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

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE SISTÊMICA EM CAMUNDONGOS APÓS
INOCULAÇÃO POR DIFERENTES VIAS DE IMUNIZAÇÃO COM
ESCHERICHIA COLI O86:H34 VIVAS OU MORTAS POR FORMALINA**

ANA PATRÍCIA DA SILVA OLIVEIRA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari

São Paulo
2001

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

O48e Oliveira, Ana Patrícia da Silva
 Estudo da resposta imune sistêmica em camundongos após
 inoculação por diferentes vias de imunização com *Escherichia coli*
 O86:H34 vivas ou mortas por formalina / Ana Patrícia da Silva
 Oliveira. -- São Paulo, 2001.
 116p.

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

Orientador: De Gaspari, Elizabeth Natal

1. Imunologia 2. Imunoquímica I. T. II. De Gaspari,
Elizabeth Natal, orientador.

615.37 CDD

Ana Patrícia da Silva Oliveira

**ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE SISTÊMICA EM CAMUNDONGOS APÓS
INOCULAÇÃO POR DIFERENTES VIAS DE IMUNIZAÇÃO COM
ESCHERICHIA COLI O86:H34 VIVAS OU MORTAS POR FORMALINA**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Elizabeth Natal De Gaspari
orientador/presidente

Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral
1º. examinador

Sandro Rogerio de Almeida
2º. examinador

São Paulo, 19 de dezembro de 2001.

Este trabalho foi realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, sendo o projeto aprovado pelo Comitê Técnico e Científico desta instituição

Apoio financeiro: FAPESP, PROCESSO 00/05834-7.

*“Jamais descobriremos alguma coisa se nos
contentássemos com o que está descoberto”.*

L.A. Sêneca

*Aos meus pais Jorge e Marlene, por sempre me fazer
acreditar que o sucesso de toda realização está na arte
de saber persistir.*

*A meu tio Paulo, meu irmão Jorginho e
meus sonbrinhos.*

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade que me foi concedida para realizar este trabalho e, acima de tudo, pelas lições surgidas a cada instante, destacando o verdadeiro valor da verdade e da contínua busca do conhecimento, fazendo-nos evidenciar a grandeza da humildade, acima do saber.

Vivemos na certeza de que, todos nós somos peças interdependentes na longa viagem da vida, logo, em todo trabalho realizado necessitamos do auxílio e compreensão de pessoas que, na verdade, dentro de suas possibilidades contribuíram, e foram imprescindíveis para a conclusão de nossos objetivos. Por isso, neste momento, não poderia deixar de agradecer:

À Dra. Elizabeth Natal De Gaspari que me acolheu em seu laboratório e por me ensinar que orientar é, antes de tudo, um ato de constante compreensão e carinho; mostrando sempre muita paciência e tolerância, e, principalmente, teimando e insistindo para reduzir as dúvidas, destacando sempre a importância de melhorar o nosso conhecimento e persistir na busca da pesquisa científica.

À Dra. Mirthes Ueda pela enorme colaboração, desde o período da qualificação, e as sugestões que melhoraram o entendimento do trabalho.

À Dr. Jorge A. Girón (Universidade de Puebla-México) pelas sugestões e doação das cepas de *E. coli* mutadas.

À Dra. Marina Martinez (FCF-USP) pela inestimável colaboração desde o exame de qualificação.

À Dra. Tânia A.T. Gomes (Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP) pela doação da cepa protótipo de *E. coli* e pelo soro de coelho anti-intimina universal, além de sugestões oferecidas humildemente.

À Lígia, Elzinha, Matheus e Aline pela colaboração e apoio diário no transcorrer do desenvolvimento deste trabalho, e a Dimitri pela imensa

AGRADECIMENTOS

colaboração ao executarmos uma importante parte dos experimentos que realizamos.

Aos amigos Gustavo, Rodrigo e Andréa.

A Maristela pelo constante apoio.

À Seção de Imunologia e Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

À Dra. Angela C.R. Guilhard que cedeu, gentilmente, a cepa O86:H34 de *E. coli*.

À Dra. Kinue Irino e Maria Aida M.F. Kato pela constante colaboração e realização da sorotipagem das cepas utilizadas neste estudo.

Aos professores Raimundo Antônio Oliveira, Antônio Benedito Oliveira e Mário Hirata pelos estímulos oferecidos, que me foram importantes tanto no início, como na continuação de meus estudos no mestrado.

Dra. Isabel C.A. Scaletsky pelas críticas realizadas no exame de qualificação.

A todos aqueles que, de alguma forma, tiveram pelo menos a intenção de contribuir com o êxito deste trabalho e na melhoria de minha formação profissional.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1- INTRODUÇÃO	1
1.1- <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROPATOGENICA	3
1.1.1- ESTUDOS “ <i>IN VIVO</i> ” E “ <i>IN VITRO</i> ”	12
1.1.2- RESPOSTA IMUNE	13
1.2- EHEC (<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTERO HEMORRÁGICA)	17
1.3- IMUNOLOGIA DAS MUCOSAS	19
2- OBJETIVOS	30
3- MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1- CEPAS BACTERIANAS	31
3.2- CRESCIMENTO BACTERIANO	33
3.3- SOROTIPAGEM	33
3.4- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	35
3.5- PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL	36
3.6- ELISA-“ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY”	39
3.7- “ <i>COLONY BLOT</i> ”	40
3.8- “ <i>IMMUNOBLOT</i> ”	42
3.9- OBTENÇÃO DO COMPLEXO DE MEMBRANA EXTERNA BACTERIANA	43
4-RESULTADOS	45
4.1- SOROTIPAGEM	45
4.2- CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA POR SDS-PAGE	45
4.3- ELISA	47
4.4- “ <i>COLONY BLOT</i> ”	72
4.5- “ <i>IMMUNOBLOT</i> ”	75
5- DISCUSSÃO	80
6- CONCLUSÃO	95
7- ANEXOS	96
8- REFERÊNCIAS	97

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A/E: Lesão “*attaching and Effacing*”
ACF: Adjuvante completo de Freund
AEC: “3- amino-9-ethyl carbarale
AIF: Adjuvante incompleto de Freund
AL: Aderência localizada
ATCC: “American Typing Culture Collection”
BALT: Tecido linfóide associado aos brônquios
BFP: “Bundle- forming pillus”
bfp: Gene que codifica o BFP
Blot: “Immunobloting”
CFU: Unidade formadora de colônia
D.O: Densidade óptica
DAB: 3,3’ diamino benzidina
eae: “*E. coli attaching and effacing*”, gene que codifica a intimina
EAF: Plasmídeo de virulência que codifica o BFP
EaggEC: *Escherichia coli* enteroagregativa
EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica
ELISA: “ ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY”
EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica
esp: “ EPEC secreted proteins”, gene que codifica as proteínas secretoras de EPEC
ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica
GALT: Tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal
HUS: Síndrome urêmica hemolítica
IG: via Intragástrica
IgA: Imunoglobulina do isótipo A
IgG: Imunoglobulina do isótipo G
IgM: Imunoglobulina do isótipo M
IM: Via intramuscular
K12: Linhagem de *E. coli* não patogênica
kDa: Kilo daltons
LB: Luria-Bertani
LEE: “ Locus of enterocyte effacement “, Ilha de patogenicidade onde se encontra um conjunto de genes que são responsáveis pela patogenicidade de bactérias que apresentam A/E
LPS: Lipopolissacárides
MALT: Tecido linfóide associado à mucosa
MDa: mega Dalton
OMC: Complexo de membrana externa
OPD: o- Fenilenodiamina
PM: Peso molecular
RN: Recém nascido
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida
sep: “ Secretion of EPEC proteins”, gene que codifica o sistema de secreção tipo III.
SIgA: IgA secretora

ABREVIATURAS

SN: Soro normal

STEC: *Escherichia coli* produtora de Shiga toxina

TIR: “ Translocated intimin receptor”, proteína secretada.

TMB: Trimetilbenzidina

WB: “*Western blotting*”

RESUMO

A *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) é um dos principais agentes etiológicos da diarreia infecciosa tanto em crianças no primeiro ano de vida, como em adultos. As infecções por EPEC são prevalentes nos países em desenvolvimento, principalmente nas populações de baixo nível sócio-econômico, como as encontradas no Brasil. A resposta imune na infecção por EPEC permanece pobremente caracterizada. O uso das novas tecnologias no desenvolvimento de vacinas vem reforçar a importância de se levar em consideração a via natural de infecção do patógeno e utilizá-la como tema de estudo, quando se pretende estudar a resposta imune a um determinado agente infeccioso.

O objetivo deste trabalho foi efetuar o estudo da resposta imune em animais inoculados com bactérias vivas ou mortas, por meio de diferentes vias de imunização. As bactérias em estudo foram: a cepa de *E. coli* O86:H34 e a cepa protótipo de *E. coli* O127:H6. A cepa de *E. coli* pertencente ao sorotipo O86:H34 foi isolada de fezes de crianças com diarreia. Foram empregadas as cepas : E2348/69, DH5 α e as mutantes E2348/69 *flic*-, E2348/69 Δ *tir*, E2348/69 *EscN*-, CVD 206 Δ *eaeA*, UMD 872 Δ *EspA*, UMD 864 Δ *EspB*, UMD 870 Δ *EspD*.

No presente estudo os camundongos BALB/c foram inoculados pela via intragástrica com a cepa de *E. coli* O86:H34 viva ou cepas O86:H34 e O127:H6 mortas por formol, que foram utilizadas nas imunizações pela via intragástrica e pela via intramuscular. Por meio de ELISA foram determinados os níveis de anticorpos específicos dos isotipos IgG, IgA e IgM, assim como o direcionamento da resposta imune para importantes antígenos que participam do mecanismo de patogenicidade da bactéria. De acordo com o perfil de reatividade no *Immunoblot* foi avaliada a especificidade dos anticorpos presentes nos soros imunes obtidos, frente aos antígenos de "whole cells" ou complexo de membrana externa bacteriana, empregados na técnica de "immunoblotting".

A resposta imune a proteínas, como EspA, EspB, Tir, intimina, flagelos e BFP observada em camundongos, tem um importante papel no esclarecimento da infecção por este patógeno.

Pela primeira vez foi realizado um estudo utilizando diferentes vias de imunização por EPEC em camundongos. Este estudo permitiu a análise de antígenos de *E. coli* reconhecidos pelos anticorpos produzidos pelas inoculações de bactérias vivas ou mortas por meio de vias intragástrica e intramuscular em camundongos, em comparação com aqueles reconhecidos na infecção natural ou experimental humana. Por conseguinte, os dados obtidos poderão auxiliar no esclarecimento desse complexo mecanismo de patogenicidade e orientar na seleção de peptídeos a serem utilizados no preparo de produtos vacinais específicos.

Palavras-chave: *Escherichia coli* enteropatogênica, resposta imune em camundongos, anticorpo policlonal, "Immunoblot" e ELISA.

ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* is one of the major etiologic agent that causes infectious diarrhoea in both infants and adults individuals.

EPEC infections are prevalent in developing countries, mainly in low social-economic populations, as those found in Brazil. The immune response of this infection is still insufficiently known. Use of new technologies in the development of vaccines has been reinforced the importance of taking in account the natural route of infection of pathogens and use of it in investigation on immune response to be elicited against a certain to infectious agent.

The aim of the present investigation was to study the immune response in mice inoculated with dead or alive bacteria, by means of diverse immunization routes. *E. coli* O86:H34 strain and *E. coli* O127:H6 prototype were employed for immunization.

E. coli strain belonging to O86:H34 serotype was isolated from faeces from infants with diarrhoea. The strains: E2348/69, DH5 α and the mutants strains E2348/69 flic-, E2348/69 Δ tir, E2348/69 EscN-, CVD 206 Δ eaeA, UMD 872 Δ EspA, UMD 874 Δ EspB, UMD 870 Δ EspD were employed.

BALB/c mice were inoculated by intragastric route with alive *E. coli* O86:H34 strain or formalin-killed O86:H34 and O127:H6 strains intragastric and intramuscular immunization routes.

The specific antibodies of isotypes IgA, IgG and IgM were determined by means of ELISA and the course of the immune response for important antigens that participate in the pathogenicity mechanism of bacteria could be analysed. By means of reactivity profile on immunoblotting, the specificity of antibodies present in obtained sera against whole cells or the outer membrane complex of the bacteria were analysed.

Immune response to proteins like EspA, EspB, Tir, intimin, flagelin and BFP in immunized mice may have an important meaning for elucidation of infection in this pathogen

At the first time a research using different routes of immunization with EPEC strains in mice has been conducted. This study allowed to compare antigens from *E. coli* recognized in natural or experimental human infection, and consequently these data may help in the elucidation of this complex mechanism of pathogenicity, and also to orientate the selection of peptides to be used in preparation of specific vaccines.

Key-words: Enteropathogenic *E. coli*, immune response in mice, polyclonal antibodies, immunoblot and ELISA.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O Brasil, país de dimensão continental, convive ainda tanto com doenças de país desenvolvido (câncer, hipertensão arterial, diabetes), como também com doenças infecciosas e parasitárias, características do subdesenvolvimento (Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde, 1994).

Entre os microrganismos patogênicos de interesse em saúde pública, destacam-se os enteropatogênicos, correspondentes àqueles cuja patologia se expressa no trato gastrointestinal. Alguns microrganismos enteropatogênicos agem interferindo com as microvilosidades das células epiteliais do intestino delgado; outros produzem enterotoxinas que alteram a fisiologia das células epiteliais e, muitos deles, precisam colonizar o intestino aderindo à mucosa para não serem eliminados pelas defesas intestinais naturais. Alguns patógenos agem, preferencialmente, nas regiões iniciais do intestino delgado (duodeno e jejuno), outros preferem o íleo. Há os que são pouco invasores, limitando-se à camada epitelial e os muito invasivos, podem alcançar a lâmina própria e as correntes linfática e circulatória. Outros patógenos, veiculados por alimentos, utilizam-se do trato gastrointestinal como porta de entrada no organismo humano, expressando sua patogenicidade em outros locais das diversas partes do corpo humano (SAVIDGE, 1996).

O sintoma mais comum nas doenças de origem alimentar é a diarreia. Dependendo da patogenicidade do microrganismo envolvido no processo e das condições gerais do indivíduo afetado, a doença pode ser aguda e, neste caso, é normalmente autolimitada, como também pode tornar-se crônica e oferecer um risco maior. Por outro lado, as doenças de origem alimentar podem não se limitar ao trato gastrointestinal, mas afetar outros órgãos podendo causar distúrbios no sistema nervoso, na corrente circulatória, no aparelho genital, no fígado e em outros órgãos.

INTRODUÇÃO

A diarreia infecciosa é a principal causa de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento, onde é considerada endêmica (HANSON, 1993), principalmente nas populações de baixo nível sócio-econômico, como as encontradas no Brasil. Suas manifestações clínicas são variáveis em características e gravidade, estando relacionadas ao estado imunológico do indivíduo e à natureza do agente etiológico, destacando-se bactérias, vírus e protozoários (THEA & KEUSCH, 1993). Diversos estudos epidemiológicos têm mostrado a *Escherichia coli* diarreiogênica como um dos principais agentes etiológicos dessa síndrome, tanto em crianças no primeiro ano de vida como em adultos"" (LEVINE, 1987; GOMES et al., 1991; ALBERT et al., 1995).

As *Escherichia coli* capazes de causar infecções intestinais receberam, universalmente, a denominação genérica de *E. coli* enteropatogênica, mas a partir da demonstração de que a patogenia poderia ser causada por fatores de virulência diversos, elas passaram a ser agrupadas, sendo atualmente reconhecidas atualmente em categorias, de acordo com os sítios de infecção e as manifestações clínicas que causam ou, ainda, pelos fatores de virulência que apresentam. As amostras patogênicas podem ser classificadas em 6 principais categorias designadas: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (NATARO & KAPER, 1998).

As principais características que definem estas categorias estão apresentadas na tabela 1.

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Principais características das categorias de *E. coli*.

Categorias de <i>E. coli</i> diarreio gênicas	Principais características
EPEC típica	<i>eae</i> ^a , plasmídeo EAF ^b
EPEC atípica	<i>eae</i>
EHEC	<i>eae</i> , Stx1 ^c , e/ou Stx2 ^d
ETEC	produção de Lt ^e e/ou St ^f
EAEC	Padrão de adesão agregativa
DAEC	Padrão de adesão difusa
EIEC	Invasão de células em cultura de tecido e produção de ceratoconjuntivite em cobaia.

eae^a, ^a "EPEC attachment/effacement gene", ^b plasmídeo EAF, "EPEC adherence factor", ^{c,d} Stx1 e Stx2, toxina de shiga 1 e 2; ^e LT, enterotoxina termo-lábil; ^f ST, enterotoxina termo estável.

Apesar dessas categorias serem diferentes, elas possuem algumas características comuns de patogenicidade, a saber: os principais fatores de virulência são codificados por plasmídeo, a existência de uma interação característica com a mucosa do intestino e a produção de citocinas (NATARO & KAPER, 1998)

A primeira categoria de *E. coli* associada à doença diarreica foi a EPEC, entretanto somente a partir da década de 1980, é que os seus mecanismos de patogenicidade puderam ser determinados. Até este período, as EPEC eram caracterizadas por pertencerem a sorogrupos com mecanismos de virulência distintos (ROBINS- BROWE, 1987)

A infecção por EPEC é transmitida de pessoa para pessoa, porém pode ser adquirida pela ingestão desses microrganismos em água e comida contaminadas; e o problema é agravado pela subnutrição e o desmame precoce de crianças (LAW, 1994).

1.1- *Escherichia coli* enteropatogênica

A primeira descrição de *E. coli*, inicialmente denominada de *Bacterium coli commune*, foi feita em 1885 por um pediatra alemão, Theodore

INTRODUÇÃO

Escherich, que sugeriu este nome pela sua ocorrência no trato gastrointestinal de indivíduos sadios e sem associá-la, portanto, a casos patogênicos (ROBINS- BROWNE, 1987).

As primeiras suspeitas que indicavam que a *E. coli* poderia ter um papel na gênese da diarreia surgiram com os estudos de ADAM (1923) e GOLDSCHMIDT (1933). Entretanto, somente com os estudos de BRAY (1945) , pode-se efetuar a associação etiológica da *E. coli* com a diarreia de verão que ocorria na Inglaterra, e obtenção de evidências mais concretas; o agente foi então denominado de *Bacterium coli neopolitanum* (BRAY, 1945).

Posteriormente, esses dados foram confirmados por relatos de surtos similares na Escócia (GILES & SANGSTER, 1948; GILES et al., 1949). As amostras isoladas desses casos foram denominadas de *Bacterium coli* α e β . Neste período, TAYLOR et al. (1949) observaram que uma amostra de *Bacterium coli* estava envolvida em 96% dos casos de diarreia infantil em uma série de surtos em hospitais na Inglaterra. Em 1955, NETER et al. propuseram que as amostras incriminadas epidemiologicamente, como causadoras de diarreia infantil, passassem a ser chamadas de *E. coli* enteropatogênica ou EPEC.

Com os relatos de que algumas *E. coli* causavam diarreia pela produção de toxinas ou de sua capacidade invasora, surgiu, na década de 70, um novo debate questionando a capacidade da EPEC em causar diarreia, uma vez que essas propriedades eram raramente detectadas nas amostras pertencentes aos sorogrupos de EPEC (SACK, 1976; GANGAROSA & MERSON, 1977). Entretanto, os estudos realizados com indivíduos adultos por LEVINE et al. (1978) confirmaram a enteropatogenicidade da bactéria, ao demonstrar que amostras de diferentes sorogrupos possuíam propriedades enterotoxigênicas e enteroinvasoras e que causavam diarreia em voluntários.

A partir dessas evidências, passou-se a aceitar que os sorotipos de EPEC estavam envolvidos em surtos de diarreia infantil, enquanto a sua associação com a diarreia endêmica permanecia controversa, apesar da

INTRODUÇÃO

existência de estudos que mostravam claramente que a EPEC era um agente importante de diarreia endêmica na comunidade (GURWITH et al., 1978). No nosso meio a questão foi reavaliada por TOLEDO et al. (1983), que confirmaram que a EPEC estava envolvida também com a diarreia infantil endêmica e que sorogrupos e sorotipos predominantes eram os mesmos detectados há vários anos em São Paulo (TRABULSI & CAMARGO, 1965)

A falta de um modelo animal que pudesse reproduzir o processo infeccioso causado por EPEC, dificultou enormemente a compreensão dos mecanismos envolvidos em sua patogênese. Um achado importante nesse sentido foi a constatação de que as amostras de EPEC tinham a capacidade de aderir às células HEp-2 (CRAVIOTO et al., 1979). Posteriormente, SCALETISKY et al. (1984) descreveram que diferentes amostras de *E. coli* aderiam a células HeLa em dois padrões distintos. As amostras de EPEC aderiam no padrão denominado adesão localizada (AL), que era caracterizado pela presença de microcolônias bacterianas em determinadas áreas da superfície celular. Por outro lado, outras amostras de *E. coli* eram não aderentes ou aderiam de maneira dispersa em toda a superfície celular, em padrão denominado de adesão difusa (AD). Algumas amostras de EPEC apresentaram também o padrão AD/AL, simultaneamente.

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de esclarecer as características da aderência de EPEC.

BALDINI et al. (1983) evidenciaram a presença de um plasmídeo de 50-70MDa, denominado pMar2 na cepa E2348/69 pertencente ao sorotipo O127:H6, que estava associado a aderência localizada e denominado de EAF ("EPEC Adherence Factor") por LEVINE et al. (1985). Com o estudo de KNUTTON et al. (1989) ficou demonstrado que após a cura deste plasmídeo, a bactéria perdia a propriedade de aderir à célula epitelial, porém, ao transferi-lo para a *E. coli* K12, esta se tornava capaz de aderir de maneira localizada à célula Hep-2, apresentando uma adesão menos intensa.

NATARO et al. (1985) construíram a sonda para EAF, a partir do

INTRODUÇÃO

pMar2, que tem sido amplamente utilizada, completando a identificação de amostras que produzem AL em vários estudos (GOMES et al., 1989; SCOTLAND et al., 1989; GOMES et al., 1991).

Em estudos com a cepa B171 do sorotipo O111: NM, foi descrita a presença de uma fímbria envolvida no processo de adesão localizada de *E. coli*, que recebeu o nome de “Bundle Forming Pillus” (BFP) (GIRÓN et al., 1991a). A síntese dessa fímbria é codificada por um operon de 14 genes (localizado no plasmídeo EAF), sendo que o gene estrutural dessa fímbria é *bfpA*, o qual foi seqüenciado por DONNENBERG et al. (1992a). Observou-se também que a produção da fímbria é dependente das condições de cultivo da bactéria (Ordóñez, J.A.G., Tese de mestrado-ICB/USP, 1998). Os estudos recentes sugerem que o BFP pode estar envolvida na formação de microcolônias na adesão localizada, agregando as bactérias entre si, de modo tridimensional, intensificando a adesão AL (NATARO & KAPER, 1998).

MOON et al. (1983) analisaram as amostras de *E. coli* O119 e O142 de origem humana e O15 de origem animal, por meio de ensaio de alças ligadas de intestino de suínos. Estes autores observaram que a interação de EPEC com a célula epitelial resultava em uma lesão histopatológica, que foi denominada de “Attaching and Effacing lesions” (A/E). A lesão A/E caracteriza-se por alterações histopatológicas envolvendo rearranjo do citoesqueleto, com polimerização de filamentos de actina, formação de pedestal e ainda destruição das microvilosidades da célula epitelial. Outros componentes do citoesqueleto, além de actina, estão também envolvidos na lesão A/E (FINLAY et al., 1992).

Os estudos de MCDANIEL et al. (1995) demonstraram que a capacidade de produzir lesão A/E é codificada por genes localizados em uma região de 35.6Kb, denominada LEE (“Locus Enterocytes Effacement”), que se encontra inserida no cromossomo de *E. coli* no gene que codifica o RNAt para selenocisteína (*selC*). A região LEE da cepa de *E. coli* enteropatogênica E2348/69 foi seqüenciada por ELLIOT et al. (1998). O primeiro gene associado à lesão A/E foi denominado *eae*, que codifica uma

INTRODUÇÃO

proteína de membrana externa de 94KDa denominada intimina, descrita por JERSE et al. (1990), que está diretamente relacionada à adesão íntima da bactéria à célula epitelial. Posteriormente, os autores construíram a sonda que detecta o gene *eae* (JERSE et al., 1991). Próximo ao gene *eae*, encontra-se o que codifica Tir (Translocated intimin receptor) (KENNY et al., 1997), receptor para intimina e que é translocado para a célula epitelial pelo sistema de secreção tipo III. Na região LEE também estão presentes os genes que codificam o sistema de secreção tipo III (JAVIS et al., 1995). Há ainda várias proteínas secretadas (EspA, EspB e EspD), que são necessárias para tradução de sinais na célula do hospedeiro.

A intensificação na pesquisa sobre os fatores de virulência de EPEC revelou a existência de uma complexa rede de estrutura e eventos que participam na interação bactéria-célula hospedeira. Nesses estudos, ficou evidente o envolvimento direto tanto dos genes cromossômicos como os plasmidiais (RILEY et al., 1987).

Em vista disso, desde 1994 vêm surgindo na literatura relatos alertando que a definição de EPEC apenas pela sorotipagem é insuficiente. Diversos autores já demonstraram que sorogrupos de EPEC como O111 (CAMPOS et al., 1994), O55 (RODRIGUES et al., 1996) e O119 (GONÇALVES et al., 1997) podem compreender uma variedade de clones portadores de diferentes fatores de virulência.

Assim, no SEGUNDO SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE EPEC (realizado em São Paulo, no período de 28 a 30 de agosto de 1995), chegou-se a um consenso sobre as características básicas de EPEC, que teriam a capacidade de causar a histopatologia A/E ("attaching and effacing"), a presença do plasmídio EAF (pEAF) (EPEC adherence factor) e a ausência de toxina Shiga (Stx). Aquelas sem o plasmídeo EAF, mas contendo o gene cromossomal *eae*, seriam consideradas EPEC atípicas (KAPER, 1996).

A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1987, reconheceu como *E. coli* enteropatogênica (EPEC) as cepas dos seguintes sorogrupos O:O26, O55, O111, O86, O114, O119, O125, O127, O128, O142 e O158 (WHO,

INTRODUÇÃO

1987).

Embora as *E. coli* sejam rotineiramente identificadas como EPEC pela aglutinação com anti-soros específicos, os estudos recentes demonstraram que os sorogrupos de EPEC podem conter sorotipo de EAEC, EHEC e EPEC atípicas (SCOTLAND et al., 1993; CAMPOS et al., 1994; GONÇALVES et al., 1997; VALLE et al., 1997).

Portanto, atualmente a definição de EPEC baseia-se não somente na sorotipagem, mas também na presença de fatores de virulência (NATARO & KAPER, 1998)

Todos esses estudos, dos fenômenos de adesão em si, dos componentes bacterianos e celulares envolvidos, dos genes cromossomais e plasmidiais necessários, levaram DONNENBERG & KAPER (1992 b) a efetuar a formulação de um modelo de 3 estágios para explicar a patogênese de EPEC:

Em primeiro lugar ocorreria a adesão de EPEC aos microvilos da célula do hospedeiro, adesão seria mediada por BFP, adesina codificada pelo locus *bfpA* no plasmídeo EAF. Genes cromossomais também são necessários para esse fenômeno de AL (GIRÓN, 1991b).

Num segundo estágio ocorreria um sinal de transdução determinado por genes cromossomais, o que promoveria a fosforilação de resíduos de tirosina de proteínas celulares, levando ao aumento de Ca^{++} intracelular, o que causaria desorganização do citoesqueleto e lesão nos microvilos. Neste estágio, os genes plasmidiais ativam o gene cromossomal *eaeA* para promover a produção de intimina, a adesina de 94 kDa (ROSENSHINE et al., 1996).

No terceiro estágio, a presença da intimina na superfície celular permitiria à bactéria permanecer intimamente ligada à superfície celular, cujos efeitos no citoesqueleto seriam amplificados, havendo acúmulo de actina e proteínas fosforiladas e formação do pedestal no qual fica alojada a bactéria.

O fenômeno de A/E é multifatorial, necessitando a concorrência de um "cluster" de genes, como foi demonstrado por DONNENBERG et al.

INTRODUÇÃO

(1993), que encontraram o gene *eaeB*, cujo produto é provavelmente, uma proteína de 39kDa, envolvida no processo de adesão.

Recentemente, KNUTTON et al. (1998), propuseram um modelo de quatro estágios para interação entre EPEC e células epiteliais (cultura de tecidos), associado à EspA, que atualmente é descrita como uma organela de superfície bacteriana. A EspA está envolvida na fase inicial do processo de patogenicidade, ligando a bactéria à célula epitelial pela formação de uma ponte, que facilita a translocação das proteínas secretadas de BFP, a expressão de intimina, a produção de filamentos de EspA e a adesão da bactéria mediada por BFP e EspA. Numa segunda etapa, ocorre a translocação de EspB e Tir, quando então iniciam-se as reações de transdução de sinal, resultando na fosforilação de Tir, que passa a funcionar como receptor de intimina. Numa terceira etapa ocorre a adesão íntima da bactéria à célula, como a interação Tir/intimina, que resulta na polimerização e acúmulo de filamentos de actina abaixo da bactéria aderida. Por último, o acúmulo adicional de filamentos de actina produz a lesão A/E madura, que se caracteriza por uma estrutura em forma de pedestal visualizada sob a bactéria.

HICKS et al. (1998), observando material de biópsia intestinal de criança, também propuseram um modelo de quatro estágios na patogenia de EPEC. No primeiro estágio, ocorre uma adesão inicial mediada por adesinas que não BFP e transdução de sinais; seguindo a adesão íntima mediada pela intimina, há a formação da lesão A/E. O último estágio caracteriza-se pela formação de microcolônias tridimensional envolvendo BFP.

Por mais complexos que sejam os eventos que ocorrem na adesão de EPEC à célula epitelial do hospedeiro susceptível, este por sua vez, na tentativa de preservar sua integridade, desenvolve mecanismos que impedem ou pelo menos dificultam essa adesão.

A infecção por EPEC ocasiona no hospedeiro uma alteração da permeabilidade da membrana, a destruição dos microvilos e à ruptura do citoesqueleto dos enterócitos. Quando isto ocorre, as células começam a perder sua função de absorver água, resultando na diarreia (KNUTTON et

INTRODUÇÃO

al., 1996, NATARO & KAPER, 1998).

O sistema flagelar bacteriano é estudado quanto à regulação da sua formação, à sua morfogênese, à conversão de energia química em motora e à quimiotaxia.

O flagelo tem origem na membrana da célula e se estende de 15 a 20 μ M da superfície da célula. O arranjo do número de flagelos na superfície da bactéria varia de superfície para superfície e pode depender das condições de crescimento bacteriano. A maioria das bactérias flageladas tem o seu flagelo localizado extracelularmente; mas, em espiroquetas, ele se localiza no espaço periplasmático e é constituído de um pacote ou feixe de fibrilas que se originam dos pólos da célula, abaixo da bainha externa, formando um espiral em torno da célula (MOENS et al., 1996).

Em *E. coli* os genes flagelares estão agrupados em três ou quatro regiões do cromossomo. Eles estão organizados em vários operons de acordo com a função. Os genes são chamados de *flg*, *flh*, *fli* ou *flj*, de acordo com a região do cromossomo onde se encontram. A designação “fl” deve-se ao seu envolvimento na montagem e na função do flagelo (KOMEDA et al., 1986; KU TSUKATE et al., 1990).

Em muitas infecções, o flagelo é altamente imunogênico e desenvolve resposta imune no hospedeiro (MOENS et al., 1996).

Alguns pesquisadores inseriram epitopos diferentes no domínio antigênico variável do flagelo de cepas não patogênicas para obter resposta imune específica, fornecendo assim proteção contra certos patógenos (ACERO et al., 1994, NEWTON et al., 1989) Por outro lado, a maioria das bactéria patogênicas desenvolve vários mecanismos para escapar da resposta imune do hospedeiro. Algumas bactérias são capazes de mudar entre a fase flagelar e a não flagelar (variação de fase), outras podem mudar os tipos de flagelinas com diferentes propriedades antigênicas (variação antigênica). Essas mudanças fenotípicas podem prolongar a sobrevivência de patógenos dentro do hospedeiro (WASSENAAR et al., 1993). Um dos exemplos mais conhecidos do microrganismo capaz de modificar o seu flagelo é *Salmonella Typhimurium*, cuja variação de fase da flagelina ocorre

INTRODUÇÃO

pela presença de dois genes, o *fliC* da fase 1 e o *fliB* da fase 2. Esses genes estão presentes na mesma cepa e são expressados alternativamente e a mudança entre as fases 1 e 2 ocorre por recombinação (KAWAGISHI et al., 1992).

A *E.coli* enteropatogênica é a principal causa de diarreia infantil em países em desenvolvimento (ALBERT, 1996; CRAVIOTO et al., 1996; GOMES et al., 1996; LEVINE et al., 1987). Estudos realizados em São Paulo e em outros estados indicaram que alguns sorotipos de EPEC são responsáveis por 30% ou mais dos casos de diarreia em crianças com menos de um ano de idade (TRABULSI et al., 1961; TOLEDO et al., 1983; TRABULSI et al., 1985).

Os estudos relatados na literatura demonstraram a existência de duas categorias ou classes de EPEC: uma é constituída de sorotipos cujas amostras transportam o plasmídeo EAF, e a outra, por sorotipos que não transportam o referido plasmídeo. O primeiro grupo de sorotipos é conhecido por EPEC típica e o segundo por EPEC atípica (TRABULSI et al., 1996). Os sorotipos de EPEC típica são bastante homogêneos em suas propriedades de virulência, pois expressam basicamente os fatores de virulência codificados pela ilha de patogenicidade denominada LEE e pelo plasmídeo EAF, com exceção apenas do sorotipo O86:H34, que alberga no cromossomo o gene *cdt*, o qual codifica para a toxina citolética distensora (CDT) (SCOTT & KAPER, 1994). Os sorotipos de EPEC atípica, ao contrário, são constituídos de amostras com fatores de virulência diversos. Esses fatores variam dependendo do sorotipo e dentro de um sorotipo entre as amostras que o constituem. Assim sendo, os sorotipos de EPEC atípica são constituídos por amostras que expressam fatores de virulência codificados pela região LEE e de amostras, que além desses fatores, expressam outros como enterotoxinas, citotoxinas e adesinas do tipo difuso e agregativo.

A primeira cepa de *E. coli* do sorogrupo O86 (*E. coli* E990) foi identificada por TAYLOR & CHARTER (1952) como causa de um surto de diarreia aguda em crianças ocorrido em Londres. Até então, as cepas deste sorogrupo, principalmente o sorotipo O86:H34, tinham sido isoladas em

INTRODUÇÃO

surtos e casos esporádicos de diarreia no mundo (GOMES et al., 1989, TOLEDO et al., 1993, SCOTLAND et al., 1996, CRAVIOTO et al., 1996)

Recentemente GUILLARD et al. (2001) mostraram que a maioria das cepas O86:H34 e algumas cepas imóveis produzem uma toxina citolética distensora (CDT), sugerindo que a produção de CDT poderia ser uma propriedade associada ao clone universal representado pelo sorotipo O86:H34. Essas cepas se comportam como EPEC e carregam o gene *eae*, *bfpA*, o plasmídeo EAF e apresentam aderência localizada em células HeLa.

1.1.1- ESTUDOS “IN VIVO” E “IN VITRO”

Estudos “in vitro” associados à evidência “in vivo”, têm levado a uma divisão do processo patogênico da diarreia por EPEC em três estágios (DONNENBERG et al., 1997; KAPER, 1996) ou quatro estágios (KNUTTON et al., 1998). A fase inicial desse processo consiste na colonização dos tecidos alvo. Durante esta etapa as bactérias formam microcolônias bem delimitadas na superfície das células eucarióticas, originando um fenótipo descrito como aderência localizada (AL) (SCALETSKY et al., 1984., CRAVIOTO et al., 1987). Diferentes loci gênicos dispostos num plasmídeo denominado EAF (EPEC adherence factor) codificam esse fenótipo. A expressão coordenada desses genes resulta na biossíntese da fímbria BFP (bundle-forming pilus), mediadora de AL em EPEC (GIRÓN et al., 1991; STONE et al., 1996). Um outro filamento bacteriano formado por subunidades EspA (EPEC secreted protein A) codificadas no cromossomo de EPEC, também participa deste contato inicial com as células alvo, embora seu papel para a colonização não esteja tão caracterizado quanto o da BFP. Os demais estágios se caracterizam por desorganização progressiva da borda em forma de escova dos enterócitos, seguida por uma interação íntima com EPEC. Uma série de produtos codificados no locus LEE (*locus of enterocyte effacement*) do cromossomo bacteriano dentre eles há: o próprio EspA, além de EspB e EspD, que agem sobre a célula-alvo

INTRODUÇÃO

desencadeando a ativação de uma resposta complexa. Desta resulta o rearranjo do esqueleto de actina e desorganização dos microvilos do enterócito (ROSENSHINE et al., 1992, FOUBISTER et al., 1994, JARVIS et al., 1995, KENNY & FINLAY., 1995).

1.1.2- RESPOSTA IMUNE

A resposta imune resultante da infecção por EPEC ainda necessita de melhor caracterização. Dentre os antígenos da bactéria capazes de induzir anticorpos estão as fímbrias do tipo I, a intimina e os antígenos somáticos O (FERGUSON & JINE, 1952, LEVINE et al., 1985, KARCH et al., 1987, DONNENBERG et al., 1993a). Os anticorpos contra antígeno O, que definem os sorogrupos clássicos de EPEC, são encontrados com maior frequência em crianças com idades acima de um ano do que naquelas mais jovens, o que em associação à observação de que infecções por esses patógenos diminuem com o avançar da idade levou NETER et al. (1955) a proporem que a exposição a EPEC durante a infância confere imunidade e proteção à reinfecção na fase adulta. Recentemente, DONNENBERG et al. (1998) em ensaio com voluntários adultos, demonstraram que a infecção prévia por EPEC resulta em redução da gravidade do quadro clínico frente à reinfecção com a cepa homóloga. Dessa forma, esse achado corrobora as observações de CRAVIOTO et al. (1991) realizadas em estudos longitudinais. Os autores mostraram, ainda, uma correlação inversa, estatisticamente significativa, entre os níveis séricos de IgG anti-LPS da cepa (O127) e a gravidade do quadro clínico. Esse achado reforça a hipótese já antiga lançada por NETER et al. (1955) de que os anticorpos contra esses antígenos somáticos estão associados com a resistência à infecção por EPEC.

Evidências da existência de anticorpos em diferentes fluidos corpóreos, capazes de inibir a aderência de EPEC à célula-alvo têm sido documentadas. Sabe-se que o aleitamento materno protege o lactente contra a infecção por EPEC (BLACK et al., 1993). Tanto o colostro como o

INTRODUÇÃO

leite materno têm anticorpos contra antígenos O e componentes de membrana externa de EPEC, sendo capazes de inibir a aderência localizada da bactéria a células eucarióticas (CRAVIOTO et al., 1991, SILVA & GIAMPAGLIA, 1992, COSTA-CARVALHO et al., 1994, CÂMARA et al., 1994, DELNERI et al., 1997, CARBONARE et al., 1997).

CÂMARA et al. (1994) e CARBONARE et al. (1997) demonstraram que os anticorpos IgA são importantes nessa inibição da aderência localizada. Já DELNERI et al. (1997) identificaram imunoglobulinas do leite e do colostro reativas contra um peptídeo de aproximadamente 18kDa, presente em extrato de EPEC e de peso molecular compatível com a atribuída a BfpA.

Achados semelhantes foram descritos nos soros de crianças naturalmente infectadas com esses patógenos (BARROS et al., 1995; MARTINEZ et al., 1999). BARROS et al. (1995) demonstraram que a aderência localizada de cepas de EPEC homólogas e heterólogas, isoladas nas fezes de crianças, são inibidas pelas amostras de soros coletadas tanto na fase aguda da doença, assim como após alta hospitalar. Por outro lado, analisando a presença de anticorpos contra diferentes fatores de EPEC em soros de crianças brasileiras naturalmente infectadas, MARTINEZ et al. (1999) descreveram que IgG anti-BfpA são juntamente com anti-EspB os mais freqüentemente encontrados. Esses dados ajudaram a confirmar que a BFP de fato é produzida durante a infecção natural e que sua pilina é capaz de induzir uma resposta humoral nos indivíduos infectados.

No estudo com voluntários adultos, DONNENBERG et al. (1998) mostraram uma leve tendência inversa entre os níveis séricos de IgG anti-BfpA e a gravidade do quadro clínico após o desafio. A falta de significância estatística foi possivelmente influenciada pelo pequeno tamanho da amostra estudada. Contudo, nesse trabalho foi observada uma correlação inversa, estatisticamente significativa, entre os níveis séricos de IgG anti-BfpA pré desafio e a proporção de colônias eaf+ de EPEC recuperadas das fezes dos voluntários.

EPEC compreende pelo menos onze diferentes sorogrupos de *E. coli*

INTRODUÇÃO

com um ou mais sorotipos em cada sorogrupo. Essa heterogeneidade torna complexa a tarefa de se desenvolver uma vacina, que além de eficaz durante ensaios clínicos empregando cepas homólogas a imunização e ao desafio, mostre-se efetiva na população, em que as infecções maternas podem envolver cepas heterólogas às usadas na imunoprevenção. Assim, a conservação ao longo dos diversos sorotipos de EPEC confere à BfpA uma vantagem prática ao ser usada como imunógeno.

Refletindo essa homogeneidade genética os determinantes antigênicos de BfpA são comuns a diversos sorogrupos como demonstrado por meio de anticorpos monoclonais contra a proteína da cepa O111:NM B171 (GIRÓN et al., 1995). Três dos anticorpos monoclonais, ICA2, ICA3 e ICA4, específicos para diferentes epitopos foram testados contra extratos de EPEC homóloga e heteróloga por meio de "*immunoblot*". ICA2 reconheceu BfpA em 14 das 20 cepas testadas, enquanto que ICA3 e ICA4 foram capazes de reconhecer determinantes antigênicos em 19 das 20 cepas AL+. Esses resultados indicam a existência de diferentes determinantes em BfpA, muito difundidos entre os diversos sorogrupos de EPEC. Alguns deles podem ser compartilhados por até 95% das cepas dessa bactéria.

Os estudos recentes, com soros de crianças que apresentavam diarreia por EPEC, demonstraram que amostras da fase aguda, bem como após a infecção, inibiram a adesão de EPEC a células Hep-2, tanto da linhagem homóloga que ocasionou a diarreia, como também das linhagens heteróloga. O soro de cordão umbilical, neste mesmo estudo, demonstrou também inibição da adesão. Esses resultados sugerem a presença de anticorpos dirigidos a antígenos comuns, a vários sorotipos e não apenas a antígenos O (BARROS et al., 1995).

Foram realizados alguns estudos de infecção experimental por EPEC em voluntários adultos que ingeriram cepas de EPEC com ou sem plasmídeo do mesmo sorotipo (LEVINE et al., 1985) ou, então, cepas virulentas ou não de diferentes sorotipos (DONNENBERG et al., 1993 b ; DONNENBERG et al., 1998). Os grupos de voluntários tiveram acompanhamento clínico e laboratorial. Foi avaliada a resposta de

INTRODUÇÃO

anticorpos séricos para diferentes antígenos bacterianos. No primeiro estudo, os autores relacionaram a proteção à infecção com a presença de anticorpos séricos anti-intimina (LEVINE et al., 1985). No segundo estudo, DONNENBERG et al. (1993 a) demonstraram que a colonização com bactérias não virulentas ou pouco virulentas estimulava a produção de anticorpos anti-lipopolissacarídeo; entretanto, a intensidade da reação variava de acordo com a virulência, sendo que a resposta era maior quando a bactéria era virulenta.

No último estudo, os autores relataram que houve uma diminuição na intensidade dos sintomas da doença no grupo que recebeu pela segunda vez as bactérias do mesmo tipo (DONNENBERG et al., 1998).

Martinez et al.(1999) verificaram a presença de anticorpos contra intimina e alguns determinantes de virulência como BFP ou Esps em soro de crianças brasileiras na faixa etária de 2 meses a 3 anos de idade, em amostras de sangue coletadas 10 dias após o aparecimento de quadro agudo de diarreia por EPEC. De acordo com os resultados obtidos, verificou-se a presença de anticorpos IgG circulantes principalmente contra BFP em 76,4% das crianças infectadas por EPEC *bfpA+*. Neste estudo a reatividade para intimina e para as Esps foi dependente da cepa utilizada como imunógeno (MARTINEZ et al., 1999).

Estudo recente realizado por SANCHES et al.(2000) com soros de crianças coletados dez dias após o quadro de diarreia aguda provocada por EPEC, mostrou a presença de anticorpos IgG específicos para Tir recombinante (63%). Nos soros de crianças sem diarreia, também foram encontrados anticorpos anti-Tir. Em todos os "pools" de colostro utilizados neste estudo, foram detectados anticorpos IgA anti-Tir. Tanto anticorpos IgG do soro, quanto IgA do colostro reagiram de forma predominante com o domínio Tir -M (região de Tir que se liga a intimina).

Outros estudos mostraram que no colostro, nos soros de mães e seus filhos ao nascer e 6 meses depois, apresentavam anticorpos para BFP, intimina e as proteínas secretadas EspA e EspB. Interessantemente, houve

INTRODUÇÃO

diferença na resposta de IgG para antígenos de EPEC entre os soros dos recém-nascidos e das mesmas crianças aos 6 meses de idade. Os autores sugeriram que essas crianças foram expostas à infecção por EPEC e, conseqüentemente, produziram anticorpos para fatores de colonização produzidos "in vivo", tal como BFP (PARISSI-CRIVELLI et al., 2000).

1.2- EHEC (*Escherichia coli* entero-hemorrágica)

As STEC compreendem amostras de *E. coli* que são agentes da colite hemorrágica e da síndrome hemolítica urêmica. O sorotipo protótipo é o O157:H7, mas outros também têm sido classificados nessa categoria (KARMALI, 1989). Elas produzem citotoxinas idênticas àquelas produzidas produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo I, designadas atualmente de Stx1 e variantes de Stx2 (CALDERWOOD et al., 1996). As amostras podem produzir apenas uma ou ambas as citotoxinas. As citotoxinas Stx são codificadas por DNA fágico inserido no cromossomo (SMITH et al., 1970.; SCOTLAND et al., 1983; O'BRIEN et al., 1987;). Aparentemente, as amostras de EHEC que produzem apenas Stx2 estão mais associadas com o desenvolvimento da "síndrome hemolítica urêmica" (HUS) do que as amostras que produzem apenas Stx1 (NATARO & KAPER, 1998).

Além de produzirem citotoxinas, as EHEC contêm um plasmídeo altamente conservado de aproximadamente 60MDa, causando a lesão A/E e colonização do intestino grosso (NATARO & KAPER, 1998). A lesão A/E causada por EHEC é análoga àquela causada por EPEC. Todos os genes necessários para o estabelecimento dessa lesão estão localizados em uma "ilha de patogenicidade" de 35Kb inserida no cromossomo e as proteínas deduzidas das seqüências desses genes possuem uma homologia superior a 80% com as proteínas de EPEC. Entretanto, ao contrário das EPEC, as EHEC parecem não realizar a fosforilação de resíduos de tirosina da proteína homóloga a Tir (ISMAILI et al., 1995 a,b).

O mecanismo pelo qual linhagens de STEC geram lesões A/E são menos conhecidos, mas é essencialmente análogo ao da EPEC. A região LEE de STEC também codifica proteínas Sep pertencentes ao sistema de

INTRODUÇÃO

secreção tipo III, os genes que codificam a intimina (94-97kDa), e um grupo de proteínas secretadas, entre elas, EspA (25kDa), EspB (37kDa), EspD (40kDa) também necessários para a transdução de sinais nas células do hospedeiro e formação da lesão A/E (PATON & PATON, 1998). Recentemente foi demonstrado que a proteína EspE (72kDa), também foi codificada pela região LEE da STEC, seria o sinônimo da proteína Tir da EPEC (DEILBEL et al., 1998).

O gene *eae*, presente em STEC, gera um produto de 934 aminoácidos com 83% de homologia com a intimina da EPEC (YU & KAPER, 1992). As moléculas de intimina de EPEC e STEC são idênticas nos primeiros 700 aminoácidos, mas a porção C-terminal (em torno de 25% do total da molécula) é bem divergente, mostrando somente 50% de homologia, e esta é a região envolvida na ligação com a célula epitelial (FRANKEL et al., 1994).

SHERMAN et al. (1991), verificaram que anticorpos para uma proteína de membrana externa de 94kDa de uma linhagem de STEC O157:H7, bloqueavam aderência e formação da lesão A/E formadas por esta linhagem, mas não tinham efeito na linhagem de EPEC O127:H6.

Em um trabalho com soros de pacientes convalescentes de HUS infectados principalmente com STEC do sorotipo O111:H⁻, os ensaios de "immunoblot" revelaram bandas de 94, 70 e 50kDa, o que não foi encontrado nos soros controles. Eles verificaram que as proteínas de 94 e 50kDa eram produzidas na região LEE. A sequência de aminoácidos desta proteína de 94kDa total era 88,6% idêntica à intimina de EHEC O157:H7, com 75% de identidade na região C-terminal. Essa variação se mostrou significativa, pois os soros de pacientes infectados somente com O111:H⁻ reagiram com a intimina da EPEC, e outros isolados de STEC *eae* positivos, mas não reagiram com a STEC positiva pertencente ao sorotipo O157:H7 (VOSS et al., 1998).

Já nos estudos de LOUIE et al. (1993) foi preparado um anti-soro de coelho contra os 266 aminoácidos C-terminais da intimina de STEC O157:H7 que reagiu, em ensaios de "immunoblotting", com uma proteína de

INTRODUÇÃO

externa de 97kDa de linhagens de STEC dos sorogrupos O5, O26, O111 e O157, além do sorogrupos de EPEC O55 e O127 e estes autores concluíram que esta proteína é a intimina.

Testes sorológicos e PCR para classificação da intimina têm sido desenvolvidos, baseados nas seqüências dos genes *eae* de EPEC O127:H6, O114:H2, O86:H34 e STEC O157:H7. Estes testes demonstraram que as intiminas podem ser divididas dentro de 5 tipos sorologicamente distintos, designados intimina α , β , δ e γ , respectivamente. O 5º grupo é não-tipável sugerindo que outros tipos de intimina ainda serão descobertos (ADU-BOBIE et al., 1998)

Recentemente MARCHÈS et al. (2000) identificaram um novo tipo de intimina designada como ϵ , presente em linhagens de STEC isolados tanto em humanos, como em bovinos, pertencentes aos sorogrupos O8, O11, O45, O103, O121 e O165. A intimina ϵ é a maior, clonada até hoje, com 948 aminoácidos e apresenta grande identidade seqüencial total com a intimina β , embora a análise dos últimos 280 aminoácidos C-terminais sugere uma grande similaridade com as intiminas α e γ .

Há um intrigante fenômeno observado nos países em desenvolvimento, onde o isolamento de linhagens de STEC em casos de diarreias ocorre com a mesma frequência do que em outros países (GUTH et al., 2000, IRINO et al., 2000), porém não existem relatos de casos de HC e ou HUS associados à estas linhagens, sugerindo duas possibilidades, ou existe uma resistência imunológica em nossa população contra STEC, ou existe uma falha na detecção destes casos graves relacionados com estes patógenos.

1.3- IMUNOLOGIA DAS MUCOSAS

A superfície mucosa, que recobre o trato respiratório, intestinal e genito-urinário, possui uma série de mecanismos inespecíficos e específicos que podem prevenir a entrada de microrganismos para os espaços internos

INTRODUÇÃO

do organismo. Este conjunto de fatores compõe o Sistema Imune Secretor ou Sistema Imune das Mucosas (KAGNOFF, 1987).

Os mecanismos inespecíficos são compostos pela barreira promovida pelo muco, pela camada de glicocálice, pelo fluxo de secreções e excreções, pelo muco ciliar e peristáltico, que reciclam o conteúdo da luz e removem material não ligado à superfície epitelial, bem como por uma série de substâncias com atividade antimicrobiana, como lisozima, lactoferrina, o interferon e outras (KAGNOFF, 1987; STROBER & JAMES, 1991).

Além dos fatores de defesa inespecíficos, o sistema imune das mucosas possui o tecido linfóide associado às mucosas, denominado genericamente de MALT (Mucosal Associated Lymphoid Tissue). O conhecimento sobre as estruturas que compõe o MALT advém em grande parte dos modelos murinos. Estes modelos nos ajudam a compreender as interações celulares que ocorrem a nível do sistema imune das mucosas, embora muitas questões ainda estejam em aberto (STROBER & JAMES, 1991).

O MALT compreende o tecido linfóide presente nas mucosas dos ductos pancreático e biliar, ocorrendo uma rede de interações por meio de células linfóides que circulam entre vários sítios (PARMELY & BEER, 1977; BIENESTOCK et al., 1987; VAERMAN, 1987; HANSON & BRANDTZAEG, 1989). O MALT pode se apresentar como tecido linfóide organizado, formando áreas de acúmulo de tecido linfóide na submucosa, bem como de material linfóide difusamente espalhado entre as células epiteliais e na lâmina própria (STROBER & JAMES, 1991).

A região do MALT na mucosa brônquica é denominada de tecido linfóide associado aos brônquios ou BALT (bronchus-associated lymphoid tissue); e a região equivalente na mucosa intestinal é chamada de GALT (gut-associated lymphoid tissue). Nesses dois compartimentos encontram-se as áreas de tecido linfóide organizado, como as placas de Peyer no trato intestinal, principalmente na região ileal, apêndice e cólon. Nas outras áreas do MALT predomina uma distribuição de tecido linfóide ao longo da lâmina própria (KAGNOFF, 1987, STROBER & JAMES, 1991).

INTRODUÇÃO

As placas de Peyer são formadas por três regiões: 1) a cápsula composta de células epiteliais associadas ao folículo, ricas em antígenos de histocompatibilidade classe II e de células M, que mantém estreito contato com linfócitos adjacentes, parecendo ser um local de entrada de alguns microrganismos, como certos vírus; 2) o folículo formado pelo acúmulo de células na sua maioria linfócitos B IgA⁺; 3) a zona interfolicular T-dependente composta por linfócitos T alfa-beta CD4⁺ e CD8⁺ (na razão 2:1), macrófagos e células dendríticas (KAGNOFF, 1987; KRAEHENBUHL et al., 1988; STROBER & JAMES, 1991).

O tecido linfóide difuso é composto por linfócitos intraepiteliais (LIE) e linfócitos da lâmina própria. Em condições fisiológicas, há presença de 6 a 40 LIE por células epiteliais, havendo um aumento desse número no curso de processos inflamatórios. Linfócitos T intraepiteliais apresentam predominantemente o receptor gama-delta e fenótipo tipo CD2⁺, CD3⁺, CD4⁻, CD8⁻, cujos mecanismos de ativação e função efetora, ainda pouco conhecidos, parecem ser distintos daqueles apresentados pelos linfócitos T existentes na lâmina própria. Na lâmina própria ocorrem linfócitos B e T, plasmócitos, macrófagos, eosinófilos e mastócitos espalhados no tecido conjuntivo rico em vasos linfáticos e sangüíneos. O fenótipo dessa população celular é semelhante ao das células presentes nas placas de Peyer (KAGNOFF, 1987; STROBER & JAMES, 1991). Os linfócitos encontrados na lâmina própria apresentam moléculas de membrana com características de células em estado de ativação (com aumento da expressão do receptor para IL-2), sugerindo que essas regiões do MALT constituam locais de resposta imune eferente, por serem povoados por células pré-ativadas originárias do tecido linfóide organizado (STROBER & JAMES, 1991).

O tecido linfóide associado ao intestino (GALT) representa o maior acúmulo de linfócitos do organismo com síntese preferencial de S-IgA (IgA secretória) (HANSON et al., 1983b; MESTECKY & MCGHEE, 1987). Os anticorpos presentes nas mucosas interagem não apenas com microrganismos que chegam à luz, como também com materiais exógenos

INTRODUÇÃO

da dieta alimentar (BURGIO et al., 1980; MESTECKY et al., 1980; MCNABB & TOMASI, 1981; HANSON et al., 1983 ; KWASNISH & STROBER, 1983; MESTECKY & MCGHEE, 1987). Estudos realizados camundongos mostraram a ocorrência de um grande número de plasmócitos produtores de IgAs espalhado ao longo do duodeno e jejuno. No homem, estas regiões são responsáveis pela absorção de antígenos alimentares e podem ser colonizadas por alguns microrganismos patogênicos (KAGNOFF, 1987).

A produção diária de IgAs, nas mucosas, excede a todas as outras classes de imunoglobulinas , porém a sua vida média é a mais curta. Ela é encontrada na forma de duas subclasses: IgA₁ e IgA₂. A IgA₁ possui na região da dobradiça, uma sequência de aminoácidos que podem ser clivados por proteases bacterianas. Esta sequência está ausente na IgA₂. No GALT, 35% a 60% das células são produtoras de IgA₂, com predomínio no íleo e no intestino grosso. Na glândula salivar, 37% dos linfócitos B são IgA₂⁺ (MESTECKY et al., 1980; MCNABB & TOMASI, 1981; KAWANISHI & STROBER, 1983; TOMASI & PLAUT, 1985; BRANDTZAEG et al, 1987). Acredita-se que a IgA, seja, evolutivamente, a mais nova das imunoglobulinas e a IgA₂ Ter surgido após a IgA₁, devido às pressões evolutivas exercidas pela interação com a microbiota. Esta idéia é sugerida pelo fato da estrutura lipolissacarídica (LPS) das bactérias gram-negativas induzir, preferencialmente, a síntese de IgA₂. Além disso, a IgA₂ possui na composição de seus carboidratos uma quantidade maior de resíduos de manose do que a IgA₁ (CONLEY & DELACROIX, 1987; MESTECKY & MCGHEE, 1987; HANSON & BRANDTZAEG, 1989; LADJEVA et al., 1989). A existência dos resíduos de manose na estrutura pode inibir a aderência bacteriana, pois a manose é um importante açúcar com provável envolvimento no mecanismo de ação bacteriana por meio de fímbrias (OFEK et al., 1977, WOLD et al., 1990).

As mucosas formam a via natural de entrada de antígenos que podem penetrar através dos epitélios associados aos folículos (células M), permitindo assim a interação com células acessórias residentes (macrófagos

INTRODUÇÃO

e células dendríticas) e com as células linfóides (TOMASI & PLAUT, 1985; BRANDTZAEG et al., 1987; MESTECKY & MCGHEE, 1987).

As bactérias são capazes de se fixar e de crescer na maioria das superfícies. Sabe-se, atualmente, que o primeiro passo para o estabelecimento de um processo infeccioso é o contato do microrganismo com a camada de muco que recobre a superfície epitelial de uma mucosa do hospedeiro. A aderência da bactéria a esse tecido requer o estabelecimento de ligações específicas entre estruturas complementares existentes na superfície da bactéria e da célula epitelial. Assim, certas espécies patogênicas de *Mycoplasma* aderem a células epiteliais da traquéia. A capacidade de aderir a células de mucosa também parece ser fator importante na colonização da nasofaringe por *Streptococcus pneumoniae* e por *Haemophilus influenzae*, precedendo a otite média. Estudos realizados com roedores mostraram que amostras altamente patogênicas de *Streptococcus mutans* são importantes como fator etiológico da cárie dentária, com formação de grandes massas bacterianas na superfície dos dentes, ao contrário das não patogênicas. Amostras virulentas de *Shigella* e *E. coli* enteropatogênica comportam-se de maneira semelhante, aderindo à superfície do intestino delgado melhor do que amostras não virulentas (HUSBAND, et al., 1996).

Atualmente tem sido considerado o conceito de que a adesão dos microrganismos à mucosa intestinal facilita a sua resistência ao peristaltismo, possibilitando a colonização no trato gastrointestinal e, conseqüentemente, a ação de outros fatores de virulência característicos de cada um dos enteropatógenos. Esta aderência é feita por meio de fímbrias ou estruturas protéicas filamentosas distintas dos flagelos, que estão dispostas em toda a superfície da bactéria, freqüentemente em número de 100 a 200 por célula. Estas estruturas atuam como adesinas que ligam a bactéria a receptores específicos na superfície das células epiteliais da mucosa intestinal. As fímbrias têm sido classificadas em sensíveis (MSHA) ou resistentes (MRHA) a D-manose de acordo com a capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies (HAGBERG et al., 1981).

INTRODUÇÃO

A aderência íntima à mucosa do intestino delgado tem sido reconhecida como característica importante na colonização intestinal por EPEC.

Diante de tais evidências é possível perceber que fatores capazes de interferir na adesão bacteriana apresentam potencial efeito protetor. Impossibilitada de aderir, a bactéria pode ser eliminada por outros mecanismos inespecíficos de defesa, tais como : o movimento peristáltico, o transporte mucociliar e o fluxo urinário. Pode-se até aceitar que o controle dessas infecções poderia ser feito, prioritariamente, pela melhoria da qualidade de vida da população como o suprimento adequado de água, noções básicas de higiene como parte de um programa de melhoria do sistema educacional. Poderia, ainda, ter uma abordagem curativa como a terapia de reidratação oral, não havendo concordância apenas com o uso da antibioticoterapia devido às elevadas incidências de bactérias resistentes, levando à redução da eficiência do tratamento. Entretanto, não existem dados conclusivos que comprovam a eficácia dos tratamentos existentes e conseqüente redução da intensidade e duração do episódio diarréico, exceto em casos específicos como, por exemplo, os causados por parasitos como giárdia e ameba (BLACK, 1993).

Nos países em desenvolvimento como Brasil, o contínuo e desordenado crescimento populacional, a constante falta de recursos e uma política governamental dúbia em relação à saúde pública, deixaram evidente que ferramentas que possam inibir o mecanismo de patogenicidade das bactérias, como a adesão no caso da EPEC, contribuiriam para a erradicação das diarréias infecciosas. Tudo isso leva a crer que uma abordagem preventiva baseada em vacinas seria uma alternativa eficaz (BLACK, 1993). Portanto, vacinas contra diarréias capazes de estimular preferencialmente o sistema imunológico de mucosas possuem a capacidade de proteger o indivíduo na etapa inicial do processo infeccioso (MUCMLUSKIE & DAVIS, 1999)

O principal obstáculo para o desenvolvimento de vacinas contra as doenças diarréicas é a grande diversidade de alvos. Vários agentes

INTRODUÇÃO

patogênicos (vírus, bactérias e parasitas) podem levar ao quadro diarreico e todos apresentam uma grande complexidade antigênica. Isso faz crer que uma única vacina eficaz contra todos os tipos de diarreia nunca será obtida, mas provavelmente um conjunto de vacinas, cada uma delas específica para um ou alguns patógenos causadores de diarreia, permitirá reduzir ou eliminar essa doença em um futuro não muito longínquo (SANSONETTI, 1998).

Vários são os agentes causadores de diarreias, entre os quais se incluem parasitas como amebas e giárdias, vírus (rotavírus) e diversas espécies de bactérias. A Organização Mundial de Saúde considerou como principais agentes patogênicos causadores de diarreia os seguintes microrganismos: *rotavírus*, *Shigella*, *Vibrio cholerae*, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *Salmonella typhi*, *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) e *Entamoeba histolytica*. Esses patógenos representam, portanto, os principais alvos para o desenvolvimento de vacinas anti-diarreia (SANSONETTI, 1998).

A diversidade e a complexidade antigênica dos agentes causadores de diarreia são enormes. Em alguns casos, variantes sorológicos de uma mesma bactéria podem causar diarreias com intensidade, duração e gravidade características. Frequentemente, essas diferenças refletem estratégias ou mecanismos específicos de virulência, como a habilidade de colonizar ou de invadir o epitélio intestinal ou, ainda, a produção de toxinas. Em alguns casos, diferentes sorotipos e sorogrupos (definidos pela composição antigênica do envoltório celular) de uma mesma espécie bacteriana podem levar à diarreia. O exemplo mais conhecido é representado pela *E. coli*. Linhagens patogênicas de *E. coli* podem causar doenças tão distintas como meningite, infecção urinária e diarreias (LÁSARO et al., 2000).

Aliada à grande diversidade de patógenos e antígenos-alvo, o desenvolvimento de vacinas contra a diarreia deve levar em consideração ainda outros aspectos, como a definição do perfil dos potenciais usuários (turistas, militares ou crianças), o tipo de resposta imune a ser ativada e,

INTRODUÇÃO

consequentemente, a via de inoculação. A ativação do sistema de mucosa pode conferir maior grau de proteção para diarreias causadas por muitas bactérias e rotavírus que não invadem o epitélio intestinal. Para estes patógenos, as vacinas mais eficazes devem ser baseadas em formulações administradas pela via oral e constituídas por microrganismos mortos ou atenuados. Por outro lado, vacinas capazes de ativar respostas sistêmicas, humorais ou citotóxicas devem ser mais eficazes contra parasitas e bactérias invasoras como *S. typhi*. Para estes patógenos, as vacinas mais recomendadas devem se basear em antígenos purificados, administrados por via parenteral (intramuscular ou subcutânea) (SANSONETTI, 1998).

A constatação de que a inoculação de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) em induzir potente resposta imune contra o(s) antígeno(s) codificado(s), tem conduzido uma nova estratégia a ser utilizada no campo do desenvolvimento de vacinas (SILVA, 1997; AZEVEDO, 1999). Basicamente, a estratégia consiste em criar plasmídeos bacterianos capazes de codificar antígenos sob o controle de promotores eucarióticos fortes. Plasmídeos purificados são administrados por via parenteral em soluções salinas (via intramuscular) ou aderidos a partículas de ouro injetadas na derme com auxílios de pistolas ("gen-gun"). Vacinas de DNA administradas por via parenteral ativam forte resposta imune sistêmica, humoral ou celular contra o antígeno produzido por células que receberam o plasmídeo recombinante. Entretanto, o desenvolvimento de vacinas contra diarreias baseadas em plasmídeos tem sido limitado pela incapacidade de estimular o sistema imune de mucosas de forma eficiente.

Recentemente, ALVES et al., 1999 a,b, demonstraram que vacinas de DNA são capazes de levar à expressão do CFA/I em células de mamíferos transfectadas com plasmídeos recombinantes; entretanto, animais imunizados com o pRECFA não foram capazes de produzir quantidades significativas de S-IgA contra CFA/I (ALVES et al., 1999a,b)

Uma alternativa interessante e promissora para a produção de vacinas de DNA capazes de estimular o sistema imune de mucosas, baseia-se no uso de bactérias atenuadas como transportadoras dos plasmídeos

INTRODUÇÃO

vacinais aos sítios indutores do sistema imunológico de mucosa. Trabalhos recentes demonstram que linhagens avirulentas de *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, quando administradas por via oral, podem introduzir plasmídeos nas células do hospedeiro atuando como verdadeiras “seringas celulares”. Essas bactérias são atenuadas em genes envolvidos na síntese de metabólitos essenciais não disponíveis nos tecidos de mamíferos, portanto não conseguem sobreviver no hospedeiro, mas permanecem no organismo o tempo suficiente para induzir resposta imune sistêmica e secretora (DIETRICH et al., 1999)

Na procura de possíveis soluções para melhorar o desempenho do plasmídeo, como uma vacina de DNA eficaz contra diarreia, o uso de protocolos de vacinação combinados, nos quais a vacina de DNA atuaria como estímulo, sensibilizaria tanto o sistema imunológico sistêmico como o sistema secretor do indivíduo. Uma segunda vacina administrada por via oral, constituída, a exemplo de um trabalho realizado, por uma linhagem atenuada de *Salmonella typhimurium* capaz de expressar o CFA/II de ETEC como antígeno intracelular (GUILLOBEL et al., 1998), atuaria como reforço específico para a ativação do sistema imunológico de mucosas. Espera-se, com este procedimento, um efeito sinérgico sobre as respostas imunológicas induzidas por essas vacinas, pois se acredita que a vacina de DNA, administrada por via parenteral, garantiria uma resposta sistêmica forte e duradoura, enquanto que a vacina oral, representada pela bactéria transportadora do antígeno pré-formado, atuaria como estímulo para a ativação preferencial do sistema imune de mucosas (LÁSARO et al., 2000).

Alguns autores observaram que a exposição primária da mucosa a alguns antígenos, com subsequente “booster” por via parenteral, confere imunidade local, ao passo que a sensibilização inicial por via parenteral leva a supressão na mucosa por longo período de tempo (OGRA et al., 1983, BIENESTOCK et al., 1987, MESTECKY, 1987).

A falta de um modelo experimental de infecção em pequenos animais dificulta o uso de ensaios de desafio com EPEC. Embora esses ensaios se constituam no padrão de avaliação experimental de candidatos vacinais, o

INTRODUÇÃO

uso de outros sistemas de avaliação permitem um potencial de relevância nas respostas induzidas nos casos cujos desafios não são viáveis.

Nos últimos 10 anos, um grande progresso tem sido observado na tentativa de se esclarecerem os mecanismos em humanos infectados com EHEC e EPEC em vista da descoberta de LEE e do esclarecimento subsequente da importância da intimina, Tir e Esps em propiciar a lesão A/L, e a EPEC e EHEC têm sido considerada como um modelo para estudar o aparelho de secreção tipo III e a patogênese bacteriana (FRANKEL et al., 1998, DONNENBERG & WHITTAM, 2001,). Entretanto, a maioria desses estudos foi realizada “in vitro”. Em estudos com voluntários, o papel da intimina, pili e EspB na patogenicidade de EPEC foi estudado (DONNENBERG et al., 1993 a, BIERBER et al., 1998, TACKET et al., 2000). Estudos utilizando-se voluntários para a cepa EHEC não são realizados “in vivo” devido à alta patogenicidade observada, comparando-se com EPEC.

Modelos animais como coelhos, porcos e gado bovino vêm sendo usados para estudar a função da intimina, Tir, EspA e EspB nas infecções por EPEC e EHEC (DONNENBERG et al., 1993 b, TZIPORE et al., 1995, ABE et al., 1998, DEAN-NYSTROM et al., 1998, MARCHES et al., 2000). Entretanto, esse tipo de estudo é limitado devido ao custo e complexidade. Vários fatores de virulência identificados em patógenos que causam lesão A/E e a importância da doença ainda precisam ser estudados num modelo relevante e prático.

Recentemente, DENG et al., (2001) demonstraram que a bactéria *Citrobacter rodentium* é o único patógeno conhecido para A/E e serve como modelo para infecção por EPEC e EHEC em camundongos. Nesse trabalho, os autores relataram a homologia da sequência de DNA do *C. rodentium* com EHEC e EPEC. Os resultados mostraram que LEE (*locus of enterocyte effacement*) foi adquirido, pelo *C. rodentium* e cepas de *E. coli* que causam a lesão A/E, independentemente durante a evolução.

Considerando as evidências, pode-se constatar que existem na literatura numerosos estudos sobre os mecanismos de patogenicidade

INTRODUÇÃO

quanto às características de estrutura dos principais fatores de virulência de *E. coli*. Entretanto, a resposta imune do hospedeiro permanece insuficientemente caracterizada e poucos são os trabalhos relacionados sobre o estudo da imunidade. Sendo assim, decidiu-se estudar a resposta imune em camundongos BALB/c levando-se em consideração a via natural de entrada de *E.coli* que foi realizada na tentativa de comparar a resposta imune em camundongos, inoculados com esse patógeno pela via intragástrica e via intramuscular.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

2-OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visou o estudo da resposta imune em camundongos inoculados com bactérias vivas ou mortas por diferentes vias, utilizando a cepa de *E. coli* O86:H34 e a protótipo de *E. coli* O127:H6 de EPEC.

2.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudo da cinética de produção de anticorpos dos isótipos G, M e A presentes no soro de camundongos inoculados com cepas de *E. coli* O86:H34 vivas ou mortas.
- Avaliação da especificidade dos anticorpos IgG produzidos por diferentes vias de imunização utilizando a cepa de *E. coli* O127:H6 mutantes para antígenos de superfície.
- Estudo da reatividade específica e cruzada para antígenos de *E. coli* O86:H34 e O157:H7 por meio de ELISA e “*Immunoblot*”.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1-Cepas de bactérias

Nas imunizações foi utilizada a cepa de *E. coli* isolada de fezes de crianças com diarreia, provenientes de regiões do Estado de São Paulo (IRINO et al., 1984). Essa cepa pertencente ao sorotipo O86:H34 e previamente descrita com o padrão de aderência típico de EPEC (Fig1A), foram também analisadas quanto a. características genotípicas e fenotípicas relacionadas a fatores de virulência (GUILARDI, 1999, GUILARDI, 2001). Foi obtida do Setor de Enterobactérias da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e, gentilmente, cedida pela Dra. Angela Cristina Rodrigues Guilard. A amostra foi mantida em ágar-conservação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As cepas O157:H7 (ATCC) e K12 (DH5 α) foram fornecidas pela Seção de Coleção de Cultura do Instituto Adolfo Lutz. Além desta, a amostra protótipo de *E. coli* O127:H6 (E2348/69) foi gentilmente cedida pela Dra. Tânia A.T. Gomes da Escola Paulista de Medicina da (UNIFESP). As linhagens mutantes de *E. coli* a partir de uma EPEC O127:H6 (E2348/69), para diferentes antígenos, foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jorge A. Girón da Universidade de Puebla-México.

- E2348/69 (fliC- km^R) com deleção de *fliC*

-E2348/69 (Δ *tir*) com deleção de *tir*

-E2348/69 (*escN*-) mutante de *escN*. (aparelho secretor tipo III) (JARVIS et al., 1995)

-CVD 206 E2348/69 (Δ *eaeA*) com deleção de *eaeA* (DONNENBERG & KAPER, 1991)

-UMD872 (Δ *espA* km^R) com deleção *espA* (KENNY et al., 1996)

-UMD 864 (Δ *espB*) com deleção de *espB* (DONNENBERG et al., 1996)

-UMD 870 (Δ *espD* km^R) com deleção de *espD* (LAI et al., 1997)

-JPN15 curada do plasmídeo EAF (JERSE et al, 1991)

Fig 1 A- *E. coli* O86:H34 apresentando padrão de aderência localizada (AL). Teste de adesão em células HeLa (De Gaspari et al, 1996).

Fig 1B- *E. coli* O86:H34 apresentando padrão não aderente em teste de adesão em células HeLa.

MATERIAL E MÉTODOS

3.2- Crescimento Bacteriano

Todas as amostras foram cultivadas em estufa bacteriana (Revco Scientific- USA) a 37°C em caldo Luria- Bertani (LB) (Gibco Life-Technologies, NY, USA) ou ágar MacConkey (MC) (Difco Laboratories, Detroit, USA). As preparações antigênicas das EPEC mutadas foram feitas a partir de culturas de 15-18 horas em 10mL de meio LB. Os meios de cultura foram preparados conforme especificações do fabricante. As culturas em meio líquido foram incubadas sob agitação constante entre 180 a 200rpm a 37°C durante 15-18 horas. Foram feitos novos repiques das cepas bacterianas numa diluição de 1:5 para 10mL do meio LB e novamente incubadas sob agitação como descrito anteriormente. Adicionou-se 30µg/mL de Kanamicina (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia) aos meios em que foram crescidas as cepas E2348/69 *flic*-, UMD872 (Δ *EspA*) e UMD 870 (Δ *EspD*). As culturas bacterianas foram centrifugadas a 5000rpm, a 4°C por 10 minutos e ressuspensas em PBS em diluição suficiente para se obter densidade ótica igual a 1, em comprimento de onda de 650nm no espectrofotometro (CELM, E2000-250) e correspondente a 9×10^9 bactérias por mL. As amostras foram estocadas como descritas anteriormente.

3.3-SOROTIPAGEM

O sorotipo da cepa de *E. coli* O86:H34, isolada de fezes de crianças com diarreia, foi determinado no Setor de Enterobactérias da Seção de Bacteriologia do IAL pela Dra. Kinue Irino. A determinação do antígeno somático (O) e do antígeno flagelar (H) foi realizado segundo a técnica descrita por EDWARDS & EWING (1972). Os anti-soros para determinação dos antígenos somático e flagelar, utilizados neste estudo, foram produzidos na Seção de Bacteriologia do I A L.

MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1- Determinação do antígeno somático

O antígeno somático foi determinado pela técnica de soroaglutinação em lâminas e o título de aglutinação foi estabelecido com anti-soro específico para o antígeno O. Para este procedimento a amostra foi crescida em TSB (Tryptic Soy Broth)(Difco Laboratories Detroit, USA) a 37°C durante 18 horas, e, então, foram selecionadas as colônias lisas da bactéria.

3.3.2-Determinação do antígeno flagelar (H)

Para determinação do antígeno H, a amostra foi ativada pela semeadura por repiques sucessivos em tubos em forma de U contendo meio semi-sólido (Meio de Svengard 0,3% de ágar) (Difco Laboratories Detroit, USA) onde se inoculou a cepa em uma das extremidades do tubo e incubada a 37°C. Após esta etapa, a amostra foi semeada em 4mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion-Difco), e incubada durante 18 horas. Em seguida, foi acrescentado formaldeído na concentração final de 5% e incubado por um período de 30 minutos; a seguir foi feita a diluição segundo a escala 3 de MacFarland com SSF (Solução Fisiológica contendo formol (Merck) a 0,5%). Para realização de técnica de aglutinação em tubo, como recomendado por EDWARDS & EWING (1972), foram utilizados os anti-soros polivalentes (A-F), preparados como descrito por GROSS & ROWE (1995) e também os anti-soros monovalentes específicos. Os anti-soros polivalentes são constituídos pelos seguintes anti-soros monovalentes, como descritos a seguir:

Polivalente A:	H1, H2, H3, H11, H12, H21, H30, H31 e H32
Polivalente B:	H4, H5, H6, H7, H8, H10, H23 e H55
Polivalente C:	H9, H14, H15, H16, H17, H18, H19, H54 e H56
Polivalente D:	H20, H24, H25, H26, H27, H28, H29 e H33
Polivalente E:	H34, H35, H36, H37, H38, H39, H40, H41 e H42
Polivalente F:	H43, H44, H45, H46, H47, H49, H51, H52 e H53

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C e a leitura foi feita após os períodos de 30, 60 e 120 minutos.

3.4-ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

As suspensões bacterianas de *E. coli* foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), sob condições redutoras, em sistema descontínuo seguindo-se o procedimento descrito por LAEMMLI, 1970. Esta técnica foi executada para caracterizar a composição peptídica dos extratos antigênicos utilizados no presente estudo.

3.4.1-Preparo de Placas

Foram utilizadas placas de vidro com dimensões de 9,5 x 9,5 cm, sobrepostas entre espaçadores de 1mm de espessura colocadas nas extremidades laterais e inferior da placa. O gel de separação foi preparado a 13%. Adicionou-se o gel de separação até uma altura de 5,5 cm da placa e acrescentou-se cerca de 1,5 cm de água, gota a gota. Após aproximadamente 40 minutos, foi obtida a polimerização do gel. Em seguida, foi retirada a água por inversão da placa e adicionado o gel de empilhamento até o nível próximo do topo da placa. Foi inserido o pente, que logo após a polimerização, foi cuidadosamente retirado. Após a polimerização do gel de empilhamento, foi removido o espaçador inferior e a placa foi aderida à cuba de corrida eletroforética. O tampão de corrida (Tris-hidroximetilaminoetano 0,075M, glicina 0,576M e SDS 0,15, pH=8,3) foi adicionado e as amostras foram aplicadas. As corridas eletroforéticas foram feitas no aparelho da Bio-Rad (modelo 200/2.0 - MO, USA), sendo iniciadas a 50V (cerca de 15mA) até o empilhamento das amostras no início do gel de separação. Em seguida, a voltagem foi aumentada e mantida a 100V, até o final da corrida eletroforética.

MATERIAL E MÉTODOS

3.4.2-Preparo das amostras usadas em SDS-PAGE

As preparações antigênicas de *E. coli* foram constituídas por suspensões bacterianas mortas com formol ("whole cells") e suspensões bacterianas que foram submetidas ao tratamento por ultra-som (ULTRASONIC POWER UNIT-MSE,USA), em três intervalos de 1 minuto cada, a 1mA e 20KHz, em banho de gelo, correspondente àquelas na concentração determinada pela densidade ótica igual a 1 a 650nm ou componentes de superfície bacteriana (OMC).

As preparações antigênicas analisadas pela coloração por Coomassie Blue e utilizadas na técnica de "*Immunoblot*" foram centrifugadas a 5000 rpm e concentradas 5 vezes; posteriormente foram diluídas em solução de Tris-HCl 25mM, contendo glicina a 25%, SDS a 2%, 2-mercaptoetanol a 14,4mM e azul de bromofenol a 0,1%, aquecidos a 100°C por 5 minutos.

3.4.3-MÉTODO DE COLORAÇÃO

Coomassie Blue

Após a corrida eletroforética, o gel foi colocado em solução fixadora constituída de metanol a 50% e ácido acético a 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente e corado com Coomassie Phast Blue-R250 a 0,1% (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), a 56°C por 3 minutos e descorado três vezes com solução de ácido a acético a 7% a 56°C. Em seguida foram feitas várias lavagens com 200mL de água destilada.

3.5- PRODUÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL

Duas cepas bacterianas de *E. coli* enteropatogênica foram utilizadas no estudo, uma pertence ao sorotipo O86:H34 e a outra O127:H6.

As suspensões bacterianas vivas (na concentração de 9×10^9 CFU/ mL), diluídas em tampão PBS, foram utilizadas para inocular animais pela via

MATERIAL E MÉTODOS

intragástrica; as suspensões mortas em formol a 1% na mesma concentração bacteriana, foram utilizadas para imunização de camundongos pelas vias intragástrica e intramuscular.

Foram utilizados, 5 grupos de 10 camundongos da linhagem BALB/c pesando entre 18 a 21g. Para a inoculação intragástrica, utilizou-se uma agulha de entubação curva com ponta esférica com formato de pêra (Sigma Chemical Company, USA). A alimentação e água foi suspensa nas duas horas que antecederam o procedimento da inoculação de bactérias vivas ou mortas. Os animais foram sangrados pelo plexo oftálmico para obtenção de soro normal, que foi utilizado como controle do presente estudo. Após a inoculação, os animais permaneceram por mais 1 hora sem alimentação e água. As amostras de sangue dos camundongos foram colhidas pelo plexo oftálmico no 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º dias após inoculação, para o grupo no qual as bactérias foram administradas vivas pela via intragástrica; no 7º, 14º, 21º e 28º dias após inoculação no grupo de camundongos imunizados pela via intragástrica e no 14º, 21º e 28º dia após inoculação no grupo de camundongos imunizado pela via intramuscular.

Esquema de inoculação

Via intragástrica (bactérias vivas ou mortas): Os animais imunizados receberam quatro doses, sendo três doses de 100µL da suspensão bacteriana (9×10^9 bactérias/mL) isto é, 9×10^6 bactérias, e uma dose reforço com 200µL (18×10^6 bactérias); as inoculações foram feitas em intervalos de 8 dias. Os animais, inoculados com bactérias vivas, receberam 4 inoculações de 100µL da suspensão bacteriana viva (9×10^6 bactérias), como descrito anteriormente.

Via intramuscular (imunização): Os animais receberam duas doses de uma suspensão de 9×10^9 bactérias/mL, sendo a primeira inoculação de 50µL da preparação antigênica contendo 4.5×10^6 bactérias tratadas por ultra-som (como

MATERIAL E MÉTODOS

citado no ítem 3.4.2) e emulsificada v/v em adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA); a dose reforço de 100 μ L (9x10⁶ bactérias) foi emulsificada v/v em adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), e administrado em intervalo de 20 dias.

Preparo de antígeno

-Via intragástrica: 1mL da suspensão bacteriana na concentração correspondente a D.O igual a 1 a 650nm vivas ou mortas por formol a 1%, foi centrifugada a 5000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspense em 1mL de solução de bicarbonato de sódio a 1%.

-Via Intramuscular: 1,5mL da suspensão bacteriana na concentração correspondente a D.O igual a 1 a 650nm e mortas por formol a 1% foram lavadas duas vezes com PBS a 5000 rpm e ressuspensa em PBS estéril. A suspensão foi submetida ao tratamento por ultra-som (ULTRASONIC POWER UNIT- MSE,USA) em três intervalos de 1 minuto cada, a 1mA e 20KHz, em banho de gelo. Em seguida, foi emulsificada v/v com adjuvante completo de Freund (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) na primeira inoculação e adjuvante incompleto de Freund (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) na segunda dose.

Grupos experimentais: Os animais utilizados foram divididos em 5 grupos de 10 animais:

INOCULADOS COM *E. COLI* O86:H34 VIVAS

Grupo I: Camundongos foram inoculados pela via intragástrica com 100 μ L de suspensão bacteriana da cepa O86:H34 viva em PBS.

Os animais infectados foram mantidos separados sob condições especiais, em caixas de policarbonato com filtro (Nalgene- PCG- Scientifics-

MATERIAL E MÉTODOS

USA).

IMUNIZADOS COM *E. COLI* O86:H34 E O127:H6 MORTAS

Grupo II: Camundongos foram imunizados pela via intragástrica com 100µL de suspensão bacteriana da cepa O86:H34 morta em formol a 1%.

Grupo III: Camundongos foram imunizados pela via intramuscular com 50µL de suspensão bacteriana da cepa O86:H34 morta em formol a 1% e em emulsão com adjuvante completo de Freund.

Grupo IV: Camundongos foram imunizados pela via intragástrica com 100µL de suspensão bacteriana da cepa O127:H6 morta em formol a 1%.

Grupo V: Camundongos foram imunizados pela via intramuscular com 50µL de suspensão bacteriana da cepa O127:H6 morta em formol a 1% e em emulsão com adjuvante completo de Freund.

3.6- ELISA -“ENZYMELINKED IMMUNOSORBENT ASSAY”

O procedimento utilizado foi baseado na técnica de ABDILLARDI & POOLMAN (1987) com algumas modificações. As placas de microtitulação de fundo chato (Nalgene Nunc International, NY, USA) foram sensibilizadas com 100µL das suspensões bacterianas (“whole cells”) de *E. coli* O86:H34, E2348/69 O127:H6, E2348/69 (*flic- km^R*), E2348/69 (Δ *tir*), E2348/69 (*escN*), CVD 206, UMD872, UMD 874, UMD 870, JPN15 e O157:H7) diluídas em PBS numa concentração correspondente à leitura de densidade ótica igual a 1,0 a 650nm. Foi feita a incubação durante 15-18 horas a 37°C, então, lavadas 5 vezes durante 5 minutos cada com PBS contendo Tween a 0,01%. Após incubação, os sítios ativos das placas foram bloqueados com 200µL/cavidade com leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé do Brasil) a 37°C por 60 minutos. As placas foram novamente lavadas 5 vezes durante 5 minutos cada, com PBS contendo Tween. As amostras de soros de camundongos inoculados

MATERIAL E MÉTODOS

com bactérias vivas ou imunizados foram diluídas em série na razão 2 em solução contendo leite desnatado a 2,5%. E, então, adicionadas no volume de 100µL/cavidade. As placas foram incubadas a 37°C durante 120 minutos. As placas foram novamente lavadas por 5 vezes e 100µL/cavidade de soros anti-IgG, anti-IgA e anti-IgM cadeia pesada específicas (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) marcados com peroxidase foram adicionados nas diluições de 1:2000 para conjugados anti-IgG, IgA e IgM, de acordo com a prévia titulação em bloco. As placas foram incubadas novamente a 37°C por 2 horas, lavadas e reveladas com 100µL/ cavidade de solução cromógena contendo 250µL de TMB (Trimetilbenzidina) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) + 12,5mL tampão citrato-fosfato + 2,5µL de H₂O₂ a 30% por um período de 20 minutos. A reação enzimática foi interrompida com 100µL de solução de H₂SO₄ a 1N. Para se determinar o limite de reatividade do ELISA ("cut-off") foi analisada a amostra de soro normal de cada grupo experimental, para os isótipos IgG, IgA e IgM. Foram consideradas positivas as amostras com leituras de D.O. maiores ao maior título apresentado pelos soros normais. E, para auxiliar o entendimento dos resultados, utilizou-se métodos proporcionais e empregou-se razão entre os valores da amostra e um valor médio de um grupo de amostras não reagentes (soro normal).

Os limiares de reatividade foram determinados para cada cepa na detecção das classes IgG, IgM e IgA induzidas por diferentes vias de imunização, com o intuito de obter a máxima descrição entre a reatividade com as diferentes cepas de *E. coli* utilizadas.

3.7- "COLONY BLOT"

Para o ensaio de "colony blot" as bactérias foram plaqueadas e distribuídas de maneira homogênea com alças do tipo L (Drigalsky) em uma

MATERIAL E MÉTODOS

placa de Petri contendo ágar Müeller-Hinton (Difco Laboratories Detroit, MI, EUA). Após crescimento de aproximadamente 15-18 horas foi preparada uma suspensão bacteriana com o objetivo de se obter uma concentração correspondente a DO igual a 1 a 650nm. As suspensões bacterianas foram diluídas, plaqueadas e incubadas a 37°C durante 15-18 horas. No dia seguinte, as membranas de nitrocelulose de 90mm de diâmetro e porosidade de 0,45µm (Millipore) foram colocadas em contato com as placas para se obter uma cópia das bactérias crescidas. Após a obtenção das cópias das bactérias presentes nas placas, as membranas foram incubadas a 37°C por 10 minutos e armazenadas a 4°C. O bloqueio dos sítios ativos das membranas foi realizado com leite desnatado a 5% (Molico) durante duas horas. Após a lavagem das membranas com tampão PBS pH 7,4, as amostras de soros obtidos dos diferentes protocolos foram diluídas a 1:2000 (para pesquisa de IgG) e a 1:250, (para pesquisa de IgA e IgM) e incubadas durante 16-18 horas a 4°C. A seguir, novas lavagens com PBS foram realizadas e os soros anti-imunoglobulina específicas IgG, IgM e IgA (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) conjugados com peroxidase foram adicionadas na diluição de 1:2000 em solução de leite desnatado a 2,5% e incubados durante duas horas. A reação foi revelada utilizando-se DAB (5mg de DAB+ 30mL de tampão PBS+ 150µL de H₂O₂) para IgG e AEC 4% (2,6mL de AEC+ 40mL de solução de acetato de sódio +40µL de H₂O₂) para revelação de anticorpos IgA e IgM.

Membranas e diluições bacterianas

Esta técnica foi inicialmente realizada com 3 membranas diferentes da marca Millipore (Nitrocelulose, HATF e GVWP).

Com o objetivo de se obter uma suspensão bacteriana, onde as colônias pudessem ser plaqueadas isoladamente, foi utilizada a suspensão bacteriana correspondente a D.O igual a 1 em diluição a 1:50.000 em PBS estéril.

MATERIAL E MÉTODOS

3.8- "IMMUNOBLOT"

Após a eletroforese, o gel foi retirado cuidadosamente das placas e mergulhado inicialmente em tampão de transferência (Tris-hidrometilaminoetano 25mM, glicina 192mM, e metanol 20%, pH=8,3) por 15 minutos. Foram utilizadas 12 folhas de papel de filtro nº2 e um papel de filtro nº1 (Wattman, England) mergulhadas em tampão de transferência. Foi feito um sanduíche com 6 papéis de filtro, a membrana de nitrocelulose, o gel e mais 6 papéis de filtro, todos previamente embebidos em tampão de transferência. Os peptídeos separados por SDS-PAGE foram transferidos do gel para membrana de nitrocelulose de 0,2µm (Millipore), segundo a técnica descrita por TOWBIN et al. (1979). A transferência foi processada por um período de 18 horas, a 50mA e voltagem constante de 17V (Bio-Rad Blot SD, MO, USA). Em seguida, a membrana foi corada com Ponceau-S a 0,5% (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) para controle da transferência. Após secagem, a membrana foi envolvida em papel de filtro, vedada em saco plástico e armazenada a 4°C, até o momento do uso. As membranas foram usadas no máximo após uma semana da transferência eletroforética.

A membrana de nitrocelulose foi lavada sob agitação contínua com PBS (Na_2HPO_4 0,0075M, NaH_2PO_4 0,0025M e NaCl 0,14M pH 7,2) e 0,05% Tween e, então, efetuou-se o bloqueio dos sítios ativos com leite desnatado a 5% (Molico, Nestlé do Brasil) em PBS por duas horas. Foram feitas novas lavagens, seguindo-se incubação de 16-18 horas a 4°C com a amostra de soro normal e soros obtidos de animais dos grupos I a VI diluídas a 1:1000 para pesquisa de IgG e a 1:100 para pesquisa de IgA e IgM, diluídos em solução de leite desnatado a 2,5% contendo detergente NP-40 (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) a 0,05%. Após as lavagens das membranas, foram adicionados os conjugados específicos: anti-imunoglobulina de camundongo marcado com peroxidase diluídos a 1:2000 [anti-IgG, IgA e IgM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA)] e incubadas por duas horas. Após a lavagem, foi

MATERIAL E MÉTODOS

adicionado o substrato constituído de 2,5mg de 4-cloro 1-naftol (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) ou 2,5mg de 3, 3'diaminobenzidina-DAB (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) + 30mL de PBS + 150 μ L de água oxigenada ou, ainda, AEC - Immuno Pure -R AEC-PIERCE: 2,6mL AEC+ 40mL de solução de acetato de sódio + 40 μ L H₂O₂. As reações enzimáticas foram interrompidas com lavagens em água.

Nos ensaios utilizando soro anti-BFP e anti-intimina de coelho cedidos pela Dra. Marina B. Martinez (FCF-USP) e Dra. Tânia A.T. Gomes (EPM) respectivamente, foram utilizados diluídos a 1:2000. Foi utilizado o anticorpo monoclonal de camundongo anti-IgG de coelho (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) diluído a 1:1000. Os “blots” foram feitos como descrito anteriormente com algumas modificações. Foi empregado PBS contendo Tween a 0,05%, tanto nas lavagens como nas diluições de anti-soros de coelho.

Os padrões de peso molecular usados foram: fosforilase b (94kDa), albumina bovina (67kDa), ovalbumina (43kDa), anidrase carbônica (30kDa), inibidor de tripsina (20kDa) e alfa-lactoalbumina (14,4kDa) (Armsham- Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia).

Os pesos moleculares (P.M.) das bandas reativas foram determinadas a partir da reação linear entre o log do PM e a migração relativa (RF) de proteínas padrões.

3.9- OBTENÇÃO DE COMPLEXO DE MEMBRANA EXTERNA BACTERIANA

Com a finalidade de analisar os complexo de membrana externa (OMC), as suspensões bacterianas de *Escherichia coli* de sorotipo O157:H7, crescidas em meio Müller Hinton, foram purificadas empregando-se a técnica descrita por NICOLAS et al. (1985) com algumas modificações. Resumidamente, as bactérias cultivadas em placas em placas durante 15-18 horas foram centrifugadas (10.000xg por 10 minutos a 4^oC) e o sedimento obtido foi ressuspenso em 20mL de PBS pH7,4. As bactérias foram aquecidas a 65^oC por

MATERIAL E MÉTODOS

30 minutos e agitadas em um banho a 37°C com pérolas de vidro por 30 minutos. Posteriormente, as bactérias foram centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos para remoção dos restos celulares. As proteínas do sobrenadante foram precipitadas com sulfato de amônio a 80% durante 16h a 4°C, sendo em seguida centrifugada a 18.000xg durante 90 minutos. O sedimento foi suspenso em 2mL de PBS e dialisado com o mesmo tampão durante 48h para retirada do sulfato de amônio. As proteínas foram analisadas em gel de SDS-PAGE a 13% e coradas por Coomassie Blue (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) na concentração de 15µg de proteína por "slot". As proteínas das preparações obtidas foram dosadas pela técnica de LOWRY et al. (1951).

RESULTADOS

4-RESULTADOS

4.1-Sorotipagem (Determinação do antígeno somático e flagelar)

A cepa de *E. coli* utilizada em nossos estudos apresentou o sorotipo O86:H34.

4.2- Caracterização antigênica por SDS-PAGE

A figura 2 mostra o perfil eletroforético de 11 preparações antigênicas de *E. coli* coradas por Coomassie BlueR-250 (Sigma Chemical Company, St. Louis, EUA) onde pode observar que as cepas de *E. coli* apresentam antígenos na faixa de 10 e 120kDa. Os antígenos de 30 a 45kDa foram predominantemente corados nas cepas analisadas.

Não foram observadas diferenças significativas no padrão de peptídeos das amostras bacterianas O86:H34 após tratamento pelo ultrassom, quando comparado com o padrão de amostras sem esse tratamento (Figura 3). Estas amostras foram utilizadas na imunização intramuscular dos camundongos.

Fig 2- SDS-PAGE 13% de suspensão bacteriana de *E. coli* na concentração correspondente a DO= 1.0, a 650nm. (1) O86:H34, (2) E2348/69 (O127:H6), (3) CVD 206 (Δ eae), (4) E2348/69 (Δ tir), (5) CVD 452 (Δ escN), (6) UMD 872 (Δ espA), (7) UMD 864 (Δ espB), (8) UMD 870 (Δ espD), (9) E2348/69 (flic-), (10) JPN15, (11) DH5 α , (12) Padrão de peso molecular. Coloração por Coomansie blue.

Fig 3- SDS-PAGE 13% de suspensões de *E. coli* O86:H34 submetidas ou não ao tratamento pelo ultra-som. (1) O86:H34 não submetidas ao ultra-som, (2) O86:H34 submetidas ao ultra-som, (3) Padrão de peso molecular. Coloração por Coomassie Blue.

RESULTADOS

4-3-ELISA

Os anticorpos IgG, IgA e IgM produzidos pelos camundongos inoculados com bactérias vivas ou imunizados foram quantificados, utilizando-se como antígeno “*whole cells*” de cepas de *E. coli* O86:H34. As amostras de soros utilizadas foram obtidas de grupos de animais experimentais, onde os camundongos foram individualmente sangrados pelo plexo oftálmico em diferentes dias. E, então feito um “pool” de soros dos animais dos respectivos grupos.

CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CAMUNDONGOS BALB/c INOCULADOS COM A CEPA DE *E. COLI* O86:34 VIVA, PELA VIA INTRAGÁSTRICA

Os anticorpos presentes no soro de camundongos foram analisados por meio de ELISA. Os animais foram inoculados com bactérias vivas pela via intragástrica e sangrados nos dias 7º, 14º, 21º, 28º, 35º e 42º.

A figura 4 apresenta detecção de anticorpos IgG e IgM a partir do 14º dia após inoculação com bactérias vivas. Houve uma diferença significativa entre os níveis dos anticorpos IgG, IgA e IgM produzidos. O nível de IgA está significativamente aumentado a partir do 28º dia, comparando com o nível de IgM já elevado a partir do 7º dia. Embora a via intragástrica tenha sido utilizada, um nível significativo de IgA só pode ser observado após a 4ª dose de administração do inóculo bacteriano.

Cinética da produção de anticorpos IgG, IgA e IgM em camundongos BALB/c após inoculação por via intragástrica com a cepa de *E. coli* O86:H34 viva

Figura 4- Detecção de anticorpos específicos dos isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos em diferentes dias após inoculação por via intragástrica com a cepa de *E. coli* O86:H34 vivas por meio de ELISA.

CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS PELA VIA INTRAGÁSTRICA COM A CEPA *E. COLI* O86:H34 MORTAS COM FORMOL

Os anticorpos presentes no soro de camundongos foram analisadas por ELISA. Os animais imunizados pela via intragástrica foram sangrados nos dias 7º, 14º, 21º e 28º após a inoculação.

Na fig 5 estão representados os níveis de anticorpos IgG, A e M detectados a partir do 7º dia após imunização dos camundongos, isto é, a partir da primeira dose do antígeno inoculado. Os níveis de anticorpos IgG e IgM foram maiores nos soros de camundongos nos diferentes dias após a imunização, quando comparados com IgA. No 7º dia após a imunização, o nível de anticorpo IgM presente no soro foi maior do que os anticorpos IgG e IgA.

Cinética da produção de anticorpos IgG, IgA e IgM em camundongos BALB/c após imunização por via intragástrica com a cepa de *E. coli* O86:34

Figura 5- Detecção por meio de ELISA de anticorpos específicos dos isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos em diferentes dias após imunização por via intragástrica com a cepa de *E. coli* O86:H34 mortas por formol.

CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS EM CAMUNDONGOS BALB/c IMUNIZADOS PELA VIA INTRAMUSCULAR COM A CEPA *E. COLI*/O86:H34 SUBMETIDAS AO TRATAMENTOS POR ULTRA-SOM.

Os animais imunizados pela via intramuscular foram sangrados pelo plexo oftálmico nos dias 14º, 21º e 28º após a imunização.

Na figura 6 observa-se que a partir do 14º dia, os níveis de anticorpos IgG e IgM puderam ser detectados comparando-se com IgA, cujos títulos significativos foram detectados apenas a partir do 28º dia após a imunização, isto é, após a dose reforço.

Cinética da produção de anticorpos IgG, IgA e IgM no soro de camundongos BALB/c após imunização por via intramuscular com a cepa de *E. coli* O86:H34

Figura 6- Detecção por meio de ELISA de anticorpos específicos dos isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos em diferentes dias após imunização por via intramuscular com a cepa de *E. coli* O86:H34 mortas por formal.

RESULTADOS

Com o avanço das técnicas de engenharia genética foi possível obter-se bactérias mutantes, onde houve deleções de genes que codificam várias proteínas importantes no mecanismo de patogenicidade dessas bactérias.

Dentre as amostras analisadas no presente estudo foram selecionadas aquelas que apresentaram maior título de anticorpos, dentro de cada grupo experimental analisado. Estas amostras foram, posteriormente, utilizadas nos ensaios de ELISA, quando foi possível identificar o direcionamento da resposta imune contra os diferentes antígenos de *E. coli*. Nessa análise foram utilizadas cepas transformadas de *E. coli*: CVD 206 (Δeae), E2348/69 (Δtir), CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 872 ($\Delta espA$), UMD 864 ($\Delta espB$), UMD 870 ($\Delta espD$), E2348/69 (*flic*-) e JPN15.

As figuras 7B, 8B, 9B, 10B, 11B, 12B, 13B, 14B, 15B, 16B e 17B mostram o índice do incremento de reatividade ou razão DO/média.

REATIVIDADE COM CEPAS DE *E. COLI* TRANSFORMADAS COM ANTICORPOS PRESENTES NOS SOROS OBTIDOS DE:

-INOCULAÇÃO DA CEPA DE *E. COLI* O86:H34 VIVA PELA VIA INTRAGÁSTRICA

Os soros de camundongos BALB/c, obtidos no 42º dia após a inoculação pela via intragástrica com “*whole cells*” de *E. coli* O86:H34 vivas, foi analisado quanto ao padrão de direcionamento da resposta imune, usando as cepas de *E. coli* modificadas. A reatividade de anticorpos do isótipo IgG presentes nestes soros apresentaram uma redução de reatividade com as cepas transformadas CVD 206 (Δeae), E2348/69 (Δtir), CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 864 ($\Delta espB$), UMD 870 ($\Delta espD$), E2348/69 (*flic*-), JPN15 e DH5 α (figura 7A). Esses dados são significativos e mostram que os animais inoculados com bactérias vivas produziram anticorpos IgG com especificidade direcionada para intimina, Tir, EscN, EspB, EspD, Flic e BFP.

RESULTADOS

Os anticorpos de isótipo IgA apresentaram reatividade reduzida para as cepas de *E. coli* CVD 206 (Δeae), E2348/69 (Δtir), CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 864 ($\Delta espB$), UMD 870 ($\Delta espD$), E2348/69 (*flic*-), JPN15 e DH5 α (figura 8A). Esses resultados mostram que os soros desses animais, quando inoculados pela via intragástrica, produziram anticorpos IgG para intimina, Tir, EscN, EspB, EspD, Flic e BFP; indicando um perfil de reconhecimento de antígenos semelhante ao observado para anticorpos IgG.

Os anticorpos do isótipo IgM apresentaram diminuição da reatividade quando reagiram com as cepas de *E. coli* CVD 206 (Δeae), CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 872 ($\Delta espA$), E2348/69 (*flic*-) e DH5 α (figura 9A). Esses dados indicam que os soros apresentaram anticorpos IgM direcionados para intimina, EscN, EspA e Flic. Interessantemente somente anticorpos do isótipo IgM reconheceram EspA.

-IMUNIZAÇÃO INTRAGÁSTRICA COM A CEPA *E. COLI* O86:H34

Os soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intragástrica com “whole cells” de *E. coli* O86:H34 no 28º dia após a imunização, foi também analisado quanto ao padrão de direcionamento da reatividade dos anticorpos IgG, IgM e IgA usando as cepas de *E. coli* modificadas.

A reatividade de anticorpos do isótipo IgG apresentaram redução da reatividade com as cepas de *E. coli* CVD 206 (Δeae), E2348/69 (Δtir), CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 864 ($\Delta espB$), UMD 870 ($\Delta espD$), E2348/69 (*flic*-), JPN15 e DH5 α (figura 10A). Esses achados mostram que os soros desses animais continham anticorpos IgG com especificidade para Intimina, Tir, EscN, EspB, EspD, Flic e BFP.

A figura 11A mostra que os anticorpos do isótipo IgA apresentaram baixa reatividade com as cepas de *E. coli* CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 870 ($\Delta espD$), E2348/69 (*flic*-) e JPN15, mostrando que nos soros de animais imunizados com a cepa de *E. coli*, apresentavam anticorpos IgA direcionados para EscN, EspD, Flic e BFP.

RESULTADOS

A figura 12A demonstra que os anticorpos do isótipo IgM não apresentaram reatividade para as cepas de *E. coli* CVD 206 (Δeae), CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 872 ($\Delta espA$), E2348/69 (*flic*-), JPN15 e DH5 α ; isto mostra que os animais imunizados produziram anticorpos IgM específicos para intimina, EscN, EspA e Flic e BFP.

-IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR COM A CEPA *E. COLI* O86:H34

Os soros de camundongos BALB/c, imunizados pela via intramuscular com “whole cells” da cepa *E. coli* O86:H34 tratados por ultra-som foram analisados, no 28º dia após imunização, quanto ao direcionamento da resposta imune frente as cepas de *E. coli* modificadas.

A reatividade de anticorpos do isótipo IgG com *E. coli* apresentaram diminuição da reatividade quando reagiram com as cepas E2348/69 (Δtir), CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 864 ($\Delta espB$), E2348/69 (*flic*-) e JPN15 (figura 13A). Isto mostra que os soros desses animais apresentaram anticorpos IgG para Tir, EscN, EspB, Flagelos e BFP; enquanto que os anticorpos do isótipo IgA presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intramuscular apresentaram diminuição da reatividade com as cepas de *E. coli* CVD 206 (Δeae), E2348/69 (Δtir), CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 870 ($\Delta espD$), E2348/69 (*flic*-), JPN15 e DH5 α . Portanto, os soros desses animais apresentavam anticorpos do isótipo IgA para intimina, Tir, EscN, EspD, flagelos e BFP, quando comparados com a cepa O86:H34 e a cepa O127:H6 utilizadas. (figura 14A)

A figura 15A mostra que os anticorpos do isótipo IgM apresentaram diminuição da reatividade quando reagiram com as cepas de *E. coli* CVD 206 (Δeae), CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 872 ($\Delta espA$), E2348/69 (*flic*-) e DH5 α , isto significa que a imunização pela via intramuscular com a cepa de *E. coli* O86:H34 produziram anticorpos IgM direcionados para intimina, EscN, EspA e flagelos.

RESULTADOS

-IMUNIZAÇÃO INTRAGÁSTRICA COM A CEPA PROTÓTIPO DE *E. COLI* O127:H6 MORTAS

Os soros de camundongos BALB/c, obtidos no 28º dia após imunização pela via intragástrica com “whole cells” de *E. coli* O127:H6, foram analisados quanto ao padrão de direcionamento da resposta imune frente as cepas de *E. coli* modificadas.

A figura 16A mostra que os anticorpos dos isótipos IgG apresentaram redução de reatividade com as cepas transformadas CVD 206 (Δeae), E2348/69 (Δtir), CVD 452 ($\Delta escN$), UMD 874 ($\Delta espB$), UMD 870 ($\Delta espD$), E2348/69 (*flic*-), JPN15 e DH5 α . Por conseguinte, os animais inoculados com bactérias mortas por formol, produziram anticorpos IgG com especificidade para intimina, Tir, EscN, EspB, EspD, Flic e BFP.

-IMUNIZAÇÃO INTRAMUSCULAR COM A CEPA PROTÓTIPO DE *E. COLI* O127:H6

Os soros de camundongos BALB/c, obtidos no 28º dia após imunização pela via intramuscular com “whole cells” de *E. coli* O127:H6 tratadas por ultra-som, foram analisados quanto ao padrão de direcionamento da resposta imune na presença de cepas de *E. coli* modificadas.

Os anticorpos dos isótipos IgG apresentaram uma redução de reatividade com as cepas transformadas E2348/69 (Δtir), CVD 452 ($\Delta escN$), E2348/69 (*flic*-), mostrando significativamente que animais inoculados com bactérias vivas produziram anticorpos IgG com especificidade para Tir, EscN e Flic (figura 17A).

A tabela 2 apresenta os resultados do índice do incremento de reatividade com as diferentes cepas mutantes, apresentado por anticorpos dos isótipos IgG, IgM e IgA, por ELISA, em camundongos BALB/c inoculados com EPEC.

A tabela 3 descreve a reatividade detectada por meio de ELISA, para diferentes fatores de virulência apresentada por anticorpos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c inoculados com *E. coli*

RESULTADOS

O86:H34 vivas, ou imunizados pela via intragástrica e intramuscular com as cepas de *E. coli* O86:H34 ou O127:H6 mortas por formol.

REATIVIDADE CRUZADA COM A CEPA *E. COLI* O157:H7

Com o intuito de analisar a reatividade cruzada de anticorpos com a cepa *E. coli* O157:H7. Foram empregados os soros de camundongos BALB/c obtidos no 42º dia após a inoculação com a cepa de *E. coli* O86:H34 viva pela via intragástrica e os soros do 28º dia após as imunizações pela via intragástrica e intramuscular. A figura 18 apresenta os diferentes perfis de reatividade cruzada com a cepa O157:H7 pelos anticorpos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos submetidos a inoculações com a cepa O86:H34 por diferentes vias de imunização.

Figura 7A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgG pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 7B - Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgG contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Figura 8A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgA pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 8B - Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgA contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Figura 9A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgM pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 9B - Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgM contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Figura 10A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgG pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 10B - Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgG contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Figura 11A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgA pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 11B - Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgA contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Figura 12A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgM pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 12B - Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgM contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Figura 13A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgG pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 13B- Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgG contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Figura 14A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgA pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 14B - Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgA contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Figura 15A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgM pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 15B - Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgM contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Figura 16A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgG pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 16B - Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgG contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Figura 17A - Resultados em absorbância para as amostras de soros de camundongos em comparação com o grupo controle, na pesquisa de anticorpos da classe IgG pelo ensaio de ELISA com as cepas mutantes de *E. coli*.

Figura 17B - Resultados da razão DO/ média dos títulos de anticorpos IgG contra *E. coli* obtidos pela técnica de ELISA

Tabela 2 -Índice do Incremento de Reatividade apresentado por anticorpos dos isótipos IgG, IgM e IgA, por ELISA, em camundongos BALB/c inoculados com EPEC . Cepas: O86:H34- cepa de *E. coli* isolada de pacientes, E2348/69- Cepa protótipo de *E. coli*, CVD 206 eae-, E2348/69 tir-, E2348/69 EscN-, UMD 872 EspA-, UMD 864 EspB, UMD 870 EspD-, E2348/69 Flic-, JPN15 e DH5α.

Soro de camundongos inoculados ou imunizados com a cepa O86:H34													
Vias de inoculação	Bactérias		O86:H34	E2348/69	VCD 206	Tir-	EscN-	EspA-	EspB-	EspD-	Flic-	BFP-	DH5α
	Isótipos												
Vias de inoculação	IgG		6,7	6	5,1	2,5	1	6,2	1,6	2,5	2	1,1	3
	IgM		7,1	5,3	1,3	7	1	2,2	6,7	6,3	0,9	6,6	2,5
Bactérias vivas (IG)	IgA		3,9	4	2,4	2,7	0,9	4	2,6	2	1,2	2,2	2
	IgG		6,7	6,9	5,7	2,5	1	7,2	2,3	4,6	1,9	1,1	3,7
Bactérias Mortas (IG)	IgM		5,1	4,6	1,9	4,9	1,3	2,6	4,3	5	1,5	3,4	2,2
	IgA		4	3,6	3	3,4	1	3,1	3,3	2,8	1,3	2,5	2,8
Bactérias Mortas (IM)	IgG		7,3	7,1	5,6	3,3	1,6	6,3	2,7	4,6	3,5	1,3	1,3
	IgM		7,3	5,1	2,1	6,8	1	3,4	6,8	6,3	1,1	6,3	1,5
	IgA		3,2	3,2	2,2	2,4	0,9	3,2	2,6	1,6	1,1	2,3	2,2
Soro de camundongos imunizados com a cepa O127:H6													
Bactérias Mortas (IG)	IgG			9,1	2,2	1,9	0,6	8,2	3,8	1,2	0,9	6	0,9
Bactérias Mortas (IM)	IgG			7,3	4,9	4,1	1,4	6,9	4,7	4,7	2,5	5,9	4,4

Tabela 3- Reatividade para diferentes fatores de virulência apresentada por anticorpos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c inoculados com cepas vivas de O86:H34, imunizados pela via intragástrica ou intramuscular com as cepas de *E. coli* O86:H34 ou O127:H6.

Soro de camundongos inoculados ou imunizados com a cepa O86:H34									
Vias de inoculação	Isótipo	intimina	Tir	EspA	EspB	EspD	Flagelos	BFP	
	IgG	X	X		X	X	X	X	
Bactérias vivas (IG)	IgM	X		X			X		
	IgA	X	X		X	X	X	X	
	IgG	X	X		X	X	X	X	
Bactérias Mortas (IG)	IgM	X		X			X	X	
	IgA	X			X	X	X	X	
	IgG		X		X		X	X	
Bactérias Mortas (IM)	IgM	X		X			X		
	IgA	X				X	X	X	
	IgG								
Soro de camundongos imunizados com a cepa O127:H6									
Bactérias Mortas (IG)	IgG	X	X		X	X	X	X	
Bactérias Mortas (IM)	IgG		X		X		X	X	

Reatividade cruzada com a cepa de *E. coli* O157:H7 pelos anticorpos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos inoculados com cepa de *E. coli* O86:H34 viva e imunizados com a cepa de *E. coli* O86:H34 pela via intragástrica e intramuscular

Figura 18- Título de anticorpos IgG, IgA e IgM contra *E. coli* O157:H7 presentes nos soros de animais inoculados pelas diferentes vias de imunização com a cepa de *E. coli* O86:H34, por meio dos ensaios de ELISA

4.4- “COLONY BLOT”

Com o objetivo de verificar o reconhecimento dos antígenos de superfície “*whole cells*” de *E. coli* pelos anticorpos de isótipos IgG, IgA e IgM presentes nos soros de camundongos BALB/c inoculados com cepas de *E. coli* O86:H34 vivas ou imunizados por diferentes vias com a mesma bactéria. Para execução da técnica de “colony blot”, foram testadas algumas membranas de de nitrocelulose da marca Millipore (Nitrocelulose, HATF, GVWP). Como não houve diferenças significativas entre as membranas analisadas na detecção de anticorpos de isótipo IgG (figura 19), decidiu-se utilizar a membrana do tipo HATF no presente trabalho. Os anticorpos IgG, IgA e IgM reconheceram as bactérias “*whole cells*”, que podem ser respectivamente visualizadas na figura 20.

PADRONIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

Figura 19- Resultado da padronização de ensaio de “Colony Blot” utilizando-se 3 tipos de membranas da Millipore (1-Nitrocelulose, 2-HATF e 3-GVWP), na análise de soros de camundongos BALB/c inoculados pela via intragástrica com “Whole cells” de *E. coli* O86:H34 vivas (diluição 1:2000). Conjugado anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (diluição 1:2000).

Fig 20- Resultado do ensaio de "Colony Blot" utilizando como amostras os soros de camundongos BALB/c imunizados pela via intragástrica com *E. coli* O86:H34 (A), imunizados pela via intramuscular (B), inoculados com bactérias vivas pela via intragástrica (C) e soros normais (D) diluídos a 1:2000 para detecção de IgG e a 1:250 para IgA e IgM. Conjugado anti-IgG (1), anti-IgA (2) e anti-IgM (3) de camundongo marcado com peroxidase (diluição 1:2000).

RESULTADOS

4.5- "IMMUNOBLOT"

Por meio de "*immunoblot*" pudemos caracterizar a reatividade dos anticorpos IgG, IgA e IgM de soros de camundongos inoculados pela via intragástrica com a cepa de *E. coli* O86:H34 vivas ou imunizados com as cepas O86:H34 e O127:H6 por diferentes vias.

Dados existentes na literatura (ACHTMAN et al., 1983), mostram que a utilização do detergente NP-40 propicia a caracterização de um número maior de antígenos pelos anticorpos por meio de "*Immunoblot*".

Sendo assim, em nosso estudo, utilizamos soro de camundongos inoculados com *E. coli* O86:H34 vivas, com ou sem NP-40, com o intuito de escolhermos o método que apresentasse um padrão mais representativo de reatividade (dados não apresentados).

REATIVIDADE COM A CEPA DE *E. COLI* O86:H34

Observamos na figura 21 (Aa, Bb e Cc) o reconhecimento pelos anticorpos IgG de bandas em torno de 94kDa, que representa a região da intimina, quando analisamos soros de camundongos BALB/c inoculados com bactérias vivas ou imunizados pela via intragástrica e intramuscular. Anticorpos do isótipo IgA presentes nos soros de camundongos inoculados com bactérias vivas pela via intragástrica ou imunizados pela via intramuscular também reconheceram um peptídeo nesta região, o peptídeo de 94kDa pode ser melhor caracterizado, quando utilizamos o soro anti-intimina universal de coelho, como controle do posicionamento deste peptídeo. O peptídeo de 18kDa pode ser também reconhecido por anticorpos IgG (Figura 21Aa, Ca) quando utilizamos soros de camundongos inoculados com bactérias vivas pela via intragástrica ou imunizados pela via intramuscular. O controle do posicionamento do peptídeo de 18kDa pode ser observado quando utilizamos o soro de coelho anti-BFP (tira f).

Anticorpos IgG e IgA presentes nos soros de animais inoculados por bactérias vivas pela via intragástrica ou imunizados pela via intragástrica e

RESULTADOS

intramuscular mostraram uma reação de intensidade maior contra os peptídeos 30 e 43kDa, entretanto não foi possível afirmar que se trata das proteínas EspB e/ou EspD no "*Immunoblot*", mas a reatividade de anticorpos para essas proteínas puderam ser determinadas nos estudos feitos por ELISA quando as cepas de *E. coli* mutantes foram utilizadas.

Notamos a presença de bandas na região de 25kDa sendo reconhecidas por anticorpos IgG presentes tanto nos soros de animais inoculados com bactérias vivas pela via intragástrica como imunizados pela via intragástrica figura 21 (Ab, Ca), Também observamos na figura 21 (Ab, Cb) o reconhecimento pelos anticorpos do isótipo IgA, do peptídeo de 94kDa, que pode ser melhor caracterizado quando comparado com o peptídeo de 94kDa reconhecido pelo soro de coelho anti-intimina (Af, Cf).

Observamos o reconhecimento de bandas na faixa de 14 a 20kDa, que variam de intensidade, reconhecidas por anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos inoculados com bactérias vivas pela via intragástrica e imunizados pela via intramuscular, e também reconhecidos por anticorpos IgA presentes nos soros de animais imunizados pela via intragástrica e intramuscular (figura 21 Ab, Bb e Cb).

Os anticorpos IgM apresentaram uma fraca reatividade contra os peptídeos na faixa de 40-60kDa. Não pudemos observar uma imunorreatividade com o peptídeo de 94kDa, peso atribuído a intimina (figura 21Ac, Bc, Cc), assim como para peptídeos de baixo peso molecular.

REATIVIDADE COM A CEPA O127:H6

Anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos inoculados com a cepa de *E.coli* O86:H34 vivas , ou imunizados pela via intragástrica, ou pela via intramuscular com a cepa de *E. coli* O86:H34, reconheceram peptídeos da cepa de *E. coli* O127:H6 em torno de 94kDa, que representa a região da intimina, e uma reação de maior intensidade também foi observada para bandas entre os pesos moleculares de 30-43kDa. Anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intramuscular com a cepa O86:H34 reconheceram fortemente bandas de

RESULTADOS

baixo peso molecular na faixa de 14-20kDa, enquanto os anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intragástrica com a cepa de *E. coli* O86:H34 (figura 21 Ad, Bd) não apresentaram uma reatividade cruzada contra peptídeos de baixo peso molecular, encontrados na faixa de 14-30kDa.

Na figura 22 observamos a reatividade específica de anticorpos IgG presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados com "*whole cells*" da cepa protótipo O127:H6. Anticorpos presentes nos soros de camundongos imunizados pela via intragástrica reconheceram peptídeos na faixa de 30-100kDa (figura 22d) enquanto os anticorpos IgG produzidos em camundongos imunizados pela via intramuscular reconheceram peptídeos na faixa de 11-94kDa (figura 22b).

REATIVIDADE COM A CEPA DE *E. COLI* O157:H7

A figura 23 (Aa), mostra o perfil eletroforético da preparação antigênica de *E. coli* da cepa O157:H7 coradas por Coomassie Blue R-250 (Amersham- Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia), onde podemos observar antígenos na faixa de 10 a 120 kDa. A figura 23B, C e D mostra a reatividade cruzada dos anticorpos IgG, IgM e IgA presentes nos soros de camundongos BALB/c imunizados com a cepa O86:H34 contra peptídeos da cepa de *E. coli* O157:H7. Quando foi utilizado "*whole cells*" da cepa O157:H7 (figura B1) uma fraca reatividade cruzada foi observada, entretanto, essa reatividade só pode ser melhor caracterizada quando OMC da cepa O157:H7 (figura B a,b,c) foi utilizada. Neste estudo, observou-se a reatividade cruzada contra antígenos de membrana externa por anticorpos IgG, IgM e IgA, visto que não dispomos no momento de cepas mutantes ou marcadores desse sorogrupo.

Quando utilizamos soros de camundongos inoculados com bactérias vivas da cepa O86:H34, uma reatividade contra peptídeos na faixa de 25-94kDa foi observada pelos anticorpos IgG, 40-100kDa pelos anticorpos IgA e contra o peptídeo de 35kDa, pelos anticorpos do isótipo IgM (figura B).

RESULTADOS

Soro de camundongos imunizados com O86:H34 pela via intragástrica (figura 23C), mostrou que anticorpos IgG reconheceu o peptídeo de 35kDa, anticorpos IgA reconheceram peptídeos na faixa de 11-30kDa e IgM peptídeos de 67-70kDa. Quando camundongos foram imunizados pela via intramuscular com a cepa O86:H34, um número maior de peptídeos pertencente a cepa de *E. coli* O157:H7 foram reconhecidos pelos anticorpos IgG, IgA e IgM. Os anticorpos do isótipo IgG e IgA reconheceram antígenos na faixa de 10-100kDa, e os anticorpos IgM na faixa de 43 a 67kDa (figura 23D).

Figura 21 - Immunoblot de "whole cells" de *E. coli* O86:H34 (a, b, c), O127:H6 (d, e, f) e DH5 α (g). Reatividade com anticorpos IgG, IgA e IgM de soro de camundongos BALB/c . A- Inoculados com microrganismos vivos (IG), B- Imunizados com "whole cells" mortas (IG), C- Imunizados com bactérias tratadas pelo US pela via intramuscular emulsificada com adjuvante de Freund da cepa de *E. coli* O86:H34; (e) soro de coelho anti-BFP de *E. coli*, (f, g) soro de coelho anti-intimina universal e (h) padrão de peso molecular.

Figura 22 - Immunoblot de “whole cells” de *E. coli* O127:H6 (a, b, c, d, e, f) e *E. coli* DH5 α (g). Reatividade de anticorpos IgG de soro de camundongos BALB/c imunizados com “whole cells” da cepa O127:H6. (a) Soro normal de camundongos, grupo intramuscular (IM), (b) Soro imune IM no 28 $^{\circ}$ dia após imunização, (c) Soro normal de camundongos, grupo intragástrico (IG), (d) Soro imune IG no 28 $^{\circ}$ após imunização, (e) Soro de coelho anti-BFP de *E. coli*, (f, g) Soro de coelho anti-intimina e (h) Padrão de peso molecular.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Devido à grande importância da *Escherichia coli* enteropatogênica, como agente etiológico de diarreias infantis nos países em desenvolvimento, existe um grande interesse em se estudar os fatores que ocasionam a virulência, causada por este patógeno.

A porta de entrada da maioria das infecções no homem é a superfície da mucosa, principalmente do trato gastrointestinal e respiratório (MACNAB & TOMASI, 1981). As superfícies das mucosas representam uma fronteira entre o ambiente interno e externo. Através da alimentação e respiração, o organismo entra em contato com substâncias potencialmente alergênicas ou nocivas e microrganismos patogênicos. No entanto, o equilíbrio com o ambiente é praticamente perfeito e o estado de doença constitui a exceção e não regra geral.

A infecção provocada por EPEC acomete principalmente o intestino delgado, causando diarreia com eliminação de fezes aquosas indicando comprometimento da absorção e secreção de líquidos e sais. A preservação de SIgA ao longo do trato intestinal é um fator importantíssimo para a proteção do lactente, pois possibilita ação local de anticorpos na defesa contra essas infecções, mesmo nas porções terminais do intestino (DAVIDISON & LONERDA, L., 1987).

As bactérias selecionam seus habitats onde a sobrevivência é ótima, pela expressão de moléculas de superfície (adesinas) que seletivamente reconhecem receptores específicos, permitindo às bactérias aderidas expandir sua população neste local (ABRAHAM et al., 1999). As *E. coli* diarreiogênicas são um ótimo exemplo da importância da adesão no estabelecimento da colonização de tecidos, servindo de modelo para um estudo da interação entre microrganismo e hospedeiro.

Portanto, as estratégias de imunização por via oral são capazes de estimular as placas de Peyer e podem se mostrar eficazes contra patógenos, que interagem com a mucosa digestiva para ganhar o interior do organismo

DISCUSSÃO

ou causar doenças como diarreias independente da topografia dessa interação. A administração oral de vacinas oferece também outros atrativos como a não agressão, o fácil treinamento dos agentes de saúde para a administração dos inóculos e o fato de dispensar o uso de seringas e agulhas hipodermicas.

O presente trabalho mostrou, pela primeira vez na literatura, que os soros de camundongos inoculados pela imunização via intragástrica com bactérias vivas ou mortas com formalina reconheceram os diferentes fatores de virulência de EPEC: intimina, BFP, flagelos, EspA, EspB e EspD. E, mostrou, ainda, que a via intragástrica, porta natural desse microrganismo, induziu a formação de anticorpos dos isótipos IgG, IgA e IgM.

Em nossos estudos fizemos avaliação de anticorpos séricos, mas temos conhecimento de dados na literatura que mostram que existe equivalência entre os níveis de anticorpos séricos e secretores induzidos pelos antígenos de *E.coli* (OGRA et al., 1994).

Há dificuldades em efetuar a comparação entre os dados obtidos de estudos em humanos com os resultados providos do presente estudo experimental em camundongos, pois o quadro patogênico em homens causado por EPEC está bem caracterizado. Os camundongos BALB/c, por sua vez, quando foram inoculados com bactérias vivas, os animais não apresentaram quadro de diarreia característico. Contudo, pode-se verificar a atividade imunogênica de antígenos de membrana externa de cepa EPEC O86:H34, após inoculação dessas bactérias vivas. Por conseguinte, a resposta imunogênica observada em estudo experimental em camundongos pode ser comparada àquela verificada em modelos humanos, quanto ao perfil de anticorpos induzidos, bem como a especificidade dirigida aos fatores de virulência do microrganismo (LEVINE et al., 1985, DONNENBERG, 1998).

O presente estudo permitiu efetuar a avaliação do papel de imunização experimental pela via intragástrica que é a porta de entrada natural do patógeno em questão, inoculando-se "*whole cells*" dessas bactérias mortas com formalina em camundongos e efetuando-se correlação

DISCUSSÃO

com a resposta obtida em camundongos após inoculação pela via intragástrica com bactérias vivas. Os marcadores da resposta imune humoral, especificamente a produção de anticorpos específicos, foram avaliados por meio de ELISA e "*Imunoblot*". As duas preparações, forma vivas e mortas, de microrganismos induziram a formação de anticorpos de classes IgG, IgA e IgM suas especificidades puderam ser comparadas com os relatos descritos na literatura em estudos com modelos humanos experimentais (LEVINE et al., 1995, DONNENBERG et al., 1998), bem como com os dados de estudos realizados recentemente utilizando soros de indivíduos infectados com EPEC (MARTINEZ et al., 1999, SANCHES, 2000).

No presente trabalho foram utilizadas dois tipos de abordagem para a pesquisa de anticorpos em camundongos inoculados pelas diferentes vias de imunização. A técnica de ELISA foi realizada com a bactéria inteira, mortas por formalina, que permitiu detectar anticorpos dirigidos para antígenos de superfície bacteriana. Os ensaios de "*immunoblot*" foram realizados com preparações antigênicas de bactérias mortas por formol e foi feita uma avaliação qualitativa da resposta para as diferentes frações antigênicas. Este procedimento permitiu efetuar comparação dos antígenos reconhecidos pelos diferentes isótipos de anticorpos induzidos pelas diferentes vias de imunização.

Por meio de técnica de SDS-PAGE foi possível verificar a existência de inúmeras frações antigênicas presentes na cepa O86:H34 isolada de paciente, bem como no protótipo O127:H6 e suas mutantes, e na cepa DH5 α utilizadas como controle. A cepa O157:H7 foi utilizada em alguns ensaios de avaliação de reatividade cruzada.

De acordo com os resultados de SDS-PAGE não houve diferença significativa no perfil de peptídeos (Fig 3), quando a cepa O86:H34 foi submetida ao tratamento por ultra-som. Esta preparação antigênica foi utilizada nas imunizações de camundongos; pela via intramuscular. Todavia altos títulos de anticorpos de isotipos IgG e IgM foram induzidos, quando bactérias "*whole cells*" foram empregados na técnica de ELISA. Nessa avaliação foram empregadas as cepa homólogas, bem como a cepa

DISCUSSÃO

protótipo e suas variantes e, ainda, a cepa DH5 α de *E.coli*. A especificidade para determinantes de virulência e outros componentes da bactéria puderam ser caracterizados.

Com os soros obtidos de animais inoculados pela via intragástrica e com a utilização das cepas mutantes da bactéria identificou-se a especificidade de anticorpos IgG, IgM e IgA que foram direcionados principalmente para as Esps, BFP e flagelos (Tabela-3).

De acordo com os resultados obtidos na técnica de ELISA, os anticorpos do isótipo IgM, induzidos pela inoculação de bactérias vivas ou imunizados pelas vias intragástrica e intramuscular com bactérias mortas, reconheceram intimina, EspA, EscN e flagelos. Neste ensaio foram empregadas bactérias mutantes. Interessantemente, apenas o anticorpo do isótipo IgM foi capaz de reconhecer a proteína EspA, independente da via de imunização utilizada; no entanto, não observamos no “*immunoblot*” uma reatividade para EspA, independente da via de imunização. Talvez possamos inferir essas diferenças à natureza antigênica apresentada nos ensaios de ELISA e “*Immunoblot*”, utilizado em nossos estudos. De acordo com dados obtidos na literatura, EspA é uma proteína, que juntamente com BFP, é utilizada pela bactéria no primeiro contato com a célula do hospedeiro (KNUTTON et al., 1998). Talvez esta característica tenha sido o motivo do citado reconhecimento exclusivo dessa proteína pelos anticorpos do isótipo IgM. Entretanto, o anticorpo IgM não foi capaz de reconhecer BFP em ensaios em que foram analisadas as amostras de soro obtidas de animais imunizados por quaisquer vias de inoculação. Contudo foi identificada por meio de ELISA a produção de anticorpos de isótipos IgG e IgA dirigidos à proteína BFP, independente da via e imunização empregada.

A produção de filamentos de EspA na superfície de EPEC intervém na aderência bacteriana a células epiteliais juntamente com BFP, e essas duas proteínas estimulam a translocação de EspB e Tir para dentro da célula do hospedeiro. KENNY et al.(1997) descreveram a proteína Tir (translocated intimin receptor) produzida pela EPEC e sua liberação depende do sistema de secreção tipo III. Após entrar na membrana da célula epitelial, a Tir é

DISCUSSÃO

fosforilada e seu peso molecular aumenta para 90kDa (referida como antiga Hp90) e, assim, ela se torna o receptor para intimina da própria bactéria. Após a ligação de Tir com a intimina, ocorre a adesão íntima da bactéria à célula do hospedeiro. Uma cascata de eventos conduz à lesão característica A/E (HICKS et al., 1998).

Os trabalhos, utilizando modelo de infecção experimental em voluntários humanos com inóculo de *E. coli* E2348/69 (O127:H6), mostraram a produção de anticorpos dos isótipos IgG e IgA dirigidos para o peptídeo de membrana externa de 94kDa (LEVINE et al., 1985). Esse peptídeo foi inicialmente caracterizado como sendo um determinante para EAF; porém mais tarde, foi identificado como intimina. Os autores relataram que apenas um voluntário, que não desenvolveu quadro de diarreia, já possuía anticorpos anti-intimina na amostra de soro colhida na data anterior à inóculo bacteriana; sugerindo importante papel desses anticorpos na proteção. IgA e frações oligossacarídicas do colostro humano apresentam a capacidade de inibir a aderência localizada (LA) de EPEC em células Hep-2 ou HeLa e os anticorpos reconhece a intimina (CÂMARA et al., 1994, COSTA-CARVALHO et al., 1994, CRAVIOTO et al., 1991, DONNENBERG et al., 1993 b). Em alguns estudos descritos na literatura realizados por LEVINE et al., 1985; CÂMARA et al., 1994; COSTA-CARVALHO et al., 1994; CRAVIOTO et al., 1991; DONNENBERG et al. 1993 a , o não reconhecimento de BFP foi atribuído às condições de crescimento bacteriano utilizado nos estudos realizados. Entretanto, no nosso estudo ao utilizar soros de camundongos inoculados com a cepa O86:H34 viva pela via intragástrica, foi observada a reatividade com BFP. Esse achado talvez possa ter ocorrido pelo uso de metodologias diferentes. LEVINE et al. (1995) utilizaram OMP nos ensaios de “*Immunoblot*”, enquanto que no estudo a resposta dirigida para essas proteínas foi detectada por meio de ELISA, onde os antígenos foram utilizados na forma íntegra ou “*whole cells*” de bactérias. Esses resultados não foram observados pela técnica de “*Immunoblot*”. Os dados da nossa investigação estão de acordo com os achados relatados por LEVINE et al. (1995), uma vez que fraca reatividade

DISCUSSÃO

com BFP pelos anticorpos IgG e IgA foi detectada nos ensaios de "*Immunoblot*", no trabalho por nós realizado.

Por meio de ELISA, empregando bactérias íntegras- "*whole cells*", foi acompanhada a cinética da resposta imune e observada para quais antígenos o direcionamento da resposta ocorreu. Com auxílio de preparações antigênicas, onde as bactérias sofreram deleções de genes responsáveis em codificar fatores de virulência. Logo, estas preparações funcionaram como controle negativo, ou seja, para averiguar se a ausência destas proteínas foi capaz de reduzir os títulos dos anticorpos nos ensaios de ELISA, quando comparados com a cepa EPEC de referência. Consequentemente pode-se observar a produção de anticorpos especificamente direcionados para os antígenos em que o gene sofreu deleção. E, assim foi possível analisar as proteínas de membrana externa bacteriana importantes na indução da resposta imune obtida pelas diferentes vias de imunização, tão bem como a quantificação desses anticorpos e a variação no repertório de antígenos reconhecidos de acordo com o isótipo de anticorpo produzido.

Os ensaios de "*immunoblot*" foram realizados com o intuito de verificar para quais os antígenos de EPEC seriam produzidos os anticorpos e suas especificidades de acordo com as diferentes vias de imunização. Assim, por meio de "*immunoblot*" verificou-se que os anticorpos IgG e IgA presentes nos soros, obtidos por diferentes vias de imunização, reconheceram diferentes frações antigênicas com pesos moleculares entre 14 e 100 kDa, O anticorpo IgM no entanto, foi induzido preferencialmente por antígenos de 40 a 70kDa, que têm sido reconhecidos como fatores de virulência na infecção por EPEC: intimina (94kDa), Tir (78kDa), EspD (40kDa), EspB (38kDa), EspA (25kDa), BFP (18kDa) e provavelmente outras frações ainda não descritas (JERSE et al., 1990, KENNY et al., 1997, LAI et al., 1997, WOLFF et al., 1998, KNUTTON et al., 1998, DONNENBERG et al., 1997).

Nos ensaios realizados com anti-soros de coelho anti-intimina (EPEC), constatou-se que a cepa protótipo O127:H6 apresentou imunorreatividade com o peptídeo de 94kDa. Esta reatividade veio confirmar

DISCUSSÃO

a presença desse peptídeo quando utilizado como marcador nos ensaios de "*Immunoblot*". O soro anti-BFP produzido em coelhos apresentou forte reatividade com o peptídeo de 18kDa, peso este atribuído a BFP. Em nossos estudos não foram observadas as duas bandas na região da intimina, provavelmente pelo fato de ter empregado um anticorpo monoclonal de coelho do isótipo IgG. Esse procedimento não propiciou a visualização de uma banda mais fraca na região de 94kDa como descrito na literatura. Isto significa que não houve a detecção do produto de degradação desse peptídeo (BATCHELOR et al., 1999). Esses dados obtidos sugerem que a produção de anticorpos monoclonais poderia auxiliar de uma maneira mais efetiva no esclarecimento de peptídeos apresentados nessa região da membrana externa bacteriana.

Em nossos ensaios por meio de "*Immunoblot*", os anticorpos IgG e IgA induzidos pelas diferentes vias de imunização também foram capazes de reconhecer fortemente os peptídeos na região entre 30 a 40kDa, embora não tenha tido um marcador para esses peptídeos no *Immunoblot*. No entanto, com o auxílio de cepas mutantes e por meio de ensaios de ELISA foi permitido verificar a reatividade dos anticorpos dos isótipos IgG e IgA com EspB e EspD, quando os camundongos foram inoculados pela via intragástrica com bactérias vivas ou mortas. Por outro lado, essas proteínas não induziram anticorpos IgM, independente da via de imunização utilizada. Este fato é interessante, pois em nossos estudos a produção de isótipos IgG e IgA independente da utilização de bactérias vivas ou mortas, reforça mais uma vez a importância do uso da via intragástrica para a administração de preparações vacinais, sendo esta a porta natural de entrada do patógeno em estudo.

Proteínas na faixa de peso molecular entre 30 e 100kDa foram reconhecidos pelos anticorpos IgG e IgA presentes nos soros de animais inoculados com a cepa O86:H34 viva, quando foi empregada a OMC obtida da bactéria enterohemorrágica O157:H7. Por conseguinte, torna-se muito importante que sejam realizados estudos adicionais para caracterizar a natureza desses antígenos, que provavelmente estão conservados entre as

DISCUSSÃO

espécies bacterianas e altamente imunogênicos, bem como a investigação do possível efeito protetor dos anticorpos dirigidos para eles e, assim, avaliar o seu potencial como imunógenos.

Em nossos ensaios de *Immunoblot*, as bandas na região referente ao BFP (18kDa) não foi detectada pelos anticorpos do isótipo IgG nos soros de camundongos inoculados pela via intragástrica com bactérias vivas ou pela via intramuscular com bactérias mortas por formol. O uso de soro de coelho anti-BFP possibilitou efetuar melhor caracterização desse peptídeo. Por meio de ELISA verificou-se a produção de anticorpos por meio de inoculação tanto pela via intragástrica utilizando-se bactérias vivas ou mortas, bem como pela via intramuscular, pois ocorreu redução no título de anticorpos quando a cepa de *E. coli* JPN15 foi utilizada.

No nosso trabalho, foi possível determinar que anticorpos dos isótipos IgG, IgM e IgA induzidos pelas diferentes vias de inoculação reconheceram uma fração antigênica em torno de 80kDa, provavelmente referente à proteína de 78kDa. Não se pode afirmar que essa banda seja referente à Tir, uma vez que no presente trabalho não havia disponibilidade de controle positivo para Tir, para ser utilizado como marcador no "*Immunoblot*". No entanto no ELISA utilizou-se uma cepa mutante para essa proteína e foi possível detectar a imunogenicidade desse peptídeo. Nossos dados corroboram com os recentes dados relatados por SANCHES et al. (2000), onde foram observados que anticorpos IgG presentes no soro e anticorpos IgA presentes no colostro apresentaram forte reatividade com esse peptídeo no "*immunoblot*". Neste mesmo estudo, com auxílio de proteínas Tir recombinantes foi verificado que esses anticorpos reagiram predominantemente com o domínio Tir-M (região de Tir que se liga a intimina).

Por meio de ELISA foram quantificados os anticorpos reagentes com antígenos de superfície da bactéria, uma vez que as placas de microtitulação foram sensibilizadas com suspensão de bactérias íntegras. No caso do "*Immunoblot*" foram detectados anticorpos dirigidos às diferentes frações antigênicas da bactéria.

DISCUSSÃO

No nosso estudo, o uso de bactérias mutantes permitiu efetuar a quantificação da resposta de anticorpos a fatores de virulência em modelo camundongo, em que os animais foram inoculados com microrganismos vivos ou mortos por meio de diferentes vias de imunização.

Para auxiliar a análise dos resultados de ELISA, foi estabelecido um critério para avaliar se houve queda de títulos de anticorpos induzidos por EPEC por diferentes vias de imunização. Para tanto, foi utilizada a cepa protótipo O127:H6 e suas mutantes. Assim, para a análise dos resultados de ELISA, estabeleceu-se que a partir de uma variação igual ou menor do que dois títulos, quando comparado com os títulos de anticorpos que reconheceram a bactéria de referência e sem deleções (O86:H34 e O127:H6), seria considerado como diminuição desse título e, conseqüentemente, como resposta produzida para o antígeno que sofreu deleção.

Em resposta imune contra um antígeno, muitos fatores determinam o resultado do desafio antigênico. As respostas imunes são específicas para antígenos distintos. Assim, tanto a natureza do antígeno e adjuvante, como a via de imunização contribuem efetivamente para a especificidade do anticorpo produzido.

Os adjuvantes têm sido usados como ferramentas para o estudo da ativação de células imunologicamente competentes, apresentando a capacidade de alterar o caráter da resposta imune a antígenos e peptídeos sintéticos; estes últimos são geralmente imunógenos fracos. As propriedades imunomodulatórias dos adjuvantes podem influenciar o tipo e a intensidade da resposta imune. A seleção de adjuvantes mostrou ser importante na determinação do papel da resposta de anticorpos, assim como na indução de citocinas produzidas por células T ativadas (KENNY et al., 1989).

Há diversos trabalhos mostrando a presença de anticorpos para vários antígenos da EPEC(LEVINE et al., 1985, MARTINEZ et al., 1999), mas a questão de maior relevância é investigar o possível efeito protetor dos anticorpos específicos, para avaliar o seu potencial como imunógenos.

DISCUSSÃO

Em nossos estudos uma forte imunogenicidade pôde ser observada para a proteína flagelar de *E.coli* independente da preparação antigênica ou da via de imunização utilizada. A produção do flagelo é considerada um processo vantajoso para a bactéria. Além de fornecer a motilidade necessária para o microrganismo alcançar o nicho mais favorável para a sua colonização, permite que ocorra competição entre os microrganismos por esses nichos. Em contrapartida, quando a bactéria não precisa competir para sobreviver, perde sua mobilidade ou capacidade de síntese flagelar. Outra atribuição dada ao flagelo é a de adesão, embora de importância secundária, pois existem outras adesinas com funções específicas no processo de adesão (MOENS et al., 1996).

Cerca de 80% de todas as espécies bacterianas são flageladas (AIZAWA, 1996). Esse número poderá ser maior se levar em consideração a variação que pode ocorrer na análise por microscopia eletrônica e a pesquisa de flagelo em microrganismo que expressa essa organela em baixo número. É sabido, também, que a expressão de flagelos é influenciada pelo meio de cultura utilizado, pois quando as cepas bacterianas são cultivadas em meio MacConkey produzem maior quantidade de flagelos. Essa condição mostra a influência do meio ambiente na formação dessa organela. Em vista de haver efetuado o cultivo da cepa O86:H34 em meio MacConkey, em nossos estudos, especula-se que esse procedimento possa ter influenciado na expressão desse componente, aumentando surpreendentemente a resposta de anticorpos IgG, IgA e IgM, detectados por meio de ELISA utilizando cepas mutantes deletadas para o gene Flic (Flic-).

Os experimentos apresentados no presente estudo tiveram como meta principal a caracterização da resposta imune no curso da imunização pela via intragástrica com microrganismos vivos ou mortos. Esse objetivo foi delineado em virtude do pouco conhecimento sobre o efeito das imunizações por EPEC no modelo murino.

Em nossos estudos a cepa O127:H6 foi utilizada como ferramenta de comparação da resposta imune, por ser uma cepa protótipo de EPEC e por

DISCUSSÃO

apresentar as mutantes bem caracterizadas (JARVIS et al., 1995, DONNENBERG & KAPER, 1991, KENNY et al., 1996, DONNENBERG et al., 1996, LAI et al., 1997, JERSE et al., 1991). Assim, esta foi uma estratégia para avaliar o direcionamento da resposta imune induzida contra esse patógeno. Em nossos estudos, os anticorpos IgG presentes em soros de camundongos, imunizados pela via intragástrica e intramuscular com a cepa O127:H6, não apresentaram diferenças significantes na resposta imune para os fatores de virulência, quando comparados com os resultados obtidos em animais imunizados com a cepa O86:H34. Entretanto, estudos complementares estão em andamento em nosso laboratório (MARINOTO et al., 2001), em que são realizadas as análises dos anticorpos de isótipos IgM e IgA com as cepas mutantes, bem como o estudo da modulação da resposta imune dirigida aos fatores de virulência.

Os grupos de *E. coli* patogênicas, como EPEC e EHEC, provocam a doença por intermédio de toxinas e/ou colonização, que causam a destruição das microvilosidades do epitélio intestinal. As EHEC, em particular as lesões produzidas, podem extrapolar o ambiente intestinal, já que pelo menos uma das toxinas produzidas pode atravessar a barreira intestinal e cair na corrente sangüínea. Nesse ambiente, as toxinas atuam nas células que formam a parede dos vasos sangüíneos, o que termina por comprometer a função renal.

Em nosso trabalho, a reatividade cruzada apresentada para diferentes antígenos de *E. coli* O157:H7 por ELISA e "Immunoblot" por anticorpos IgG, IgA e IgM, justificam futuros estudos para esse sorogrupo de *E. coli*. Para tentarmos esclarecer a grande homologia existente entre EHEC e EPEC, bactérias mutantes ou nova abordagem serão necessárias. Trabalhos recentes descritos na literatura sugere que exista uma imunidade cruzada entre EPEC e EHEC (Palmeira, 2001).

Aliada à grande diversidade de patógenos e antígenos-alvo, o desenvolvimento de vacinas contra diarreia deve ainda levar em consideração outros aspectos como: a definição do perfil dos potenciais

DISCUSSÃO

usuários (militares e crianças), o tipo de resposta imune a ser ativada, e consequentemente, a via de inoculação.

O desenvolvimento de vacinas contra diarreia infecciosa apresenta numerosos obstáculos e entre eles encontram-se as grandes diversidades e a complexidade antigênica, que na verdade refletem as estratégias e os mecanismos de patogenicidade distintos.

A *Escherichia coli* enteropatogênica é responsável por 30% dos casos de diarreia no primeiro ano de vida e é justamente devido à sua grande importância como agente etiológico das diarreias infantis nos países em desenvolvimento, que consequentemente, existem vários estudos com o intuito de encontrar estratégias para que seja desenvolvida uma vacina para tal patógeno.

O estudo da resposta imune no hospedeiro, a modulação desta resposta e o reconhecimento pelos anticorpos de diferentes fatores de virulência são essenciais para auxiliar na escolha da composição de uma vacina.

Entre os modelos experimentais desenvolvidos para a caracterização dos fatores genéticos que regulam a complexa série de fenômenos participantes da resposta imune, destacam-se aqueles que utilizam animais isogênicos e os que utilizam linhagens geneticamente selecionadas para uma determinada reatividade imunológica.

Os resultados obtidos no nosso trabalho e os recentes estudos citados na literatura (DENG et al., 2001) reforçam a necessidade de se prosseguir nas investigações, para conseguir melhor esclarecimento sobre o mecanismo de patogenicidade desse microrganismo. Até o momento, estudos foram realizados no homem, pois não se dispunha de um modelo animal que pudesse reproduzir os mecanismos de virulência desse patógeno. Um dos obstáculos foi, muitas vezes, decorrente da virulência de cepas como O157:H7, dificultando o esclarecimento de muitos aspectos desta doença.

O presente estudo mostrou que a inoculação de microrganismos vivos ou mortos em camundongos BALB/c por diferentes vias, induziu anticorpos

DISCUSSÃO

para diferentes fatores de virulência da EPEC, independente da via de imunização utilizada.

Por meio de *colony blot* um padrão de reconhecimento de antígenos de superfície bacteriana foi observado pela reatividade com diferentes isótipos de anticorpos, mostrando assim a homogeneidade de preparações antigênicas de membrana externa de bactérias utilizadas em nosso trabalho.

O estudo aqui apresentado é de extrema importância, pois permitiu efetuar a análise da resposta imune a diferentes fatores de virulência da EPEC. Os dados obtidos indicam que a utilização de amostras biológicas humanas, como soro e colostro, seria altamente relevante. Contudo, devido à grande homologia existente entre os diferentes patógenos que causam diarreia no homem, não há possibilidade, no momento, de conjecturar esses estudos.

Nossos estudos abrem perspectivas para o entendimento sobre *E. coli*, onde pesquisas vêm avançando rapidamente no campo dos mecanismos de virulência dos patógenos causadores de diarreia e, recentemente, para o desenvolvimento de novas estratégias vacinais, mais seguras e eficazes, que possam levar no futuro próximo, à redução significativa da incidência da diarreia no mundo.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pudemos concluir que:

- A cepa O86:H34 (EPEC) inoculada viva e morta pela via intragástrica (porta de entrada deste patógeno) em camundongos BALB/c induziu a produção de anticorpos IgG, IgA e IgM e reconheceu diferentes fatores de virulência de EPEC.
- A cepa O86:H34 inoculada morta e emulsificada com adjuvante completo de Freund, induziu anticorpos IgG, IgA e IgM.
- A cepa O86:H34 apresentou um padrão comparável de resposta imune com a cepa protótipo O127:H6 de *E. coli* (EPEC), quando inoculada pela via intragástrica e intramuscular.
- O uso das cepas mutantes contribuiu de uma maneira efetiva para a seleção de antígenos importantes na imunogenicidade.

ANEXOS

7-ANEXOS**-Soluções utilizadas**

PBS-I: Na_2HPO_4 0,0075M, NaH_2PO_4 0,0025M e NaCL 0,14M-pH 7,2

PBS-II: Na_2HPO_4 0,0075M, NaH_2PO_4 0,0025M e NaCL 0,14M-pH 7,4

Salina: NaCl 0,15M

Tampão carbonato/ bicarbonato: Na_2CO_3 0,003 e NaHCO_3 0,007M-pH 9,6

Tampão citrato/fosfato:ácido cítrico 0,01M e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,1M-pH 5,0

Tampão de corrida: Tris-hidroximetilaminoetano 0,075, glicina 0,576M e SDS 0,15M-pH8,3

Tampão de transferência: Tris-hidrometilaminoetano 25mM, glicina 192mM e metanol 20% (v/v)- pH 8,3

T/S (Tris/salina): Tris 10Mm e NaCl 0,9%-pH 7,5

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

8-REFERÊNCIAS

- ABDILAH, H., POLLMAN, J.T. *Neisseria meningitidis* group B serosubtyping using monoclonal antibodies in whole-cell ELISA. **Microb. Pathog.**, Paris, v.4, p.27-32, 1988.
- ABRAHAM, S.N., SHARO, N.N., OFEK, I. Adhesion of bacteria to mucosal surfaces. In: OGRA, P.L., MESTECKY, J., LAMM, M.E., STROKER, W., BIENENSTOCK, J., MCGHEE, J.R., BIENENSTOCK, F.R.C.P. eds. **Mucosal immunology**. San Diego: Academic Press, 1999. p.31-42.
- ABE, A., HECZKO, U., HEGELE, R.G., HINLAY, B.B. Two enteropathogenic type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. **J. Exp. Med.**, New York, v.188, p.1-10, 1998.
- ACERO-REYES, J.R., NEWTON, S.M.C. Expression of Cholera toxin epitopes inserted in flagelin by attenuated Salmonella strains. **Rev. Bras. Genet.**, Ribeirão Preto, v. 17, p.249, 1994.
- ACHTMAN, M., MERCER, A., KUSECK, A.P., HEUZENROEDER, M., ARONSON, W., SUTTON, A., SILVER, R. P. Six Widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. **Infection Immunity**, Washington, v.39, p.315-335, 1983.
- ADAM, A. Über die Biologie der dyspepsiekoli und ihre beziehungen zur pathogenese der dyspepsie und intoxication. **Jahrb Kinderheilk. Phys. Erziehung**, Munchen, v.101, p.295-314, 1923.
- ADU-BOBIE, J., FRANKEL, G., BAIN, C., GONÇALVES, 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.**, Washington, v.36, p.662-668, 1998.
- ALBERT, M.J., FARUQUE, S.M., FARUQUE, A. S., NEOGI, P.K., ANSARUZZAMAN, M., BHUIYAN, N. A., ALAM, K., AKBAR, M.S. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladesh children. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, p.973-977, 1995.
- ALVES, A.M.B., LÁSARO, M.O., ALMEIDA, D.F., FERREIRA, L.C.S. New

REFERÊNCIAS

- strategies against enterotoxigenic *Escherichia coli*. I- DNA vaccines against the CFA/I fimbrial adhesin. **Braz. J. med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.32, p.223-229, 1999a
- ALVES, A.M.B., LÁSARO, M.O., PYRRHO, A.S., GATTAS, C.R., ALMEIDA, D.F., FERREIRA, L.C.S. Antibody response in mice immunized with a plasmid DNA encoding the colonization factor antigen I of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.23, p.321-330, 1999b.
- BALDINI, M.M., KAPER, J.B., LEVINE, M.M., CANDY, D.C.A., MOON, H.W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, New York, v.2, p.534-538, 1983.
- BARROS, H.C., RAMOS, S.R.T.S., TRABULSI, L.R., SILVA, M.L.M. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to *HeLa* cells by serum of infants with diarrhea and by cord serum. **Braz. J. med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.28, p.83-7, 1995.
- BATCHELOR, M., KNUTTON, S., CAPRIOLI, A., HUTER, V., ZANIAL, M., DOUGAN, G., FRANKEL, G. Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.12, p.3822-2827, 1999.
- BIENESTOCK, J., ERNST, P.B., UNDERDOWN, B.J. The gastrointesrinal tract as an immunologic organ - state of art. **Ann. Allergy**, Minneapolis, v.59, n.2, p.17-20, 1987.
- BIERBER, D., RAMER, C.Y., MURRAY, W.J., TOBE, T., FERNANDEZ, R., SCHOOLNIK, G.K. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, Washington, v.280, p.2114-2118, 1998.
- BLACK, R.E. Epidemiology of diarrhoeal disease: implications for control by vaccines. **Vaccine**, Amsterdam, v.11, p.100-106, 1993.
- BRANDTZAEG, P., BJERKE, K., KETT, K., KVALE, D., ROGNUM, T.O., SCOTT, H., SOLLID, L.M., VALNES, K. Production and secretion of

REFERÊNCIAS

- immunoglobulins in the gastrointestinal tract. **Ann. Allergy**, Minneapolis, v.59, n.2, p.21-39, 1987.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Fundação Nacional da Saúde. **Manual integrado de prevenção e controle da cólera**. Brasília: Ministério da Saúde, 1994.
- BRAY, J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli neopolitana* from summer diarrhoea of infants. **J. Pathol. Bacteriol.**, Cambridge, v.57, p.239-247, 1945.
- BRAY, J., BEAVAN, T.E.D. Slide agglutination of *Bacterium coli neopolitana* in summer diarrhoea. **J. Pathol. Bacteriol.**, Cambridge, v.60, p.395-401, 1948.
- CALDERWOOD, S.B., ACHESON, D.W.K., KEUSCH, G.T., BARRET, T.J., GRIFFIN, P.M., STROCKBINE, N.A., SWAMINATHAN, B., KAPER, J.B., LEVINE, M.M., KAPLAN, B.S., KARCH, H., O'BRIEN, A.D., OBRIG, T.G., TAKEDA, Y., TARR, P.I., WACHSMUTH, I.K. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. **ASM News**, Michigan, v.62, p.118-9, 1996.
- CAMARA, L.M., CARBONARE, S.B., SILVA, M.L.M., CARNEIRO SAMPAIO, M.M.S. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to HeLa cells by human colostrum: detection of specific *slgA* related to EPEC outer membrane proteins. **Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v.103, p.307-310, 1994.
- CAMPOS, L.C., WHITTAM, T.S., GOMES, T.A.T., ANDRADE, J.R.C., TRABULSI, L.R. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, p.3282-3288, 1994.
- CARBONARE, S.B., SILVA, M.L.M., PALMEIRA, P., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S. Human colostrum IgA antibodies reacting to enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) antigens and their persistence in the faeces of a breast-fed infant. **J. Diarrhoeal Dis. Res., Dhaka**, v.15, p. 53-8, 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

REFERÊNCIAS

- antigens. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, Saint Louis, v.108, p. 113-8, 1995.
- CHART, H., ROWE, B. The outer membrane protein of enteropathogenic *Escherichia coli* described as localised adherence factor is OmpF and probably not involved in adhesion to Hep-2 cells. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.61, p.291-296, 1989.
- CONLEY, M.E., DELACROIX, D.L. Intravascular and mucosal IgA: two separate but related systems of immune response. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v.106, p.892-899, 1987.
- COSTA-CARVALHO, B.T., BERTIPOGLIA, A., SALE, D., NASPITZ, C.K., SCALETSKY, I.C.A. Detection of immunoglobulin (IgG and IgA) anti-outer membrane proteins of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in saliva, colostrum, breast milk, serum, cord blood and amniotic fluid. Study of localized adherence of EPEC to HeLa cells. **Acta Paediatr.**, Budapest, v.83, p.870-73, 1994.
- CRAVIOTO, A., MOLINA, J., MANJARREZ, A., ESLAVA, C. Enteropathogenic *Escherichia coli*: the mexican experience. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.27, suppl.1, p.21-24, 1996.
- CRAVIOTO, A., TELLO, A., VILLAFÁN RUIZ, J, NEESER, J.R. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. **J. Infect. Dis.**, Chicago, p.163, v.1247-1255, 1991.
- DAVISON, L.A., LONERDAL, B. Persistence of human milk protein in the breast-fed infant. **Acta Paediatr. Scan.**, Stockholm, v.76, p.733-740, 1987.
- DE GASPARI, OLIVEIRA, L.M.C. Production of monoclonal antibodies against *Neisseria meningitidis* that recognize specific and cross reactive antigens. In: Human antibodies and hybridoma Journal. England:1996. v.7, n.2, 1996.
- DEAN-NYSTROM, E., BOSWORTH, B., MOON, H., O'BRIEN, A. *Escherichia coli* O157:H7 requires intimin for enteropathogenicity in calves. **Infect. Immun.**, Washington, v.66, p.4560-4563, 1998.
- DEIBEL, C., KRAMER, S., CHAKRABORTY, T., EBEL, F. EspE, a novel

REFERÊNCIAS

- secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells where it appears as a tyrosine-phosphorylated protein. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.28, p.463-474, 1998.
- DELNERI, M.T., CARBONARE, S.B., SILVA, M.L.M., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S., - Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to Hep-2 cells by colostrum and milk from mothers delivering low-birth-weight neonates. **Eur. J. Pediatr.**, Berlin, v.156, p.493-8, 1997.
- DENG, W., LI, Y., VALLANCE, B.A., FINLAY, B. Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. **Infect. Immun.**, Washington, v.69, p.6323-6335, 2001.
- DIETRICH, G., GENTSCHEV, I., HESS, J., ULMER, J.B., HAUFMANN, S.H.E., GOEBEL, W. Delivery of DNA vaccines by attenuated intracellular bacteria. **Immunol. Today.**, Amsterdam, v.20, p. 251-253, 1999.
- DONALD, N., MEDEANIS, KENNY, J.F. Observations concerning the pathogenesis of *E. coli* infections in mice. **J. Immunol.**, Baltimore, v.101, p.534-540, 1968.
- DONNENBERG, M.S., GIRÓN, J.A., NATARO, J.P., KAPER, J.P. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.6, p.3427-3437, 1992a.
- DONNENBERG, M.S., KAPER, J.P. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. **Infect. Immun.**, Washington, v.59, p.4310-4317, 1991.
- DONNENBERG, M.S., KAPER, J.P. Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v.60, p.3953-3961, 1992b.
- DONNENBERG, M.S., TACKET, C.O., LOSONS, K.Y.G. Effacing of prior experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection on illness following homologous and heterologous rechallenge. **Infect. Immun.**,

REFERÊNCIAS

- Washington, v.66, p.52-58, 1998.
- DONNENBERG, M.S., WHITTAM, T.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **J. Clin. Invest.**, New York, v.107, p.539-548, 2001.
- DONNENBERG, M.S., YU, J., KAPER, J.B. The role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **J. Clin. Invest.**, New York, v.92, p.1412-1417, 1993a.
- DONNENBERG, M.S., YU, J., KAPER, J.P. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *E. coli* to epithelial cell. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.175, p.4670-4680, 1993b.
- DONNENBERG, M.S., KAPER, J.P., FINLAY, B.B. Interactions between enteropathogenic *E. coli* and host epithelial cells. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v.5, p.1090-14, 1997.
- DONNENBERG, M.S. – Entry of Enteropathogenic *Escherichia coli* into host cells. IN: MILLER, V.L. (ED). IN: **Bacterial Invasiveness**. Springer, p.79-98, 1996.
- DUPONT, H.L., FORMAT, S.B., HORNICK, R.B., SNYDER, M.J., LIBONATI, J.P., SHEAHAN, D.G., LABREC, E.H., KALAS, J.P. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhoea. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.285, p.1-9, 1971.
- EDWARDS, P.R., EWING, W.H. **Edwards and Ewing's identification of enterobacteriaceae**. 4.ed. New York: Elsevier Science, 1986.
- ELLIOT, S.J., WAINWRIGHT, L., MACDANIEL, T.K., JARVIS, K.G., DENG, Y., LAI, L.C., MCNAMARA, B.P., DONNENBERG, M.S., KAPER, J.B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *E. coli* E2348/69. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.28, p.1-4, 1998.
- FERGUNSON, W.W, JUNE, R.C. Experiments on feeding adults volunteers with *Escherichia coli* 111, B₄, a coliform organism associated with infant diarrhoea. **Am. J. Hyg.**, Baltimore, v.55, p.155-169, 1952.
- FINLAY, B.B., ROSENSHINE, I., DONNENBERG, M.S., KAPER, J.B.

REFERÊNCIAS

- Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *E. coli* adherence to HeLa cells. **Infect. Immun.**, Washington, v.60, p.2541-2543, 1992.
- FOUBISTER, V., ROSENSHINE, I., DONNENBERG, M.S., FINLAY, B.B. The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, p.3038-3040, 1994.
- FRANKEL, G., CANDY, D.C.A., EVEREST, P., DOUGAN, G. Characterization of c-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei*. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, p.1835-1842, 1994.
- FRANKEL, G.A., PHILLIPSD, I., ROSENSHINE, I., DOUGAN, G., KAPER, J.B., KNUTTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.30, p.911-921, 1998.
- GANGAROSA, E.J., MERSON, M.H. Epidemiologic assessment of the relevance of the so-called enteropathogenic serogroups of *Escherichia coli* in diarrhea. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.296, p.1210-1213, 1977.
- GHILARDI, A.C. Características de virulência e análise clonal de amostras de *Escherichia coli* dos sorogrupos O142, O127, O86. São Paulo, 1999. (Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo).
- GHILARDI, A.C., GOMES, T.A., TRABULSI, L.R. Production of cytolethal distending toxin and other virulence characteristics of *Escherichia coli* strains of serogroup O86. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.5, p.703-708, 2001.
- GILES, C., SANGSTER, G., SMITH, J. Epidemic gastroenteritis of infants in Aberdeen during 1947. **Arch. Dis. Child.**, London, v.24, p.45-53, 1949.
- GILES, C., SANGSTER, M.B. An outbreak of infantile gastroenteritis in Aberdeen. **J. Hyg.**, Cambridge, v.46, p.1-9, 1948.
- GIRÓN, J.A., DONNENBERG, M.S., MARTIN, W.C., JARVIS, K.G., KAPER,

REFERÊNCIAS

- J.B. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.168, p.1037-1041, 1993.
- GIRÓN, J.A., HO, A.S.Y., SCHOOLNIK, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, Washington, v.254, p.710-713, 1991a.
- GIRÓN, J.A., JONES, T., MILLAN-VELASCO, F., CASTRO-MUNOZ, E., ZARATE, L., FRY, J., FRANKEL, G., MOSELEY, S.L., BAUDRY, B., KAPER, J.B. Diffuse- adhering *E. coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.163, p.507-513, 1991b.
- GIRÓN, J.A., F. QADRI., K.J. JARVIS., KAPER. J.B., ALBERT. M.J. Monoclonal antibodies specific for the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v.63, v. 4949-52, 1995.
- GOLDMAN, A.S. The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflammatory and immunomodulating properties. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v.12, p.664-671, 1993.
- GOMES, T.A.T., GRIFFIN, P.M., IVEY, C., TRABULSI, L.R., RAMOS, S.T.R. EPEC infections in São Paulo. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.27, suppl.1, p.25-33, 1996.
- GOMES, T.A.T., RASSI, V., MACDONALD, K.L., RAMOS, S.R.T.S., 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 associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.164, p.331-337, 1991.
- GOMES, T.A.T., VIEIRA, M.A.M., WACHSMUTH, I.K., BLAKE, P.A., TRABULSI, L.R. Serotype-specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes in infant with and without diarrhea in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.160, p.131-135, 1989.

REFERÊNCIAS

-
- GONÇALVES, A.G., CAMPOS, L.C., GOMES, T.A.T., RODRIGUES, J., SPERADIO, V., WHITTAM, T.H., TRABULSI, L.R. Virulence properties and clonal structure of strains of *Escherichia coli* O119 serotypes. **Infect. Immun.**, Washington, v.65, p.2034-2040, 1997.
- GROSS, R.J.; ROWE, B. The virulence of *Escherichia coli*. In: _____. **Serotyping of *E. coli*: reviews and methods**. London: Academic Press, 1972. p.345-363. (Special publication of the Society for General Microbiology).
- GUILLOBEL, H.C., LUNA, M.G., CAMACHO, E.F., ALMEIDA, D.F., FERREIRA, L.C. Immunization against the colonization factor antigen I of Enterotoxigenic *Escherichia coli* by administration of a bivalent *Salmonella typhimurium aroA* strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.31, p.545-554, 1998.
- GURWITH, M., HINDE, D., GROSS, R., ROWE, B. A prospective study of enteropathogenic *Escherichia coli* in endemic diarrheal disease. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.137, p.292-297, 1978.
- GUTH, B.E.C., RAMOS, S.R.T.S., CERQUEIRA, A.M.F., ANDRADE, J.R.C., GOMES, T.A.T. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from children in São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM AND WORKSHOP ON "SHIGA TOXIN (VEROCYTOTOXIN) - PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* INFECTIONS", 4, Kyoto, **Abstract**. Kyoto, 2000. v.226, p.149.
- HANSON, L.A., BRANDTZAEG, P. The mucosal defense system: immunological disorders in infants and children. In: Stiehm, E.R., ed.. 3.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1989. p.116-155.
- HANSON, L.A., AHLSTEDT, S., ANDERSSON, B., CARLSSON, B., COLE, M.F., CRUZ, J.R., DAHLGREN, U., ERICSSON, T.H., JALIL, F., KHAN, S.R., MELLANDER, L., SCHNEERSON, R., SVANBORG-EDÉN, C., SODERSTOM, T., WADSWORTH, C. Mucosal Immunity. In: **The Secretory Immune System**. Eds. J. McGhee, J. Mestecky. New York, American New York Academy of Science. v.409, p.1-20, 1983.

REFERÊNCIAS

- HANSON, L.A., ASHRAF, R., CARLSSON, B., JALIL, F., KARLBER, G.J., LIND BLAND, B.S. KHAN, S.R., ZAMAN, S. Save the children. In: Peace health and development. Ed. L.A.Hanson & Kohler, University of Göteborg & the Nordic School of Public Health, N.H.V. Report, 1993, v.4, p.31-31.
- HICKS, S., FRANKEL, G., KAPER, J.B., DOUGAN, G., PHILIPS, A.D. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *E. coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. **Infect. Immun.**, Washington, v.66, p.1570-1578, 1998.
- HUSBAND, A.J., GLEESON, M. Ontogeny of mucosal immunity environmental and behavioral influences. **Brain. Behav. Immunol.**, Washington, v.10, p.188-204, 1996.
- IRINO, K., GOMES, T.A.T., VAZ, T.I., KANO, E., KATO, M.A.M.F., DIAS, A.M.G., GONÇALVES, C.R., GUTH, B.E.C. Prevalence of Shiga toxin and intimin gene sequence among *Escherichia coli* of serogroup O26, O55, O111, O119 and O157 isolated in São Paulo, Brazil. In: International Symposium and Workshop on "Shiga toxin (verotoxin)- producing *Escherichia coli* infections", 4., Kyoto, Japan:2000. Abstract 226, p.107.
- IRINO, K., KANO, E., DIAS, A.M.G., CALZADA, C.T., NEME, S.N., FERNANDES, S.A., NAKARARA, L.K., PESSÔA, G.V.A. Isolamento de bactérias enteropatogênicas de coprocultura realizadas durante o período de 1977-1983, na Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.44, p.161-178, 1984.
- ISMAILI, A., PHILLPOTT, D.J., DYTOC, M.T., SONI, R., RATNAM, S., SHERMAN, P.M. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, **Infect. Immun.**, Washington, v.63, p.3316-26, 1995.
- ISMAILI, A., PHILLPOTT, D.J., DYTOC, M.T., SHERMAN, P.M. α -Actinin accumulation in epithelial cells infected with attaching and effacing gastrointestinal pathogens. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.172, p.1393-96, 1995.
- JARVIS, K.G., GIRÓN, J.A., JERSE, A.E., MCDANIEL, T.K., DONNENBERG,

REFERÊNCIAS

- M.S., KAPER, J.B. Enteropathogenic *E. coli* contains a putative type secretion system necessary for the export of protein involved in attaching and effacing lesion formation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.92, p.7996-8000, 1995.
- JERSE, A., KAPER, J.B. The *eae* gene of enteropathogenic *E. coli* encodes a 94Kda membrane protein the expression of which is fluenced by EAF plasmid. **Infect. Immun.**, Washington, v.59, p.4302-4309, 1991.
- JERSE, A.E., YU, J., TALL, B.D., KAPER, J.B. A genetic locus of enterophatogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.87, p.7839-7843, 1990.
- KAGNOFF, M. **Immunology of the digestive system**. in: physiology of the gastrointestinal tract. In: Johnson, L.R. 2.ed. New York: Raven Press, 1987. p.1699-1719.
- KAPER, J.B. Defining EPEC. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.27, suppl.1, p.130-133, 1996.
- KARCH, H., HEESEMANN, J., LAUFS, R., O'BRIEN, A.D., TACKET, C.O., LEVINE, M.M. A plasmid of Entero hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. **Infect. Immun.**, Washington, v.55, p.455-61, 1987.
- KARMALI, M.A. Infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.2, p.15-38, 1989.
- KARMALI, M.A., STEELE, B.T., PETRIC, M., LIM, C. Sporadic cases haemolytic- uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **Lancet**, London, v.1, p.629-620, 1983.
- KAWAGISHI, I., MÜLLER, U., MACNAB, R.M. Subdivision of flagellar region III of the *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* chromossomes and identification of two additional flagellar genes. **J. Gen. Microbiol.**, Colchesler, v.138, p.1051-1065, 1992.

REFERÊNCIAS

- KÄYTHY, H., PELTOLA H, MÄKELÄ, P.H. Serum antibodies after vaccination with *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide and responses to reimmunization, no evidence of immunologic tolerance or memory. **Pediatrics**, New York, v.74, p.857-865, 1984.
- 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**, Cambridge, v.91, p.511-520, 1997.
- KENNY, B., HUGHES, B.W., MASADA, M.P., ALLISON, A.C. Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, v.121, p.157-166, 1989.
- KENNY, B., LAI, L.C., FINLAY, B.B., DONNENBERG, M.S. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is require to signals in epithelial cells. **Mol. microbiol.**, Oxford, v.20, p.313-323, 1996.
- KIRBY, A.C., HALL, E.G., COACKLEY, W. Neonatal diarrhoea and vomiting: outbreaks in the same maternity unit. **Lancet**, London, v.2, p.201-207, 1950.
- KNUTTON, S., BALDWIN, T., WILLIAMS, P.H., MCNEISH, A.S. Action accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, Washington, v.57, p.1290-1298, 1989.
- KNUTTON, S., COLLINGTON, G.K., BALDWIN, T., HAIG, R.D., WILLIAMNS, P.H. Cellular responses to EPEC infection. **Rev. Microbiol., São Paulo.**, v.27, (suppl.1), p.84-94, 1996.
- KNUTTON, S., ROSENSHINE, I., PALLLEN, M.J., NISAN, I., NEVES, B.C., BAIN, C., WOLFF, C., DOUGAN, G., FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *E. coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **Embo J.**, Oxford, v.17, p.2166-76, 1998.
- KOMEDA, Y. Transcriptional control of flagelar genes in *Escherichia coli* K12, **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.168, p. 1315-1318, 1986.
- KRAEHENBUHL, J.P., WELTZIN, R., SCHAERER, E., SOLARI, R. Mucosal

REFERÊNCIAS

- immunity and the mammary gland. In: Hanson, L.A., ed. **Biology of human milk**. New York: Raven Press, 1988. v.15, p.185-195. (Nestlé Nutrition Workshop Series).
- KUTSUKAKE, K., LINO, T. Transcriptional analysis of the flagellar regulation of *Salmonella typhimurium*. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.172, p.741-747, 1990.
- KWASNISH, K., STROBER, W. T cell regulation of IgA immunoglobulin production in gut-associated lymphoid tissues. **Mol. Immunol.**, Oxford, v.20, n.9, p.917-30, 1983.
- LADJEVA, I., PETERMAN, J.H., MESTECKY, J. IgA subclasses of human colostral antibodies specific for microbial and food antigens. **Clin. Exp. Immunol.**, Oxford, v.78, p.85-90, 1989.
- LAEMMILI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, Londres, v.227, p.680-685, 1970.
- LAI, L.C., WAINWRIGHT, L.A., STONE, K.D., DONNENBERG, M.S. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. **Infect. Immun.**, Washington, v.65, p.2211-2217, 1997.
- LÁSARO, M.O., FERREIRA, L.C.S. Vacinas contra diarreia. **Biotecnologia**, Ijuí, v.14, p.28-32, 2000.
- LAW, D. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.7, p.152-173, 1994.
- LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, Chicago, 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 and heat-stable enterotoxins are non-invasive. **Lancet**, London, v.1, p.1119-1122, 1978.
- LEVINE, M.M., NATARO, J.P., KARCH, H., BALDINI, M., KAPER, J.B., BLACK,

REFERÊNCIAS

- R.E., CLEMENTS, M.L. The diarrhoeal response of humans to same serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.152, p.550-559, 1985.
- LOUIE, M., AZEVEDO, J.C.S., HANDELSMAN, M.Y.C., CLARKE, C.G., ALLY, B., DYTOC, M., SHERMAN, P., BRUNTON, J. Expression and characterization of the *eaeA* gene product of *Escherichia coli* serotype O157:H7. **Infect. Immun.**, Washington, v.61, p.4085-4092, 1993.
- LOWRY, O.H, ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.
- MACCLUSKIE, M.J., DAVIS, H.L. Novel strategies using DNA for the induction of mucosal immunity. **Immunology**, Baltimore,, v.19, p.303-329, 1999.
- MACDANIEL, T.K., JARVIS, K.G., DONNENBERG, M.S., KAPER, J.B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.92, p.1664-1668, 1995.
- MACNABB, Z., TOMASI, T.B. Host defense mechanism at mucosal surfaces. **Ann. Rev. Microbiol.**, Paris, v.35, p.477-496, 1981.
- MARCHES, O., NOUGAYREDE, J.P., BOULLIER, S., MAINIL, J., CHARLIER, G., RAY-MOD, I., POHL, P., BOURY, M., RYCKE DE, J., MILON, A., OSWALD, E. Role of *tir* and *intimin* in the virulence of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O103:H2. **Infect. Immun.**, Washington, v.68, p.2171-2182, 2000.
- MARINOTO, D.B.E., OLIVEIRA, A.P.S., DE GASPARI, E.N. Estudo da cinética da produção de anticorpos em camundongos BALB/c imunizados pela via intragástrica com *Escherichia coli* (E2348/69). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.60, supl.1, p.126, 2001.
- MARTINEZ, M.B., TADDEI, C.R., RUIZ-TAGLE, A., TRABULSI, L.R., GIRÓN, J.A. Antibody response of children with enteropathogenic *Escherichia coli*

REFERÊNCIAS

- infection to the Bundle-Forming Pilus and *Locus* of Enterocyte Effacement-encoded virulence determinants. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.179, p.269-274, 1999.
- MCNABBS, P.C., TOMASI, T.B. Host defense mechanism at mucosal surfaces. **Ann. Rev. Microbiol.**, Paris, v.35, p.477-496, 1981.
- MESTECKY, J., MCGHEE, J.R. IgA: molecular and cellular interactions involved in IgA biosynthesis and immune response. **Adv. Immunol.**, New York, v.40, p.53-245, 1987.
- MESTECKY, J., MCGHEE, J.R., CRAGO, S.S., JACKSON, S., KILIAN, M., KIYONO, H., BABB, J.C., MICHALEK, S.M. Molecular-cellular interactions in the secretory IgA response. **J. Reticul. Society**, New York, v.28, p.45-60, 1980.
- MOENS, S., VANDERLEYDEN, F. Function of bacterial flagella. **Crit. Rev. Microbiol.**, Cleveland, v.22, p.67-100, 1996.
- MOON, H.W., WHIPP, S.C., ARGENZIO, R.A., LEVINE, M.M., GIANELLA, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, Washington, v.41, p.1340-1351, 1983.
- NATARO, J.P., BALDINI, M.M., KAPER, J.B., BLACK, R.E., BRAVO, N., LEVINE, M.M. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.152, p.560-565, 1985.
- NATARO, J.P., Kaper, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.11, n.1, p.142-201, 1998.
- NETER, E., WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., GINO, R.M., GORZYNSKI, E.A. Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* in sera of children of various ages. **Pediatrics**, New York, v.16, p.801-808, 1955.
- NEWTON, S.M.C., JACOB, C.O., STOCKER, B.A.D. Immune response to cholera toxin epitope insert in *Salmonella flagellin*. **Science**, Washington,

REFERÊNCIAS

- v.244, p.70-72, 1989.
- NICHOLAS, G.G., SOLOMAN L., GARY, K.S., KESSLEK, T.W., DONALD, A.G. Purification and characterization of *Haemophilus influenzae* pili and their structural and serological relatedness to *Escherichia coli* and manose-sensitive pili. **J. Exp. Med.**, New York, v.161, p.145-159, 1985.
- O'BRIEN, A.D., HOLMES, R.K. Shiga nad Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.51, p.206-20, 1987.
- OFEK, I, MIRELMAN, D., SHARON, N. Adherence of *E. coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. **Nature**, Londres, v.265, p.623-625, 1977.
- OGAWA, H., NAKAMURA, A., SAKAZAKI, R. Pathogenic proprerties of enteropathogenic *Escherichia coli* from diarrheal children and adults. **Jap. J. Med. Sci. Biol.**, Tokyo, v.21, p.339-349, 1968.
- OGRA, P.L., LOSONSKY, G.A., FISHAUT, M. Colostrun-derived immunity and maternal-neonatal interaction. **Ann. NY Acad. Sci.**, New York, v.409, p.82-93, 1983.
- OGRA, P.L., MESTECKY, J., LAMM, M.E., STROKER, W., BIENENSTOCK, J., MCGHEE, J.R., BIENENSTOCK, F.R.C.P. **Handbook of mucosal Immunology**. 1.ed. San Diego: Academic Press, 1994.
- ORDÓÑEZ, J.G. Influência das condições ambientais na expressão da fímbria BFP em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC). São Paulo, 1998. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas - USP).
- PATON, A.W., PATON, J.C. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v.11, p.450-479, 1998.
- PALMEIRA, P. Efeito do colostro humano sobre a adesão e a citotoxicidade de *Escherichia coli* produtoras de toxinas shiga (STEC). São Paulo, 2001. (Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas – USP).
- PARISSI-CRIVELLI, A., PARISSI-CRIVELLI, J.M., GIRÓN, J.A. Recognition of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence Determinants by Human

REFERÊNCIAS

- Colostrum and Serum Antibodies. **J.Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, p.2696-2700, 2000.
- RILEY, L.W., REMIS, R.S., HELGERSON, S.D., MCGEE, H.B., WELIS, J.G., DAVIS, B.R., HEBERT, R.J., OLVOFF, 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.**, Boston, v.308, p.681-685, 1987.
- ROBINS-BROWNE, R.M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.9, p.28-53, 1987.
- RODRIGUES, J., SCARLETSKY, I.C., CAMPOS, L.C., GOMES, T.A., WHITTAM, T.S., TRABULSI, L.R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. **Infect. Immun.**, Washington, v. 64, p.2680-2686, 1996.
- ROSENSHINE, I., RUSCHKOWSKI, S., STEIN, M., REINSCHIED, D. MILLS, S.D., FINLAY, B.B. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. **EMBO. J.**, Oxford, v.15, p.2613-24, 1996.
- ROSA, A.C.P., MARIANO, A.T. PEREIRA, A.M.S., TIBANA, A., GOMES, T.A.T., ANDRADE, J.R.C. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Microbiol.**, Edinburg, v. 47, p.781-90, 1998.
- SACK, R.B. Serotyping of *E. coli*. **Lancet**, London, v.1, p.1132, 1976.
- SANCHES, M.I., KELLER, R., HARTLAND, E.L., FIGUEREDO, D.M.M., BATCHELOR, M., MARTINEZ, M.B., DOUGAN, G., CARNEIRO-SAMPAIO, M.M.S., FRANKEL, G., TRABULSI, L.R. Human colostrum and serum contain antibodies reactive to the intimin-binding region of the enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, New York, v.30, p.73-77, 2000.
- SANSONETTI, P.J. Slaying the Hydra all at once or head by head? **Nature Medicine**, Londres, v.4, p.499-500, 1998.
- SAVARINO, S.J., FASANO, A., WATSON, J., MARTIN, B.M., LEVINE, M.M.,

REFERÊNCIAS

-
- GUANDALINI, S., GUERRY, P. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v.90, p.3093-3097, 1993.
- SAVIDGE, T.C. The life and times of an intestinal M cell. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v.8, p.301-306, 1996.
- SCALETSKY, I.C.A., SILVA, M.L.M, TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, Washington, v.45, p.534-536, 1984.
- 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 characterization *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v.44, p.438-443, 1996.
- SCOTT, D., KAPER, J.B. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. **Infect. Immun.**, Washington, v.62, p.244-251, 1994.
- SERÉNY, B. Biochemical reactions and virulence of *Escherichia coli* 0124:K72 (B17). **Acta Microbiol. Hung.**, Budapest, v.10, p.11-18, 1963.
- SHERMAN, P., COCKERIL III, F., SONI, R., BRUNTON, J. Outer membranes are competitive inhibitors of *Escherichia coli* 0157:H7 adherence to epithelial cells. **Infect. Immun.**, Washington, v.159, p.890-9, 1991.
- SILVA, C.L. Vacinas gênicas. *Biotecnologia*, ijuí, v.3, p.323-334, 1997.
- SILVA, M.L.M., GIAMPLAGIA, C.M.S. Effect of colostrum and human milk on the adherence to HeLa cells of common and rare enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes found in Brazil. **Rev. Microbiol., São Paulo**, v.23, p.211-16, 1992.
- STONE, K.D., ZHANG, H.Z., CARLSON, L. K., DONNENBERG, M.S. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the BFP ultrastructure. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.20, p.325-38, 1996.
- STROBER, W., JAMES, S.P. The mucosal immune system. In: STITES, D.P.,

REFERÊNCIAS

- TERR, A.I. **Basic and clinical Immunology**. 7.ed. California: Appleton & Lange, 1991. p.175-85.
- TACKET, C.O., SZTEIN, M.B., LOSSONSKY, G., ABE, A., FINLAY, B.B., MC-NAMARA, B.P., FANTRY, G.T., JAMES, S.P., NATARO, J.P., LEVINE, M.M., DONNENBERG, M.S. Role of EspB in experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Infect. Immun.**, Washington, v.68, p.3586-3695, 2000.
- TAYLOR, J., POWELL, B.W., WRIGHT, J. Infantile diarrhoea and vomiting: a clinical bacteriological investigation. **Br. Med. J.**, London, v.2, p.117-125, 1949.
- THEA, D.M., KEUSCH, G.T. Digestive system. In: SCHAECHTER, M., MEDOFF, G., EISENSTEIN, B. I., eds. **Mechanism of microbial disease**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1993. p.695-715.
- TOLEDO, M.R., ALVARIZA, M.D.C., MURAHOVSKI, J., RAMOS, S.R., TRABULSI, L.R. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhoea in infants. **Infect. immun.**, Washington, v.39, p.586-589, 1983.
- TOMASI, T.B., PLAUT, A.G. Humoral aspects of mucosal immunity. In: GALLIN, J., FAUCI, A., eds. **Advances in host defense mechanism-mucosal immunity**. New York: Raven Press, 1985. v.4.
- TRABULSI, L.R., CAMPOS, L.C., WHITTAM, T.S., GOMES, T.A.T., RODRIGUES, J., GONÇALVES, A.G. Tradicional and non - tradicional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.27, p.1-6, 1996.
- TRABULSI, L.R., TOLEDO, R.F., CEBALLOS, B.S.O.-Epidemiology of diarrhoeal diseases in South America. In: **Infectious diarrhoea in the young**. Eds.S. Tzipori et al. Elsevier Science Publishers, B.V. p.121-5, 1985.
- TZIPORI, S., GUNZER, F., DONNENBERG, M., MONTIGNY DE, L., KAPER, J., DONOHUE-ROLFE, A. The role of *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. **Infect. Immun.**, Washington, v.63, p.3621-3627, 1995.

REFERÊNCIAS

- VAERMAN, J.P.- The secretory immune system. **Antibiot. Chemother.**, Basel, v.39, p.41-50, 1987.
- VALLE, G.R.F., GOMES, T.A.T., IRINO, K., TRABULSI, L.R. The tradicional enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) serogroup O125 comprises serotypes which are mainly associated with the category of enteroaggregative *E. coli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.152, p.95-100, 1997.
- VOSS, E., PATON, A.W., MANNING, P.A., PATON, J.C. Molecular analysis of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O111:H- proteins which sera from patients with hemolytic-uremic syndrome **Infect. Immun.**, Washington, v.66, p.1467-1472, 1998.
- WASSENAAR, T.M., AYLING, R., NEWELL, D.G. Colonization of quacks by mobility mutants of *Campylobacter Jejuni* demonstrates the importance of flagelin A expression. **J. Gen. Microbiol.**, Colchesler, v.139, p.1171-1175, 1993.
- WOLD, A.E., MESTECKY, J., TOMANA, M., KOBATA, A., OHBAYASHI, H., ENDO, T., SVANBORG-EDEN, C. Secretory IgA carries oligosaccharide receptor for *E. coli* type 1 fimbrial lectin. **Infect. Immun.**, Washington, v.58, n.9, p.3073-3077, 1990.
- WOLFF, C., NISAN, I., HANSKY, E., FRANKEL, G., ROSENSHINE, I. Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.28, p.143-55, 1998.
- YU, J., KAPER, J.B. Cloning and characterization of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v.6, p.411-417, 1992.