição, o que significa que aparentemente não houve relação entre as concentrações de anticorpos anti-intiminas e a capacidade inibitória da adesão.

Este resultado não é surpreendente em primeiro lugar porque os anticorpos secretores da classe IgA presentes no colostro são muito eficientes em inibir a aderência de microrganismos às células do hospedeiro, sendo esta uma função fisiológica e primordial de SigA nas superfícies mucosas. As moléculas de IgA secretória apresentam cadeias laterais que podem se ligar a adesinas bacterianas, como as fímbrias tipo I, de forma inespecífica, independentemente da especificidade do sítio de ligação com o antígeno, inibindo a adesão bacteriana (WOLD et al., 1990). Além disso, o colostro apresenta outros fatores como oligossacarídeos e glicoconjugados que podem atuar na inibição da adesão (KUNZ et al., 1993).

Pelo fato da intimina β ser própria da EPEC O111:H-, seria de se esperar uma porcentagem de inibição da adesão desta bactéria mais alta para o “pool” formado com amostras com concentrações altas de anti-v β que para os outros “pools”. Entretanto nota-se que essas porcentagens de inibição são altas para todos os

“pools”, especialmente para aqueles com concentrações elevadas de anticorpos reativos com as porções variáveis de intimina. Isso pode ser atribuído, como foi mostrado também nos ensaios de IB, à presença de amostras com altos níveis de anticorpos para várias intiminas.

Ao comparar as porcentagens de inibição da adesão das bactérias, EPEC O127:H6, EPEC O111:H- e EHEC O157:H7, utilizando diferentes quantidades de soro, colostro e IgA, observamos que foi necessária uma quantidade maior de soro que de colostro ou IgA para atingir o mesmo nível de inibição de adesão para as três bactérias, confirmando que os anticorpos secretores IgA são muito eficientes na inibição da aderência de microrganismos às células do hospedeiro.

Além disso, as porcentagens de inibição de EPEC O127:H6 e EHEC O157:H7 foram mais altas que de EPEC O111:H, fato que foi observado anteriormente por Palmeira e cols. (2006) que mostrou que apesar de existir equivalência na inibição da adesão de EPEC O111:H- e EHEC O157:H7 por amostras de colostro, as porcentagens desta última são um pouco mais altas.

Uma observação relevante nestes ensaios é a diferença entre o “pool” de soro com concentração baixa anti- $v\alpha$ e anti-conservada com a EPEC O127:H6: a inibição pelo “pool” anti- $v\alpha$ é alta e com pouca variação, independente do volume utilizado, enquanto que o “pool” anti-conservada tem uma queda da inibição em função do volume. Este resultado está de acordo com as características das regiões variáveis e conservada da intimina. Os anticorpos anti- $v\alpha$ reagem especificamente com a região C-terminal variável da intimina que é a região aonde acontece a ligação da bactéria com a célula, (FRANKEL et al., 1994). Assim, a inibição da adesão por estes anticorpos será mais eficiente que a inibição pelos anticorpos reativos com a região conservada, onde apenas uma porção desta região (552 a 657 aa) está exposta externamente à membrana da bactéria, dificultando assim o acesso dos anticorpos (LUO et al., 2000) e além disso, essa seqüência não está envolvida diretamente na ligação com a célula. Este resultado também foi observado por Lima (2004), em ensaio com anticorpos policlonais obtidos a partir da inoculação de coelhos com a região conservada da intimina.

Os ensaios de inibição da adesão com as preparações de IgA purificada absorvidas com as intiminas mostraram uma vez mais a existência de reação cruzada na resposta imune contra as intiminas.

Em conjunto, os resultados de inibição da adesão indicam que mesmo apresentando concentrações variadas de anticorpos anti-intimina, a atividade biológica destes anticorpos é sempre a mesma, independente do subtipo de intimina. Amostras de soro ou colostro que contém anticorpos policlonais, como é o caso de nossos “pools”, podem ter atividade em diferentes graus sobre as várias bactérias estudadas.

A presença de anticorpos reativos com diferentes fatores de virulência característicos da EHEC O157:H7 como o LPS, que foi detectado previamente (ZAPATA-QUINTANILLA et al., 2006) e agora com a intimina γ no presente trabalho, mostra que na nossa população existe uma proteção contra esta bactéria. Talvez seja esse o motivo pelo qual existam tão poucos casos de infecções por EHEC com complicações como HUS e HC em nosso meio. A detecção destes anticorpos no colostro humano também mostra que existe uma proteção de mãe para filho, que está sendo confirmada também pela presença destes anticorpos no sangue de cordão umbilical de recém nascidos (NUNEZ et al., 2008).

Nos últimos anos tem sido verificada uma maior freqüência de isolamento de EPEC atípicas em casos de diarreia no nosso meio (FRANZOLIN et al., 2005; REGUA-MANGIA et al., 2004; RODRIGUES et al., 2004; TRABULSI et al., 2002). Sendo a intimina um fator de virulência também das EPEC atípicas, anticorpos anti-intimina podem ser protetores na prevenção de infecções por estas bactérias. Este fato é particularmente importante se tratando de anticorpos SIgA do colostro e leite humano para a proteção dos lactentes.

Anticorpos reativos com fatores de virulência de *E.coli* diarreiogênicas têm sido detectados por nós e outros autores em mulheres brasileiras e outras partes do mundo e desempenham um importante papel na proteção de recém nascidos contra gastroenterites infantis (CÂMARA et al., 1994, CARBONARE et al., 1995, FERNANDES et al., 2001, LOUREIRO et al., 1998, NOGUERA-OBENZA et al., 2003, PALMEIRA et al., 2005). A alta concentração de anticorpos anti-intimina no colostro, comparada com os anticorpos no soro, pode estar relacionada com o efeito protetor do aleitamento contra a infecção por EPEC em crianças. Após uma previa infecção intestinal, os linfócitos migram do intestino à glândula mamária devido à integração do sistema imune comum de mucosas, com a conseqüente formação de anticorpos SIgA que são secretados no leite humano (CARBONARE et al., 2008).

Não podemos estar certos de qual seja a origem dos anticorpos reativos com intimina em indivíduos saudáveis. Muitos animais domésticos e rurais albergam linhagens de *E. coli* ou outras bactérias, como *Citrobacter*, que também produzem a lesão A/E e têm a intimina como um importante fator de virulência (AIDAR-UGRINOVICH et al., 2007, FRANKEL et al., 1994). Outras espécies de bactérias apresentam antígenos parcialmente homólogos à intimina. Provavelmente, o contato com estes antígenos pode induzir uma resposta imunológica e despertar a produção de anticorpos reativos com determinantes antigênicos comuns a várias bactérias, mesmo no caso de espécies que não são freqüentes no nosso meio.

A detecção de anticorpos SIgA no colostro pode ser utilizada como uma ferramenta em estudos epidemiológicos, devido à rápida formação destes anticorpos, e pela alta concentração comparada com a do soro. Além disso, anticorpos anti-intimina podem conferir proteção contra as bactérias causadoras de lesão A/E, sejam elas EPEC típicas, atípicas ou EHEC.

Com o presente trabalho verificamos que a concentração de anticorpos IgG anti-região conservada da intimina em amostras de soro de adultos saudáveis é elevada em comparação com os anticorpos anti-regiões variáveis. Assim que seja possível estabelecer valores precisos de "cut-off", este fato pode ser aplicado ao diagnóstico de infecções causadas por *E. coli eae*-positiva, especialmente em casos em que a identificação da bactéria nas fezes seja negativa, seja por métodos bioquímicos ou por biologia molecular. A detecção dos anticorpos anti-região conservada no soro, pode ser acompanhada da determinação dos anticorpos IgM anti-LPS, ajudando desta maneira na identificação específica do sorogrupo de *E. coli* pelo qual a infecção no indivíduo foi produzida.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- ✓ Adultos saudáveis da população da Grande São Paulo apresentam anticorpos séricos e secretores reativos com a região conservada e as regiões variáveis das intiminas α , β e γ .
- ✓ A pesquisa destes anticorpos só poderá ser aplicada para fins diagnósticos após o estabelecimento de valores confiáveis de “cut-off” que permitam diferenciar valores típicos de indivíduos saudáveis daqueles indicativos de infecção recente.
- ✓ Os testes de correlação e os resultados obtidos nos ensaios de absorção indicam que existe reatividade cruzada entre os anticorpos reativos com os vários tipos de intiminas, o que foi confirmado pelos resultados dos ensaios de inibição da adesão.
- ✓ Tanto os anticorpos reativos com a região conservada como os reativos com as regiões variáveis da intimina inibem a adesão das bactérias às células HEp-2. No entanto, a reatividade cruzada dificultou o isolamento de anticorpos mono-específicos.
- ✓ Em conjunto, os resultados indicam que a nossa população desenvolve uma imunidade natural, que pode ser resultante da exposição a linhagens de *E. coli* ou outras bactérias presentes no ambiente, que confere uma proteção contra EHEC, mesmo não sendo esta bactéria tão freqüente como EPEC no nosso meio.

BIBLIOGRAFIA

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADU-BOBIE, J.; FRANKEL, G.; BAIN, C.; GONCALVES, A.G.; TRABULSI, L.R.; DOUCE, G.; KNUTTON, S.; DOUGAN, G. Detection of intimins α , β , γ and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.662-668, 1998.
- ADU-BOBIE, J.; TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin α E and intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.66 p.5643–5649, 1998.
- AGIN, T.S.; WOLF, M.K. Identification of family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesion in rabbits, humans and swine. **Infection and Immunity**., v.65, p.320 - 326, 1997.
- AIDAR-UGRINOVICH, L.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; LEOMIL, L.; DAHBI, G.; MORA, A.; ONUMA, D.L.; SILVEIRA, W.D.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. **Int. J. Food. Microbiol.**, v.115, p.297-306, 2007.
- ALBERT, M.J. Epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in Bangladesh. **Rev. Microbiol. São Paulo.**, v.27, suppl.1, p.17–20, 1996.
- AN, H.; FAIRBROTHER, J.M.; DUBREUIL, J.D.; HAREL, J. Cloning and characterization of the *eae* gene from a dog attaching and effacing *Escherichia coli* strain 4221. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.148, p.239–245, 1997.
- ANDREOLI, S.R.; TACHTMAN, H.; ACHESON, D.W.; SIEGLER, R.L.; OBRIG, T.G. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology and therapy. **Pediatr. Nephrol.**, v.17, p.293 - 298, 2002.

- 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. **J. Clin. Microbiol.**, v.5, p.3396-3399, 2007.
- BACKERT, S. & SELBACH, M. Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within. **Trends. Microbiol.**, v.13, p.476-484, 2005.
- BATCHELOR, M.; PRASANNAN, S.; DANIELL, S.; REECE, S.; CONNERTON, I.; BLOOMBERG, G.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G.; MATTHEWS, S. Structural basis for recognition of the translocated intimin receptor (Tir) by intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. **EMBO J.**, v.19, p.2452-2464, 2000.
- BAUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; HEFFRON, F. The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.93, p.279-283, 1996.
- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Cattle in Spain and Identification of a New Intimin Variant Gene (eae-ξ). **J.Clin. Microbiol.**, v.42, p.645-651, 2004.
- BLANCO, M.; SCHUMACHER, S.; TASARA, T.; ZWEIFEL, C.; BLANCO J.E.; DHABI, G.; BLANCO, J.; STEPHAN, R. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-η2), **BMC Microbiol.**, v.5, p.23, 2005.
- BOWER, J.R.; CONGENI, B.L.; CLEARY, T.G.; STONE, R.T.; WANGER, A.; MURRAY, B.E.; MATTHEWSON, J.J.; PICKERING, L.K. *Escherichia coli* O114: non-motile as a pathogen in an outbreak of severe diarrhoea associated with a day care centre. **J. Infect. Dis.**, v.160, p.243-247, 1989.
- BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. Coli neopolitana* from summer diarrhoea of infants. **J. Pathol. Bacteriol.**, v.57, p.239-247, 1945.
- BRUNDER, W.; SCHIMDT, H.; KARCH, P. EspP a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. **Mol. Microbiology.**, v.24, p.767-772, 1997.

- BRUNDER, W.; SCHIMDT, H.; KARCH, P. KatP a novel catalase-peroxidase encoding by the large plamid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Microbiology**, v.142, p.3305 - 3315, 1996.
- BUERIS, V.; SIRCILI, M.P.; TADDEI, C.R.; DOS 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.102, p.839-844, 2007.
- BURLAND, V.; SHAO, Y.; PERNA, N.T.; PLUNKETT, G.; SOFIA, H.J.; BLATTNER, F.R. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. **Nucleic Acid Res.**, v.26, p.4196 - 4204, 1998.
- CÂMARA, L.M.C.; CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.M.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to HeLa cells by human colostrums: detection of specific slgA related to EPEC outer membrane proteins. **Int. Arch. Allergy. Immunol.**, v.152, p.307-310, 1994.
- CAMPELLONE, K.G.; GIESE, A.; TIPPER, D.J.; LEONG, J.M. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. **Mol. Microbiol.**, v.43, p.1227-1241, 2002.
- CAMPELLONE, K.G.; ROBBINS, D.; LEONG, J.M. EspFU Is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. **Dev Cell.**, v.7, p.217-228, 2004.
- CAMPOS, L.C.; FRANZOLIN, M.R.; TRABULSI, L.R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the traditional enteropathogenic *E. coli* O serogroups--a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.99, p.545-552, 2004.
- CANTEY, J. R., AND R. K. BLAKE. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. **J. Infect. Dis.**, v.135, p.454- 462, 1977.
- CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGÈRE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.**, v.36, p.289-311, 2005.
- CARBONARE, C.B.; CARBONARE, S.B.; CARNEIRO-SAMPAIO M.M.S. Early acquisition of serum and saliva antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) virulence-associated proteins by infant living in na endemic area. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v.14, p.222 - 228, 2003.

- CARBONARE, S. B.; CARBONARE, C. B. Imunidade de Mucosas in: **Alergia e imunologia na criança e no adolescente**. Rio de Janeiro, Brasil. Ed. Atheneu, 2008. ISBN: 978-85-7379-1.
- CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.M.; PALMEIRA, P.; CARNEIRO-SAMPAIO M.M.S. Human colostrum IgA antibodies reacting to enteropathogenic *E.coli* (EPEC) antigens and their persistence in the faeces of breast-infant. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, v.15, p.53 – 58, 1997.
- CARBONARE, S.B.; SILVA, M.L.M.; TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Inhibition of HEp-2 cell invasion by Enteroinvasive *Escherichia coli* by human colostrum: detection of specific IgA related to invasion plasmid antigens. **Int. Arch. Allergy. Immunol.**, v.108, p.113 -118, 1995.
- CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; SILVA, M.L.M.; CARBONARE, S.B.; PALMEIRA, P.; DELNERI, M.T.; HONÓRIO, A.C.; TRABULSI, L.R. Breast-feeding protection against enteropathogenic *Escherichia coli*. **Rev. Microbiol.**, v.27 p.120-125, 1996.
- CARVALHO, H.M.; TEEL, L.D.; KOKAI-KUN, J.F.; O'BRIEN, A.D. Antibody against the carboxyl terminus of intimin alpha reduces enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to tissue culture cells and subsequent induction of actin polymerization. **Infect Immun.**, v.73, p.2541-2546, 2005.
- CERQUEIRA, A.M.; GUTH, B.E.C.; JOAQUIM, R.M.; ANDRADE, J.R. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet . Microbiol.**, v.70, p.111 - 121, 1999.
- CERQUEIRA, A.M.F.; TIBANA, A.; GUTH, B.E.C. High occurrence of Shiga-like toxin-producing strains among diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from raw beef products in Rio de Janeiro City, Brazil. **J. Food Protection.**, v.60, p.177 -180, 1997.
- CHART, H. & JENKINS, C. Serodiagnosis of infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **J. Appl. Microbiol.**, v.86, p.569-575, 1999.
- CHART, H. & ROWE, B. Improved detection of infection by *Escherichia coli* O157 in patients with haemolytic uremic syndrome by means of IgA antibodies to lipopolysaccharide. **J. Infec.**, v.24, p.257 - 261, 1992.
- CLARKE, S.C.; HAIGH, R.D.; FREESTONE, P.P.E.; WILLIAMS P.H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. **Clin. Microb. Rev.**, v.16, p.365-378, 2003.

- COOK, S.R.; MAITI, P.K.; DEVINNEY, R.; ALLEN-VERCOE, E.; BACH, S.J.; MCALLISTER, T.A. Avian- and mammalian-derived antibodies against adherence-associated proteins inhibit host cell colonization by *Escherichia coli* O157:H7. **J. Appl. Microbiol.** v.103, p.1206-1219, 2007.
- COOKSON, A.L.; HAYES, C.M.; ROE, J.M.; WALES, A.D.; PEARSON, G.R.; WOODWARD, M.J. Isolation from sheep of an attaching and effacing *E. coli* O115:H- with a novel combination of virulence factors. **J. Med. Microbiol.**, v.51 p.1041-1049, 2002.
- CORTÉS, C.; DE LA FUENTE, R.; BLANCO, J.; BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; DHABI, G.; MORA, A.; JUSTEL, P.; CONTRERAS, A.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES, J.C.; ORDEN, J.A. Serotypes, virulence genes and intimin types of verotoxin-producing *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli* isolated from healthy dairy goats in Spain, **Vet. Microbiol.**, v.110, p.67-76, 2005.
- CRAVIOTO, A.; MOLINA, J.; MANJARREZ, A.; ESLAVA, C. Enteropathogenic *Escherichia coli*: the Mexican experience. **Rev. Microbiol.**, v.27, p.17-20, 1996.
- CRAVIOTO, A.; REYES, R.E.; ORTEGA, R.; FERNÁNDEZ, G.; HERNÁNDEZ, R.; LÓPEZ, D. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. **Epidemiol. Rev.**, v.101, p.123-134, 1988.
- DALWAI, F. & CHART, H. Human antibody response to R-core epitopes on the lipopolysaccharide of *Escherichia coli* O157. **Let. Appl. Microb.**, v.37, p.429-432, 2003.
- DEAN, P.; MARESCA, M.; KENNY, B. EPEC's weapons of mass subversion. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.8, p.28-34, 2005.
- DEIBEL, C.; KRAMER, S.; CHAKRABORTY, T.; EBEL, F. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. **Mol. Microbiol.**, v.28, p.463- 474, 1998.
- DENNEHY, P. Acute Diarrheal Disease in Children: Epidemiology, Prevention, and Treatment. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v.19, p.585-602, 2005.

- DONNENBERG, M. S.; TZIPORI, S.; MCKEE, M. L.; O'BRIEN, A. D.; ALROY, J.; KAPER, J. B. The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. **J. Clin. Invest.**, v.92, p.1418–1424, 1993.
- DONNENBERG, M.S. & KAPER, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, v.60, p.3953–3961, 1992.
- DUHAMEL, G.E.; MOXLEY, R.A.; MADDOX, C.W.; ERICKSON, E.D. Enteric infection of goat with enterohemorrhagic *E. coli* (O103:H2). **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.4 p.197-200, 1992.
- EBEL, F.; PODZADEL, T.; ROHDE, M.; KRESSE, A.U.; KRÄMER, S.; DEIBEL, C.; GUZMÁN, C.A.; CHAKRABORTY, T. Initial binding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. **Mol. Microbiol.**, v.30, p.147–161, 1998.
- ELLIOT, S.J.; WAINWRIGHT, L.A.; McDANIELS, T.K.; JARVIS, K.G.; DENG, Y.K.; LAI, L.C.; McNAMARA, B.P.; DONNENBER, M.S.; KAPER, J.B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.**, v.28, p.1-4, 1998.
- ELLIOTT, S.J.; HUTCHESON, S.W.; DUBOIS, M.S.; MELLIES, J.L.; WAINWRIGHT, L.A.; BATCHELOR, M. Identification of cestT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol Microbiol.**, v. 33., p.1176–1189, 1999.
- ESPIÉ, E.; GRIMONT, F.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; BOUVET, P.; HAEGHEBAERT, S.; FILLIOL, I.; LOIRAT, C.; DECLUDT, B.; MINH, N.N.; VAILLANT, V.; DE VALK, H. Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996–2006. **Ped. Infect. Dis. J.**, v.27, p.595-601, 2008.
- FAGUNDES-NETO, U. & SCALETSKY, A.I.C. *Escherichia coli* infections and malnutrition. **Lancet Suppl.**, v.27, p.356, 2000.
- FERNANDES, R.M.; CARBONARE, S.B.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S.; TRABULSI, L.R. Inhibition of enteroaggregative *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by secretory IgA from human colostrum. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.20, p.272 – 278, 2001.

- FITZHENRY, R.J.; REECE, S.; TRABULSI, L.R.; HEUSCHKEL, R.; MURCH, S.; THOMSON, M.; FRANKEL, G.; PHILLIPS, A.D. Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup. **Infect. Immun.**, v.70, p.4362–4368, 2002.
- FOMSGAARD, A. Antibodies to lipopolysaccharides: some diagnostic and protective aspect. **APMIS Suppl.**, v.98, p.5 – 38, 1990.
- FRANKEL, G.; CANDY, D.C.A.; EVEREST, P.; DOUGAN, G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. **Infect. Immun.**, v.62, p.1835– 1842, 1994.
- FRANZOLIN, M.R.; 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p.359-363, 2005.
- GARMENDIA, J.; PHILLIPS, A.D.; CARLIER, M.F.; CHONG, Y.; SCHÜLLER, S.; MARCHES, O.; DAHAN, S.; OSWALD, E.; SHAW, R.K.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. TccP is an enterohaemorrhagic *E. coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. **Cell Microbiol.**, v.6, p.1167–1183, 2004.
- GARRIDO, P.; BLANCO, M.; MORENO-PAZ, M.; BRIONES, C.; DAHBI, G.; BLANCO, J.; BLANCO, J.; PARRO, V. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. **Clin. Chem.**, v.52, p.192-201, 2006.
- GIRARD, F.; BATHISSON, I.; FRANKEL, G.M.; HAREL, J.; FAIRBROTHER, J.M. Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence. **Infect. Immun.**, v.73, p.6005-6016, 2005.
- GIRON, J.A.; HO, A.S.Y.; SHOOLNIK, G.K. A inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, p.710-713, 1991.
- GOMES, T.A.; IRINO, K.; GIRÃO, D.M.; GIRÃO, V.B.; GUTH, B.E.; VAZ, T.M.; MOREIRA, F.C.; CHINARELLI, S.H.; VIEIRA, M.A. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains?. **Emerg. Infect. Dis.** v.10. p.1851-1855, 2004.

- GOMES, T.A.T.; GRIFFIN, P.M.; IVEY, C.; TRABULSI, L.R.; RAMOS S.R.T.S. EPEC infections in São Paulo. **Rev. Microbiol. São Paulo**, v.27, p.25 - 33, 1996.
- GOMES, T.A.T.; RASSI, V.; MACDONALD, K.L.; SILVA-RAMOS, S.R.T.; TRABULSI, L.R.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C.; CANDEIAS, J.A.N.; IVEY, C.; TOLEDO, M.R.F.; BLAKE, P.A. Enteropathogens associate with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v.164, p.331 -337, 1991.
- GOOSNEY, D.L.; DEVINNEY, R.; PFUETZNER, R.A.; FREY, E.A.; STRYNADKA, N.C.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. **Curr. Biol.**, v.10, p.735-738, 2000.
- GREATOREX, J.S. & THORNE, G.M. Humoral immune responses to shiga-like toxins and *Escherichia coli* O157 lipopolysaccharide in haemolytic-uremic syndrome patients and healthy subjects. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1172 - 1178, 1994.
- GRIFFIN, P. M. & TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol. Rev.**, v.13, p.60-98, 1991.
- GRISI, S. & ESCOBAR, A.M. Diarréia Aguda In: Prática Pediátrica, Grisi, S. e Escobar, A M.;511-515, São Paulo, Atheneu, Brasil, 2000. Disponível:http://idsaude.uol.com.br/psf/medicina/tema2/texto30_definicao.asp. Acesso em: 14 julho 2004.
- GRUENHEID, S.; DEVINNEY, R.; BLADT, F.; GOOSNEY, D.; GELKOP, S.; GISH, G.D.; PAWSON, T.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. **Nat. Cell. Biol.**, v.3, p.856-859, 2001.
- GUNNING, R.F.; WALES, A.D.; PEARSON, G.R.; DONE, E.; COOKSON, A.L.; WOODWARD, M.J. Attaching and effacing lesion in the intestinal of two calves associated with natural infection with *E. coli* O26:H11. **Vet. Rec.**, v.148 p.780-782, 2001.
- GUTH, B.E.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; CERQUEIRA, A.M.; CHILLEMI, G.; ANDRADE, J.R.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M. Serotypes and Shiga toxin-producing genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. **Vet. Microbiol.**, v.92, p.335-349, 2003.

- GUTH, B.E.C.; DE SOUZA, R.L.; VAZ, T.M.; IRINO, K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.535 - 536, 2002.
- GUTH, B.E.C.; GIRALDI, R.; GOMES, T.A.T.; MARQUES, L.R.M. Survey of cytotoxin production among *Escherichia coli* strains characterized as enteropathogenic (EPEC) by serotyping and presence of EPEC adherence factor (EAF) sequences. **Can. J. Microbiol.**, v.40, p.342 - 344, 1994.
- GUTH, B.E.C.; VAZ, T.M.I.; GOMES, T.A.T.; CHINARELLI, S.H.; ROCHA, M.M.M.; PESTANA DE CASTRO, A.F.; IRINO, K. Re-emergence of O103:H2 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in São Paulo, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v.54, p.805-806, 2005.
- HAJRA, T.K.; BAG, P.K.; DAS, S.C.; MUKHERJEE, S.; KHAN, A.; RAMAMURTHY, T. Development of a simple latex agglutination assay for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) by using polyclonal antibody against STEC. **Clin. Vaccine Immunol.** v.14, p.600-604, 2007.
- HARTLAND, E.L.; BATCHELOR, M.; DELAHAY, R.M.; HALE, C.; MATTHEWS, S.; DOUGAN, G.; KNUTTON, S.; CONNERTON, I.; FRANKEL, G. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. **Mol. Microbiol.**, v.32, p.151-181, 1999.
- HAYASHI, T.; MAKINO, K.; OHNISHI, M.; KUROKAWA, K.; ISHII, K.; YOKOYAMA, K.; HAN, C.G.; OHTSUBO, E.; NAKAYAMA, K.; MURATA, T.; TANAKA, M.; TOBE, T.; IIDA, T.; TAKAMI, H.; HONDA, T.; SASAKAWA, C.; OGASAWARA, N.; YASUNAGA, T.; KUHARA, S.; SHIBA, T.; HATTORI, M.; SHINAGAWA, H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. **DNA Res.**, v.8, p.11-22, 2001.
- HERNANDES, R.T.; SILVA, R.M.; CARNEIRO, S.M.; SALVADOR, F.A.; FERNANDES, M.C.; PADOVAN, A.C.; YAMAMOTO, D.; MORTARA, R.A.; ELIAS, W.P.; DA SILVA BRIONES, M.R.; GOMES, T.A. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. **Cell Microbiol.**, v.10, p. 415-425, 2008.
- HEUVELINK, A.E.; VAN HEERWAARDEN, C.; ZWARTKRUIS-NAHUIS, J.T.; VAN OOSTEROM, R.; EDINK, K.; VAN DUYNHOVEN, Y.T.; DE BOER, E. *E. coli* O157 infection associated with a petting zoo. **Epidemiol. Infect.**, v.129, p.295-302, 2002.

- HICKS, S.; FRANKEL, G.; KAPER, J. B.; DOUGAN, G.; PHILLIPS, A. D. **Infect. Immun.**, v.66, p.1570–1578, 1998.
- HICKS, S.; FRANKEL, G.; KAPER, J.B.; DOUGAN, G.; PHILLIPS, A.D. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. **Infect. Immun.**, v.66, p.1570–1578, 1998.
- HIGGINS, L.M.; FRANKEL, G.; CONNERTON, I.; GONCALVES, N.S.; DOUGAN, G.; McDONALD, T.T. Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. **Science**, v.285, p.588-591, 1999.
- HIGGINS, R.J.; PEARSON, WRAY, C. Attaching and effacing *E. coli* microscopic and ultrastructural observation of intestinal infections in pigs. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.412 p.59-62, 1997.
- IRINO, K.; KATO, M.A.; VAZ, T.M.; RAMOS, I.I.; SOUZA, M.A.; CRUZ, A.S.; GOMES, T.A.; VIEIRA, M.A.; GUTH, B.E. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. **Vet. Microbiol.**, v.105, p.29–36, 2005.
- IRINO, K.; VAZ, T.M.; KATO, M.A.; NAVES, Z.V.; LARA, R.R.; MARCO, M.E.; ROCHA, M.M.; MOREIRA, T.P.; GOMES, T.A.; GUTH, B.E. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.446 - 447, 2002.
- JANKE, B.H.; FRANCIS, D.H.; COLLINS, J.E.; LIBAL, M.C.; ZEMAN, D.H.; JOHNSON, D.D. Attaching and effacing *Escherichia coli* infection in calves pigs, lambs and dogs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.1, p.6-11, 1989.
- JARVIS, K.G.; GIRON, 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. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.92, p.7996-8000, 1995.
- JENKINS, C.; CHART, H.; SMITH, H.R.; HARTLAND, E.L.; BATCHELOR, M.; DELAHAY, R.M.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. Antibody response of patients infected with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* to protein antigens encoded on the *LEE* locus. **J. Med. Microbiol.**, v.49, p.97-101, 2000.

- JENKINS, C.; SMITH, H.R.; LAWSON, A.J.; WILLSHAW, G.A.; CHEASTY, T.; WHEELER, J.G.; TOMPKINS, D.S. Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial resistance patterns of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in England from 1993 to 1996. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.25, p.19-24, 2006.
- 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. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.87, p.7839-7843, 1990.
- KALMAN, D.; WEINER, O.D.; GOOSNEY, D.L.; SEDAT, J.W.; FINLAY, B.B.; ABO, A.; BISHOP, J.M. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. **Nat. Cell. Biol.**, v.1, p.389-391, 1999.
- KAPER, J. B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, v.27, p.130 - 133, 1996.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.2, p.123 - 140, 2004.
- KARMALI, M.A. Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.2, p.15 - 38, 1989.
- KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHIED, D.J.; FREY, E.A.; FINLAY, B.B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v.91, p.511-520, 1997.
- KLAPPROTH, J.M.; SCALETSKY, I.C.; McNAMARA, B.P.; LAI, L.C.; MALSTROM, C.; JAMES, S.P.; DONNEMBERG M.S. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. **Infect. Immun.**, v.68, p.2148-2155, 2000.
- 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*. **Infect. Immun.**, v.57, p.1290-1298, 1989.
- KOGA, P.C.; MENEZES, C.A.; LIMA, A.F.; NARA, J.M.; MAGALHÃES, C.A.; CIANCIARULLO, A.M.; FERREIRA-JÚNIOR, J.M.C.; TRABULSI, L.R.; MENDES-LEDESMA, M.R.B.; PIAZZA, R.M. Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and its use in EPEC and EHEC diagnosis. **Brazilian J. Microbiol.**, v.34, p.5-7, 2003.
- KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R.L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. **Bull World Health Organ.**, v.81, p.197-204, 2003.

- KUNZ, C.; RUDLOFF, S. Biological functions of oligosaccharides in human milk. **Acta Paediatr. Stockholm**, v.82, p.903-912, 1993.
- LEBLANC, J. J. Implication of virulence factors in *Escherichia coli* O157:H7 pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.29, p.277-296, 2003.
- LEOMIL, L.; AIDAR-UGRINOVICH, L.; GUTH, B.E.; IRINO, K.; VETTORATO, M.P.; ONUMA, D.L.; DE CASTRO, A.F. Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. **Vet. Microbiol.**, v.97, p.103 - 109, 2003.
- LEVINE, M.M. *E.coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, entero-invasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, v.155, p.377 - 389, 1987.
- LEVINE, M.M.; BERGQUIST, E.J.; NALIN, D.R.; WATERMAN, D.H.; HORNICK, R.B.; YOUNG, C.R.; SOTMAN, S. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. **Lancet**, v.27, p.1119-1122, 1978.
- LI, Y.; FREY, E.; MACKENZIE, A.M.; FINLAY, B.B. Human Response to *Escherichia coli* O157:H7 Infection: Antibodies to Secreted Virulence Factors. **Infect. Immun.**, v.68, p.5090-5095, 2000.
- LIMA, F.A. *Estudo da imunogenicidade de íntimina de Escherichia coli enteropatogênica*. São Paulo, 2004. 82p. [Tese de mestrado. Departamento de Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, Brasil].
- LOMMEL, S.; BENESCH, S.; ROTTNER, K.; FRANZ, T.; WEHLAND, J.; KÜHN, R.; Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. **EMBO Rep.**, v.2, p.850-857, 2001.
- LOUREIRO, I.; FRANKEL, G.; ADU-BOBIE, J.; DOUGAN, G.; TRABULSI, L.R.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Human colostrums contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins: Intimin, BfpA, EspA and EspB. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, v.27, p.166-171, 1998.
- LUO, Y.; FREY E.A.; PFUETZNER, R.A.; CREAGH, A.L.; KNOECHEL, D.G.; HAYNES, C.A.; FINLAY, B.B.; STRYNADKA, N.C. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. **Nature**, v.405, p.1073-1077, 2000.

- MARTINEZ, M.B.; TADDEI, C.R.; RUIZ-TAGLE, A.; TRABULSI, L.R.; GIRÓN, J.A. Antibody response of children with enteropathogenic *Escherichia coli* infection to the bundle-forming pilus and locus of enterocyte effacement-encoded virulence determinants. **J. Infect. Dis.**, v.179, p.269-274, 1999.
- McDANIELS, T.K. & KAPER J.B. **Mol. Microbiol.** v.23, p.399–407, 1997.
- McDANIELS, T.K.; JARVIS, K.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B.A. Genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v 92, p. 1664-1668, 1995.
- McGRAW, E.A.; LI, J.; SELANDER, R.K.; WHITTAM, T.S. Molecular evolution and mosaic structure of alpha, beta, and gamma intimins of pathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Biol. Evol.**, v.16, p.12–22, 1999.
- MOREIRA, C.N.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; RODRIGUEZ, D.P.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in Southern Brazil. **Vet. Microbiol.**, v.93, p.179-183, 2003.
- NAKAZATO, G.; GYLES, C.; ZIEBELL, K.; KELLER, R.; TRABULSI, L.R.; GOMES, T.A.T.; IRINO, K.; SILVEIRA, W.D.; PESTANA DE CASTRO, A.F. Attaching and effacing *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil: characteristics and serotypic relationship to human enteropathogenic *E. coli* (EPEC). **Vet. Microbiol.**, v.101, p.269 -277, 2004.
- NATARO, J.P. & KAPER, J.B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.11, p.142 - 201, 1998.
- NICHOLLS, L.; GRANT, T.H.; ROBINS-BROWNE, R.M. Identification of novel genetic locus that is required *in vitro* adhesion of a clinical isolated of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. **Mol. Microbiol.**, v.35, p.275-288, 2000.
- NOGUERA-OBENZA, M.; OCHOA, T.J.; GOMEZ, H.F.; GUERRERO, M.L.; HERRERA-INSUA, I.; MORROW, A. L.; RUIZ-PALACIOS, G.; PICKERING, L. K.; GUZMAN, C.A.; CLEARY, T.G. Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, p.545–551, 2003.

- NUNES, E.B.; SARIDAKIS, H.O.; IRINO, K.; PELAYO, J.S. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, v.52, p.499-504, 2003.
- NUÑEZ SP, CARBONARE CB, ZAPATA-QUINTANILLA LB, CARBONARE SB. Seric and secretory antibodies reactive with intimins α , β and γ in healthy Brazilian mothers and cord sera of their newborns. In: Memórias do Instituto Butantan X Annual Scientific Meeting, v. 65, p.2-47, 2008.
- ORDEN, J.A.; YUSTE, M.; CID, D.; PIACESI, T.; MARTINEZ, S.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; DE LA FUENTE, R. Typing of the *eae* and *espB* genes of attaching and effacing *Escherichia coli* isolates from ruminants, **Vet. Microbiol.**, v.96 p.203-215, 2003.
- OSWALD, E.; SHMIDT, H.; MORABITO, S.; KARCH, H.; MARCHES, O.; CAPRIOLI, A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *E.coli*: characterization of a new intimina variant. **Infect. Immun.**, v.68, p.64-71, 2000.
- OZEKI, Y.; KURAZONO, T.; SAITO, A.; KISHIMOTO, T.; YAMAGUCHI, M. A diffuse outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 related to the Japanese-style pickles in Saitama, Japan, **Kansenshogaku Zasshi**, v.77, p.493-498, 2003.
- PALMEIRA P.; CARBONARE, S.B.; AMARAL, J.A.; TINO-DE-FRANCO, M.; CARMEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Colostrum from healthy Brazilian women inhibits adhesion and contains IgA antibodies reactivity with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Eur. J. Pediatr.**, v.164, p.37-43, 2005.
- PALMEIRA, P.; YU ITO, L.; ARSLANIAN, C.; CARNEIRO-SAMPAIO, M.M. Passive immunity acquisition of maternal anti-enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 IgG antibodies by the newborn. **Eur. J. Pediatr.**, v.166, p.413-419, 2007.
- PANLOZZI, L.J., JOHNSON, K.E., KAMAHELE, L.M., CLAUSEN, C.R., RILEY, L.W. AND HELGERSON, S.D. Diarrhoea associated with adherent enteropathogenic *Escherichia coli* in an infant and toddler centre, Seattle, Washington. **Pediatrics**, v.77p.296-300, 1989.
- PATON, J.C. & PATON, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 11, p. 450- 479, 1998.

➤ BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

- PEARSON, G.R.; BAZAELEY, K.J.; JONES, J.R.; GUNNING, R.F.; GREEN, M.J. COOKSON, A.L.; WOODWARD, M.J. Attaching and effacing lesion in the large intestine of an 8-month-old heifer associated with *Escherichia coli* O26 infection in a group of animal with dysentery. **Vet. Rec.**, v.145 p.370-373, 1999.
- PERNA, N.T.; PLUNKETT, G.; BURLAND, V.; MAU, B.; GLASNER, J.D.; ROSE, D.J.; MAYHEW, G.F.; EVANS, P.S.; GREGOR, J.; KIRKPATRICK, H.A.; PÓSFAL, G.; HACKETT, J.; KLINK, S.; BOUTIN, A.; SHAO, Y.; MILLER, L.; GROTEBECK, E.J.; DAVIS, N.W.; LIM, A.; DIMALANTA, E.T.; POTAMOUCIS, K.D.; APODACA, J.; ANANTHARAMAN, T.S.; LIN, J.; YEN, G.; SCHWARTZ, D.C.; WELCH, R.A.; BLATTNER, F.R. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Nature**, v.409, p.529–533, 2001.
- PHILLIPS, A. D.; NAVABPOUR, S.; HICKS, S.; DOUGAN, G.; WALLIS, T.; FRANKEL, G. **Gut**, v. 47, p. 377–381, 2000.
- PHILLIPS, A.D.; NAVABPOUR, S.; HICKS, S.; DOUGAN, G.; WALLIS, T.; FRANKEL, G. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. **Gut**, v. 47, p. :377–381, 2000.
- RAMACHANDRAN, V.; BRETT, K.; HORNITZKY, M.A.; DOWTON, M.; BETTELHEIM, K.A.; WALKER, M.J.; DJORDJEVIC, S.P. Distribution of Intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.5022-5032, 2003.
- REGUA-MANGIA, A.H.; GOMES, T.A.T.; VIEIRA, M.A.M.; ANDRADE, J.R.C.; IRINO, K.; TEIXEIRA, L.M. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Infection.**, v.48, p.161-167, 2004.
- RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.G.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HERBERT, 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. **N. Engl. J. Med.**, v.308, p.681-685, 1983.
- ROBINS-BROWNE, R.M.; LEVINE, M.M.; ROWE, B.; GABRIEL, E.M. Failure to detect conventional enterotoxins in classical enteropathogenic (serotyped). *Escherichia coli* strains of proven pathogenicity. **Infect. Immun.**, v.38, p.798–801, 1982.

- RODRIGUES, J.; THOMAZINI, C.M.; MORELLI, A.; DE BATISTA, G.C. Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.398-400, 2004.
- 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. **Infect. Immun.**, v.3, p.966-973, 1996.
- SANGER, J.M.; CHANG, R.; ASHTON, F.; KAPER, J.B.; SANGER, J.W. Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. **Cell Motil Cytoskeleton.**, v.34, p.279-287, 1996.
- SARIDAKIS, H.O.; EL GARED, A.S.; VIDOTTO, M.C.; GUTH, B.E. Virulence properties of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic (EPEC) serogroups isolated from calves with diarrhea. **Vet. Microbiol.**, v.54, p.145-153, 1997.
- SARTZ, L.; DE JONG, B.; HJERTQVIST, M.; PLYM-FORSHELL, L.; ALSTERLUND, R.; LÖFDAHL, S.; OSTERMAN, B.; STÅHL, A.; ERIKSSON, E.; HANSSON, H.B.; KARPMAN, D. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. **Epidemiol. Infect.**, v.20, p.1-11, 2007.
- SCOTLAND, S.M.; SMITH, H.R.; CHEASTY, T.; SAID, B.; WILLSHAW, G.A.; STOKES, N.; ROWE, B. Use of gene probes and adhesion tests to characterise *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. **J. Med. Microbiol.**, v.44, p.438-443, 1996.
- SHIMOOKI, O.; TSUTSUMI, R.; TAKAHASHI, K.; SATO, S. Serum anti-LPS antibody production in an outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection among schoolchildren]. **Kansenshogaku Zasshi.**, v.80, p.84-90, 2006.
- SINCLAIR, J. F. & O'BRIEN, A. D. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.2876-2885, 2002.
- SINCLAIR, J.F.; DEAN-NYSTROM, E.A.; O'BRIEN, A.D. The established intimin receptor Tir and the putative eucaryotic intimin receptors nucleolin and beta1 integrin localize at or near the site of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence to enterocytes in vivo. **Infect. Immun.**, v.74, p.1255-1265, 2006.

- SMITH, H.R.; SCOTLAND, S.M.; CHEASTY, T.; WILLSHAW, G.; ROWE, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* in the United Kingdom. **Rev. Microbiol.**, v.27, p.45–49, 1996.
- SOUZA, R.I.; Nishimura, L.S.; Guth, B.E. Uncommon Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotype O165:HNM as cause of hemolytic uremic syndrome in São Paulo, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.59, p.223–225, 2007.
- SUEYOSHI, M.; NAKAZAWA, M.; TANAKA, S. A chick model for the study of "attaching and effacing *Escherichia coli*" infection. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.412, p.99–102, 1997.
- TARR, C.L. & WHITTAM, T.S. Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v.184, p.479 – 487, 2002.
- THORPE, C.M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Clin. Infect. Dis.**, v.38, p.1298 - 1303, 2004.
- TOBE, T.; HAYASHI, T.; HAN, C.G.; SCHOOLNIK, G.K.; OHTSUBO, E.; SASAKAWA, C. Complete DNA sequence and structural analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. **Infect. Immun.**, v.76, p.5455 - 5462, 1999.
- TORRES, A.G. & KAPER, J.B. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. **Infect. Immun.** v.71, p.4985–4995, 2003.
- TORRES, A.G.; GIRON, J.A.; PERNA, N.T.; BURLAND, V.; BLATTNER, F.R.; AVELINO-FLORES, F.; KAPER, J.B. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Infect. Immun.** v.70, p.5416–5427, 2002.
- TORRES, A.G.; KANACK, K.J.; TUTT, C.B.; POPOV, V.; KAPER, J.B. Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.** v.238, p.333–344, 2004.
- TRABULSI, T.R.; KELLER, R.; GOMES, T.A.T. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg. Infect. Dis.**, v.8, p.508 – 513, 2002.
- TRISTÃO, L.C.; GONZALEZ, A.G.; COUTINHO, C.A.; CERQUEIRA, A.M.; GOMES, M.J.; IRINO, K.; GUTH, B.E.; ANDRADE, J.R. Virulence markers and genetic relationships of Shiga toxin-producing

Escherichia coli strains from serogroup O111 isolated from cattle. **Vet. Microbiol.**, v.119, p.358-365, 2007.

TZIPORI, S.; GIBSON, R.; MONTANARO, J. Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. **Infect. Immun.**, v.57, p.1142 - 1150, 1989.

VALLANCE, B.A. & FINLAY, B.B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. **PNAS**, v.97, p.8799-8806, 2000.

VAN DIEMEN, P.A.; DZIVA, F.; STEVENS, M.P.; WALLIS, T.S. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26: H-genes required for intestinal colonization in calves. **Infect. Immun.** v. 73, p. 1735-1743, 2005.

VAZ, T. M. I.; IRINO, K.; KATO, M.A.M.F.; DIAS, A.M.G.; GOMES, T.A.T.; MEDEIROS, M.I.C.; ROCHA, M.M.M.; GUTH, B.E.C. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, from 1976 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.903-905, 2004.

VAZ, T.M.; IRINO, K.; NISHIMURA, L.S.; CERGOLLE-NOVELLA, M.C.; GUTH, B.E. Genetic heterogeneity of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated in São Paulo, Brazil, from 1976 through 2003, as revealed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.798-804, 2006.

VICTORA, C.G.; SMITH, P.G.; VAULGHAN, J.P.; NOBRE, L.C.; LOMBARDI, C.; TEIXEIRA, A.M.B.; FUCHS, S.M.C.; MOREIRA, L.B.; GIGANTE, L.P.; BARROS, F.C. Evidence for protection by breastfeeding against infants deaths from infectious disease in Brazil. **Lancet**, v.2, p.319 - 321, 1987.

VILTE, D.A.; LARZÁBAL, M.; CATALDI, A.A.; MERCADO, E.C. Bovine colostrum contains immunoglobulin G antibodies against intimin, espA, and espB and inhibits hemolytic activity mediated by the type three secretion system of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Clin. Vaccine Immunol.** v.15, p.1208-1213, 2008.

WHITTAM, T.S. & MCGRAW, E.A. Clonal analysis of EPEC serogroups. **Rev. Microbiol.**, v.27, p.7 - 16, 1996.

WOLD, A.E.; MESTECKY, J.; TOMANA, M.; KOBATA, A.; OHBAYASHI, H.; ENDO, T.; EDÉN, C.S. Secretory immunoglobulin A carries

oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type I fimbrial lectins. *Infect. Immun.* v.18, p.161-166, 1998.

WOODWARD, M.J.; BEST, A.; SPRINGINGS, K.A.; PEARSON, G.R.; SKUSE, A.M.; WALES, A.; HAYES, M.; ROE, J.M.; LOW, J.C.; LARAGIONE, R.M. Non-toxicogenic *E. coli* O157:H7 strain NCT12900 causes attaching-effacing lesion and *eae*-dependent persistent in weaned sheep. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.293, p.299 – 308, 2003.

YU, J. & KAPER, J.B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.*, v.6, p.411 – 417, 1992.

ZAPATA-QUINTANILLA, L.B.; PALMEIRA, P.; TINO-DE-FRANCO, M.; AMARAL, J.A.; CARBONARE, C.B.; CARBONARE, S.B. Systemic antibody response to diarrheagenic *Escherichia coli* and LPS O111, O157 and O55 in healthy Brazilian adults. *Scand. J. Immunol.*, v.64, p.661-667, 2006.

ZHANG, W.L.; KOHLER, B.; OSWALD, E.; BEUTIN, L.; KARCH, H.; MORABITO, S.; CAPRIOLI, A.; SUERBAUM, S.; SCHMIDT, H. Genetic Diversity of Intimin Genes of Attaching and Effacing *Escherichia coli* Strains. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, p.4486–4492, 2002.

ANEXOS

Seric and Secretory Antibodies Reactive with α , β and γ Intimins of *Escherichia coli* in Healthy Brazilian Adults

Lucy Beatriz Zapata-Quintanilla, Milene Tino-De-Franco, Silvia Patricia Nuñez, Cristiane Barros Carbonare, Amanda Bardella Vulcano, Solange Barros Carbonare.

Instituto Butantan, Sao Paulo, Brazil. (C. B. Carbonare, A. B. Vulcano, M. Tino-De-Franco, S. B. Carbonare)

Universidade de Sao Paulo, SP, Brazil. (L. B. Zapata-Quintanilla, S. P. Nuñez-Vaca)

Address for correspondence:

Solange B. Carbonare, Instituto Butantan, Laboratório de Imunogenética, Av. Dr. Vital Brasil, 1500, São Paulo, SP. 06603-900, Brazil. Phone: 55-11-3726-7222 ext. 2146; fax: 55-11-3726-7222 ext 2160; email: carbosal@usp.br

1 sentence summary: Healthy Brazilian adults have seric IgG and secretory IgA antibodies reactive with conserved and variable regions of α , β and γ intimins of *Escherichia coli*.

Running title : IgG and SIgA antibodies to α , β and γ intimins

Keywords: Enteropathogenic *Escherichia coli*. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Intimin. *E. coli*. SIgA. IgG. Colostrum.

This study was supported by FAPESP, grant 03/13250-3 awarded to S.B.C. and CNPq, grant 141302/2005-4 awarded to L.B.Z.Q.

Lucy B Zapata-Quintanilla is a doctoral student in the Pharmaceutical Sciences Faculty, São Paulo University. She has conducted her doctoral research at the Immunogenetics.

Abstract

The adhesin intimin is essential for attaching and effacing by pathogens such as EPEC and EHEC, and the antigenic polymorphism of the intimin molecule determines distinct subtypes. Our aim was to investigate the presence of IgG and IgA antibodies reactive with α , β and γ intimins in serum and colostrum from healthy Brazilian adults. We found seric IgG and secretory IgA antibodies reactive with conserved and variable regions of α , β and γ intimins and a positive correlation between the concentrations of these antibodies in both serum and colostrum that suggested a partial cross reactivity among anti-intimin antibodies, as was confirmed by immunoblotings and absorption. The concentrations of anti-conserved region antibodies were higher than those of variable region antibodies. The presence of antibodies reactive with EHEC antigens could result from direct contact with EPEC or with other bacteria found in the environment even though this bacterium is not frequent in Brazil, and suggests possible protection against EHEC.

Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) are important causes of acute gastroenteritis in humans (1). EPEC is a leading cause of infantile diarrhea in developing countries (2), while EHEC produces potent Shiga toxins (Stx) and causes a variety of human illnesses such as uncomplicated diarrhea, hemorrhagic colitis (HC), hemolytic uremic syndrome (HUS), and occasional acute renal failure (3; 4). Although the serotype O157:H7 is associated with sporadic cases of diarrhea in Brazil (5), other EHEC strains such as O26:H11, O111:H- and O111:H8 have been detected in the feces of patients with non-bloody diarrhea (6).

EHEC strains share with EPEC the ability to induce attaching and effacing lesions (A/E) on human enterocyte membranes. This property is conferred by the presence of the enterocyte effacement (LEE) locus, a chromosomal pathogenicity island that encodes various virulence factors such as the adhesin intimin, secreted Esps (*E. coli* secreted proteins), and Tir (translocated intimin receptor) proteins (1).

Analysis of intimin sequences from different EPEC and EHEC strains indicated that the first 700 amino acids were highly conserved (over 97% identity), while the C-terminal 280 amino acids (Int280) were variable. The active receptor-binding site of intimin resides within the Int280 domain (7). When expressed as an N-terminal fusion with carrier proteins, Int280

binds directly to epithelial cells (7) and interacts with both nucleolin (8) and integrin (9). Int280 also binds the LEE-encoded effector protein Tir that connects the extracellular bacterium to the host cell cytoskeleton (10;11).

Several different classes of intimin have been reported based on polymorphism within Int280 - the most common of which are α , β and γ (12). Intimin α is associated with the distinct evolutionary EPEC lineage known as EPEC-1; intimin β is the most ubiquitous type and is found among human and animal pathogens including EPEC-2, EHEC-2, and *Citrobacter rodentium*; while intimin γ is associated with EHEC O157:H7 and atypical EPEC strains (13).

The early acquisition of antibodies reactive with the EPEC virulence-associated factors such as intimin by healthy Brazilian children living in endemic areas has previously been demonstrated, and these infants exhibited seric and salivary anti-EPEC antibody repertoires by the end of their first year of life that is equivalent to those of normal adults of the same population (14). Anti-intimin antibodies in colostrum from Brazilian women inhibit bacterial adhesion to HEp-2 cells, showing that breastfeeding can be an important protection mechanism against EPEC (15) and EHEC infections (16) for newborns. Rabbits immunized with the α , β , δ , γ and ε intimin proteins obtained by cloning different regions of the gene *eae* developed high antibody levels to variable and conserved portions of intimin, and antibodies against the C-terminal region of the intimin molecule efficiently reduced EPEC adhesion to HEp-2 (17).

The present study determined the concentration of IgG antibodies in serum and IgA in colostrum that were reactive with conserved and variable regions of intimins α , β and γ in healthy adults living in São Paulo, Brazil. The evaluation of possible cross-reactions among these antibodies may lead to a better understanding of the origin of the immune response against EPEC and EHEC, and may suggest how to apply these results as diagnostic tools.

Materials and Methods

Human serum samples.

After obtaining informed consent from the patients and the approval of the institution's ethics committee, serum samples were collected from 200 healthy adult blood donors living in various neighborhoods in the city of São Paulo who demonstrated negative tests for HIV, HTLV I/II, Hepatitis B and C, Chagas disease, and syphilis. A serum pool was

prepared with equal volumes from 100 samples, and the total IgG concentration of this pool was determined by nephelometry. The remaining 100 samples were analyzed individually.

Human colostrum samples.

After obtaining informed consent from the patients and the approval of the institution's ethics committee, colostrum samples were collected from 74 healthy mothers (aged 20 to 35-years) living in São Paulo City. These women were not using any medication that might interfere with lactation, were negative for HIV, hepatitis B and syphilis, and did not present severe infectious diseases either during pregnancy or at the time of colostrum collection. Colostrum samples were donated between 48 and 72 h after the delivery of healthy full-term newborns of appropriate gestational age. Samples were defatted by centrifugation and the liquid phase was stored as aliquots at -20°C . A colostrum pool was prepared with equal volumes of 20 samples, and the total concentration of IgA was determined by capture ELISA using a commercial standard (SIGMA-0633). The remaining 54 samples were analyzed individually.

A preparation of purified IgA was obtained using samples of human colostrum and milk, as described previously (18).

Bacterial strains and recombinant intimins

E. coli M15 transformed bacteria with the recombinant plasmids pFLv α , pFLv β , pFLv γ , and pFLcons were used to produce recombinants. The transformed bacteria were provided by the Bacteriology Laboratory of the Butantan Institute, São Paulo, and were obtained by cloning the *eae* gene, as described by Lima (17). The v α , v β , v γ (variable portions of α , β and γ intimins) and cons (conserved portions of intimin) proteins were obtained as follows: 5 ml of an overnight culture of the bacterial strains grown in L broth (LB) were inoculated into 100 ml of LB supplemented with 50 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin and 25 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin. The cultures were incubated for 2 h at 37°C with shaking until attaining optical densities (OD) of 0.5 to 0.7 at 600 nm. The expression of His-Int1 α , His-Int1 β , His-Int1 γ , and His-Int4 α was induced by the addition of 1 mM of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). After an additional 4 h of incubation at 37°C , the cells were harvested by centrifugation, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 8 ml of binding buffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF, pH 8.0) and frozen overnight. The bacteria in the culture were lysed using a French Press. The lysate was centrifuged at 10,000 g for 30 min at 4°C , and the supernatant was mixed with agarose-Ni-NTA (Qiagen) (4:1) for 1 h at 4°C and subsequently loaded into a prewashed nickel column.

After loading with the cell extract, the column was eluted with 4 volumes of the washing buffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, pH 8.0). The bound protein was eluted four times with 500 µl of elution buffer (300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 250 mM Imidazol, pH 8.0). The fractions were analyzed by electrophoresis on a 15% polyacrylamide gel. The concentrations of the final proteins were determined by the bicinchoninic method (Pierce).

Anti-intimin antibodies determined by Enzyme-linked immunosorbent assay.

The ELISA technique for determining anti-intimin antibodies in serum and colostrum samples was based on Fomsgaard (19). The concentrations of IgG and IgA antibodies reactive with $\nu\alpha$, $\nu\beta$, $\nu\gamma$ and conserved intimin were first determined for the serum and colostrum pools in relation to the total IgG and IgA concentrations determined by capture ELISA, using the values obtained by nephelometry as standards for IgG and a commercial standard for IgA (SIGMA I-0633). The 100 sera and 54 colostrum samples were then analyzed individually for IgG and IgA antibody concentrations reactive with $\nu\alpha$, $\nu\beta$, $\nu\gamma$ and conserved intimin, taking the serum pool as the standard in every plate. The assays were carried out on microplates coated with 10 µg/ml of each purified intimin and with appropriated dilutions of the samples. Reactions were visualized with anti-human IgG or IgA peroxidase conjugate (Sigma) on the OPD (Sigma) substrate. OD values were measured at 492 nm (Multiskan, Labsystems, Helsinki, Finland). All data was submitted to statistical analysis: descriptive statistics represented by the box-plot graphs; variance analysis between different groups; frequency distributions of samples grouped according to antibody levels; and Spearman correlation tests.

Anti-Intimin antibodies determined by Immunoblotting.

Immunoblotting (IB) assays for the detection of IgG and IgA antibodies reactive with $\nu\alpha$, $\nu\beta$, 1γ and conserved were performed as previously described. (14), with some modifications. After electrophoresis on 15% polyacrylamide gel, the purified proteins were transferred to nitrocellulose membranes. The strips were then incubated with appropriate dilutions of samples with high antibody concentrations as determined by ELISA, or with the adsorbed samples, serum pool or purified IgA. After incubation with anti-human IgG or IgM peroxidase conjugate (Sigma), reactions were visualized using the substrate in 3,3'-diaminobenzidine (Sigma).

Absorptions.

The serum pool and purified IgA were submitted to absorption with recombinant bacteria as follows: the recombinant bacteria were grown and stimulated to bacterial expression with IPTG; after harvesting by centrifugation, the pellet was resuspended in serum or IgA purified (1 g bacteria/ml), incubated for 2 h at 37°C and then at 4°C overnight. After centrifugation at 4000 g, the supernatant was used in ELISA and IB.

Results

IgG and IgA antibodies reactive with $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ and conserved intimins.

The concentrations of antibodies IgG in serum and IgA in colostrum that were reactive with $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ and conserved intimins as determined by ELISA varied over a wide range, as shown by the box plot in Fig. 1. Higher concentrations of IgA anti-intimins were found in colostrum than IgG concentrations in serum. According to statistical analyses of the serum samples, the levels of IgG anti-conserved intimin were higher compared to the other three groups. The levels of anti- $v\alpha$ were higher than anti- $v\beta$ and anti- $v\gamma$, while the amplitude variations and medians of anti- $v\beta$ and anti- $v\gamma$ activity were similar. The anti- $v\alpha$, $v\beta$, and conserved intimin levels were similar in colostrum, with anti- $v\gamma$ intimin levels being the lowest. These results were confirmed by the frequency distribution of antibody levels (data not shown).

Comparisons of the concentrations of anti-intimin antibodies in serum and colostrum by Spearman's correlation test are summarized in Table 1. Positive coefficients were found in all pairs of data, but the coefficients among the pairs of IgA anti-intimins in colostrum were higher than the coefficients of IgG in serum. The highest coefficients were observed between antibodies anti- $v\alpha$ and anti- $v\beta$ in serum samples and between $v\beta$ and $v\gamma$, followed by anti- $v\alpha$ and anti- $v\beta$ in colostrum samples.

Cut-off values for IgG and IgA antibody concentrations against the four intimins were calculated as the mean plus two standard deviations. According to this criterion, among the 100 individual serum samples tested 1%, 4%, 4% and 1% were found with values above the cut-off for IgG anti-intimins $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ and conserved respectively; and among the 54 colostrum samples, 4%, 4%, 2% and 6% were found with values above the cut-off for IgA anti-intimins $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ and conserved respectively.

The serum and colostrum samples used in the IB assay were chosen based on the ELISA results. Pools of three samples with high concentrations of anti- $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ and conserved intimin respectively reacted with all intimin subtypes. The antibody response

against $v\beta$ and $v\gamma$ intimin was represented in a single band at 16.5 kDa, and the anti-conserved intimin at 33.6 kDa; the $v\alpha$ anti-intimin was observed as two bands - one corresponding to 16.5 kDa and the other near 20.0 kDa (17). The IB patterns were very similar among different pools, suggesting antibody cross-reactivity against the four intimins. (Fig 2)

Sera and purified IgA absorption with recombinant bacteria.

Serial and individual absorptions with recombinant bacteria of $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ and conserved intimins were performed with the serum pool and with a purified IgA preparation. Antibodies against the four intimins were determined by ELISA in absorbed samples using both the serum pool and the purified IgA (before absorption) as controls. The absorption of serum samples was very efficient in each case, irrespective of whether it was absorbed once or in series (Table 2 and Fig. 3) - probably due to low antibody concentrations in the serum pool. The preparation of purified IgA with high antibody concentrations demonstrated different results (Table 3 and Fig. 4), however, with the sample absorbed in series with $v\beta$, $v\gamma$ and conserved showing higher concentrations of antibodies against $v\alpha$ as compared with $v\beta$, and $v\gamma$, for example, and when IgA was absorbed only with $v\alpha$ it showed lower concentration of anti- $v\alpha$ than $v\beta$, $v\gamma$, and conserved. Similar results for antibodies $v\beta$, $v\gamma$, and conserved were observed.

Discussion

The human immunologic responses to EPEC and EHEC infections have been studied throughout the world. In our previous report, we detected the presence of anti-EPEC O111:H- anti-EHEC O157:H7 and anti- EHEC O111:H- antibodies by ELISA in the Brazilian population that were reactive with antigenic bacterial components present in the outer membrane and in other antigenic fractions detected by IB, including a 94 kDa band that might correspond to intimin (20).

Intimin, a virulence factor present in EPEC and EHEC, is responsible for the intimate adhesion of bacteria to cells and for the formation of A/E lesions. Intimin is highly immunogenic, and anti-intimin antibodies are able to inhibit bacterial adhesion to host cells and thus play an important role in protection against infection (12; 21-24). The three intimin subtypes chosen for this study were: α and β intimin, which are characteristic of typical and atypical EPEC and prevalent in our population; and intimin γ , which is present in some strains of atypical EPEC as serotypes O55:H(7) and O111ac:H(8) (13) and in EHEC O157:H7 (25-30).

Seric IgG and secretory IgA antibodies that are reactive with the conserved and variable regions of α , β and γ intimins were found to be present over a wide range of concentrations in all of the samples analyzed (100 sera and 54 colostrum samples from healthy Brazilians). There were no statistical differences between the antibody concentrations reactive with the different intimins among the colostrums samples. However, serum concentrations of IgG antibodies reactive with the conserved region were higher as compared with antibodies reactive with the variable regions of the three intimins, and anti- $v\alpha$ antibodies were higher as compared to anti- $v\beta$ and anti- $v\gamma$. As the conserved intimin region is common to all subtypes, antibodies reactive with this section of the intimin molecule may be present in people that have been in contact with any of the intimin subtypes. The main intimin subtypes detected in Brazil were α , β , γ , and δ in isolated typical and atypical EPEC and EHEC strains (28), in addition to other subtypes such as intimin ϵ , identified in EHEC O111:H38 and ONT:H19 (31).

The homology between the N-terminal region of intimin and the invasins found in some strains of *Yersinia* (such as *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*) may lead to the production of cross-reacting antibodies (7).

The conserved region of intimin is immunogenic and the detection of antibodies against this protein might help in the diagnosis of *E. coli* infections that produce A/E lesions but that show negative results in feces culture. Seric antibodies reactive with the conserved region of intimin were detected by IB assays in patients with positive cultures for EHEC O157 in feces, and by ELISA in 36 of 60 patients with negative cultures for EHEC O157 but with anti-LPS O157 antibodies (23). Another approach was examined by Koga et al. (32), who obtained a rabbit polyclonal serum against Int388-667 that could detect many intimin subtypes from *E. coli* serotypes O127:H6 (α), O128:H2 (β), O157:H7 (γ), O86:H34 (δ), and O103:H2 (ϵ).

Our results indicated the presence of antibodies reactive with the variable portions of α , β , and γ intimins in all of the samples tested. The increasing frequency of isolates of atypical EPEC in Brazil may be responsible for the presence of antibodies reactive with γ intimin (33;34). The high correlations found between antibodies reactive with different intimin subtypes could be explained by the presence of common epitopes among many intimin molecules that are recognized by the same antibodies. We found between 61.2 and 66.8% of similarity between the fragments $v\alpha$, $v\beta$ and $v\gamma$ examined in the present research, in agreement with other authors that found homologous sequences in various intimin subtypes

even in variable regions (35). Adu-Bobie et al. (12) determined the positions of common immunodominant epitopes in the C-terminal regions of α and β intimins by IgA antibody reactivity in colostrum samples from Brazilian mothers. This indicates a cross-reactivity in the antibody response among variable region of different intimin subtypes. The use of anti-intimin antibody levels for diagnostic purposes requires the determination of cut-off values, principally in geographical regions where healthy people demonstrate the presence of natural antibodies reactive with these antigens. We found that only 1-4% of the serum and 2-6% of the colostrum samples had antibody concentrations above our provisory cut-off values. Analyses of samples from convalescent patients of eae-positive *E. coli* infections are essential to determine cut-off values.

IB assays with serum and colostrum have confirmed cross-reactivity in response to the four intimins examined here (Figure 2). Strong bands at 16.5KDa for variable regions, and at 33.6 KDa for the conserved region, were observed after reactions with pools composed of three sera or three colostrum samples with high antibody concentrations (as determined by ELISA). Some samples included in the pools had high concentrations of antibodies against various intimin types, so we used absorption techniques to isolate antibodies reactive with only one intimin type and to eliminate cross-reacting antibodies.

The results obtained using absorption techniques, serum pools, and purified IgA confirmed the existence of cross-reactions among them, because independent of which intimin was used for the absorption, the concentrations of the other antibodies were also lowered - confirming once again the cross-reactivity between the antibodies against the intimins, especially among variable regions.

We previously identified seric antibodies reactive with EHEC O157:H7, and the present work confirmed the presence of antibodies reactive with conserved and variable portions of intimin in serum and colostrum from Brazilians. Together, these results indicate that protection against this bacterium exists among Brazilian population, and could explain the low numbers of cases of EHEC O157:H7 infection with complications like HUS in that country. We postulate the existence of protection against EHEC conferred by contact with EPEC.

An increasing frequency of atypical EPEC in cases of diarrhea has been reported in Brazil in recent years (13; 36-38). As intimin is a virulence factor of typical and atypical EPEC, anti-intimin antibodies may play a role in preventing infections by these bacteria (especially SIgA antibodies in colostrum and human milk that would protect nursing infants). In fact, the high concentration of anti-intimin antibodies in colostrum as compared to serum

might be related to the protective effect of breastfeeding against EPEC infections. The detection of higher concentrations of IgA in colostrum as compared to serum might be useful in epidemiologic studies, because lymphocytes migrate from the intestine to mammalian glandules through the common mucosa immune system after a previous intestinal infection, leading to the formation of SIgA antibodies that are delivered to the milk (39).

The present work found that the concentration of IgG antibodies against the anti-conserved region of intimin in serum samples from healthy adults is high in comparison with antibody levels against the anti-variable regions - demonstrating that the conserved region is immunogenic. The presence of these antibodies could be of diagnostic value for *eae*-positive *E. coli* infection, especially when the identification of the bacteria in feces by biochemical or molecular biological methods fails. Once reliable cut-off values are established, the detection of seric antibodies reactive with the conserved region of intimin could be accompanied by IgM anti-LPS assays, allowing the specific identification of the *E. coli* serotypes.

Although we can not be certain about the origin of the antibodies reactive with EPEC and EHEC virulence factors in healthy people, contact with strains of *eae*-positive *E. coli* from the environment, animals, or food may lead to an immune response and the development of protection against further infections.

References

1. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:123-140.
2. Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unraveling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:83-98.
3. Beutin L. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006;53:299-305.
4. Thorpe CM. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Infect Dis* 2004;38:1298-1303.
5. Irino K, Vaz TM, Kato MA, Naves ZV, Lara RR, Marco ME, Rocha MM, Moreira TP, Gomes TA, Guth BE. O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002;8:446-7.
6. Vaz TMI, Irino K, Kato MAMF, Dias AMG, Gomes TAT, Medeiros MIC, Rocha MMM, Guth BEC. Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in São Paulo, from 1976 through 1999. *J Clin Microbiol* 2004;42:903-5.

7. Frankel G, Candy DC, Everest P, Dougan G. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect Immun* 1994;62:1835–42.
8. Sinclair JF, O'Brien AD. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 2002;277:2876–85.
9. Frankel G, Lider O, Hershkovich R, Mould AP, Kachalsky SG, Candy DC, Cahalon L, Humphries MJ, Dougan G. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem* 1996;271:20359–64.
10. Kenny B, Devinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *E coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 1997;91:511–20.
11. Mundy R, Schüller S, Girard F, Fairbrother JM, Phillips AD, Frankel G. Functional studies of intimin in vivo and ex vivo: implications for host specificity and tissue tropism. *Microbiology* 2007;153:959–67.
12. Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, Knutton S, Dougan G. Detection of intimins α , β , γ and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* 1998;36:662–8.
13. Trabulsi TR, Keller R, Gomes TAT. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:508–13.
14. Carbonare CB, Carbonare SB, Carneiro-Sampaio MMS. Early acquisition of serum and saliva antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) virulence-associated proteins by infant living in an endemic area. *Pediatr Allergy Immunol* 2003;14:222–8.
15. Carneiro-Sampaio MMS, Silva MLM, Carbonare SB, Palmeira P, Delneri MT, Honório AC, Trabulsi LR. Breast-feeding protection against enteropathogenic *Escherichia coli*. *Rev Microbiol* 1996;27:120–5.
16. Palmeira P, Carbonare SB, Amaral JÁ, Tino-De-Franco M, Carneiro-Sampaio MMS. Colostrum from healthy Brazilian women inhibits adhesion and contains IgA antibodies reactivity with Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Eur J Pediatr* 2005;164:37–43.
17. Lima FA. Immunogenicity study of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* [in Portuguese]. São Paulo (SP) Department of Biology of Relationship Pathogen-Guest, Institute of Biomedical Sciences, USP, Brazil;2004.
18. Carbonare CB, Carbonare SB, Carneiro-Sampaio MM. Secretory immunoglobulin A obtained from pooled human colostrum and milk for oral passive immunization. *Pediatr Allergy Immunol*. 2005;16:574–81.
19. Fomsgaard, A. Antibodies to lipopolysaccharides: some diagnostic and protective aspect. *APMIS Suppl* 1990;98:5 – 38.

20. Zapata-Quintanilla LB, Palmeira P, Tino-De-Franco M, Amaral JA, Carbonare CB, Carbonare SB. Systemic antibody response to diarrheagenic *Escherichia coli* and LPS O111, O157 and O55 in healthy Brazilian adults. *Scand J Immunol* 2006;64:661-7.
21. Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marches O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *E.coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* 2000;68:64-71.
22. Levine MM. *E.coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 1997;155:377-89.
23. Jenkins C, Chart H, Smith HR, Hartland EL, Batchelor M, Delahay RM, Dougan G, Frankel G. Antibody response of patients infected with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* to protein antigens encoded on the *LEE* locus. *J Med Microbiol* 2000;49:97-101.
24. Loureiro I, Frankel G, Adu-Bobie J, Dougan G, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MMS. Human colostrums contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins: Intimin, BfpA, EspA and EspB. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998;27:166-71.
25. Bastos FC, Vaz TM, Irino K, Guth BE. Phenotypic characteristics, virulence profile and genetic relatedness of O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated in Brazil and other Latin American countries. *FEMS Microbiol Lett* 2006;265:89-97.
26. Donnenberg MS, Tzipori S, Mckee ML, O'brien AD, Alroy J, Kaper JB. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* 1993;92:1418-24.
27. Guth BEC, De Souza RL, Vaz TM, Irino K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002;8:535-6.
28. Gomes TA, Irino K, Girão DM, Girão VB, Guth BE, Vaz TM, Moreira FC, Chinarelli SH, Vieira MA. Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? *Emerg Infect Dis* 2004;10:1851-5.
29. Hicks S, Frankel G, Kaper JB, Dougan G, Phillips AD. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect Immun* 1998;66:1570-78.
30. Phillips AD, Navabpour S, Hicks S, Dougan G, Wallis T, Frankel G. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* 2000;47:377-81.
31. Nunes EB, Saridakis HO, Irino K, Pelayo JS. Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. *J Med Microbiol* 2003;52:499-504.

32. Koga PC, Menezes CA, Lima AF, Nara JM, Magalhães CA, Cianciarullo AM, Ferreira-Júnior JMC, Trabulsi LR, Mendes-Ledesma MRB, Piazza RM. Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and its use in EPEC and EHEC diagnosis. *Brazilian J Microbiol* 2003;34:5-7.
33. Araujo JM, Tabarelli GF, Aranda KR, Fabbriotti SH, Fagundes-Neto U, Mendes CM, Scaletsky IC. Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol* 2007;5:3396-9.
34. Bueris V, Sircili MP, Taddej CR, Dos Santos MF, Franzolin MR, Martinez MB, Ferrer SR, Barreto ML, Trabulsi LR. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007;102:839-44.
35. Zhang WL, Kohler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S, Schmidt H. Genetic Diversity of Intimin Genes of Attaching and Effacing *Escherichia coli* Strains. *J Clin Microbiol* 2002;40:4486-92.
36. Franzolin MR, Alves RC, Keller R, Gomes TA, Beutin L, Barreto ML, Milroy C, Strina A, Ribeiro H, Trabulsi LR. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:359-63.
37. Regua-Mangia AH, Gomes TAT, Vieira MAM, Andrade JRC, Irino K, Teixeira LM. Frequency and characteristics of diarrhoeagenic *Escherichia coli* strains isolated from children with and without diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. *J Infection* 2004;48:161-7.
38. Rodrigues J, Thomazini CM, Morelli A, de Batista GC. Reduced etiological role for enteropathogenic *Escherichia coli* in cases of diarrhea in Brazilian infants. *J Clin Microbiol*. 2004;42:398-400.
39. Noguera-Obenza M, Ochoa TJ, Gomez HF, Guerrero ML, Herrera-Insua I, Morrow AL, Ruiz-Palacios G, Pickering LK, Guzman CA, Cleary TG. Human milk secretory antibodies against attaching and effacing *Escherichia coli* antigens. *Emerg Infect Dis* 2003;9:545-551.

Tables

Table 1. Comparisons of the concentrations of different anti-intimin antibodies in serum and colostrum by Spearman's correlation test.

Anti-intimin antibodies			IgG – serum (P) ^a	IgA – colostrum (P) ^a
vα	X	vβ	0.7234 (0.0000)	0.8388 (0.0000)
vα	X	vγ	0.5435 (0.0000)	0.7831 (0.0000)
vα	X	cons	0.4622 (0.0000)	0.7424 (0.0000)
vβ	X	vγ	0.5692 (0.0000)	0.8475 (0.0000)
vβ	X	cons	0.2885 (0.0041)	0.7398 (0.0000)
vγ	X	cons	0.3126 (0.0019)	0.6453 (0.0000)

^a P-value at 95% confidence level.

Table 2. IgG anti-intimins vα, vβ, vγ and conserved determined by ELISA in serum pool before and after absorption with recombinant bacteria (μg/mL).

Samples	anti-vα	anti-vβ	anti-vγ	anti-cons
P0. Serum pool before absorption	2.65	1.76	1.87	5.4
P1. Serum pool absorbed with vα and vβ	0.04	0.04	0.06	0.02
P2. Serum pool absorbed with vα and cons	0.01	0.06	0.03	0
P3. Serum pool absorbed with vβ	0.06	0.01	0.09	0.26

Table 3. IgA anti-intimins vα, vβ, vγ and conserved determined by ELISA of purified IgA before and after absorption with recombinant bacteria (μg/mL).

IgA purified samples	Antibody concentrations (μg/mL)			
	anti-vα	anti-vβ	anti-vγ	anti-cons
R0. IgA before absorption	224.14	118.74	150.66	179.11
R1 - IgA absorbed with vβ, vγ and cons	2.36	0.73	0.18	2.37
R2 - IgA absorbed with vα, vγ and cons	0	6.63	0	2.19
R3 - IgA absorbed with vα, vβ and cons	0.47	1.17	6.2	4.59
R4 - IgA absorbed with vα, vβ and vγ	0.05	6.57	3.8	32.52
S1 - IgA absorbed with vα	0.92	25.86	58.94	67.58
S2 - IgA absorbed with vβ	137.05	21.64	87.89	87.08
S3 - IgA absorbed with vγ	127.57	44.62	9.64	58.70
S4 - IgA absorbed with cons	95.37	13.53	11.09	11.84

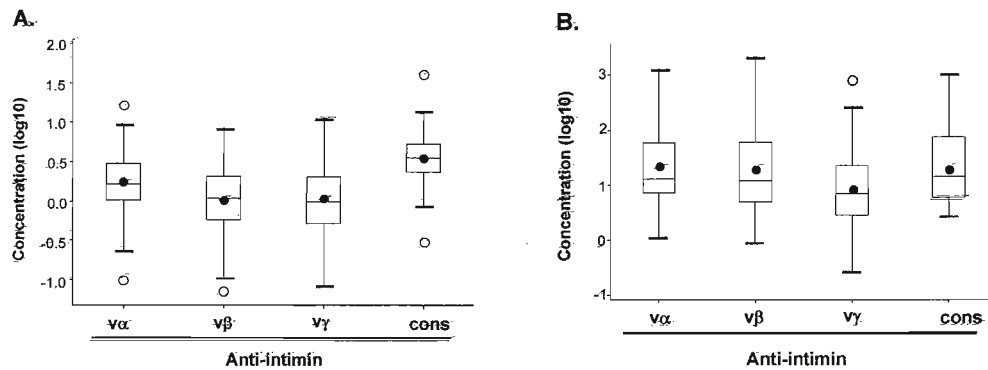


Figure 1. Comparisons between antibody responses IgG (A) in 100 serum samples and IgA (B) in 54 colostrum samples against $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ and conserved as detected by ELISA. Box plots: black circles indicate the mean, the solid line within the box is the median, the top and bottom solid lines of the box represent the 75th and 25th percentiles, the short lines outside the top and the bottom of the box represent the highest and the lowest values respectively, while white circles are discrepant values.

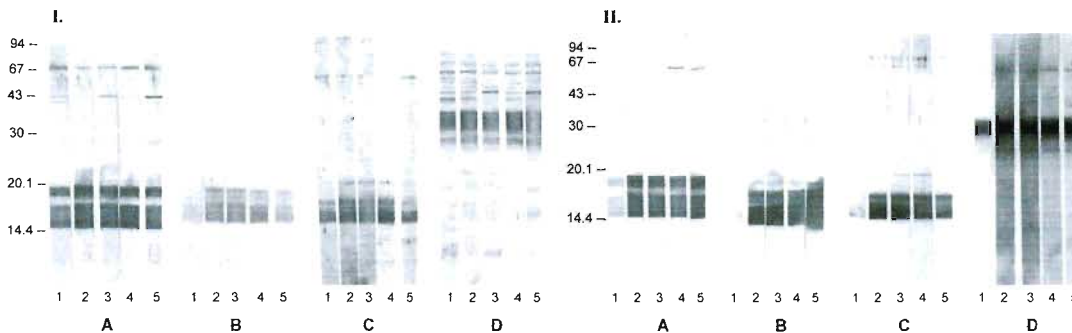


Figure 2. I IB with (A) $v\alpha$, (B) $v\beta$, (C) $v\gamma$ and (D) conserved. I Sera diluted 1:10 and anti-human IgG peroxidase conjugate diluted 1:200. II Colostrum diluted 1:50 and anti-human IgA peroxidase conjugate diluted 1:500. 1-serum pool formed by 100 samples (I), colostrum pool formed by 54 samples (II), 2, 3, 4 and 5 pools formed by three samples with the highest antibody concentrations of anti- $v\alpha$, $v\beta$, $v\gamma$ and cons respectively. Molecular weight standards on the left.

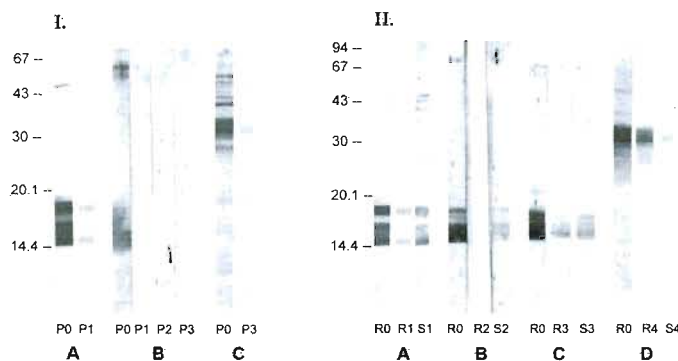


Figure 3. I IB with (A) $v\alpha$, (B) $v\beta$, and (C) conserved. Sera diluted 1:10 and anti-human IgG peroxidase conjugate diluted 1:200. P0 serum pool not absorbed, P1 serum pool absorbed with $v\alpha$ and $v\beta$, P2 serum pool absorbed with $v\alpha$ and conserved, and P3 serum pool absorbed with $v\beta$. II . IB with (A) $v\alpha$, (B) $v\beta$, (C) $v\gamma$ and (D) conserved. Purified IgA diluted 1:50 and anti-human IgA peroxidase conjugate diluted 1:500. R0 IgA purified not absorbed. R1 - IgA absorbed with $v\beta$, $v\gamma$ and conserved; R2 - IgA absorbed with $v\alpha$, $v\gamma$ and conserved; R3 - IgA absorbed with $v\alpha$, $v\beta$ and cons; R4 - IgA absorbed with $v\alpha$, $v\beta$ and cons; S1 - IgA absorbed with $v\alpha$; S2 - IgA absorbed with $v\beta$; S3 - IgA absorbed with $v\gamma$; S4 - IgA absorbed with cons. Molecular weight standards on the left.

RELAÇÃO DE REAGENTES UTILIZADOS

MEIO DE CULTURA PARA BACTÉRIAS

Meio sólido para bactérias

(Tryptic Soy Agar Oxoid CM131)

Meio TSA desidratado	40g
Água destilada	1000 mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C, distribuir em placas de petri estéreis.

Meio Líquido para bactérias (TSB)

(Tryptic Soy Broth Difco 0370-17)

Meio TSB desidratado	30 g
Água destilada	1000 mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C, distribuir em tubos ou frascos estéreis.

Meio Líquido para bactérias (BHI)

(Brain and Heart Infusion Difco 0037-17)

Meio BHI desidratado	37 g
Água destilada	1000 mL

Autoclavar por 15 minutos a 121°C, distribuir em tubos ou frascos estéreis.

REAGENTES PARA ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Tampão TBE [10X]

Tris-base (Sigma)	216 g
Ácido bórico	110 g
EDTA (0,5 M) pH 7.9 (Sigma)	80 mL

Armazenar em temperatura ambiente

REAGENTES PARA PURIFICAÇÃO DA INTIMINA**Solução de lise**

NaCl (Reagen)	300 mM
NaH ₂ PO ₄ (Queel)	50 mM
Imidazol	10 mM
PMSF (Sigma)	1 mM
Água destilada q.s.p.	10 mL

Ajustar para pH 8.0. Armazenar na geladeira.

Tampão de lavagem

NaCl (Reagen)	300 mM
NaH ₂ PO ₄ (Queel)	50 mM
Imidazol	20 mM
Água destilada q.s.p.	10 mL

Ajustar para pH 8.0. Armazenar na geladeira.

Tampão de eluição

NaCl (Reagen)	300 mM
NaH ₂ PO ₄ (Queel)	50 mM
Imidazol	250 mM

Ajustar para pH 8.0. Armazenar na geladeira.

REAGENTES PARA ELISA**Tampão carbonato bicarbonato**

Bicarbonato de sódio (ECIBRA 50-G7)	7,662 g
Carbonato de sódio anidro (Synth C1010.01 AF)	0,923 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
Acertar o pH para 9,0. Guardar em geladeira.	

Tampão PBS pH 7.4

Fosfato bibásico de sódio anidro (Synth F1033.01. AG)	17,91 g
Cloreto de sódio (Merck 1.06404.1000)	8,8 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
Acertar o pH 7,4 com HCl 6N.	

Tampão Para Bloqueio

Leite em pó desnatado	5 g
PBS 7,4 q.s.p.	100 mL

Tampão Para Diluição das Amostras e do Conjugado

Leite em pó desnatado	5 g
Cloreto de sódio (Reagen)	2 g
Tween 20 (Sigma P 1379)	0,2 mL
PBS 7,4	100 mL

Tampão de Lavagem

Tween 20 (Sigma P 1379)	0,5 mL
PBS 7,4	1000 mL

Tampão Citrato Fosfato

Ácido cítrico (Reagen)	7,4 g
Fosfato de sódio bibásico (Qeel)	9,9 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL
Acertar o pH para 5,0.	
Separar em alíquotas de 100 mL e guardar congelado.	

Solução de Substrato com OPD

O-Phenylenediamine Dihydrochloride (Sigma P 8287)	10 mg
Tampão citrato fosfato	25 mL
Perhydrol 30% (Merck 7209)	5 μ L

REAGENTES PARA SDS-PAGE**Solução de SDS 10%**

Sodium dodecyl sulfate (Sigma L-3771)	10 g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	100 mL

Solução de Acrilamida 30%

Acrilamida (Plus one 17-1302-01)	30g
N,N'-methylene-bis-acrylamide (Sigma M 7256)	0,8g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	100mL

Filtrar em papel de filtro Whatman e conservar em frasco escuro, a 4°C.

Tampão Tris-HCl pH 8,8 1,5M

Trizma base (Sigma T 1503)	27,25g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	150 mL

Ajustar o pH para 8,8 com HCl 5M.

Tampão Tris-HCl pH 6,8 0,5M

Trizma base (Sigma T 1503)	6g
Água (destilada e desmineralizada)	100 mL

Ajustar o pH para 6,8 com HCl 5M.

Solução D

Trizma base (Sigma T 1503)	6,06g
Solução de SDS 20%	2 mL
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	100 mL

Ajustar o pH para 6,8 com HCl 6N.

Solução de Persulfato de Amônio

Persulfato de amônio (Bio – Rand 161-0700)	0,2g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	2 mL

Dividir em alíquotas de 100 μ L e guardar a -20 $^{\circ}$ C.

Preparo Do Gel De Acrilamida a 15%

Montar um sanduíche de placas de vidro perfeitamente limpas e com os espaçadores bem ajustados, testando com água para verificar se não há vazamentos. Colocar o gel preparado na concentração desejada, segundo os exemplos da tabela, nesta ordem:

Água bidestilada	2,5 mL
Solução Acrilamida 30%	5 mL
Tampão Tris-HCl 8,8	2 mL
Glicerol	0,5 mL
SDS 10%	100 μ L
Persulfato de Amônio	55 μ L
TEMED *	6 μ L

*TEMED= N,N,N',N'-tetra-methylethylenediamine (Sigma T-9281)

Após polimerização do gel de corrida, colocar gel de aplicação de amostra (Gel Stacking), preparado na proporção:

Água bidestilada	3,75 mL
Sol. Acrilamida 30%	630 μ L
Tampão Tris-HCl 6,8	630 μ L
SDS 10%	50 μ L
Persulfato de amônio	40 μ L
TEMED	5 μ L

Colocar cuidadosamente o pente, que será retirado após a polimerização, para aplicação das amostras e do padrão de peso molecular (Calibration kit for molecular weight determination, Pharmacia).

Tampão de Amostra

Solução D	2,5 mL
Solução de SDS 20%	2,5 mL
Glicerol 99% (Synth G1005)	2,0 mL
EDTA 0,1M (Merck 702121)	0,1 mL
Água (destilada e desmineralizada) q.s.p.	18,5 mL

Solução de Azul de Bromofenol

Azul de bromofenol (Sigma B-5525)	2g
Água destilada	100 mL

Preparo da Amostra

Amostra (conteúdo de proteínas)	10 a 20 µg
β-mercaptoetanol (Sigma M 7157)	5 µL
Solução de azul de bromofenol	2 µL
Tampão de amostra q.s.p.	200 µL

Tampão de Corrida pH 8,3 (Sol. estoque, 5 vezes concentrado)

Trizma base (Sigma T 1503)	15g
L-Glicina	72g
Sodium dodecyl sulfate (Sigma L-3771)	5g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	1000 mL

Ajustar o pH para 8,3, guardar a 4°C. No momento do uso diluir 1:5 em água destilada.

Coloração com Coomassie**Solução Fixadora**

Metanol (Merck 21566)	500 mL
Ácido acético glacial (Reagen)	100 mL
Água destilada e desmineralizada	400 mL

Corante de Coomassie Blue

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma B 0149)	0,2g
Solução fixadora	100 mL

Solução Descorante

Metanol (Merck 21566)	100 mL
Ácido acético glacial (Synth 30310)	70 mL
Água destilada e desmineralizada	830 mL

Após a corrida eletroforética, desmontar o sanduíche de placas, retirar cuidadosamente com uma espátula o gel de aplicação da amostra e colocar o gel de corrida em cuba de vidro contendo solução fixadora. Deixar em agitação por pelo menos 30 minutos. Retirar a solução fixadora, colocar o corante e deixar em agitação por pelo menos 30 minutos. Retirar o corante e colocar a solução descorante. Deixar em agitação, trocando várias vezes o descorante até clareamento do fundo e evidenciação das bandas.

REAGENTES PARA "IMMUNOBLOTTING"**Tampão de Transferência**

Trizma base (Sigma T 1503/10)	3,03 g
Glicina (Ajinomoto)	14,41 g
Metanol (Merck 21566)	200 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Corante de Ponceau Para Nitrocelulose

Ponceau S (C.I.27195)	0,5 g
Ácido acético glacial (Synth 30310)	1 mL
Água destilada q.s.p.	100 mL

Tampão Tris-Salina 0,1M pH7,4

Trizma base (Sigma T 1503/10)	24,20 g
Cloreto de sódio (Merck 1.06404.1000)	29,22 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

**Acertar o pH para 7,4 com HCl

Tampão Tris-Salina 0,01M pH7,4

Tampão tris salina 0,1M	100 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Tampão de Bloqueio

Tampão tris salina 0,01M	100 mL
Leite em pó desnatado	5 g

Tampão de Diluição de Amostras e Conjugado

Tampão tris salina 0,01M	100 mL
Leite em pó desnatado	10 g
Tween 20 (Sigma P 1379)	0,05 mL

Tampão de Lavagem

Tampão tris salina 0,01M	1000 mL
Tween 20 (Sigma P 1379)	1 mL

Tampão Tris 0,05M

Tampão tris salina 0,1M	250 mL
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Substrato com Diaminobenzidina

3,3'-Diaminobenzidina (Sigma D 5637)	20 mg
Tampão Tris 0,05M	40 mL
Perhidrol 30% (am de liq 77)	100 µL

REAGENTES PARA CULTURA DE CÉLULAS

A água utilizada para a preparação de todos os reagentes para culturas celulares deve ser desmineralizada, destilada e filtrada em Milli-Q.

Meio DMEM:

Meio DMEM (Sigma D 5648)	13,4 g
Bicarbonato de sódio (Sigma S 7561)	3,7 g
Água q.s.p.	1000 mL

Filtrar dentro de câmara de fluxo laminar, utilizando pré-filtro e filtro Millipore de 0,22µm, para frascos esterilizados.

Solução de L-Glutamina

L-glutamina (Sigma G 5763)	2,92 g
Água q.s.p.	100 mL

Filtrar em Millipore, guardar em alíquotas a -20°C .

No momento do uso, diluir 1:100 no meio de cultura.

Solução de D-Manose:

D-(+) manose (Sigma M 4625)	10 g
Água q.s.p.	100 mL

Esterilizar por autoclavação em vapor fluente.

Solução de vermelho de fenol:

Vermelho de fenol (Nuclear)	1 g
Água q.s.p.	100 mL

Meio com SFB 10% e antibiótico para repique de células:

Meio DMEM	100 mL
Soro fetal bovino (Cultilab)	10 mL
Solução de L-glutamina	1 mL
Solução de gentamicina 50 mg/mL (Sigma G1397)	0,1 mL

Meio para ensaios de adesão:

Meio DMEM	100 mL
Soro fetal bovino (Cultilab)	2 mL
Solução de L-glutamina	1 mL
Solução de D-manose 10%	10 mL

Solução de tripsina:

Tripsina 1:250 (Sigma T 0646)	2,0 g
PBS para células	50 mL

Dissolver em banho de gelo, em agitador magnético por 3 horas. Filtrar em papel de filtro.

Solução de versene (EDTA):

Ethylenediamine-tetracetic acid (Sigma E-6758)	0,2 g
PBS para células	10 mL

Solução de ATV:

Solução de tripsina	50 mL
Solução de versene	10 mL
Solução de vermelho de fenol	1,5 mL
PBS para células q.s.p.	1000 mL

Acertar o pH 7,5-7,6 com hidróxido de sódio 1N, esterilizar por filtração e guardar em alíquotas de 100 mL.

Solução de Bicarbonato de Sódio:

(Para ajuste de pH de meios e soluções para células)

Bicarbonato de sódio (Sigma S 7561)	2,8 g
Água q.s.p.	100 mL

PBS para Células (10 vezes concentrado):

Cloreto de sódio (Reagen)	80 g
Cloreto de potássio (Nuclear)	3 g
Fosfato bibásico de sódio anidro (Qeel)	0,73 g
Fosfato monobásico de potássio (Qeel)	0,20 g
D-glucose anidra (Nuclear)	20 g
Água q.s.p.	1000 mL

Separar em alíquotas de 100 a 200mL e guardar congelado. Para uso, diluir 1:10 em água, adicionar 1mL/L de vermelho de fenol a 1% e esterilizar por autoclavação.

Reagentes para coloração de células**Tampão de Sörensen:****Solução A:**

Fosfato de potássio monobásico anidro (Qeel)	0,636 g
Água destilada estéril	70 mL

Solução B:

Fosfato de sódio bibásico (Qeel)	2,367 g
Água destilada estéril	250 mL

Solução tampão

Em frasco estéril juntar:

Solução A	69,6 mL
Solução B	230,4 mL

Manter guardado a 4°C e diluir v/v com água destilada no momento do uso.

Solução Corante de MayGrünwald:

Eosina azul de metileno segundo MayGrünwald (Merck 1424)	10 mL
Tampão de Sørensen diluído	10 mL

Preparar e filtrar no momento do uso.

Solução Corante de Giemsa:

Eosina azul de metileno segundo Giemsa (Merck 9204)	10 mL
Tampão de Sørensen diluído	20 mL

Preparar e filtrar no momento do uso.

Procedimento: Fixar as células com metanol (Merck 21566) por pelo menos 10 minutos.

Corar com solução corante de May Grünwald por 5 minutos. Lavar com água e corar com solução corante de Giemsa por 20 minutos. Lavar com água, secar e montar com Entellan (Merck 7961) entre lâmina e lamínula.

RELAÇÃO DE EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Aparelho de eletroforese modelo Mini Protean 3, BioRad, USA.
- Aparelho de transferência modelo Transblot "Semi-dry", BioRad, USA.
- Agitador basculante RockerMix1030, Brinkmann, USA.
- Banho com agitação Orbit, Labline, USA.
- Biofotômetro Eppendorff, USA.
- Bloco de aquecimento Digital Heatblock, VWR.
- Centrífuga refrigerada de mesa modelo 5804-R, Eppendorf.
- Centrífuga refrigerada modelo Super T 21, Sorvall Instruments.
- Equipamento para filtração de água modelo RIOS, Millipore, USA.
- Estufa Orion 502, Fanem, Brasil.
- Fluxo laminar modelo VLFS12, Veco, Brasil.
- Fluxo laminar modelo VLFS-09, Veco, Brasil.
- Fonte para eletroforese PowerPac HC, BioRad, USA.
- Freezer -70^o C modelo 8425 SB-E, Forma Scientific, USA.
- Incubadora de CO₂ modelo 3159, Forma Scientific, USA.
- Lavadora de placas de ELISA modelo1575, BioRad, USA.
- Leitor de ELISA, Labsystem Multiskan MS, Labsystem, Finlândia.
- Microscópio invertido CK30, Olympus, Japan.
- Microscópio 85268, Nikon, Japan.
- pHmetro Basic, Denver, USA.
- Termociclador Mastercycle Gardient, Eppendorff, USA.

APÊNDICES

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP**

Ofício CEP nº 05

São Paulo, 10 de março de 2003.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 24 de fevereiro do corrente ano, **aprovou** o projeto "Pesquisa de anticorpos séricos anti Escherichia coli produtora de toxina Shiga (STEC) em adultos normais da Grande São Paulo", apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 - item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Tit. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Ilmo(a) Sr(a).
Lucy Beatriz Zapata Quintanilla
Orientador: Prof. Solange Barros Carbone
FBC



São Paulo, 22 de junho de 2001.

À
Dra. Solange Barros Carbonare
Laboratório de Imunogenética
Neste

Tendo ouvido parecer sobre o projeto "Efeito de anticorpos anti-fatores de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) sobre *Escherichia coli* produtoras de toxinas Shigá (STEC)", em reunião do CEP, optou-se por sua aprovação para encaminhamento ao CONEP.

Atendendo a regulamentação vigente, solicita-se:

- Preenchimento e assinatura da folha de rosto do projeto.

Atenciosamente


Dr. Nilton José Fernandes Cavalcante
Pres. Comitê de Ética em Pesquisa



hospital universitário
universidade de são paulo

São Paulo, 29 de novembro de 2000.

Hma, Sra.

Dra. Solange Barros Carbonare

Departamento de Imunogenética

Instituto Butantan

Referente: **Projeto de Pesquisa:** "Efeito de anticorpos anti fatores de virulência de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) sobre *Escherichia coli* produtoras de toxinas shiga (STEC)" - **Cadastro:** Nº 088/00

Prezado(a) Senhor(a)

A Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião de 17 de novembro de 2000, analisou o projeto de pesquisa acima citado, considerando-o como APROVADO, NÃO TEMÁTICO ESPECIAL

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a esta Comissão, relatórios parciais (a cada 90 dias) e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10-10-1996, inciso IX 2, letra "c").

Atenciosamente,



Dr. Sérgio Gomes de Souza
Coordenador
Comissão Ética em Pesquisa - CEP