

Yliria Ferreira da Silva

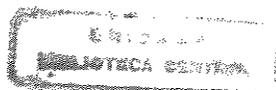
“Estudos complementares da fímbria PCFO2 expressa por cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênica”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) Yliria Ferreira da Silva e aprovada pela Comissão Julgadora. Lucila Costallat Ricci

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Genética e Biologia Molecular na Área de Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci

2001



UNICAMP^I
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE B e
 N.º CHAMADA:
T/UNICAMP
Si38e
 V. _____ Ex. _____
 TOMBO BC/ 470-24
 PROC. 16-892/07
 C D
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 20/11/07
 N.º CPD _____

CM00161925-B

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Silva, Yliria Ferreira da

Si38e

Estudos complementares da fimbria PCFO2 expressa por cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênica/Yliria Ferreira da Silva. -- Campinas, SP.[s.n.], 2001
 105 f: ilus.

Orientadora: Lucila Costallat Ricci
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

1. Fator de colonização. 2. *Escherichia coli*. 3. Monoclonal. 4. Epidemiologia.
- I. Ricci, Lucila Costallat. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Aos meus pais, pelo constante incentivo, apoio e carinho;
Ao meu filho, pela paciência e compreensão.**

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci, pela orientação, amizade, paciência e sobretudo pela sabedoria transmitida.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi, pelo apoio e por participar da banca prévia e banca definitiva.

Ao Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira Araújo, pelo apoio e por participar da banca examinadora.

À Profa. Dra. Gleize Villela Carbonell, pelo apoio e por participar como suplente da banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pelo constante apoio e por participar da banca prévia.

À Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach, pelo apoio e por participar da banca prévia.

À Profa. Dra. Liana Verinaud, pelo apoio e por participar do exame de qualificação.

À Profa. Dra. Clarice Weis Arns, pelo apoio e por participar do exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, pelo apoio e por participar do exame de qualificação.

À Profa. Dra. Beatriz Guth (UNIFESP), por ceder a amostra E17018/A, relevante para a realização dos experimentos.

Ao amigo Gerson pelo constante apoio e amizade.

Às amigas Mirtis, Michelle, Keila, Leila e Cristiane pelo apoio e amizade.

Aos amigos Paula e Evandro, pela ajuda no laboratório e pela amizade.

À amiga Juliana S. Kato por todos os ensinamentos.

À Lúcia, Lourdes, Zaira e Rosa, por toda ajuda e atenção.

À todos os funcionários do Departamento de Microbiologia.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	XI
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	12
3- MATERIAI E MÉTODOS	13
3.1. Amostras de <i>Escherichia coli</i> em estudo	13
3.1.1. Amostras padrão de <i>Escherichia coli</i> produtoras de diferentes fatores de colonização	13
3.2. Purificação da fimbria PCFO2	17
3.2.1. Metodologia padronizada	17
3.2.2. Reavaliação da metodologia de purificação: precipitação fracionada com sulfato de amônio	18
3.2.3. Diálise contra DOC (desoxicolato de sódio)	19
3.3. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford	19
3.4. Preparo de soros anti-FC	20
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	21
3.6. Avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais e soros policlonais frente às fimbrias homólogas e heterólogas através da técnica de “Western blot”	22
3.7. Titulação dos monoclonais estocados	23

3.7.1.ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) para determinação de títulos dos anticorpos monoclonais-----	23
3.7.2. Prova de Inibição do ELISA-----	24
3.7.3. Prova de Inibição cruzada do ELISA-----	25
4- RESULTADOS-----	26
4.1. Reavaliação da metodologia de purificação de PCFO2-----	26
4.1.1.Avaliação em SDS-PAGE da metodologia de purificação de PCFO2 através de precipitação fracionada com sulfato de amônio e diálise contra DOC-----	26
4.2. Padrão de bandas em SDS-PAGE, de extratos semi-purificados das cepas em estudo e cepas Padrão de FC-----	27
4.3. Verificação da adequação da metodologia de purificação de PCFO2-----	27
4.4. Avaliação da reatividade de MAbs e “pool” de MAbs dos isotipos IgA e IgG2b frente as proteínas purificadas de PCFO2-----	28
4.4.1. Reatividade de “pool” de MAbs do isotipo IgG2b e IgA frente às extrações semi-purificadas das amostras em estudo e PCFO2-----	28
4.5. Reatividade em Western blotting das amostras em estudo frente ao soro anti-312-2---	29
4.6. Reatividade em Western blotting de extratos semi-purificados das cepas em estudo e de cepas padrão de FC frente a diferentes soros-----	29

4.7. Reatividade em Western blotting de extratos semi-purificados de PCFO2 frente ao soro anti-CFA/IV e anti D242-----	30
4.8. Determinação do título das cepas CFA/IV identificadas, inicialmente, como expressando PCFO2-----	30
4.9. Avaliação dos extratos das cepas em estudo em Provas de Inibição Cruzada do ELISA--	31
5- DISCUSSÃO -----	58
6- CONCLUSÕES -----	67
7- APÊNDICE -----	70
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	79

RESUMO

Cepas de *Escherichia coli* podem apresentar mecanismos e fatores de virulência diversos podendo causar no homem, principalmente, infecções intestinais. Desta forma, tendo-se como base os dados clínicos, expressão de mecanismos e de fatores de virulência, dados epidemiológicos, sorotipagem e análises moleculares, dentre outros, as cepas de *E. coli* diarreio gênicas humanas podem ser classificadas em pelo menos sete grupos de enteropatogenicidade. Com relação ao grupo diarreio gênico representado pela *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), a identificação destes patógenos incluem a pesquisa das enterotoxinas STa e/ou LT e a expressão de fatores de colonização (FC). Estes últimos, também denominados de adesinas, permitem a colonização da bactéria à mucosa do intestino delgado, podendo variar morfológica e antígenicamente. Vários FC já foram identificados e caracterizados em cepas ETEC isoladas de diferentes regiões geográficas. Em trabalhos anteriores, a fimbria PCFO2 foi identificada, caracterizada e purificada a partir de 2 cepas ETEC LT+ pertencentes ao sorogrupo O2, isoladas no nosso meio. Na seqüência dos trabalhos, a partir da fimbria purificada, 9 hibridomas secretores de anticorpos monoclonais reativos com PCFO2 foram obtidos, seus isotipos determinados e soluções ascíticas dos mesmos preparadas e tituladas em provas de Western blotting e ELISA. Após a padronização da prova de Inibição do ELISA, desenvolvida com MAbs dos isotipos IgA (4) e IgG2b (5) e pools dos mesmos, mais 5 amostras diarreio gênicas de *E. coli* foram identificadas como sendo PCFO2+. Possível homologia (analogia) de epítomos com CFA/II foi verificada com estes MAbs, através de observações em imunomicroscopia. Neste trabalho, dando continuidade aos estudos relacionados ao PCFO2, procurou-se inicialmente reavaliar-se a metodologia de purificação e comprovar-se a Prova de Inibição do ELISA padronizada para a identificação desta fimbria, além de verificar-se possíveis homologias de epítomos entre PCFO2 e outros FC, descritos como os mais freqüentemente identificados em cepas ETEC isoladas de fezes humanas. Com base nos resultados obtidos, comprovou-se que MAbs do isotipo IgA reconhecem epítomos distintos dos MAbs IgG2b, uma vez que estes últimos são capazes de reagirem com uma segunda subunidade de 15 kDa de PCFO2, em provas de Western blotting.

Esta nova subunidade desta fimbria talvez deva corresponder ao “tip” da mesma. Pelos experimentos desenvolvidos verificou-se que apenas as amostras 312-2 e 312-3, dentre as cinco cepas identificadas inicialmente como PCFO2+, expressavam realmente esta fimbria apresentando, também, a fração de 15kDa. Quanto às amostras D242 e D243, estas demonstraram pertencer ao complexo CFA/IV expressando CS5 e CS6 sendo que esta última subunidade apresenta epítomos idênticos aos expressos em PCFO2. Quanto às amostras pertencentes ao sorogrupo O2, nenhuma reação inespecífica foi verificada. Portanto, a Prova de Inibição do ELISA desenvolvida com MAbs do isotipo IgG2b demonstrou ser adequada não só para a identificação das duas subunidades de PCFO2 expressas em cepas ETEC, como também de amostras ETEC do complexo CFA/IV, que sempre expressam a subunidade CS6.

ABSTRACT

Some strains of *Escherichia coli* may express different mechanisms and virulence factors representing one of several highly adapted clones which together have evolved the ability to cause a broad spectrum of human and animal diseases. With respect to enteric diarrheal diseases caused by *E. coli* strains, seven categories of diarrheagenic *E. coli* isolated from human stool cultures have been classified, based on clinical observations, mechanisms, virulence factors, epidemiologic studies, serotypes and molecular analysis. The group represented by enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) is identified by ST and/or LT enterotoxins production and expression of colonization factors (CF). These adhesins allow bacteria colonization on the surface of the small bowel mucosa. Detection of CF in all ETEC strains identified in the different geographic regions of the world is impractical because of their great number and heterogeneity. Previous studies, a new putative colonization factor (PCF) was characterized in isolates of ETEC from human diarrheal stools at Ouro Preto (MG) Brazil, expressing just LT and belonging to serogroup O2. This fimbriae was named PCFO2, and with this purified antigen nine hybridomas secreting MAbs (monoclonal antibodies) against PCFO2 were produced. For standardization of Inhibition ELISA Test to identify PCFO2 in enterotoxigenic strains pools of these MAbs, belonging to isotypes IgA (4) and IgG2b (5), were tested using this immune reaction. After testing new five ETEC strains presented positive results to PCFO2, all belonging to serogroup O2. The aim of this study included improvement of the purification methods of this fimbriae and evidences confirming sensibility and specificity of Inhibition ELISA Test in PCFO2 identification. The objectives proposed also included study of possible epitopes similarity between this fimbriae and the

most frequently CF reported in epidemiological studies. Ours results confirmed that MAbs belonging to IgA and IgG2b isotypes reacted with different epitopes of PCFO2. With respect to IgG2b a new subunit or adhesin presenting about 15 kDa was identified in Western blotting reactions in semi-purified proteic extraction of PCFO2 strain. Regarding to Inhibition ELISA Test developed with MAbs belonging to both isotypes data confirmed expression of PCFO2 just by 312-2 and 312-3 isolates. Antigenic similarities was demonstrated between CS6 belonging to CFA/IV complex and PCFO2. Results demonstrated that D242 and D243 express CS5 and CS6. We conclude that the Inhibition ELISA Test developed with MAbs of isotype IgG2b were able to identify not just ETEC strains expressing PCFO2 but also expressing CS6, representing an important tool for the identification of these adhesins.

1 - INTRODUÇÃO

A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Ewing *et al.*, 1986). Foi descrito pela primeira vez por Theodor Escherich em 1885, que o denominou, inicialmente, de *Bacterium coli*. É uma bactéria anaeróbica facultativa, presente na flora do intestino de mamíferos e aves, desempenhando importante papel na manutenção da fisiologia intestinal (Drasar & Hill, 1974; Hinson & Willians, 1989; Levine, 1987).

Apesar de ser a espécie gram-negativa predominante na flora normal do intestino, algumas cepas de *E. coli* podem apresentar mecanismos e fatores de virulência que a tornam patogênicas ao hospedeiro, podendo causar no homem, principalmente, infecções intestinais representadas por quadros de diarreia aguda e/ou disenteria (Blanco & Blanco, 1993; Blanco & Gonzáles, 1985; Gonzáles & Blanco, 1987; Levine, 1987; Robins-Browne, 1987; Sack, 1978).

Além de infecções intestinais, a *E. coli* patogênica pode causar, também, infecções extra-intestinais tais como a síndrome urêmica hemolítica (HUS), (Nataro & Kaper, 1998), infecções nos rins, septicemia e pneumonia, tanto no homem como em animais (Blanco & Blanco, 1993).

Diferentes amostras de *E. coli* podem possuir genes para um ou mais fatores de virulência, estes últimos normalmente reunidos em “clusters” ou sequências gênicas de “operons” controlados por um mesmo “regulon”. Fatores e mecanismos de patogenicidade expressos por cepas de *E. coli*, podem estar associados à diferentes quadros de doenças, atuando estas bactérias como agentes primários ou secundários destas síndromes (Salyers & Whitt, 1994).

Ainda, com relação às infecções extra-intestinais no homem, cepas de *E. coli* também podem estar associadas à pielonefrite (Johnson *et al.*, 1987) e à meningite do recém-nascido, estando esta última associada geralmente a cepas capazes de expressar o antígeno colomínico K1 (ácido poli-acetil neuramínico), presente na cápsula dessas bactérias, que apresentam

epítopos comuns aos encontrados na cápsula da *Neisseria meningitidis*, grupo B (Sussman, 1985).

Como já mencionado, a maioria das cepas de *E. coli* isoladas de fezes humanas e de animais não são patogênicas, por não apresentarem genes relacionados à patogenicidade. Sendo assim, é muito importante que se possa diferenciar dentre as amostras de *E. coli* isoladas, se estas são cepas diarreio gênicas, responsáveis por surtos de diarreia e/ou disenteria, ou membros da microbiota intestinal normal.

A versatilidade encontrada nos genomas da *E. coli* diarreio gênica associa-se, principalmente, a duas configurações genéticas: virulência devida a genes plasmidiais ou a verdadeiras ilhas de patogenicidade presentes no cromossomo da cepa patogênica (Nataro & Kaper, 1998).

Kauffmann em 1947, foi o primeiro a procurar identificar dentre as cepas de *E. coli* isoladas de fezes diarreicas, quais seriam as patogênicas. Desta forma propôs, pela primeira vez, que as amostras de *E. coli* fossem pesquisadas tendo-se como base seus principais antígenos de superfície. Estes foram denominados de “O”, representando o lipopolissacarídeo (LPS) termo-estável presente na membrana externa da parede das bactérias gram-negativas; antígeno “H”, representando a proteína do flagelo (destruída por fervura a 100°C por 30 minutos) e “K”, representando os antígenos capsulares expressos nos tipos A, B e L, por apresentarem variações quanto à termo-resistência. Recentemente, verificou-se que muitas estruturas diferentes, expressas por cepas de *E. coli* e que deveriam corresponder ao antígeno “K”, na verdade incluíam estruturas fimbriais. Propôs-se, então, designar-se dentro deste grupo antigênico, apenas os polissacarídeos acidificados (Lior, 1996), excluindo-se as proteínas, por estas representarem normalmente adesinas, atualmente designadas pela inicial “F” (Nataro & Kaper, 1998).

Nos procedimentos de sorogrupagem, determina-se o antígeno “O”, sendo que para este procedimento o antígeno “K” deve ser eliminado através da fervura da amostra a 121°C durante 1 hora (Gaastra & Graaf, 1982). Porém, quando existir disponibilidade dos soros específicos, o antígeno “K” pode ser incluído na sorogrupagem. Para a determinação do sorotipo, é obrigatório a pesquisa do antígeno “H”, caracterizando-se a amostra em O:H ou O:K:H (Kauffmann, 1947).

A identificação sorológica dos antígenos “O” e “H” tem permitido relacionar-se diferentes cepas de *E. coli* com algumas doenças causadas por estas bactérias, tais como quadros de septicemia e a meningite do recém-nascido, onde a maioria das cepas envolvidas pertencem ao sorogrupo O18:K1 (Achtman *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 1992; Korhonen *et al.*, 1985; Sarff *et al.*, 1975).

Nos quadros entéricos, envolvendo a *E. coli* diarreio gênica, a sorogrupagem pode auxiliar, mas não determina se a cepa é patogênica, tendo-se que se pesquisar na mesma, a expressão de fatores e mecanismos de virulência (Blanco & Blanco, 1993; Levine *et al.*, 1993; Nataro & Kaper, 1998), sendo a única exceção representada por cepas do sorotipo O157:H7, cuja sorotipagem serve como marcação da *E. coli* enterohemorrágica ou EHEC.

Atualmente, as linhagens de *Escherichia coli* diarreio gênica para o homem, podem ser classificadas em pelo menos sete grupos de patogenicidade (Nataro & Kaper, 1998; Trabulsi *et al.*, 1996). Na classificação destes grupos, destacam-se: *Escherichia coli* enteropatogênica classe I (EPEC classe I); *Escherichia coli* enteropatogênica classe II (EPEC classe II) (Rodrigues *et al.*, 1996); *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (Levine, 1987); *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) (Levine, 1987); *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (Levine, 1987; Salyers & Whitt, 1994); *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) (Bhan *et al.*, 1989; Nataro *et al.*, 1987) e *Escherichia coli* apresentando aderência difusa (DAEC) (Bilge *et al.*, 1989; Girón *et al.*, 1991; Levine *et al.*, 1993).

As cepas pertencentes a estes grupos de patogenicidade, de maneira geral apresentam características específicas tais como manifestações clínicas, mecanismos e fatores de virulência, tipo de interação com a mucosa intestinal do hospedeiro, epidemiologia e associação a determinados sorogrupos e/ou sorotipos (Levine, 1987).

A caracterização dos mecanismos de patogenicidade tem demonstrado que a *E. coli* pode expressar grande variedade de fatores de virulência, incluindo a exacerbação e alteração da resposta imune do hospedeiro (Nataro & Kaper, 1998; Salyers & Whitt, 1994; Schaechterfer *et al.*, 1993). Após a infecção, a evolução da relação parasito-hospedeiro, para um quadro de doença ou sub-clínico, dependerá não só de fatores da bactéria e do hospedeiro, como também

da microbiota intestinal já estabelecida, que interfere na expressão da virulência das cepas através de mecanismos de controle da transdução, dependentes da densidade populacional das bactérias, denominado de “quorum sensing” (Sperandio *et al.*, 2001; Winzer & Williams, 2001).

Apesar da *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) não ser o grupo mais freqüentemente identificado em nosso meio (Trabulsi *et al.*, 1996), representa um dos grupos de maior importância na patogenia da diarreia aquosa em crianças, adultos e viajantes de áreas endêmicas, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil (Black, 1990; Levine, 1987).

A patogenicidade deste grupo é devida à combinação de dois principais fatores de virulência, sendo o primeiro relacionado à colonização da bactéria no intestino delgado, o que ocorre através de adesinas expressas na superfície da célula bacteriana, capazes de interagirem com receptores das células do hospedeiro. Estas adesinas podem variar morfológica e antigenicamente e são denominadas de Fatores de Colonização (FC). O segundo fator de virulência envolvido nas enteropatias causadas por ETEC é a produção de enterotoxinas, que podem ser termo-estáveis (ST) ou termo-lábeis (LT) (Nataro & Kaper, 1998). Até o momento, a interação entre cepas ETEC e o hospedeiro é considerada espécie-específica conferindo à bactéria a habilidade de aderir à mucosa do intestino delgado, local normalmente não colonizado pela *E. coli*, resistindo inclusive ao peristaltismo e a competição por nutrientes com a microbiota local (Nataro & Kaper, 1998).

Dentre as enterotoxinas termo-estáveis a STa, também denominada por alguns autores de STI, corresponde a um peptídeo de 18 a 19 aminoácidos com massa molecular de cerca de 2 kDa, sendo solúvel em água e em solventes orgânicos, além de ser resistente à ação de enzimas proteolíticas (Alderete & Robertson, 1978; Gariépy *et al.*, 1986) e apresenta atividade em intestino de camundongo recém-nascido (Dean *et al.*, 1972). Dentre as STa, podemos encontrar duas variantes antigênicas denominadas de STp (ST suína ou STIa) e STh (ST humana ou STIb), relacionadas à expressão de cepas *E. coli* isoladas respectivamente, de suínos e humanos. Porém, ambas as variantes STIa e STIb podem ser encontradas em cepas de *E. coli* isoladas de fezes humanas, sendo estas toxinas praticamente idênticas em 13 resíduos

de aminoácidos correspondentes aos responsáveis pela atividade enterotóxica, dentre os quais 6 são representados por resíduos de cistina, formando 3 pontes dissulfeto intramoleculares, que conferem a termo-estabilidade deste grupo.

Quanto aos genes para STa e STb, estes diferem tanto estruturalmente, quanto em seus mecanismos de ação, sendo encontrados predominantemente em plasmídios, apesar de alguns terem sido descritos em transposons (Nataro & Kaper, 1998). A enterotoxina STa liga-se ao receptor GC-C, denominada de guanilciclase C e é representada por uma enzima de membrana pertencente à família de receptores ciclases (Vandrager *et al.*, 1994). Ao ligar-se, a STa aumenta os níveis intracelulares da cGMP, o que estimula a secreção de Cl^- e/ou inibe a absorção de Na, resultando em aumento da secreção intestinal (Sears & Kaper, 1996).

Quanto à enterotoxina STb, também denominada de STII, esta é insolúvel em metanol e ativa em alça ligada intestinal de suínos de 5 a 7 semanas. Apesar de ser importante na diarreia do desmame em suínos, a relevância da enterotoxina STb na diarreia humana não é comprovada, embora os genes desta toxina tenham sido detectados em amostras de *E. coli* isoladas do homem (Echeverria *et al.*, 1985). A enterotoxina STb apresenta P.M. equivalente a 5,1 kDa e não apresenta nenhuma homologia com STa, apesar de também conter 4 resíduos de cisteína formando pontes dissulfeto (Arriaga *et al.*, 1995). Ao contrário de STa, a enterotoxina STb induz danos histológicos no epitélio intestinal, representados por perda de microvilosidades e atrofia parcial da vilosidade (Sears & Kaper, 1996).

Apenas a STa, dentre as enterotoxinas termoestáveis, é comprovadamente associada a casos de diarreia em humanos (Blanco & Blanco, 1993; Clements & Finkelstein, 1978a). Os genes para STa têm sido encontrados, normalmente, em plasmídios associados a genes responsáveis pela codificação de FC e/ou genes associados a fenótipos de resistência a antimicrobianos (Clements & Finkelstein, 1979; Evans & Evans, 1978; Gyles *et al.*, 1977; McConnel *et al.*, 1989).

As enterotoxinas termolábeis também apresentam duas classes: LT-I e LT-II. A toxina LT-I segue bioquimicamente o padrão AB de toxinas, apresentando estrutura molecular e antigênica muito semelhante ao da toxina colérica (TC) (Clements & Finkelstein, 1978b). A

LT-I é capaz de estimular a enzima adenil-ciclase, promovendo uma elevação dos níveis de AMPc nos enterócitos, o que leva à perda de potássio e íons bicarbonato pela célula, com conseqüente secreção de líquido para a luz intestinal e quadro diarréico (Cravioto *et al.*, 1988).

A toxina LT-I apresenta inúmeras características em comum à toxina colérica (TC), incluindo a estrutura da holotoxina, seqüência de aminoácidos (80% de identidade), receptor primário, atividade enzimática e ação biológica em animais experimentais e culturas de células (Nataro & Kaper, 1998). Algumas diferenças entre ambas foram destacadas quanto ao processamento e secreção das toxinas além de resposta relacionada ao linfócito T helper (Dickinson & Clements, 1995; Sears & Kaper, 1996). Além de ser estruturalmente semelhante à TC, também apresenta atividade biológica e determinantes antigênicos comuns (Clements & Finkelstein, 1978a; 1978b). Assim, soros policlonais produzidos contra estas duas toxinas, apresentam reações cruzadas, bem como muitos anticorpos monoclonais (Sears & Kaper, 1996).

Enquanto genes para TC são cromossômicos, a codificação gênica da LT-I tem sido descrita, até o momento, como associada a genes presentes em plasmídios de alto peso molecular (Sears & Kaper, 1996), alguns apresentando também genes capazes de codificar marcas de resistência a antimicrobianos e fatores de colonização (Nataro & Kaper, 1998).

Dentre os subgrupos de LT descritos como LT-I e LT-II, estas toxinas não apresentam reatividade cruzada, sendo que a LT-I é expressa por amostras ETEC isoladas do homem e animais. Por outro lado, a toxina LT-II, é encontrada primariamente em animais e cepas que a expressam, apenas raramente foram isoladas de fezes humanas. Porém, LT-II, nunca foi associada à doenças entéricas no homem e nem em animais (Sears & Kaper, 1996).

A enterotoxina LT-I é uma toxina oligomérica de P.M. correspondente a 86 kDa, composta de uma subunidade A (28 kDa) e de cinco subunidades B idênticas (11,5 kDa) arranjadas em forma de um anel que se liga ao gangliosídeo GM1 e mais fracamente ao GD1b e a algumas glicoproteínas intestinais (Teneber *et al.*, 1994).

A subunidade A é responsável pela atividade enzimática da LT-I, que é proteoliticamente clivada em A1 e A2, unidas por uma ponte dissulfeto. Na enterotoxina LT-I, duas variantes antigenicamente semelhantes foram descritas e denominadas de LTp (LTp-I) e de LTh (LTh-I), purificadas a partir de cepas isoladas de porco e de fezes humanas, respectivamente. Os genes responsáveis pela expressão de LT (*elt* ou *etr*), são encontrados em plasmídios, que podem conter também, genes para STa e para fatores de colonização (Nataro & Kaper, 1998).

Recentemente, produção da toxina EAST1, descrita no virotipo das EAEC foi identificada como expressa por cepas ETEC (Savarino *et al.*, 1996).

Trabalhos desenvolvidos por diferentes autores (Elsinghorst & Kopecko, 1992; Elsinghorst & Weitz, 1994; Fleckenstein *et al.*, 1996; Schlager *et al.*, 1990; Wanke & Gerrant, 1987), relataram a capacidade de algumas amostras ETEC em invadirem culturas celulares originárias do cólon e íleo humano. Contudo, esta capacidade invasiva observada apenas “*in vitro*” e não “*in vivo*”, continua indefinida no quadro da doença.

Com relação aos fatores de colonização (FC) ou possíveis fatores de colonização (PCF), muitos têm sido identificados e descritos em cepas ETEC de origem humana. Apesar disto, em muitas das amostras isoladas, nenhum dos fatores de colonização comumente encontrados foram identificados (Levine *et al.*, 1995; McConnell & Rowe, 1989; Nirdnoy *et al.*, 1997; Viboud *et al.*, 1993a). Esta não identificação de adesinas pode envolver várias implicações, que variam desde longa estocagem e repiques freqüentes das amostras, o que poderia acelerar a cura dos plasmídios, até a falta de infra-estrutura dos Laboratórios de Análises Clínicas quanto aos recursos necessários para a identificação destes fatores (Ahrén *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1982).

Em trabalho desenvolvido por Honda *et al.* (1991), os autores demonstraram significativa segregação dos plasmídios responsáveis pela codificação das enterotoxinas ST ou LT e de FC, devido a estoques prolongados, dependência do meio utilizado nesta estocagem e da temperatura utilizada nos mesmos. Devido a isso, a confirmação da produção de

enterotoxinas pelas amostras em estudo, deve ser imediatamente seguida da pesquisa de FC nas mesmas.

Dentre os FC mais pesquisados estão o CFA/I, representando por apenas uma unidade protéica (Klemm & Mikkelsen, 1982), CFA/II que é uma proteína heterogênea, podendo apresentar as subunidades CS1, CS2 e CS3 (Thomas *et al.*, 1982) e CFA/IV, complexo protéico que pode apresentar as subunidades CS4, CS5 e CS6 (Smyth, 1982; Thomas *et al.*, 1985).

Destacam-se, em poucos trabalhos, também a identificação de CFA/III (Honda *et al.*, 1984), CS14 (previamente denominada de PCFO166) (McConnell *et al.*, 1989), CS17 (McConnell *et al.*, 1990), CS13 (previamente denominada de PCFO9) (Heuzenroeder *et al.*, 1990), antígeno 2230 (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1986), antígeno 8786 (Aubel *et al.*, 1991) e PCFO20 (Viboud *et al.*, 1993), CS20 (Valvatne *et al.*, 1996), CS22 (Cassel & Kent), CS19 (Grewal *et al.*, 1997; Khalil *et al.*, 1999), PCFO148 (Knutton *et al.*, 1987), CS7 (Hibberd *et al.*, 1990) e PCFO2 (Ricci *et al.*, 1995; Ricci *et al.*, 1997; Oliveira, E.M., 1996; Delghringaro-Augusto, 1998). Normalmente, os FC apresentam estrutura fimbrial ou fibrilar. Contudo, os antígenos 2230 e 8786 foram descritos como adesinas não fimbriais.

Com relação à subunidade CS (Coli Surface Antigen) denominada de CS6 e pertencente ao complexo CFAIV, esta pode ser encontrada isoladamente ou em associação com as subunidades CS4 ou CS5 nas cepas CFA/IV (McConnell *et al.*, 1986; McConnell *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1985). Experimentos demonstraram que a expressão isolada de CS6 pela *E. coli* enterotoxigênica foi responsável pela colonização da bactéria no intestino de coelho (Svennerholm *et al.*, 1989) e a cepa CFA/IV (CS6) também foi reconhecida como único patógeno isolado em pacientes com diarreia em trabalhos de Wolf *et al.* (1993). Estes dados comprovam que CS6 corresponde a uma adesina, e não apenas uma subunidade complementar.

Estudos epidemiológicos sugerem que CFA/I, CFA/II ou CFA/IV, são expressos por aproximadamente 75% das cepas ETEC isoladas de fezes humanas nas diferentes regiões geográficas (Wolf, 1997). Por outro lado, uma longa fimbria do tipo IV (Fernandez & Berenguer, 2000) recentemente descrita, do tipo “bundle forming pilus”, morfologicamente

diferente das demais identificadas, tem sido encontrada com grande frequência em cepas ETEC isoladas de fezes humanas (Gíron *et al.*, 1994; Gíron *et al.*, 1995).

De maneira geral, os FC descritos em amostras ETEC isoladas de quadros de diarreia no homem ou em animais, apresentam as seguintes características comuns: a) A maioria é constituído de fimbria protéicas apresentando distribuição peritríquia, com 1 a 2µm de comprimento e 6 a 9 nm de diâmetro; b) Podem ser encontradas múltiplas morfologias fimbriais em uma mesma amostra; c) Alguns FC são representados por adesinas não fimbriais d) Normalmente são codificados ou controlados por genes presentes em plasmídios de alto peso molecular, em associação com genes das enterotoxinas LT e/ou ST (Mathewson *et al.*, 1985; Smyth, 1984; Willshaw *et al.*, 1982); d) São compostos por unidades protéicas, cujo peso molecular tem sido descrito entre 14 e 34,5 kDa, normalmente apresentando elevado número de aminoácidos hidrofóbicos (Blanco *et al.*, 1991, Nataro & Kaper, 1998; Girón *et al.*, 1997); e) São encontrados apenas em amostras ETEC pertencentes a determinados sorogrupos e sorotipos; f) A maioria é capaz de hemaglutinar eritrócitos na presença de D-manose, açúcar que inibe a hemaglutinação descrita para a fimbria tipo I de *E. coli* (Klemm *et al.*, 1985); g) São termo-reguláveis, isto é, expressam-se quando as amostras de ETEC são cultivadas a 37°C mas não a 16°C (Evans *et al.*, 1975; Gaastra & Graaf, 1982; Klemm *et al.*, 1985; Krogfelt, 1991; Khalil *et al.*, 1999; Nataro & Kaper, 1998) e h) Têm sido identificados e caracterizados após crescimento das cepas ETEC em meio CFA (Evans & Evans, 1977; Klemm, 1985).

Os FC do virotipo ETEC foram, inicialmente, identificados em provas de MRMH (microhemaglutinação D-manose resistente), realizadas com eritrócitos de diferentes origens, além de reações de soroaglutinação em lâmina desenvolvidas com soros policlonais específicos contra as cepas padrão, absorvidos com amostras segregantes das mesmas ou com cultivos da cepa a 16°C, temperatura esta, onde a expressão da adesina é inibida (Evans *et al.*, 1975).

Por ser a adesão e a colonização do intestino delgado reconhecida como um fator importante, se não essencial, para que ocorra a diarreia (Gaastra & Graaf, 1982) e pelo grande problema de saúde pública representado pela diarreia associada às ETEC, muitos autores têm procurado definir quais os FC mais frequentes em cada área endêmica para a possível

construção de vacinas (Gíron *et al.*, 1997; Helander *et al.*, 1997; Luna *et al.*, 1997). Contudo, isto só será possível quando testes de identificação dos FC permitirem rapidez, especificidade e sejam acessíveis aos Laboratórios de Análises Clínicas.

Neste sentido, vários trabalhos abordando produção de vacinas compostas têm sido desenvolvidos (Adachi *et al.*, 2000; Black, 1986; Hall *et al.*, 2001; Levine, 1990; Svennerholm *et al.*, 1990), porém as expectativas não são promissoras devido à grande variação antigênica dos mesmos, o que representa um obstáculo considerável para o desenvolvimento de vacinas efetivas para áreas endêmicas (Nataro & Kaper, 1998).

Posteriormente, técnicas mais específicas e sensíveis para a identificação dos FC foram desenvolvidas, utilizando-se anticorpos monoclonais (MAbs), nas reações sorológicas pesquisando-se estes fatores (Köhler & Milstein, 1975). A utilização dos MAbs também foi fundamental para que a presença e a estrutura dos fatores CS dos complexos CFA/II e CFA/III fossem caracterizados e determinados em diferentes amostras ETEC isoladas. Experimentos realizados também permitiram identificar epítomos em comum entre os diferentes FC e avaliar a variabilidade antigênica entre os fatores CS, incluindo diferenças de epítomos na fração CS3 em cepas CFA/II distintas (Lopez-Vidal & Svennerholm, 1988).

Desta forma, Rudin *et al.* (1994) selecionaram 3 MAbs que reagiram cruzadamente em provas de “Dot blot” com CS1, CS2, CS4, PCFO166 e CS17 e também com subunidades destes, obtidas por tratamento enzimático.

Contribuindo para a caracterização dos FC, o sequenciamento de aminoácidos, em especial na fração N-terminal, tem demonstrado uma homologia muito significativa entre as várias fimbrias descritas em cepas ETEC. Estas homologias de epítomos resultaram na observação de reações cruzadas entre as subunidades de CFA/I, CS1, CS2, CS4 e CS17, quando reveladas em testes de “Western blotting” utilizando-se anticorpos monoclonais (McConnell *et al.*, 1989).

O aprimoramento das técnicas imunológicas tem melhorado significativamente a especificidade, rapidez e a sensibilidade na identificação dos FC principalmente através das

Provas de Inibição do ELISA padronizadas com MAbs específicos, utilizados para a identificação destas adesinas em enquetes epidemiológicos (Honda *et al.*, 1989b; Rudin *et al.*, 1994; Viboud *et al.*, 1994).

Desta forma, objetivando a padronização de provas específicas que permitissem melhoria na identificação dos FC menos pesquisados, Ricci *et al.* (1997), em pesquisa realizada com cepas ETEC isoladas de casos de diarreia em humanos, pesquisando a produção dos FC mais frequentes, identificaram e caracterizaram a fimbria PCFO2. Esta fimbria foi inicialmente descrita em duas cepas isoladas em Ouro Preto (MG), sendo ambas produtoras da enterotoxina LT e pertencentes ao sorogrupo O2. Em trabalho subsequente, hibridomas foram preparados com esse antígeno, resultando na obtenção de 9 MAbs dos isotipos IgG2b (5) e IgA(4) reativos contra este FC (Oliveira, 1996). No estudo da reatividade destes MAbs, Delghingaro-Augusto (1998), padronizou a Prova de Inibição do ELISA, para a identificação desta fimbria e, dentre 99 cepas de *E. coli* diarreio gênicas avaliadas, 5 foram identificadas como PCFO2+. Dentre as 5 cepas positivas, as amostras 312-2 e 312-3 eram LT+, enquanto que D242, D243 e D252 não expressavam as enterotoxinas. Porém, todas pertenciam ao sorogrupo O2. Quanto a cepa D252, resultados discordantes foram obtidos frente ao “pool” dos dois isotipos de MAbs. Também, em relação à microhemaglutinação D-manose resistente, apenas as cepas 312-2, 312-3, D242 e D243, apresentaram reações positivas com hemácias humanas, bovinas e de carneiro. Quanto a cepa D252, esta demonstrou padrão não hemaglutinante (Delghingaro-Augusto, 1998). Estas diferenças entre as 5 cepas, dentro dos padrões inicialmente estabelecidos, levantaram dúvidas sobre a adequação dos critérios adotados para a prova de Inibição do ELISA na identificação deste FC.

Por outro lado, apesar dos trabalhos anteriores terem demonstrado homologia entre PCFO2 e outros FC (Ricci *et al.*, 1995; Delghingaro-Augusto, 1998), os resultados obtidos precisavam de confirmação, através de experimentos complementares, como proposto neste trabalho. Além destes objetivos, os trabalhos envolveram reavaliação da metodologia de purificação desta fimbria e da adequação da Prova de Inibição do ELISA, quanto aos MAbs e diluições dos mesmos a serem utilizados na identificação da expressão de PCFO2.

2 -OBJETIVOS

- 1 – Avaliar alterações nas etapas da metodologia padronizada para a purificação de PCFO2, com o objetivo de obter-se maior rendimento no processo.

- 2 – Em relação aos monoclonais dos isotipos IgA e IgG2b, reativos contra a fimbria PCFO2:
 - a) confirmar a expressão desta fimbria nas cepas 312-2, 312-3, D242, D242 e D252 anteriormente identificadas como PCFO2+.
 - b) avaliar a similaridade de reconhecimento de epítomos entre os monoclonais dos dois isotipos (IgA e IgG2b)
 - c) avaliar a reatividade desses monoclonais com antígenos do sorogrupo 02.

- 3 – Verificar possível homologia de epítomos entre PCFO2 e os mais freqüentes fatores de colonização identificados: CFA/I, CFA/II, CFA/III e CFA/IV.

- 4 – Reavaliar-se a Prova de Inibição do ELISA quanto aos mais específicos anticorpos monoclonais na identificação da expressão de PCFO2 em cepas ETEC isoladas de fezes humanas.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de *Escherichia coli* em estudo:

Neste trabalho foram estudadas as seguintes cepas identificadas como PCFO2+ em trabalho anterior, através da Prova de Inibição do ELISA (PIE) utilizando-se MAbs anti-PCFO2: 312-2 e 312-3 (isoladas da mesma amostra de fezes diarréicas); D242 e D243 (isoladas da mesma amostra de fezes diarréicas) e a cepa D252. Todas as amostras foram isoladas a partir de casos de diarréia encaminhados ao HC-UNICAMP. O desenvolvimento desta prova com MAbs do isotipo IgG2b identificou como positivas todas as cepas em questão, com exceção da cepa D252. Quando a mesma prova foi desenvolvida com MAbs do isotipo IgA, todas as 5 cepas foram identificadas como positivas, inclusive a cepa D252 (Delghringaro-Augusto, 1998). A cepa D253 foi incluída neste estudo, por pertencer ao sorogrupo O2, objetivando-se analisar possíveis reações com o antígeno deste sorogrupo.

Todas as amostras em estudo foram gentilmente sorogrupadas como O2, pelo Prof. Dr. Miguel Blanco da Universidade de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha.

Utilizou-se como padrão de PCFO2, a cepa 244-1 LT+, também pertencente ao sorogrupo O2.

3.1.1. Amostras padrão de *Escherichia coli* produtoras de diferentes FC

Também, as seguintes cepas padrão de *Escherichia coli* enterotoxigênica, produtoras dos mais frequentes fatores de colonização descritos em isolados humanos foram utilizadas:

CFA/I – H10407 (DMI-IB-UNICAMP)

CFA/II (CS2) – RIMD 0509753

CFA/II (CS1, CS3) – RIMD 0509735

CFA/III – 260-1 (DMI-IB-UNICAMP)

CFA/IV (CS4, CS6) – 151-3 (Blanco, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha)

CFA/IV (CS5, CS6) – E17018/A

A cepa E17018/A, pertencente ao sorotipo O167:H5, foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Beatriz E.C.Guth, da UNIFESP.

No desenvolvimento do presente trabalho, todas as cepas de *E. coli* em estudo e as amostras padrão, foram mantidas em estoques no meio BHI acrescido de 15% de glicerol estéril, a -20°C , no meio Dorset à temperatura ambiente e em Lignieres a 4°C .

TABELA I - Características fenotípicas das amostras de *Escherichia coli* em estudo, identificadas como PCFO2+ na Prova de Inibição do ELISA desenvolvida com MAb's específicos (Delghringaro-Augusto, 1998).

<i>Amostras</i>	<i>Fator de Colonização</i>	<i>Prova de Inibição do ELISA, com MAb's/IgG2b</i>	<i>Prova de Inibição do ELISA, com MAb's/IgA</i>	<i>Sorogrupo</i>	<i>Fenótipo enterotoxi gênico</i>
244-1	PCFO2	+	+	02	LT
312-2	PCFO2	+	+	02	LT
312-3	PCFO2	+	+	02	LT
D242	PCFO2	+	+	02	N.E. ¹
D243	PCFO2	+	+	02	N.E. ¹
D253	N.I. ²	-	-	02	L.T.
D252	PCFO2	-	+	02	N.E.

1 – não enterotoxigênica

2 – não identificada

TABELA II – Características das amostras-padrão de fatores de colonização (FC) expressos por cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênicas, isoladas de fezes diarreicas humanas.

<i>Amostras</i>	<i>Fator De Colonização</i>	<i>HMR¹</i>	<i>P.M. (kDa)</i>	<i>Fenótipo enterotoxigênico</i>
10.407	CFA/I	homem, boi, galinha	15,0	LT
RIMD 0509753	CFA/II (CS2)	boi	17,0	STa
RIMD 0509735	CFA/II (CS1, CS3)	boi, galinha	CS1 – 16,8 CS3 – 14,5 a 15,5	LT
260-1	CFA/III	N.H. ²	18,0	STa
E17018/A	CFA/IV (CS5, CS6)	Homem, boi, cobaia	CS5 – 21 CS6 – 14,5 a 16	LT/STa
151-3	CFA/IV (CS4, CS6)	Homem, boi	CS4 – 17,0 CS6 – 14,5 a 16	LT/STa
244-1	PCFO2	Boi, carneiro, cavalo, homem	34,5	LT

1 – Hemaglutinação D-manose resistente

2 – Não hemaglutinante

3.2. Purificação da fimbria PCFO2

3.2.1. Metodologia padronizada

A metodologia normalmente utilizada nos procedimentos de purificação de PCFO2, foi a mesma adotada por Ricci *et al.* (1997). Na reavaliação destes processos, alterações foram avaliadas objetivando-se maior rendimento da fimbria purificada.

As amostras produtoras de PCFO2 foram, inicialmente, cultivadas em meio BHI (Brain Heart Infusion) “Gibco” e incubadas “overnight” a 37°C.

Após o crescimento bacteriano inoculou-se 1 mL desta pré-cultura em cada garrafa de Roux (20 garrafas/lote), contendo 100 mL de meio CFA ágar (Evans & Evans., 1977). As garrafas foram, então, mantidas a 37°C durante 24 horas. Após o crescimento bacteriano, o cultivo de cada garrafa foi ressuspensão com 10 mL de salina 0,15M, com o auxílio de bastões de vidro estéreis. Logo a seguir, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm (Beckman Instruments, rotor JA-14) por 15 minutos e o sedimento ressuspensão em 20 mL de tampão fosfato 0,05M pH7,4 acrescido de 1M de NaCl. A suspensão foi, então, tratada por 30 minutos em banho-maria a 60°C, sob agitações esporádicas para o desprendimento das fimbrias.

Após este processo, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos retirando-se o sobrenadante, ao qual adicionou-se tampão PBS 0,05M pH 7,4 até o volume de 100 mL, desprezando-se o “pellet”.

O sobrenadante separado, foi, então, precipitado com 60% de sulfato de amônio, a 4°C, sob agitação constante, permanecendo, a seguir, em repouso por pelo menos 2 horas. Na sequência, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos tendo seu “pellet” ressuspensão em 3 mL de tampão PBS 0,05 M pH 7,4. Para retirar-se o excesso de sulfato de amônio, a solução foi dialisada contra o mesmo tampão, durante 48 horas, a 4°C, realizando-se várias trocas deste tampão. Logo após, procedeu-se a diálise desta solução em tampão PBS acrescido de 0,5% de desoxicolato de sódio (DOC), por 72 hora a 4°C, sob agitação constante. Após este período, a fração dialisada foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos, separando-se o sobrenadante correspondente à fração fimbrial, denominada DOC-solúvel e desprezando-se o “pellet”, denominado de DOC-insolúvel, representado principalmente pelo LPS (lipopolissacarídeo) bacteriano. A fração DOC-solúvel obtida foi, então, dialisada contra tampão PBS 0,05M pH 7,4 acrescido de 4M de uréia durante 24 horas. A fração assim

preparada foi aplicada, em volume de 3 mL, em coluna de Sepharose CL4B, equilibrada com o mesmo tampão. Dentre os tubos coletados (~5mL/tubo), os correspondentes aos picos protéicos, determinados por leitura em espectrofotômetro a 280nm, foram reunidos e dialisados contra tampão PBS 0,05M pH 7,4, durante 72 horas a 4°C para retirar-se o excesso de uréia e em seguida concentrados.

Para obtenção do antígeno fimbrial purificado, a solução concentrada foi recromatografada na mesma coluna, utilizando-se as mesmas condições descritas anteriormente.

Na determinação da concentração protéica final das frações purificadas obtidas, utilizou-se a técnica de Bradford.

3.2.2. Reavaliação da metodologia de purificação: precipitação fracionada com sulfato de amônio

Após a separação do sobrenadante, como descrito no item anterior, este foi dividido em 2 alíquotas sendo uma destas precipitada diretamente com 60% de sulfato de amônio (Nuclear), pela adição do sal em temperatura de 4°C, sob agitação constante. Após completado este procedimento, a solução permaneceu sem agitação nesta mesma temperatura por mais 18 horas para a decantação do precipitado. Depois deste período, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm durante 30 minutos, o “pellet” ressuspensão com 3,0 mL de tampão PBS 0,05M pH 7,4 e estocado em freezer a -20°C, para posterior diálise a fim de se remover o excesso do sal.

Paralelamente, a segunda alíquota foi, inicialmente, precipitada com 20% de sulfato de amônio obedecendo-se o mesmo procedimento utilizado para a alíquota 1. Na sequência, a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 30 minutos, o “pellet” ressuspensão em 3,0 mL de tampão PBS e estocado a -20°C. Ao sobrenadante obtido, adicionou-se sulfato de amônio até a concentração de 40%. A seguir, a solução precipitada foi submetida novamente ao mesmo procedimento utilizado para a alíquota número 1. A solução foi, então, centrifugada a 10.000 rpm durante 30 minutos e o “pellet” ressuspensão em 3,0 mL de tampão PBS.

Após o tratamento das 3 frações, obtidas após precipitação com sulfato de amônio a 60%, 20% e 20-40%, estas foram submetidas à diálise em tampão PBS 0,05M pH 7,4 durante

72 horas, a uma temperatura de 4°C, com 3 trocas diárias do tampão, para retirar-se o excesso do sal. Depois de dialisadas, as frações foram estocadas a -20°C.

3.2.3. Diálise contra DOC

Dentre as 3 frações obtidas através de diferentes concentrações de sulfato de amônio, as frações 20-40% e 60% foram, a seguir, divididas em 2 alíquotas, sendo uma destas dialisada contra tampão PBS 0,05M pH7,4 acrescido de 0,5% de desoxicolato de sódio (DOC) “Nuclear”, durante 72 horas a 4°C sob agitação constante. Após este período, o material foi centrifugado a 10.000 rpm durante 30 minutos. Na seqüência, separou-se o sobrenadante correspondente à fração fimbrial, denominada de DOC-solúvel (DS) e o precipitado obtido, representado pelo LPS (lipopolissacarídeo) da parede celular bacteriana, sendo esta fração denominada de DOC-insolúvel (DI), ressuspensa a seguir, em 1,5 mL de tampão PBS 0,05M pH 7,4. A segunda alíquota e a fração DS foram, então, dialisadas em tampão PBS 0,05 M pH 7,4 acrescido de 4 M de uréia por um período de 24 horas, a 4°C, com a finalidade de equilibrar-se o material a ser cromatografado em coluna de Sepharose CL4B equilibrada com o mesmo tampão. Após a cromatografia, as frações eluídas foram quantificadas a 280nm em espectrofotômetro (Pharmacia) e as frações correspondentes aos picos cromatográficos, foram dialisadas em tampão PBS 0,05M pH 7,4 para que o excesso de uréia fosse removido. Em seguida, as frações selecionadas foram reunidas e concentradas por liofilização.

Quanto à fração DI (DOC-insolúvel), esta foi dialisada contra o mesmo tampão mencionado anteriormente, com a finalidade de retirar-se o excesso de DOC presente na solução.

Todas as soluções, antes de serem submetidas aos devidos testes, foram determinadas quanto à concentração protéica pelo método de Bradford.

3.3. Dosagem de proteínas pelo método de Bradford

Para estudo do rendimento dos processos de purificação e principalmente para a padronização da concentração protéica das frações obtidas a serem aplicadas em SDS-PAGE e

posteriormente transferidas para Western blotting , todas as soluções preparadas foram dosadas em microplacas pelo método descrito por Bradford (1976).

Neste método, as proteínas ligam-se ao corante Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma), comparando-se esta ligação à diferentes concentrações conhecidas de uma proteína padrão, no caso, Soro Albumina Bovina (BSA) (Sigma).

3.4. Preparo de soros anti-FC

Neste trabalho, para complementação dos experimentos foram preparados em coelhos, utilizando-se a técnica da bacterina, os soros anti-312-2, anti-D242 e o soro anti-CFAIV (CS5, CS6). Os demais, já haviam sido preparados em trabalhos anteriores (Delghringaro-Augusto, 1998; Oliveira, 1996).

Antes do início das imunizações, todos os animais foram sangrados para obtenção de soro pré-imune para controle das provas posteriormente desenvolvidas. Para a produção dos soros policlonais, coelhos albinos, com peso aproximado de 2 a 3 kg, foram inoculados com cinco doses do antígeno, representadas pelas respectivas cepas cultivadas a 37°C por 48 horas, mortas em solução de paraformaldeído em PBS pH7,4, a 1%. Para as inoculações, padronizou-se as suspensões das bactérias segundo a escala 3 de MacFarland. Como via de inoculação, foi utilizada a veia marginal da orelha, aplicando-se 5 doses com os volumes de 0,2 mL, 0,5 mL, 1,0 mL, 2,0 mL e 2,0 mL das suspensões padronizadas, com intervalos de quatro dias entre cada aplicação.

Após 10 dias da última inoculação, procedeu-se sangria de prova para a titulação do soro, e em seguida, a sangria total dos animais. Os soros obtidos foram descomplementados e exaustivamente absorvidos com a mesma cepa utilizada na inoculação, porém a partir de cultivos a 16°C, temperatura onde estas fimbrias não são expressas (Nataro & Kaper, 1998), até que fossem reativos apenas com cultivos a 37°C e não a 16°C. Em seguida, os soros permaneceram estocados a -20°C até o uso. Os títulos desses soros foram determinados por reações de soroaglutinação em lâmina e em tubo, com cultivo das amostras incubadas a 37°C.

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

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi realizada segundo a técnica descrita por Laemmli (1988), tendo sido os géis preparados de acordo com as especificações do “Hoefler Eletroforesis Catalog and Exercises” (1990-1991). Nas análises desenvolvidas, foram utilizados géis de separação contendo 15% de acrilamida e gel de empacotamento a 5%.

Para a eletroforese, antes da aplicação no gel, as amostras foram diluídas v/v em tampão de amostra (APÊNDICE) e aquecidas a 100°C durante 3 minutos. A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-glicina (APÊNDICE) aplicando-se inicialmente uma diferença de potencial de 50V até as amostras entrarem no gel de separação. A separação das proteínas foi completada a 100 V durante aproximadamente 5 horas, em se tratando de cuba grande (placas de 14,5 cm x 12,5 cm). A corrida foi interrompida quando o indicador (azul de bromofenol) atingiu o limite inferior do gel de separação.

Como padrão de peso molecular foram utilizados 2 kits contendo peptídeos e polipeptídeos de baixo peso molecular: (“Pre-stained protein molecular weight standards”) da GIBCO BRL e da SIGMA. A solução da Gibco continha os seguintes marcadores protéicos: insulina (3,0 kDa); inibidor da tripsina bovina (6,2 kDa); lisozima (14,3 kDa); β -lactoglobulina (18,4 kDa); anidrase carbônica (29,0 kDa) e ovalbumina (43,0 kDa). Enquanto que o padrão MW-SDS 70L da SIGMA continha os seguintes marcadores: lactoalbumina bovina (14,2 kDa); tripsina (20,1 kDa); tripsinogênio (24,0 kDa); anidrase carbônica (29,0 kDa); gliceraldeído (36,0 kDa); ovalbumina (45,0 kDa) e albumina bovina (66,0 kDa).

Após a corrida eletroforética, os géis foram retirados da cuba e imersos em solução fixadora) (APÊNDICE), permanecendo na mesma “overnight”. A seguir, foram colocados na solução corante contendo Coomassie Blue (APÊNDICE), por 60 minutos. Para a remoção do excesso de corante, os géis foram mergulhados em solução descorante (APÊNDICE) com trocas ocasionais da mesma, até a completa remoção da cor de fundo.

Após estes procedimentos, os géis foram fotografados.

3.6. Avaliação da especificidade dos anticorpos monoclonais e soros policlonais frente às fimbrias homólogas e heterólogas através da técnica de “Western blot”

Na verificação da possível homologia de epítomos entre PCFO2 e os mais frequentes FC descritos em cepas ETEC isoladas de fezes humanas, os extratos protéicos purificados e semi-purificados, obtidos a partir das cepas em estudo e cepas padrão de FC foram, inicialmente, separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, conforme descrito no item 3.5. A seguir, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose com poros de 0,45µm (Amersham Life Science, HybondTM - C), empregando-se uma diferença de potencial de 30V, durante 22 horas. Para este procedimento, utilizou-se cuba da Pharmacia onde o “sanduíche” ficou imerso em solução de transferência (APÊNDICE) durante todo o processo. Após este período, o sistema foi desmontado e o gel corado com solução corante contendo Coomassie Blue, para confirmação da eficiência da transferência das bandas existentes no gel para a membrana. Paralelamente, a membrana de nitrocelulose foi imersa em solução de Ponceau 3R (APÊNDICE) durante 5 minutos, também para confirmação da transferência das bandas existentes no gel para a membrana. A seguir, a membrana foi imersa em solução de bloqueio (APÊNDICE) durante 3 horas, à temperatura ambiente.

Na seqüência dos procedimentos, a membrana de nitrocelulose foi novamente imersa em diluições de soros ou MAbs pré-determinadas nos protocolos pré-estabelecido, utilizando-se para isto, solução de diluição (APÊNDICE). As membranas permaneceram, então, “overnight” a 4°C. Decorrido este período, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 20 minutos, em agitação constante com solução de lavagem (APÊNDICE). Logo após, a membrana foi incubada com anticorpos conjugados com peroxidase (Sigma), específicos contra IgG de coelho, IgG ou IgA de camundongo, diluídos na proporção de 1/1000, utilizando-se a mesma solução mencionada anteriormente, permanecendo a reação durante 1 hora à temperatura ambiente, sob agitação constante.

Na seqüência, a membrana foi novamente lavada 3 vezes durante 20 minutos sob agitação constante com solução de lavagem, procedendo-se a seguir a revelação das bandas mediante a adição de solução contendo 0,01% de H₂O₂ e diaminobenzidina (DAB-Peroxidase Substrate Tablet Set - Sigma) (APÊNDICE).

Após a visualização das bandas, a membrana de nitrocelulose foi lavada em água destilada para bloqueio das reações e colocadas para secar em ambiente escuro, entre folhas de papel de filtro. As bandas reveladas pela precipitação do DAB apresentaram coloração marrom avermelhada, significando reconhecimento dos antígenos pelo anticorpo primário.

3.7. Titulação dos monoclonais estocados

3.7.1. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) para determinação de títulos dos anticorpos monoclonais.

Utilizou-se nestes testes, microplacas rígidas de 96 cavidades com fundo chato (CORNING), sensibilizadas “overnight”, em câmara úmida a 4°C, com 50 µL por orifício do antígeno PCFO2 puro na concentração de 50µg/mL. A seguir, o excesso de antígeno foi removido por 3 lavagens consecutivas com solução de lavagem (APÊNDICE) com intervalos de 1 minuto entre cada lavagem. O bloqueio dos sítios ainda disponíveis nas placas foi realizado através da adição de 100µL/cavidade de solução bloqueadora (APÊNDICE), incubando-se as mesmas por 30 minutos a 37°C em câmara úmida. Logo após, as placas foram lavadas como já descrito e à elas adicionado as diferentes diluições dos anticorpos primários (monoclonais dos isotipos IgA ou IgG2b). Na sequência, as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após nova série de lavagens, adicionou-se o anticorpo secundário correspondente à anti-IgA ou anti-IgG de camundongo, conjugado à peroxidase “Sigma”, em diluição de 1:1.000.

As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C, em câmara úmida e logo após nova série de 3 lavagens, revelou-se a reação pela adição de 100µL/orifício da solução de OPD (OPD-orto-Phenylenediamine dihydrochloride - Sigma) na concentração de 0,4mg/mL, em tampão citrato-fosfato 0,01M pH 5,0 (Phosphate-Citrate Buffer Tablets - Sigma) preparado minutos antes do uso (APÊNDICE).

As microplacas foram, a seguir, mantidas à temperatura ambiente em local escuro durante 15 minutos. Após este período, adicionou-se 50µL de H₂SO₄ 4M por cavidade para bloqueio das reações e depois procedeu-se a leitura das placas a 492 nm, em aparelho Labsystems Multiskan Bichromatic (Modelo 348).

Na determinação do “cut-off”, considerou-se como resultados positivos valores de D.O. superiores a 4 vezes à média aritmética dos controles negativos, correspondentes às reações desenvolvidas nos orifícios não sensibilizados com o antígeno ou realizados sem a presença do anticorpo primário ou do conjugado (Albert *et al.*, 1991).

3.7.2. Prova de Inibição do ELISA

Após a titulação das soluções dos MAbs, determinou-se a capacidade das amostras de *Escherichia coli* em estudo, em inibir a ligação dos anticorpos às placas sensibilizadas com a fimbria PCFO2 purificada ou semi-purificada através da Prova de Inibição do ELISA.

Nestes procedimentos, placas de ELISA de 96 cavidades (CORNING) foram sensibilizadas “overnight”, a 4°C, com 50µL/cavidade na concentração de 50µg/mL da fimbria PCFO2 purificada ou 100µg/mL da fimbria semi-purificada. Como já descrito no item anterior, os mesmos procedimentos de lavagem e bloqueio foram realizados nestes procedimentos.

Os MAbs (monoclonais dos isotipos IgA ou IgG2b), foram utilizados nestas provas em diluições que variaram entre 5 a 10 vezes mais concentradas que o título determinado anteriormente nas provas de ELISA. Separadamente, em outra microplaca, as suspensões dos anticorpos foram misturadas v/v às suspensões bacterianas (preparadas paralelamente) padronizadas através da escala 6 de Mac Farland.

A seguir, 50µL de cada mistura foi adicionada imediatamente às placas de ELISA sensibilizadas com PCFO2, incubando-se as mesmas por 2 horas a 37°C, em câmara úmida. Em seguida, procedeu-se 3 lavagens dos orifícios com solução de lavagem adicionando-se, na sequência, os anticorpos secundários conjugados à peroxidase (anti-IgG ou anti-IgA de camundongo), diluídos 1:1000, em solução de diluição (APÊNDICE).

A seguir, as placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida e novamente lavadas por 3 vezes. Para revelação da reação, empregou-se o mesmo procedimento descrito no item 3.7.1.

Como controle das reações, foram utilizados orifícios sensibilizados com PCFO2 purificado, realizando-se reações similares, porém, sem misturar-se previamente as bactérias (padronizadas em escala 6 de Mac Farland) aos MAbs.

Foram consideradas positivas para PCFO2, amostras bacterianas que foram capazes de alterar a D.O. do controle, diminuindo-a em no mínimo 50%.

3.7.3. Prova de Inibição Cruzada do ELISA

Nestes procedimentos, placas de ELISA de 96 cavidades (CORNING) foram sensibilizadas “overnight”, a 4°C, com 50 µL/cavidade com extrações semi-purificadas a 100 µg/mL das amostras em estudo (244-1, 312-2, 312-3, D242, D243, D252, D253, CFA/II (CS1, CS3) e CFA/II (CS2)) seguida de bloqueio como descrito no item anterior.

Nestas avaliações, “pools” dos MAbs anti-PCFO2, foram empregados em diluições que variaram entre 5 a 10 vezes mais concentrados que o título determinado anteriormente nas provas de ELISA. Separadamente, em outra microplaca, as suspensões dos anticorpos foram misturadas v/v às suspensões bacterianas das diversas amostras em estudo padronizadas através da escala 6 de Mac Farland.

A seguir, 50µL de cada mistura foi adicionada imediatamente às placas de ELISA sensibilizadas, incubando-se as mesmas por 2 horas a 37°C, em câmara úmida. Em seguida, procedeu-se 3 lavagens dos orifícios com solução de lavagem e, em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase (anti-IgG, anti-IgA de camundongo), diluído 1:1000.

As placas foram, então, incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida e novamente lavadas por 3 vezes. A revelação foi realizada como descrito no item 3.7.1.

Como controle das reações foram utilizados orifícios sensibilizados com extratos semi-purificados de PCFO2 e das amostras em estudo através de reações desenvolvidas de maneira similar, sem contudo misturar-se as bactérias aos anticorpos monoclonais.

Foram consideradas positivas as reações capazes de alterar a D.O. dos controles dos extratos, diminuindo-os em no mínimo 50%.

4- RESULTADOS

4.1. Reavaliação da metodologia de purificação de PCFO2

Na análise do método de purificação para PCFO2, utilizou-se as cepas 244-1 de *E. coli* (padrão para esta fímbria), com o objetivo de obtenção de maior rendimento neste processo.

Verificou-se que com a alteração do tempo de incubação destas culturas de 24 para 48 horas em meio CFA, obteve-se maior massa de cultivo elevando em aproximadamente 20% a quantidade de proteínas purificadas por lote de 20 garrafas.

Comparando-se os 3 procedimentos utilizados, observa-se que, o melhor rendimento foi obtido através da precipitação com 60% de sulfato de amônio, sem diálise contra DOC e com dupla cromatografia em Sepharose CL4B (Tabela III).

4.1.1. Avaliação em SDS-PAGE da metodologia de purificação de PCFO2 através da precipitação fracionada com sulfato de amônio e diálise contra DOC

Com relação às diversas metodologias empregadas para a purificação de PCFO2, pode-se observar pela Figura 1, o padrão de bandas apresentadas em SDS-PAGE das precipitações com sulfato de amônio a 20%, 20-40%, 60% sem diálise contra DOC, 60% (DOC solúvel), 60% (DOC insolúvel) e 60% sem diálise contra DOC após a primeira cromatografia.

Neste processo, avaliou-se a perda de proteína com P.M. de aproximadamente 34,5 kDa (correspondente a PCFO2), contida nas frações 20% e DOC-insolúvel, que teriam a finalidade de retirar contaminantes das extrações protéicas. Foi também avaliado, o rendimento protéico relacionado as metodologias empregadas utilizando-se precipitação fracionada com sulfato de amônio a 20-40% e 60%. Em todos os procedimentos realizados para obtenção da proteína purificada e visualização de apenas uma banda de PCFO2 em SDS-PAGE, verificou-se a necessidade da dupla cromatografia em Sepharose CL4B.

4.2. Padrão de bandas em SDS-PAGE, de extratos semi-purificados das cepas em estudo e cepas padrão de FC

Pode-se observar na Figura 2, em SDS-PAGE a 15%, extratos protéicos semi-purificados das amostras em estudo e de cepas padrão de FC. Verifica-se bandas com P.M. aproximado de 34,5 kDa nos preparados das amostras 244-1, 312-2 e 312-3, além de bandas de cerca de 15 kDa presentes nestas mesmas amostras. Com relação aos extratos das cepas D253 e D252, também bandas de aproximadamente 33 kDa podem ser verificadas, além de banda de aproximadamente 15 kDa ser observada na amostra D253. Quanto às extrações das cepas D242 e D243, bandas com P.M. de cerca de 37 kDa podem ser observadas, além de mais duas nítidas bandas com P.M. próximos a 15 e 16 kDa. Quanto às subunidades do complexo CFA/II (CS1, CS3), embora fracamente coradas, ainda podem ser visualizadas bandas condizentes aos seus P.M. no extrato semi-purificado do mesmo. Além destas bandas, em ambas as amostras padrão de CFA/II (CS1, CS3) e CFA/II (CS2), nos extratos semi-purificados dos mesmos, observa-se bandas com P.M. de aproximadamente 36 kDa nesta mesma Figura.

4.3. Verificação da adequação da metodologia de purificação de PCFO2

Observando-se a Figura 3, em SDS-PAGE, pode-se verificar que a metodologia empregada para a purificação de PCFO2, demonstrou-se inadequada para as demais cepas padrão de FC, não sendo observadas as subunidades CS1, CS2, e CS3 do complexo CFA/II. Apenas bandas de alto P.M., podem ser observadas. O P.M. das bandas relacionadas aos extratos das cepas 312-2 e 312-3 são sugestivos de equivalerem à PCFO2.

4.4. Avaliação da reatividade de MAbs e “pool” de MAbs dos isotipos IgA e IgG2b frente as proteínas purificadas de PCFO2

Na Figura 4, pode-se observar reação de Western blotting desenvolvido com soluções individuais dos MAbs do isotipo IgA e IgG2b contra a fimbria PCFO2 purificada após dupla cromatografia em Sepharose CL4B (Ricci *et al.*, 1997). Com relação aos monoclonais do isotipo IgG2b, observou-se a revelação de uma banda com P.M. de 34,5 kDa, equivalente a PCFO2, além de mais uma banda de aproximadamente 15 kDa. Porém, a mesma reatividade não foi observada frente aos monoclonais do isotipo IgA, que apenas revelaram a banda de 34,5 kDa referente a PCFO2.

Observando-se a Figura 5, avaliou-se através de Western blotting, a reatividade dos “pools” dos monoclonais anti-PCFO2 dos isotipos IgA e IgG2b frente a proteína purificada da cepa 244-1 (Ricci *et al.*, 1997). Este procedimento apresentou os mesmos resultados observados no teste anterior, onde o “pool” de monoclonais do isotipo IgG2b, reconheceu bandas de 34,5 e 15 kDa em extratos purificados da fimbria PCFO2, enquanto que “pool” de monoclonais do isotipo IgA,, apenas bandas de 34,5 kDa.

4.4.1. Reatividade de “pool” de MAbs do isotipo IgG2b e IgA frente às extrações semi-purificadas das amostras em estudo e PCFO2

Analisando-se a Figura 6, verifica-se que MAbs do isotipo IgG2b são capazes de revelar em extrações das cepas do complexo CFA/II, uma banda de P.M. equivalente a 15 kDa, descrita como correspondente à CS3. Contudo, não reconhece CS1 e tampouco CS2. No mesmo preparado de CFA/II (CS1, CS3), banda próxima a 36 kDa também pode ser observada.

Quanto às extrações semi-purificadas de D242 e D243, estes MAbs revelaram nestas cepas uma banda de aproximadamente 37 kDa e outra de aproximadamente 16 kDa, correspondente em alguns trabalhos à CS6 do complexo CFA/IV (McConnell, *et al.*, 1989). Com relação às extrações semi-purificadas de 244-1, 312-2 e 312-3, estas apresentaram padrão idêntico com os Mabs revelando além da banda de 34,5 kDa, bandas de 15 kDa. Estes dados são altamente sugestivos de que a fimbria PCFO2 deva ser constituída de uma segunda fração, só identificada em reações de Western blotting revelados com MAbs do isotipo IgG2b.

Verifica-se na Figura 7, que MAbs do isotipo IgA, reativos contra PCFO2, apenas revelam bandas de P.M. equivalente a 34,5 kDa em extratos semi-purificados obtidos à partir das cepas 244-1, 312-2, e 312-3. Contudo, não reconhecem, à semelhança dos MAbs IgG2b, as bandas de P.M. equivalentes a 15 kDa.

Por outro lado, nas extrações de D242, D243 e CFA/II (CS1, CS3), apenas bandas de alto P.M. foram nitidamente reveladas. De maneira semelhante ao verificado na Figura 6, os MAbs anti-PCFO2, de ambos os isotipos, não reconhecem nenhum epítomos nas extrações semi-purificadas das cepas D252, D253 e CFA/II (CS2).

4.5. Reatividade em Western blotting das amostras em estudo frente ao soro anti-312-2.

Com base nos resultados anteriores, altamente sugestivos de que apenas as cepas 312-2 e 312-3 expressavam PCFO2 e que esta fimbria deveria apresentar uma segunda subunidade, talvez apenas expressa em cultivos de 48 horas a 37°C, preparou-se neste trabalho o soro anti-312-2. Desta forma, como pode ser observada na Figura 8, em prova de Western blotting revelando extrações das diferentes amostras em estudo e cepas padrão, confirma-se pelas canaletas 2, 8 e 9 a presença de bandas de 15 kDa em preparados semi-purificados das cepas 244-1, 312-2 e 312-3, confirmando-se que PCFO2 possui uma segunda subunidade. Talvez representativa do “tip” da mesma (Fernández & Berenguer, 1999). Nesta mesma Figura, se tratando de revelação por soro policlonal, muitas bandas foram reativas. Dentre estas, destacam-se bandas de baixo P.M. em todas as extrações, com exceção de CS2.

Com relação à cepa D253 LT+, uma nítida banda de P.M. próximo a 15,5 kDa é evidenciada, bem como bandas de 16 kDa nos extratos de D242 e D243, embora reveladas menos uniformemente.

4.6. Reatividade em Western blotting de extratos semi-purificados das cepas em estudo e de cepas padrão de F.C frente a diferentes soros

Pelas Figuras de 9 a 12, extratos de todas as cepas foram analisadas através de provas de Western blotting, objetivando-se verificar a possível homologia de epítomos frente aos soros anti

CFA/I, anti-CFA/II (CS1, CS3), anti-CFA/II (CS2) e anti CFA/III. Como pode ser verificado nestas Figuras, os soros apenas reconheceram seus antígenos homólogos, identificados pelos P.M. das bandas reativas.

4.7. Reatividade em Western blotting de extratos semi-purificados de PCFO2 frente ao soro anti-CFA/IV e anti-D242

Completando-se a avaliação de possível homologia de epítomos entre PCFO2 e os demais FC mais freqüentemente expressos em cepas de *E. coli* diarreio gênicas isoladas de fezes humanas, verifica-se pelas Figuras 13 e 14 que os soros anti-D242 e anti-CFA/IV (CS5, CS6), preparados neste trabalho, reconhecem bandas de P.M. entre 16 e 21 kDa, nos extratos protéicos semi-purificados das cepa padrão de CFA/IV (CS5, CS6) e da amostra D242. Porém, estes não reagiram com as extrações da amostra PCFO2+.

Na Figura 14, talvez pela concentração protéica e pela sensibilidade da técnica, bandas foram reveladas em extrações de cultivos a 16°C, temperatura que normalmente inibe a expressão fimbrial.

4.8. Determinação do título das cepas CFA/IV identificadas, inicialmente, como expressando PCFO2

Paralelamente as cepas em estudo foram tituladas frente a vários soros, em reações de soroa aglutinação em lâmina e em tubo. Pelas Tabelas IV e V pode-se verificar que os resultados obtidos confirmam que as cepas 312-2 e 312-3 realmente expressam PCFO2. Porém, as amostras D242 e D243 demonstraram serem PCFO2-, expressando apenas antígenos do complexo CFA/IV, uma vez que apenas aglutinaram com os soros homólogos e com anti-CFA/IV.

4.9. Avaliação dos extratos protéicos das cepas em estudo em Provas de Inibição Cruzada do ELISA

Para a comprovação da homologia antigênica entre PCFO2 e CS6, as cepas 244-1, 312-2, 312-3, D242, D243, D252, D253, CFA/II (CS1, CS3) e CFA/II (CS2) foram estudadas em placa de ELISA sensibilizadas com antígenos homólogos e heterólogos. Desta forma, a reação foi desenvolvida não apenas frente ao extrato protéico semi-purificado da mesma cepa, como também frente aos extratos das demais cepas PCFO2+, pertencentes ao sorogrupo O2 e amostras padrão de CFA/II.

Estas últimas, foram incluídas com base na reatividade observada nos testes de Western blotting e nos resultados de Delghringaro-Augusto (1998).

Desta forma, como pode ser verificado nas Figuras 15 a 19, as cepas 244-1, 312-2, 312-3, D242 e D243, demonstraram reatividade com os MAbs anti-PCFO2, tendo-se como base os valores de D.O. determinados nas Provas de Inibição do ELISA desenvolvidas.

Por outro lado, MAbs anti-PCFO2, demonstraram não reatividade com os extratos protéicos semi-purificados de D252, D253, CFA/II (CS1, CS3) e CFA/II (CS2).

Nas Figuras onde as bactérias não reagiram com MAbs anti-PCFO2, controles positivos representados por orifícios sensibilizados com extratos semi-purificados de PCFO2, a partir da cepa 244-1, foram incluídas (Figura 20 a 23).

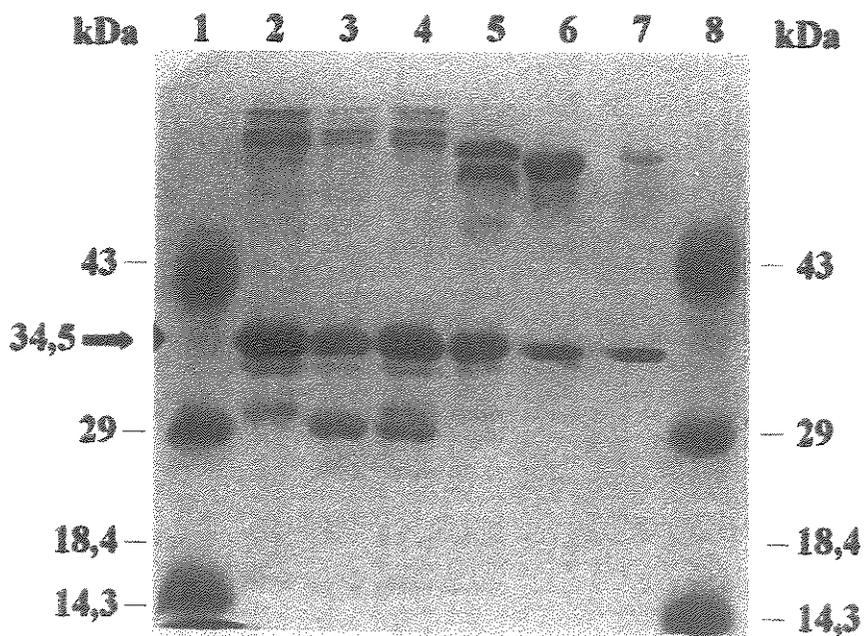


Figura 1 - Análise em SDS-PAGE a 15%, da proteína semi-purificada da fimbria PCFO2 obtida a partir de metodologias diversas, a partir de cultivos da cepa 244-1 de *Escherichia coli* enterotoxigênica a 37° C. (30µg/proteína/canalcta)

Legenda -1 -) Padrão de baixo P.M. Gibco, 2 -) extrato precipitado com 20% de sulfato de amônio; 3 -) extrato precipitado com 20-40% de sulfato de amônio; 4 -) extrato precipitado com 60% de sulfato de amônio; 5 -) extrato precipitado com 60% sulfato de amônio/ fração DOC-solúvel; 6 -) extrato precipitado com 60% sulfato de amônio/ fração DOC-insolúvel; 7 -) fração após primeira cromatografia em Sepharose CL 4B; 8 -) Padrão de baixo P.M. Gibco.

Seta indicativa da presença de bandas próximas a 34,5 kDa, correspondentes à PCFO2.

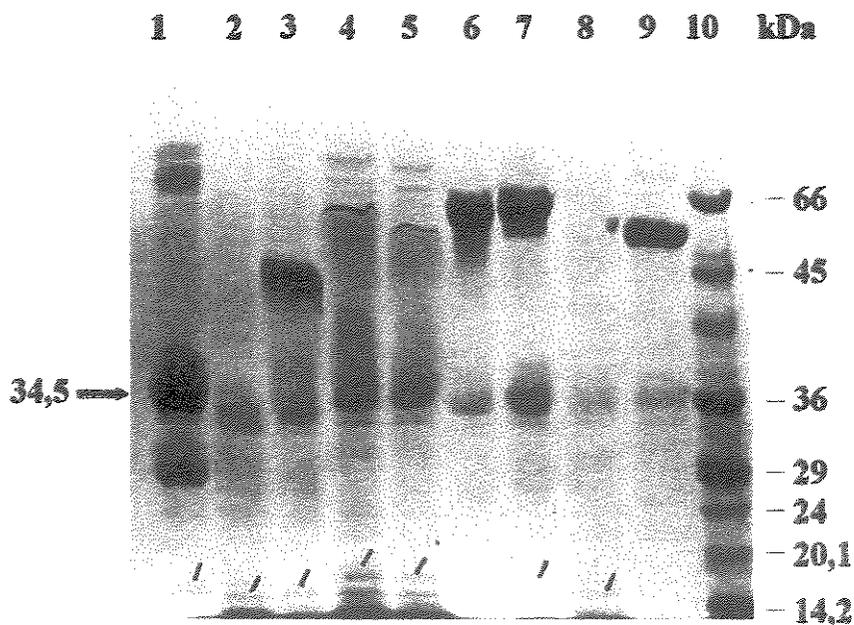


Figura 2 – Análise em SDS-PAGE a 15%, de proteínas semi-purificadas (até precipitação com a 60% de s.a.) obtidos de cepas de *Escherichia coli* diarréiogênicas, isoladas de fezes humanas (30µg proteína/canaleta).

Legenda – 1-) 244-1; 2 -) D253; 3 -) 312-2; 4 -) D243; 5-) D242; 6 -) D252; 7 -) 312-3; 8 -) CFA/II(CS1, CS3); 9-) CFA/II (CS2); 10 -) Padrão de baixo P.M. Sigma.

Seta maior indicativa da presença de bandas próximas a 34,5 kDa.

Setas menores: indicativas da presença de bandas de baixo P.M.

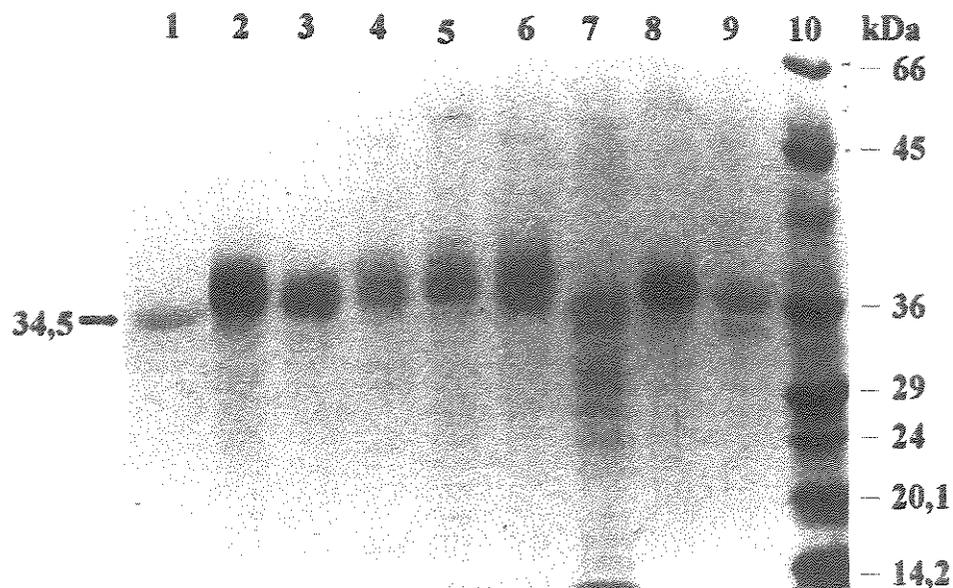


Figura 3 – Análise em SDS–PAGE a 15%, das proteínas purificadas pela metodologia padronizada para PCFO2, a partir de cepas de *Escherichia coli* diarrreio gênicas isoladas de fezes humanas; (30µg/proteína/canaleta).

Legenda- 1-) 244-1 (10µg/canaleta); 2 –) 312-2; 3-) 312-3; 4-) D242; 5-) D243; 6 -) D252; 7 -) D253 (semi-purificada até 60% de sulfato de amônio); 8 –) CFA/II(CS1,CS3); 9-) CFA/II (CS2); 10 -) Padrão de baixo P.M. Sigma

Seta indicativa da presença de bandas próximas a 34,5 kDa

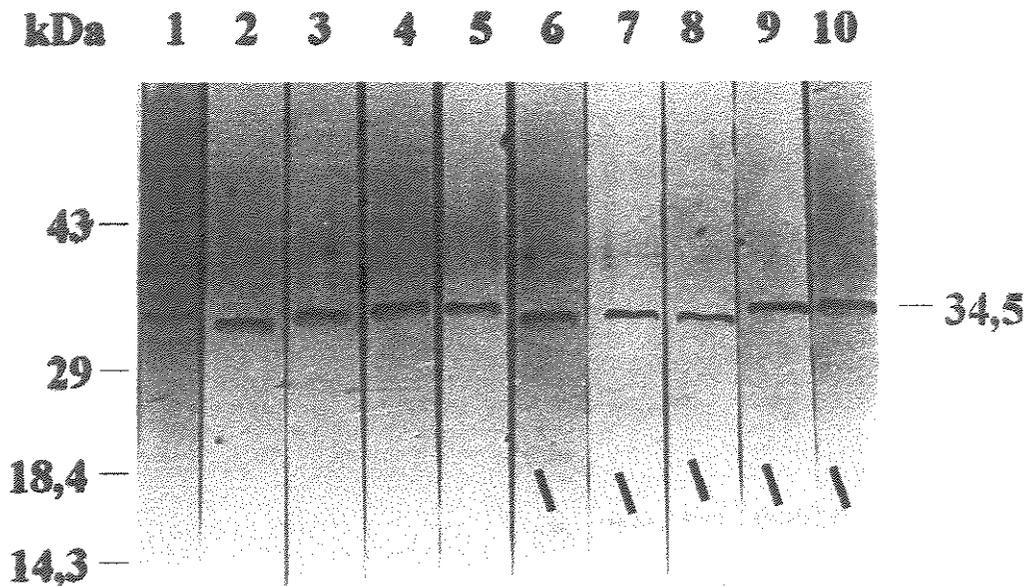


Figura 4 - Análise em Western blotting da reatividade da fimbria PCFO2 purificada a partir da cepa 244-1 de *Escherichia coli* purificada pela metodologia descrita por Ricci *et al.*, (1997); (30µg/proteína/canaleta).

Revelação por monoclonais do isotipo IgG2b e IgA (1/500).

Padrão de baixo P.M. Gibco.

Legenda - 1) fimbria PCFO2 purificada corada com amido black 0,5%; 2 a 5) revelação individual com monoclonais do isotipo IgA (1D1C5; 1D1D10; 1D1D4; 1D1E7); 6 a 10) revelação individual com monoclonais do isotipo IgG2b (2C4E10; 2C4B2; 2C4F12; 2C4G10; 2C4B9).

Setas indicativas da reatividade dos monoclonais do isotipo IgG2b, com bandas de P.M. de aproximadamente 15 kDa.

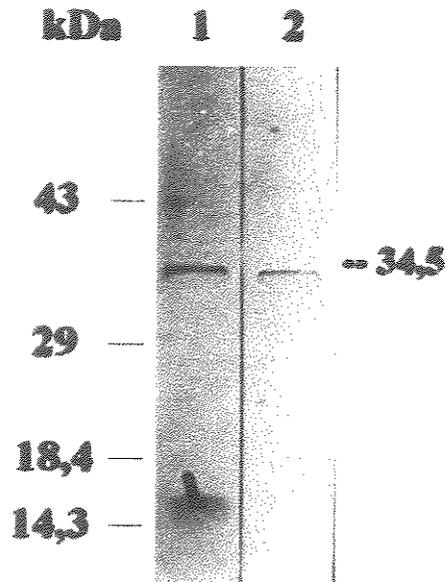


Figura 5 - Análise da reatividade da fimbria PCFO2 em Western blotting purificada a partir da cepa 244-1 de *Escherichia coli* purificada pela metodologia descrita por Ricci *et al.*, (1997); (30µg/proteína/canaleta).

Revelação por pool dos monoclonais anti-PCFO2, dos isotipos IgG2b e IgA (1/500).

Padrão de baixo P.M. Gibco.

Legenda - 1 -) revelação com pool de monoclonais do isotipo IgG2b; 2 -) revelação com pool de monoclonais do isotipo IgA.

Seta indicativa da reatividade do "pool" de monoclonais do isotipo IgG2b, com bandas de P.M. próximo a 15 kDa.

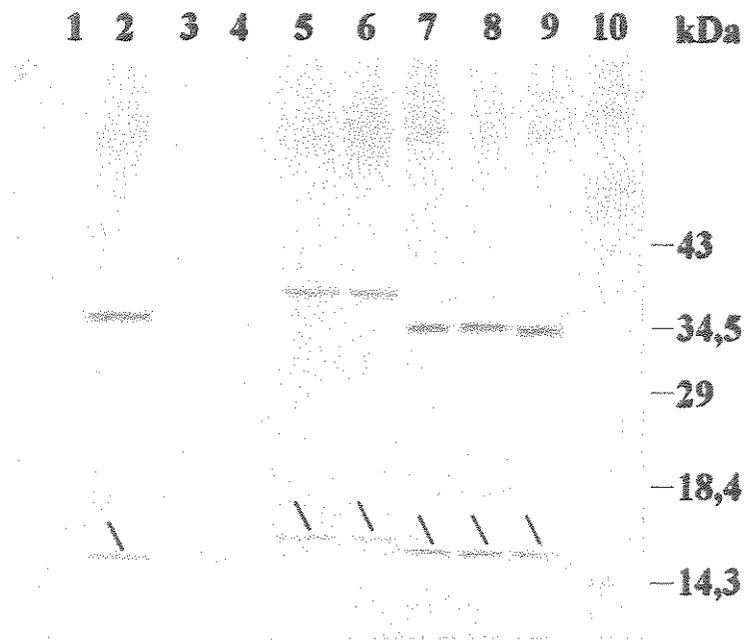


Figura 6 – Análise em Western blotting de extratos de proteínas de superfície obtidas a partir de diferentes cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes diarréicas humanas, semi-purificadas até precipitação a 60% com sulfato de amônio (35µg/proteína/canaleta).

Revelação das reações com pool de monoclonais anti-PCFO2, do isotipo IgG2b (1/500).

Legenda – 1 -) CFA/II (CS2); 2 -) CFA/II (CS1, CS3); 3 -) D252; 4 -) D253; 5 -) D242; 6 -) D243; 7 -) 312-2; 8 -) 312-3; 9 -) 244-1; 10 -) Padrão de baixo P.M. Gibco.

Setas indicativas da reatividade com bandas de P.M. de aproximadamente 15kDa nas amostras 244-1, 312-2 e 312-3; bandas de aproximadamente 16 kDa nas amostras D242 e D243 e banda de aproximadamente 15 kDa na amostra CFA/II (CS1, CS3).

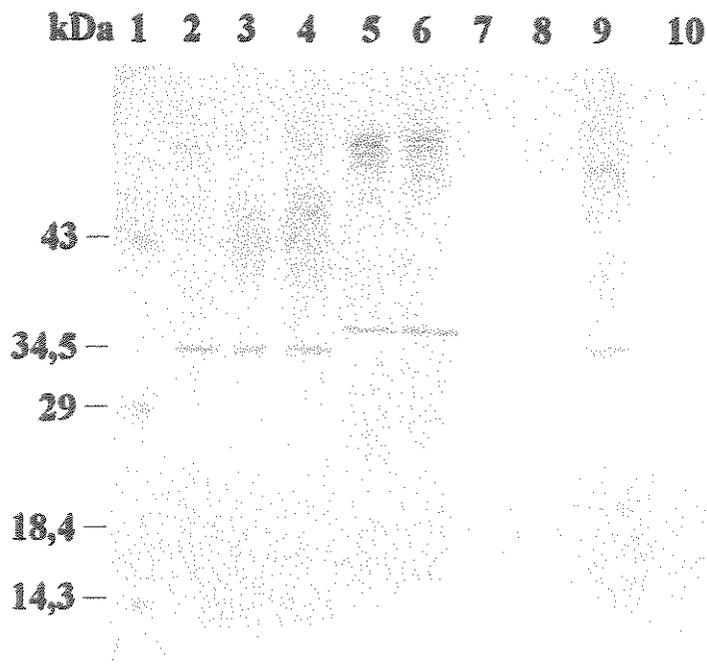


Figura 7 – Análise em Western blotting de extratos de proteínas de superfície obtidas a partir de diferentes cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes diarréicas humanas, semi-purificadas até precipitação a 60% com sulfato de amônio (35µg/proteína/canaleta).

Revelação das reações com pool de monoclonais anti-PCFO2, do isotipo IgA (1/500).

Legenda – 1 -) Padrão de baixo P.M. Gibco ; 2 -) 244--1; 3 -) 312-3; 4 -) 312-2; 5 -) D243; 6 -) D242; 7 -) D253; 8 -) D252; 9 -) CFA/II (CS1, CS3); 10 -) CFA/II (CS2)

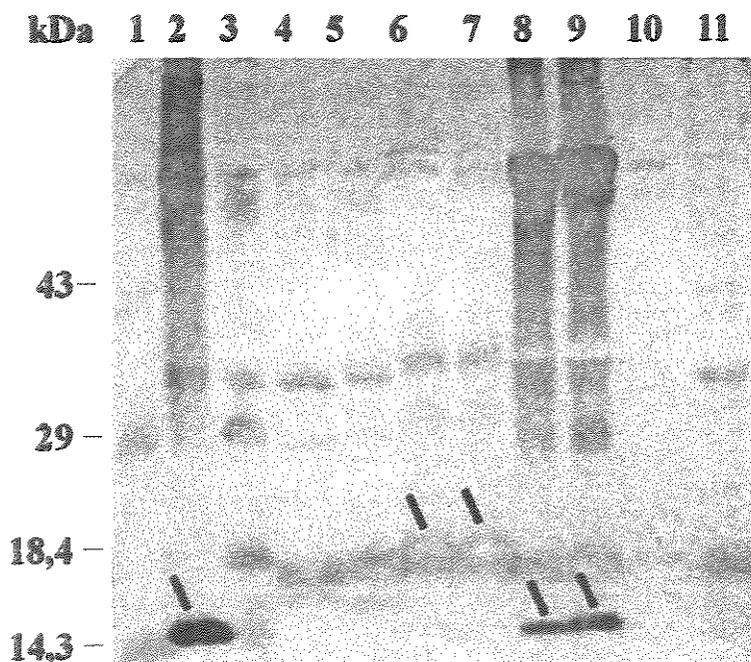


Figura 8 – Análise em Western blotting de extratos de proteínas de superfície obtidas a partir de diferentes cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes diarreicas humanas, semi-purificadas até precipitação a 60% com sulfato de amônio (30µg/proteína/canaleta).

Revelação pelo soro anti-312-2 (1/150).

Legenda – 1 -) Padrão de baixo P.M. Gibco; 2 -) 244-1 semi-purificada; 3 -) 244-1 após primeira cromatografia em Sepharose CL4B; 4 -) D253; 5 -) D252; 6 -) D242; 7 -) D243; 8 -) 312-3; 9 -) 312-2; 10 -) CFA/II (CS2); 11 -) CFA/II (CS1, CS3)

Setas indicativas da reatividade com bandas de baixo P.M.

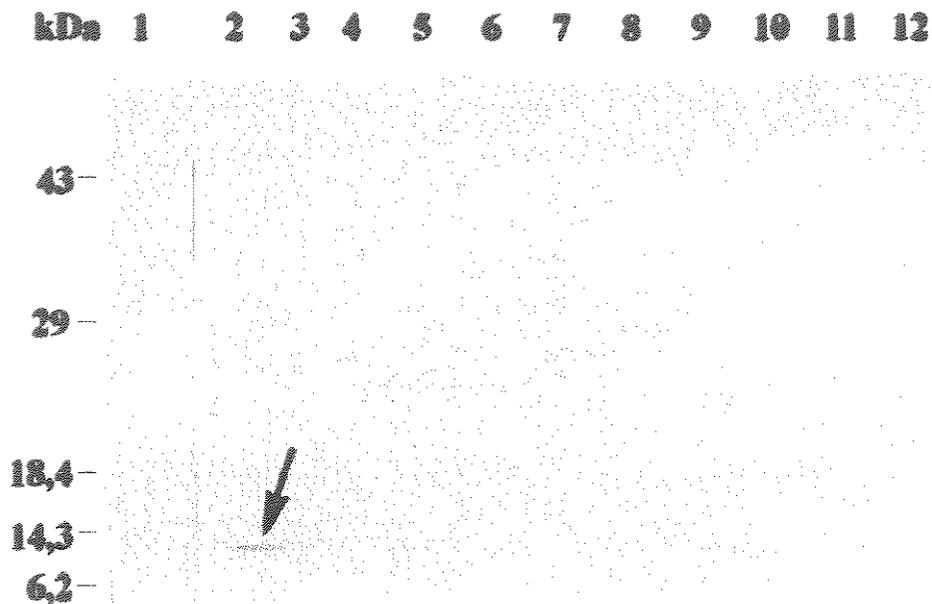


Figura 9 – Análise em Western blotting de extratos de proteínas de superfície obtidas a partir de diferentes cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes diarréicas humanas, semi-purificadas até precipitação a 60% com sulfato de amônio (30µg/proteína/canaleta). Revelação pelo soro anti-CFA/I (1/150).

Legenda – 1 -) Padrão de baixo P.M. Gibco; 2 -) CFA/I; 3 -) 244-1; 4 -) D253; 5 -) D252; 6 -) D242; 7 -) D243; 8 -) 312-3; 9 -) 312-2; 10 -) CFA/II (CS2); 11 -) CFA/II (CS1, CS3); 12 -) CFA/III.

Seta indicativa da reatividade com banda da cepa padrão para CFA/I

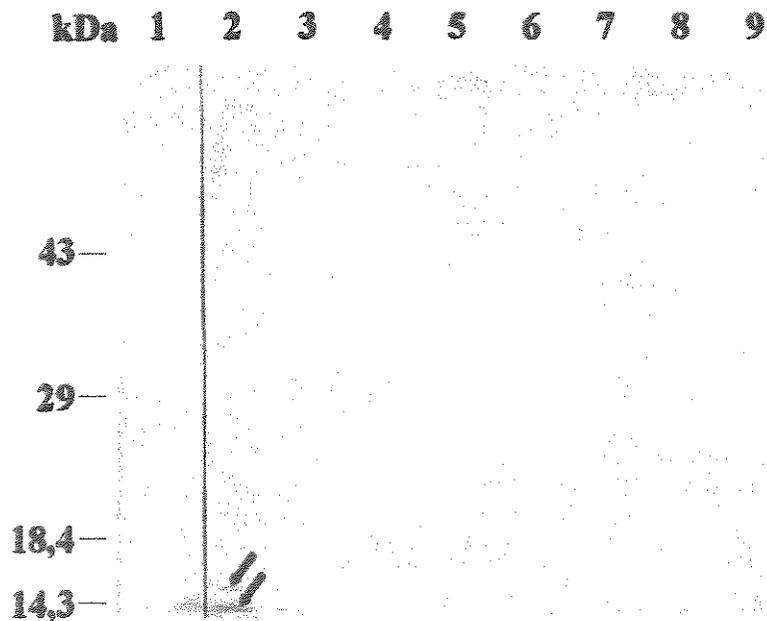


Figura 10 – Análise em Western blotting de extratos de proteínas de superfície obtidas a partir de diferentes cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes diarréicas humanas, semi-purificadas até precipitação a 60% com sulfato de amônio (30µg/proteína/canaleta).

Revelação pelo soro anti-CFA/II (CS1, CS3) (1/150).

Legenda – 1 -) Padrão de baixo P.M. Gibco; 2 -) CFA/II (CS1, CS3); 3 -) 312-3; 4 -) 312-2; 5 -) D242; 6 -) D243; 7 -) D252; 8 -) D253; 9 -) 244-1

Setas indicativas da reatividade com bandas de cepa padrão CFA/II (CS1, CS3)

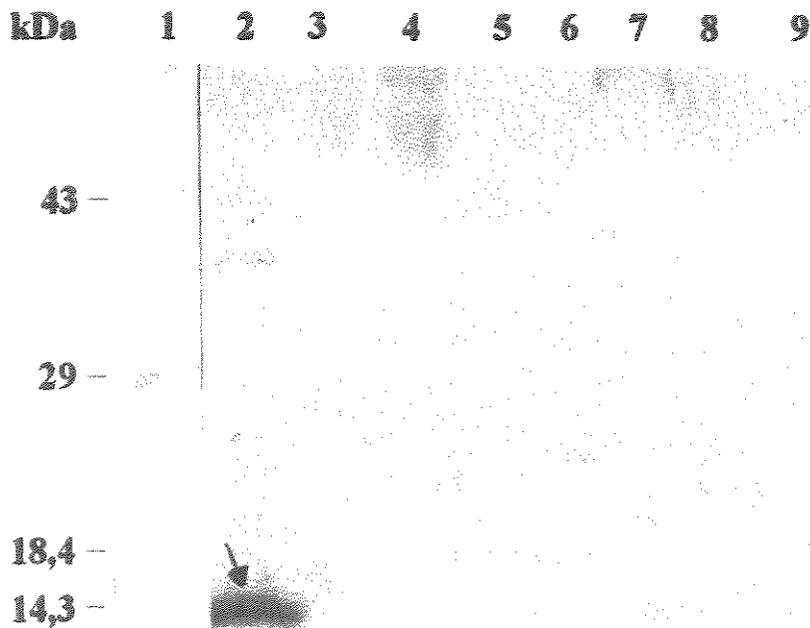


Figura 11 – Análise em Western blotting de extratos de proteínas de superfície obtidas a partir de diferentes cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes diarréicas humanas, semi-purificadas até precipitação a 60% com sulfato de amônio (30µg/proteína/canaleta).

Revelação pelo soro anti-CFA/II (CS2) (1/150).

Legenda – 1 -) Padrão de baixo P.M. Gibco; 2 -) CFA/II (CS2); 3 -) 312-3; 4 -) 312-2; 5 -) D242; 6 -) D243; 7 -) D252; 8 -) D253; 9 -) 244-1

Seta indicativa da reatividade com banda da cepa padrão CFA/II (CS2)

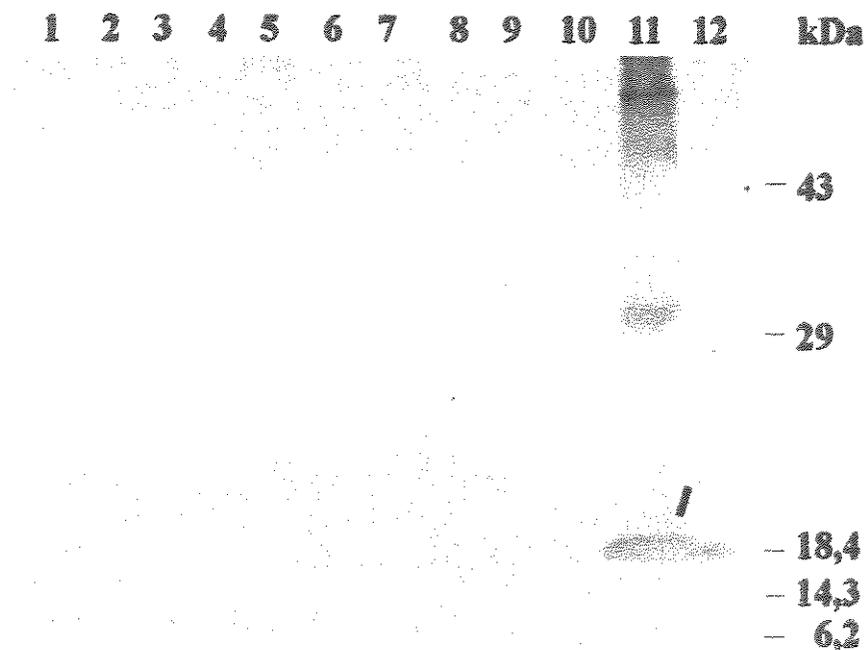


Figura 12 – Análise em Western blotting de extratos de proteínas de superfície obtidas a partir de diferentes cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes diarréicas humanas, semi-purificadas até precipitação a 60% com sulfato de amônio (30µg/proteína/canaleta). Revelação pelo soro anti-CFA/III (1/150).

Legenda – 1 -) 244--1; 2 -) 244-1 após primeira cromatografia; 3 -) 312-2; 4 -) 312-3; 5 -) D242; 6 -) D243; 7 -) D252; 8 -) D253; 9 -) CFA/II (CS1, CS3), 10 -) CFA/II (CS2); 11 -) CFA/III; 12 -) Padrão de baixo P.M. Gibco.

Seta indicativa da reatividade com banda da cepa padrão CFA/III

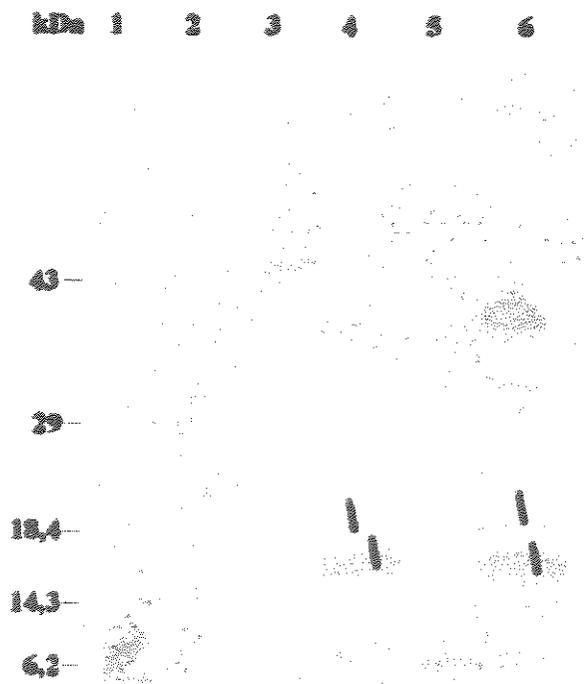


Figura 13 - Análise em Western blotting de extratos de proteínas de superfície obtidas a partir de diferentes cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes diarréicas humanas, semi-purificadas até precipitação a 60% com sulfato de amônio (30µg/proteína/canaleta).

Revelação pelo soro anti-D242 (1/150)

Legenda - 1 -) Padrão de baixo P.M. Gibco); 2 -) 244-1 cultivada a 37° C; 3 -) CFA/IV (CS5, CS6) cultivada a 16° C; 4 -) CFA/IV (CS5, CS6) cultivada a 37° C; 5 -) D242 cultivada a 16°C; 6 -) D242 cultivada a 37° C

Setas indicativas da reatividade com bandas de P.M. aproximado a 16 e 21kDa

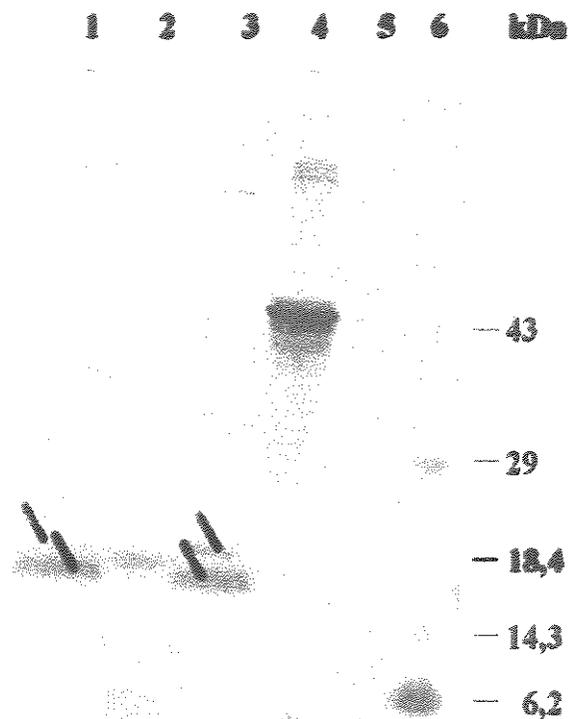


Figura 14 – Análise em Western blotting de extratos de proteínas de superfície obtidas a partir de diferentes cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes diarreicas humanas, semi-purificadas até precipitação a 60% com sulfato de amônio (30µg/proteína/canaleta).

Revelação com soro anti- CFA/IV (CS5, CS6) (1/150).

Legenda – 1 -) D242 cultivada a 37° C; 2 -) D242 cultivada a 16° C; 3 -) CFA/IV (CS5, CS6) cultivada a 37° C; 4 -) CFA/IV (CS5, CS6) cultivada a 16° C; 5 -) 244-1 cultivada a 37° C; 6 -) Padrão de baixo P.M. Gibco.

Setas indicativas da reatividade com bandas de P.M. próximo a 16 e 21kDa

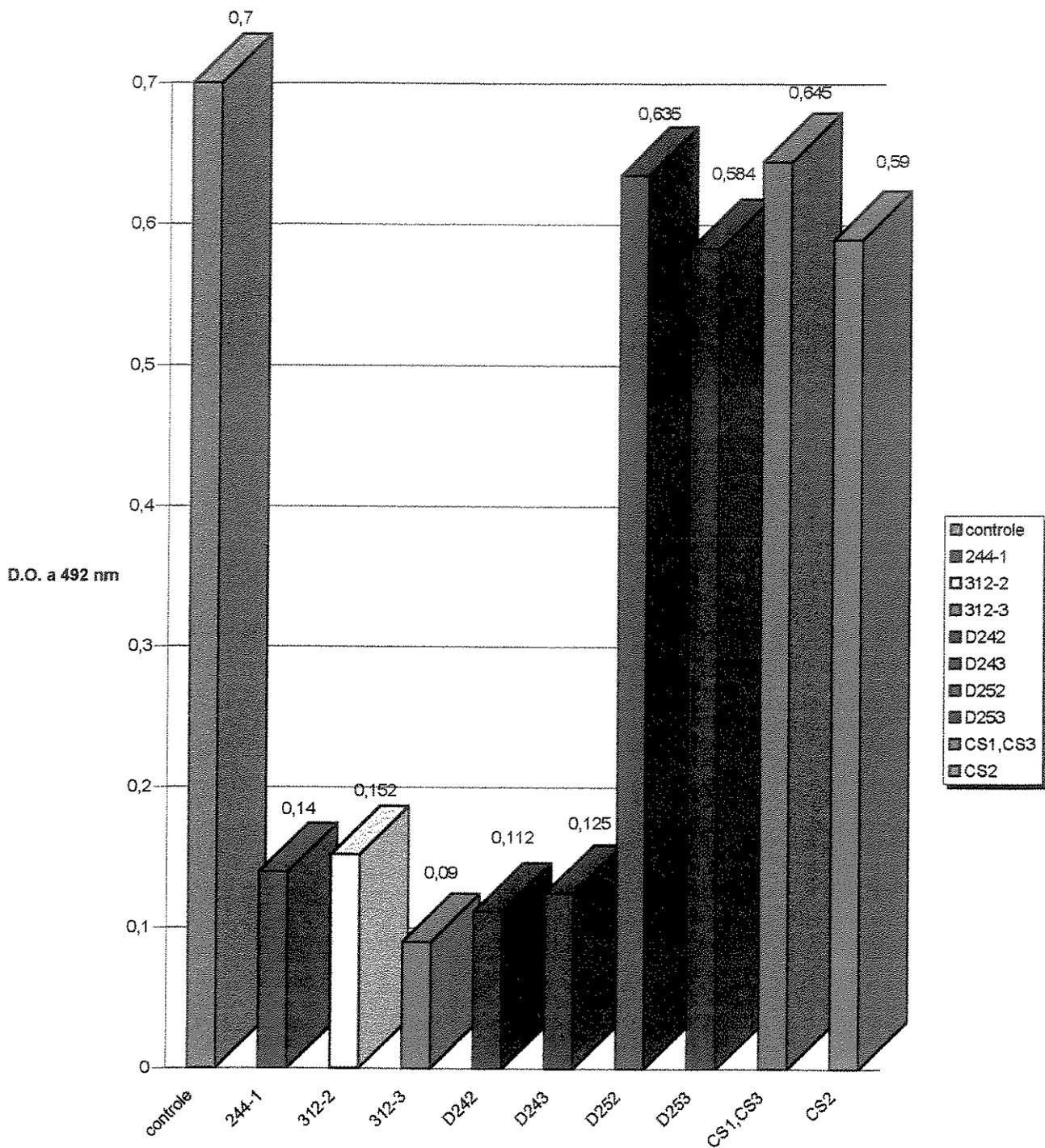


Figura 15 - Prova de Inibição Cruzada do ELISA em placa sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa 244-1. Revelação com pool de monoclonais do isotipo IgG2b (1/500).

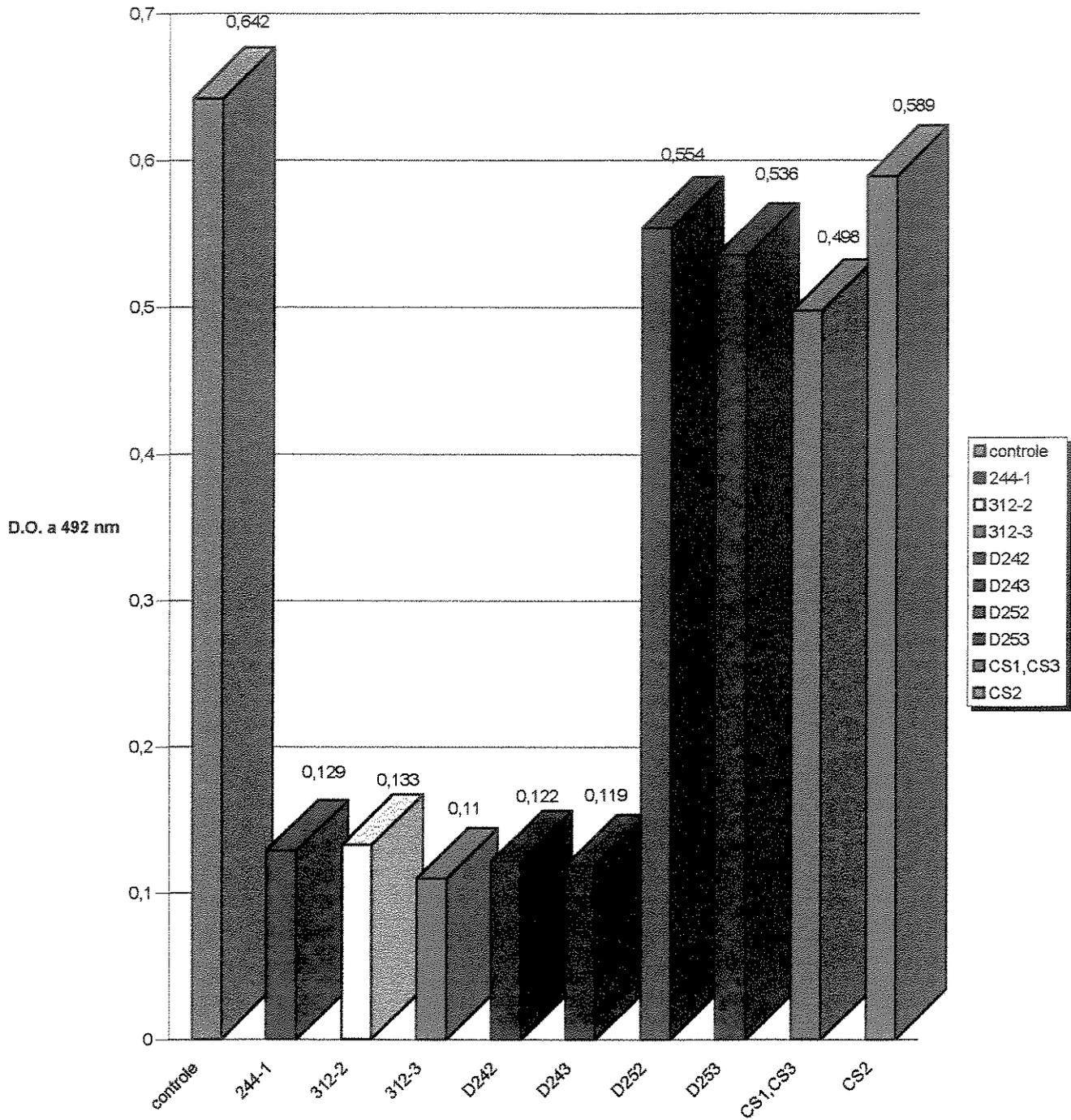


Figura 16 - Prova de Inibição Cruzada do ELISA em placa sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa 312-2. Revelação com pool de monoclonais do isotipo IgG2b (1/500).

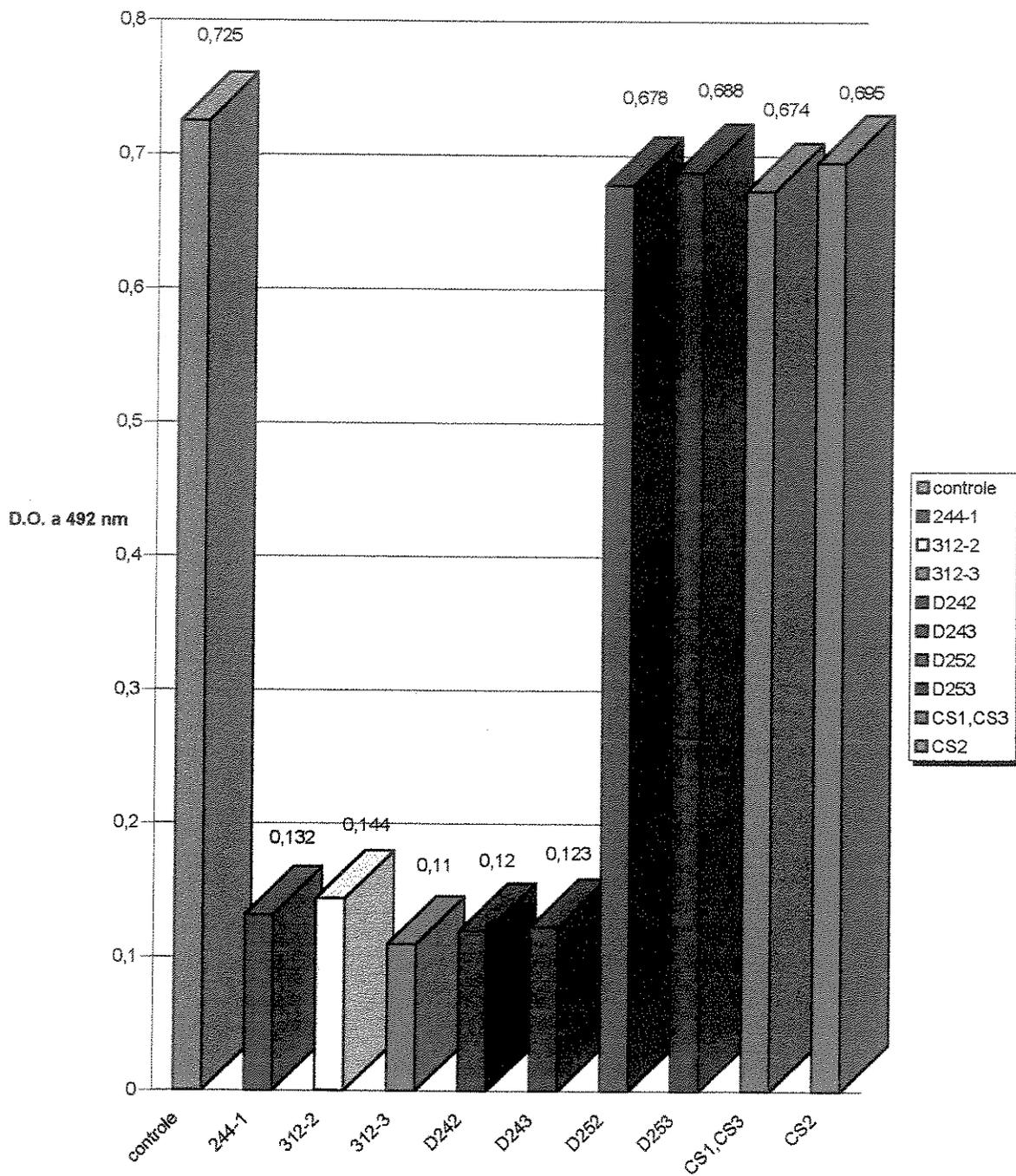


Figura 17 - Prova de Inibição Cruzada do ELISA em placa sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa 312-3. Revelação com pool de monoclonais do isotipo IgG2b (1/500).

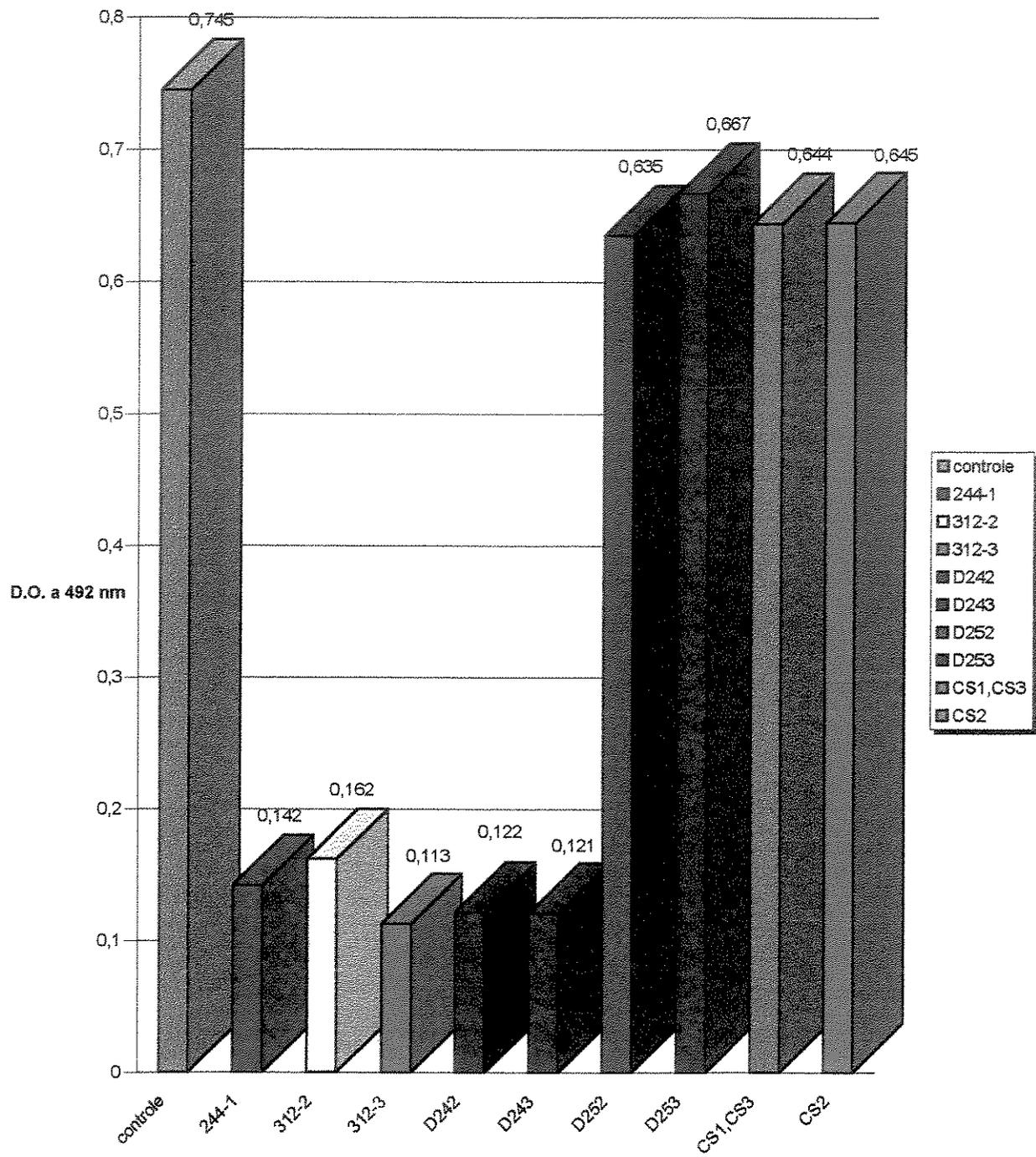


Figura 18 - Prova de Inibição Cruzada do ELISA em placa sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa D242. Revelação com pool de monoclonais do isotipo IgG2b (1/500).

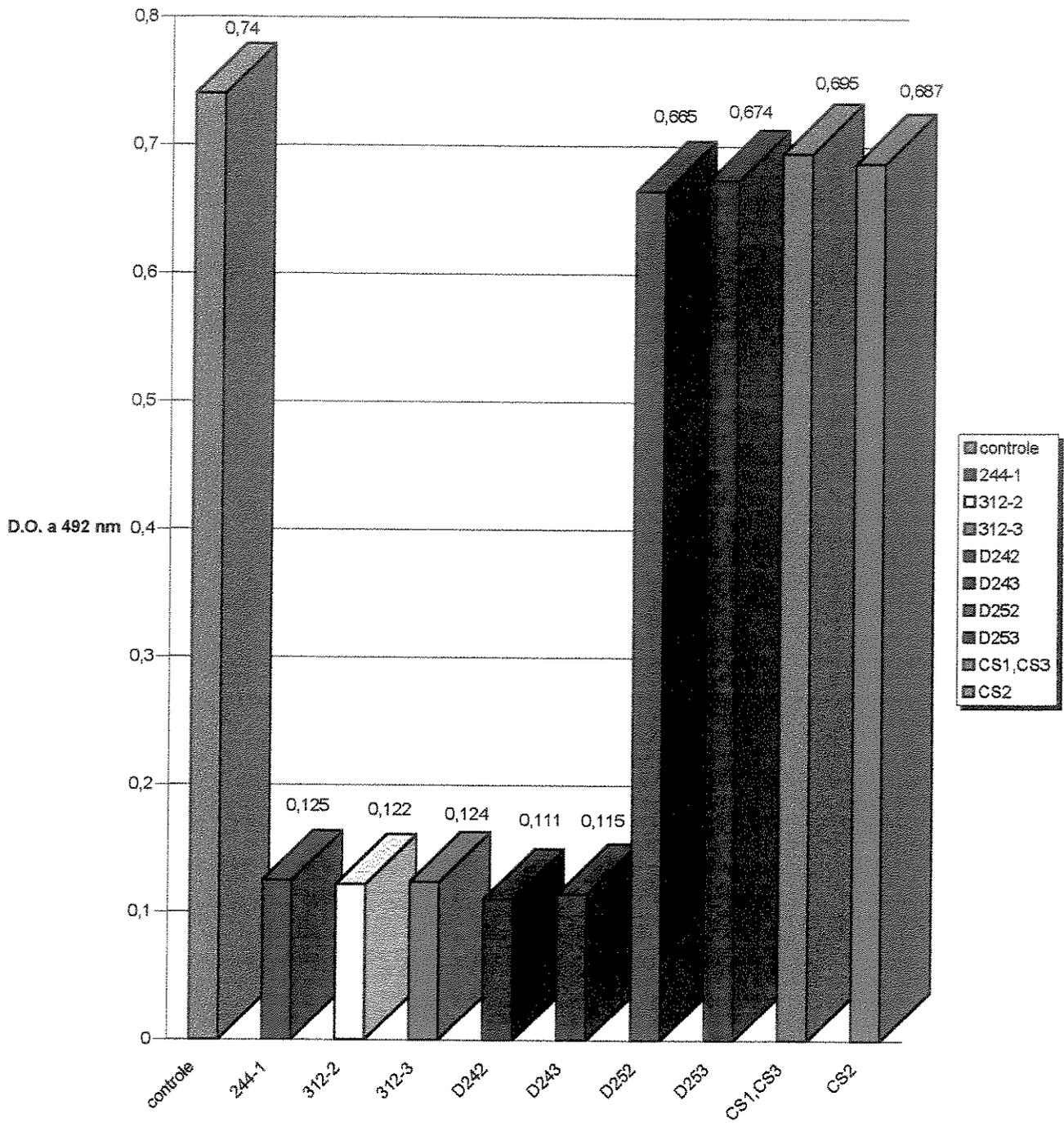


Figura 19 - Prova de Inibição Cruzada do ELISA em placas sensibilizadas com extratos semi-purificados da cepa D243. Revelação com pool de monoclonais do isotipo IgG2b (1/500).

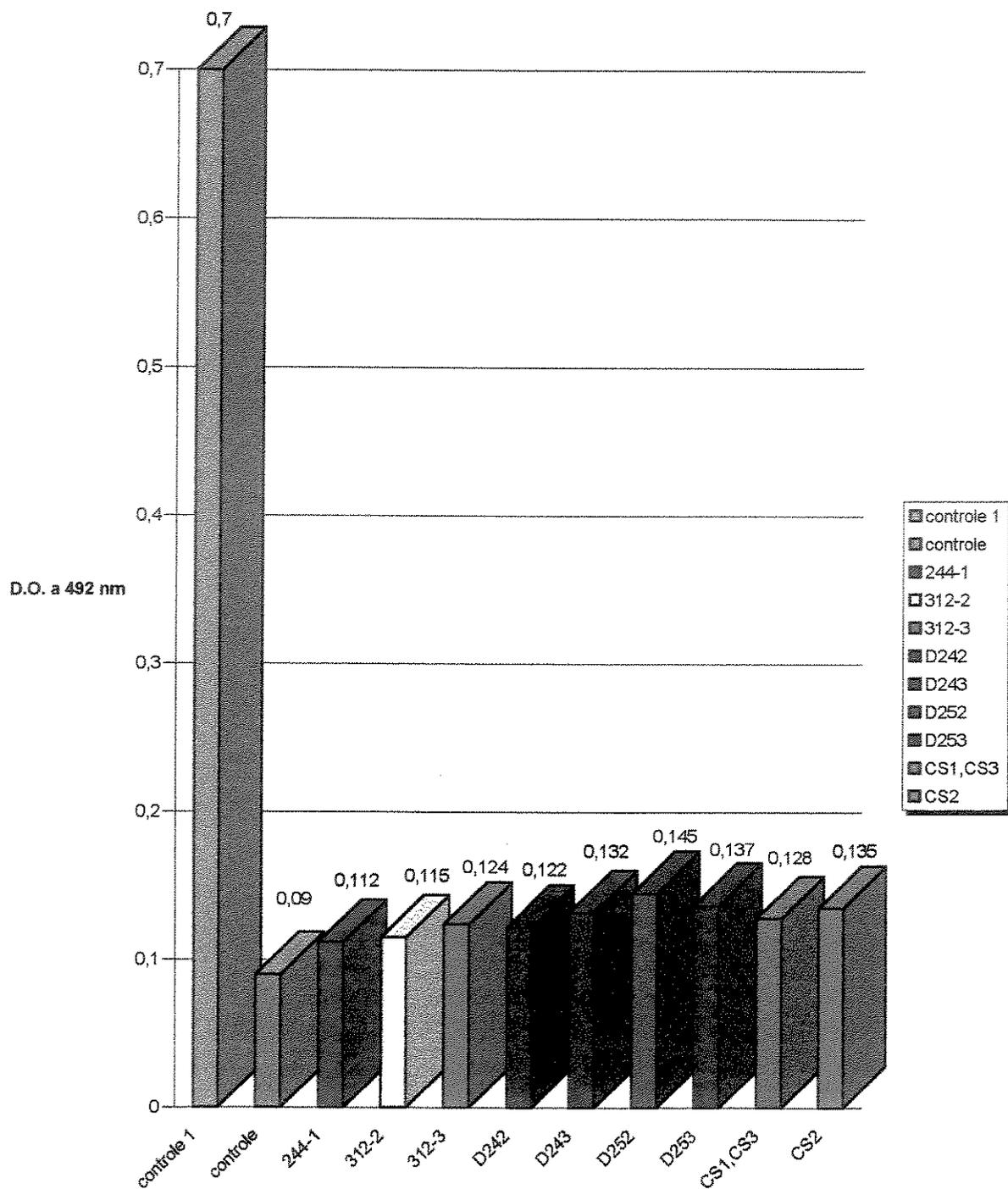


Figura 20 - Prova de Inibição Cruzada do ELISA em placa sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa D252. Revelação com pool de monoclonais do isotipo IgG2b (1/500).

Controle 1- cavidade sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa 244-1.

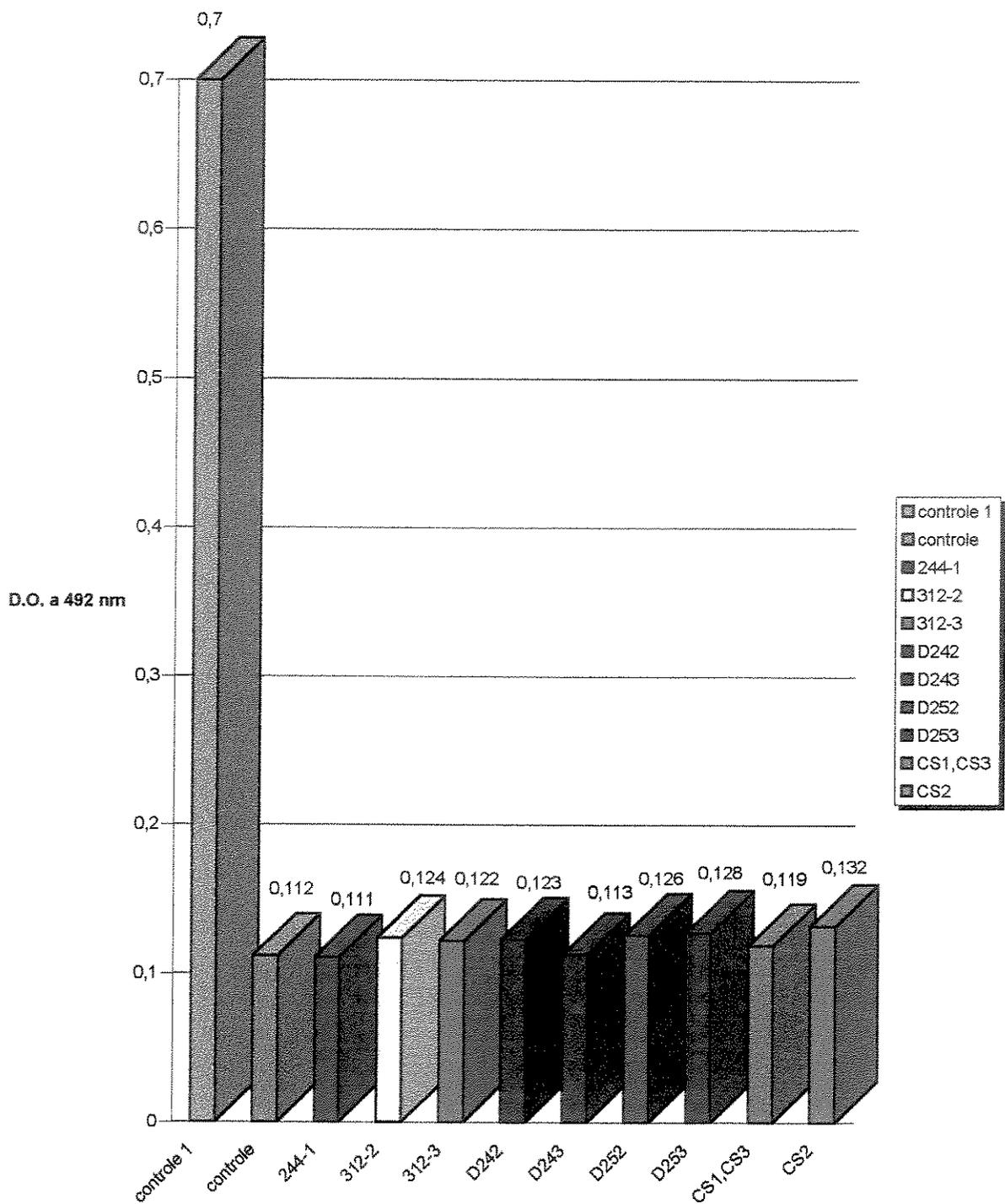


Figura 21 - Prova de Inibição Cruzada do ELISA em placa sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa D253. Revelação com pool de monoclonais do isotipo IgG2b (1/500).

Controle 1 - cavidade sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa 244-1.

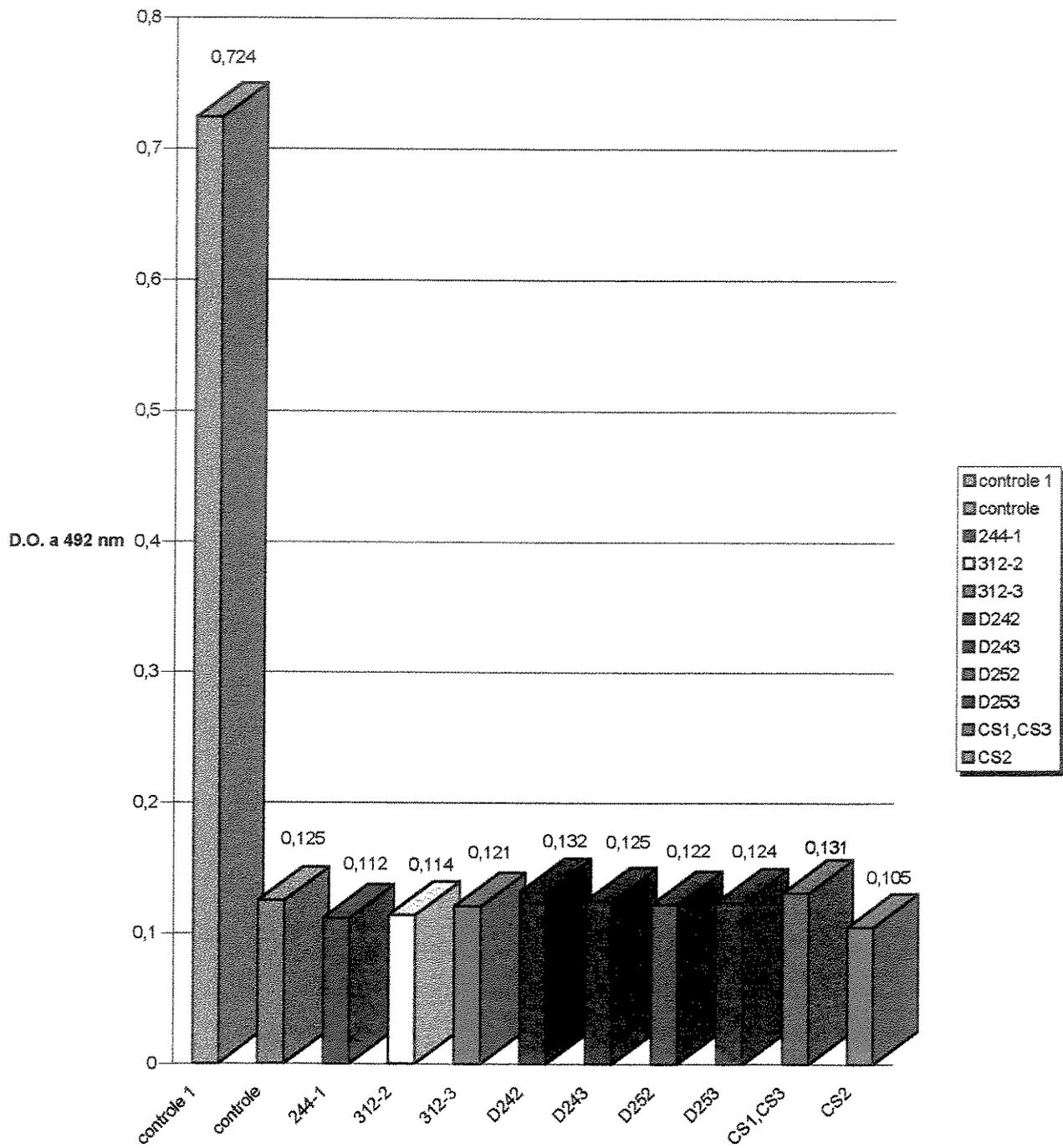


Figura 22- Prova de Inibição Cruzada do ELISA em placa sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa CFA/II (CS1,CS3). Revelação com pool de monoclonais IgG2b (1/500). Controle 1- cavidade sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa 244-1.

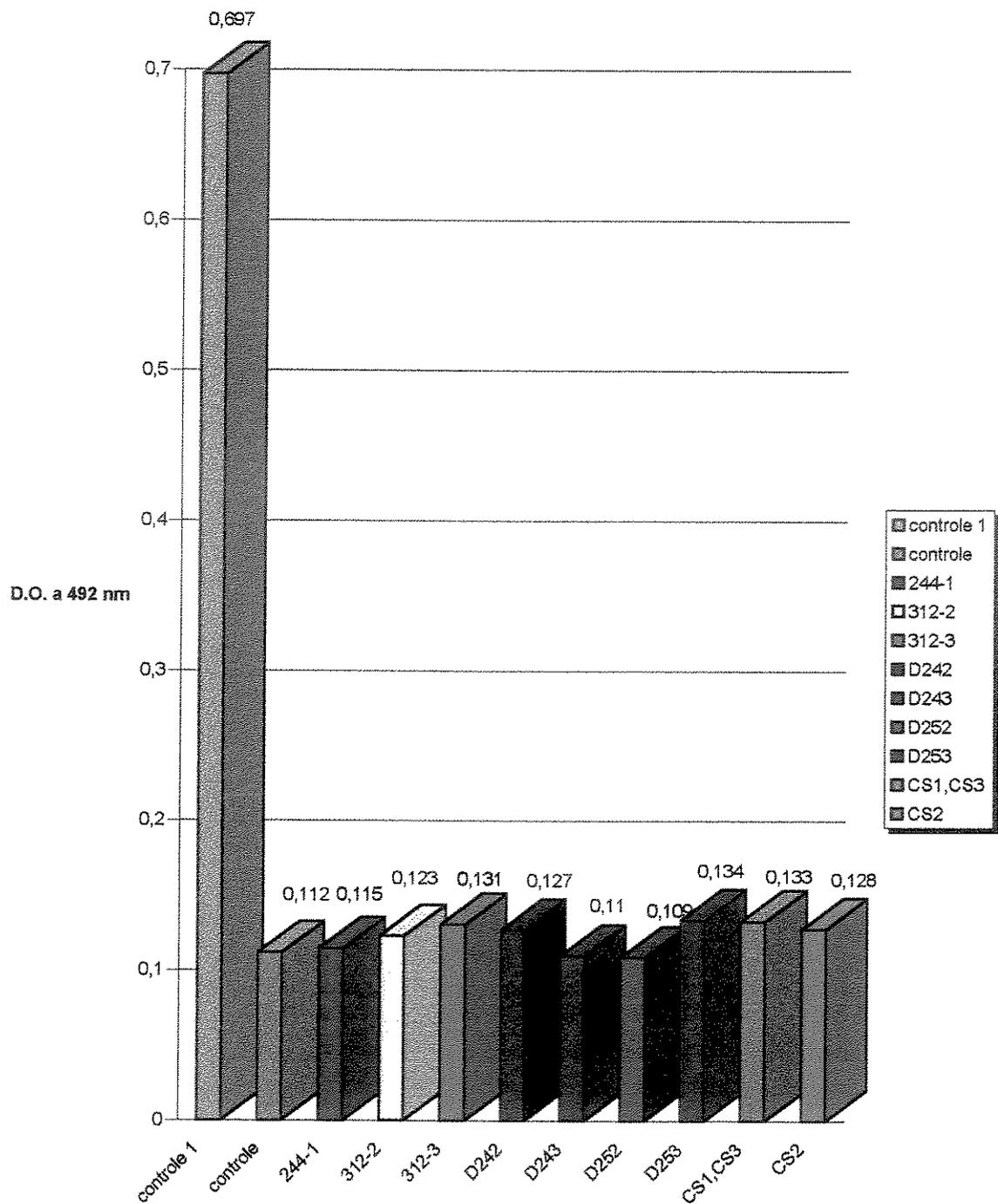


Figura 23 - Prova de inibição Cruzada do ELISA em placa sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa CFA/II(CS2). Revelação com pool de monoclonais do isotipo IgG2b (1/500).

Controle1-cavidade sensibilizada com extrato semi-purificado da cepa 244-1

TABELA III – Concentração protéica de extrações purificadas de PCFO2 em diferentes metodologias.

<i>AMOSTRA</i>	<i>METODOLOGIA DE PURIFICAÇÃO</i>	<i>CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA PURA/LOTE DE 20 GARRAFAS DE ROUX*</i>
244-1	20-40% s.a./diálise DOC/dupla cromatografia em Sepharose CL4B	169µg/mL
244-1	60% s.a./diálise DOC/dupla cromatografia em Sepharose CL4B	200µg/mL
244-1	60% s.a. /dupla cromatografia em Sepharose CL4B	280µg/mL
312-2	20-40% s.a./diálise DOC/dupla cromatografia em Sepharose CL4B	180µg/mL
312-2	60% s.a./diálise DOC/dupla cromatografia em Sepharose CL4B	215µg/mL
312-2	60% s.a. /dupla cromatografia em Sepharose CL4B	255µg/mL
312-3	20-40% s.a./diálise DOC/dupla cromatografia em Sepharose CL4B	195µg/mL
312-3	60% s.a./diálise DOC/dupla cromatografia em Sepharose CL4B	237µg/mL
312-3	60% s.a. /dupla cromatografia em Sepharose CL4B	293µg/mL

*Concentração protéica determinada através do método de Bradford

TABELA IV – Titulação das cepas em estudo por soroaglutinação em lâmina.

<i>Amostras</i>	<i>Anti-CFA/IV (CS4, CS6)</i>	<i>Anti-CFA/IV (CS5, CS6)</i>	<i>Anti-D242</i>	<i>Anti-PCFO2 (244-1)</i>	<i>Anti-312-2</i>
D242	1/20	1/320	1/320	1/10	1/10
D243	1/40	1/320	1/320	1/10	1/10
244-1	N.R.	N.R.	N.R.	1/640	1/640
312-2	N.R.	N.R.	N.R.	1/640	1/640
312-3	N.R.	N.R.	N.R.	1/640	1/640
CFA/IV (CS5, CS6) Cepa E17018/A	1/40	1/320	1/320	1/20	1/10
CFA/IV (CS4, CS6) Cepa 151-3	1/320	1/80	1/40	N.R.	N.R.

N.R. – Não reativo

TABELA V – Titulação das cepas em estudo por soroglutinação em tubo.

<i>Amostras</i>	<i>Anti-CFA/IV (CS4, CS6)</i>	<i>Anti-CFA/IV (CS5, CS6)</i>	<i>Anti-D242</i>	<i>Anti-PCFO2 (244-1)</i>	<i>Anti-312-2</i>
D242	1/80	1/640	1/640	1/20	1/40
D243	1/80	1/640	1/640	1/20	1/40
244-1	N.R.	N.R.	N.R.	1/1280	1/1280
312-2	N.R.	N.R.	N.R.	1/1280	1/1280
312-3	N.R.	N.R.	N.R.	1/1280	1/1280
CFA/IV (CS5, CS6) Cepa E17018/A	1/80	1/640	1/640	1/80	1/40
CFA/IV (CS4, CS6) Cepa 151-3	1/640	1/160	1/80	1/20	1/10

N.R. – Não reativo

5 – DISCUSSÃO

As bactérias exibem diversas respostas adaptativas devido aos diferentes estímulos físico-químicos do meio ambiente (Parkinson, 1993). Desta forma, quando uma bactéria é transferida para um nicho ecológico particular, que apresente nutrientes e metabólicos distintos dos encontrados no anterior, isto resulta na ativação de OPERONS específicos, que promovem, principalmente, a transcrição de vias metabólicas especiais, capazes de permitir o transporte e a utilização dos nutrientes disponíveis.

Na relação parasita-hospedeiro é através do controle da expressão gênica e fenotípica, que muitos microrganismos patogênicos conseguem colonizar e infectar um hospedeiro susceptível.

Após a colonização, uma variedade de mecanismos de virulência podem ser ativados nestes microrganismos, incluindo ação de toxinas, estabelecimento de parasitismo intracelular ou íntima aderência com membranas de células da mucosa do hospedeiro (EPEC e EHEC), causando lesões intracelulares e alterações no citoesqueleto dessas células (Goosney *et al.*, 2000). Além disto, inúmeros antígenos expressos e liberados pelos patógenos também contribuem de forma significativa para formação de lesões no hospedeiro, através da ativação inadequada do sistema imune (Nataro & Kaper, 1998).

Quanto à diversidade genética da *E. coli* diarreio gênica, esta tem sido associada a genes plasmidiais ou a ilhas de patogenicidade presentes no cromossomo bacteriano (Mellies *et al.*, 2001; Nataro & Kaper, 1998). Recentemente, vários trabalhos têm demonstrado que a expressão desta patogenicidade é regulada pela microbiota intestinal (Uzzau & Fasano, 2000; Sperandio *et al.*, 2001).

Sob estímulos do microhabitat, bactérias gram-negativas podem sintetizar até grandes estruturas expostas na superfície da célula bacteriana, sendo estas o resultado da polimerização ordenada de subunidades protéicas. Desta forma, estruturas regulares planas (S layers) ou tubulares (flagelos e fímbrias) podem ser observadas, exercendo funções específicas dentro do ambiente em que a bactéria se encontra (Fernández & Berenguer, 2000).

As estruturas tubulares correspondem aos flagelos nos gram-negativos e são constituídos de um filamento rígido helicoidal conectado a um filamento menor e curvo, denominado de

“hook” e a um corpo basal responsável pela rotação flagelar (Lory, 1998; Pruss & Matsumura, 1997).

Quanto às fimbrias ou pili, estas são representadas por filamentos helicoidais formadas por uma subunidade maior e por 3 a 5 subunidades protéicas menores, cuja maior função é a ligação destas estruturas às superfícies da célula bacteriana (Fernández & Berenguer, 2000).

Em bactérias gram-negativas, estas fimbrias são representadas por apêndices que se assemelham a “fios de cabelo” expressos ao redor da superfície da célula bacteriana. São formadas por subunidades protéicas denominadas de fibrinas ou pilinas e normalmente se expressam como estruturas de 1 a 2 μm de comprimento e de 2 a 8 nm de espessura (Low *et al.*, 1996). A expressão destas fimbrias têm sido associada à virulência de muitos patógenos bacterianos importantes, pela sua capacidade de permitir a adesão dos mesmos aos tecidos do hospedeiro (Finlay & Falkow, 1997).

Entretanto, o estudo destas fimbrias, somado ao da pili da classe tipo I, expressas por cepas de *Escherichia coli* uropatogênicas e *Salmonella* sp, bem como pili da classe tipo IV, descritas em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* sp, *Vibrio cholerae*, EPEC e ETEC, demonstram que a especificidade e a capacidade da adesão fimbrial é devida, em alguns casos, a componentes menores da estrutura fimbrial (Girón *et al.*, 1997; Soto & Hultgren, 1999).

A contribuição destes filamentos na virulência da bactéria têm sido demonstrada “in vivo” em muitos trabalhos (Bieber *et al.*, 1998; Langermann *et al.*, 1996). Porém, maior número de evidências quanto a esta participação, foram obtidos através de experimentos “in vitro”, verificando-se a adesão à culturas de células.

Uma vez que muitos patógenos podem expressar simultaneamente múltiplos tipos de fimbrias e/ou de adesinas não fimbriais, fica difícil definir-se a real contribuição de cada uma destas estruturas nos mecanismos de virulência destes agentes durante os processos infecciosos (Finlay & Falkow, 1997; Soto & Hultgren, 1999).

No que diz respeito ao grupo diarreio gênico representado pelas ETEC, várias cepas enterotoxigênicas isoladas, não tem seus FC identificados. Isto representa um obstáculo na completa caracterização das cepas ETEC, uma vez que pelo grande número e heterogeneidade dos FC já descritos pesquisa-se, inicialmente, a expressão das enterotoxinas LT e/ou ST para a identificação das amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas, para só depois pesquisar-

se o FC expresso pela mesma. Porém, dentre estes isolados, muitos permanecem sem terem seus FC identificados (Nataro & Kaper, 1998).

Recentemente, Pichel *et al.* (2001) avaliando cepas ETEC nas quais FC já descritos não haviam sido identificados, descreveram a expressão de uma nova adesina denominada de CS22. Nesta caracterização utilizaram provas de adesão à cultura celular Caco-2, polimorfismo randômico de DNA e técnicas de “pulse-field eletrophoresis”, estabelecendo dendogramas e análise clonal.

Em trabalhos epidemiológicos como o de Geyid *et al.* (1998), cepas de *E. coli* foram isoladas de 108 amostras fecais na Etiópia, procedentes de pacientes apresentando diarreia aguda e de 44 pacientes convalescentes deste quadro entérico. Nestas amostras, o grupo ETEC foi o mais freqüentemente identificado (63 pacientes; 58%). Utilizando MAbs reativos para CFA/I e CS1 a CS5, estes autores identificaram em apenas 18 dentre 66 amostras, como expressando um ou mais destes FC. Portanto, verifica-se a grande diversidade de adesinas expressas pelas cepas ETEC nesta região geográfica, como já relatado em muitos outros trabalhos, onde apenas 1/3 dos FC é identificado (Nirdnoy *et al.*, 1997; Pichel *et al.*, 2001).

Em trabalhos de Viboud *et al.* (1999), desenvolvido na Argentina com 145 crianças de diferentes localidades, em período de 2 anos, 730 amostras fecais foram estudadas. Dentre as cepas de *E. coli* isoladas, amostras ETEC corresponderam a 18,3% dos casos sintomáticos e a 13,3% dos casos assintomáticos.

Nestes isolados, os seguintes FC foram pesquisados: CFA/I, CFA/II, CFA/III, CFA/IV, CS7 e CS17, além dos PCF: PCF0159, PCF0166 e PCF020. O mais freqüente FC identificado correspondeu a CFA/IV (16%). Estudos de regressão matemática analisando os resultados obtidos, demonstraram que a expressão de FC está associada à doença, independente do tipo de toxina expressa. Dentre os analisados, apenas CS17 foi considerado como o único fator associado à diarreia, independentemente da produção de toxinas.

Por outro lado, no mesmo trabalho verificou-se que a maioria dos FC pesquisados associaram-se a poucos sorotipos, com exceção de CFA/IV. Portanto, os resultados deste trabalho demonstraram claramente a relevância dos FC na síndrome diarreica e a necessidade de identificação dos mesmos nas cepas ETEC isoladas nas diferentes regiões geográficas.

Entretanto, nesta identificação, apesar da *Escherichia coli* diarreiogênica ter sido o primeiro patógeno a ser profundamente estudado através de técnicas de biologia molecular, os

aspectos fenotípicos, análises seqüenciais de aminoácidos e estudos imunológicos, dentre outros, ainda são fundamentais para a caracterização de novos FC, bem como a classificação do possível envolvimento de outros aspectos envolvendo virulência, dentro da complexa patogenicidade destes agentes. (Nataro & Kaper, 1998). Pelo exposto, o primeiro passo para a erradicação destes enteropatógenos nas áreas endêmicas é conhece-los, identificando também seus FC.

Neste aspecto, a fimbria PCFO2 foi o primeiro FC identificado em cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) isoladas de quadros de diarreia humana, no nosso meio (Ricci *et al.*, 1997). Em trabalhos subseqüentes, desenvolvidos por Oliveira (1996), 9 hibridomas foram obtidos, capazes de secretarem MAbs anti-PCFO2, pertencentes aos isotipos IgG2b e IgA. Na seqüência dos estudos envolvendo esta fimbria, Delghringaro-Augusto (1998) utilizou estes monoclonais na padronização da Prova de Inibição do ELISA para a identificação de PCFO2, sendo que mais 5 cepas de *E. coli* diarreioxigênicas foram identificadas como positivas.

Dando continuidade a estes estudos, neste trabalho inicialmente reavaliou-se os procedimentos de purificação de PCFO2, objetivando-se aumentar a concentração deste antígeno purificado, para posteriores sensibilizações de placas de ELISA na identificação e determinação da prevalência desta adesina em cepas de *E. coli* enterotoxigênicas isoladas.

Desta forma, ao analisar-se os 3 processos empregados para a purificação de PCFO2 quanto à concentração protéica final obtida, verificou-se que, o que apresentou melhor rendimento foi o representado pela precipitação direta com 60% de sulfato de amônio, seguida de dupla cromatografia em Sepharose CL4B. Em relação aos procedimentos onde foram empregadas precipitações fracionadas com sulfato de amônio, verificou-se que na fração 20% ocorria perda significativa de PCFO2, uma vez que esta, durante o processo de purificação, era desprezada. Por outro lado, ao analisar-se a eficiência da diálise contra DOC, verificou-se perda de PCFO2 na fração DI, também desprezada no decorrer do esquema de purificação padronizado para esta fimbria (Ricci *et al.*, 1997). Neste sentido, tanto a purificação fracionada, quanto a diálise contra DOC, revelaram-se inadequadas em relação à obtenção de melhor rendimento no processo de purificação deste antígeno.

Porém, ao excluir-se a diálise contra DOC, resultados inadequados em provas de Western blotting foram obtidos, verificando-se ser esta etapa fundamental para a purificação de PCFO2, uma vez que através desta diálise, em especial o LPS era eliminado.

A presença deste contaminante nos preparados antigênicos ocasionou erros no desenvolvimento de provas de Western blotting reveladas pelos MAbs, por provocar arrastes das bandas protéicas que ficavam indefinidas, interferindo também, nas provas de ELISA em relação à sensibilização de placas para determinação dos títulos dos líquidos ascíticos e nas Provas de Inibição do ELISA. Devido a isto, no decorrer do trabalho, retornou-se à metodologia anteriormente padronizada para obtenção de PCFO2 puro.

Com relação à análise em SDS-PAGE das proteínas semi-purificadas e purificadas das amostras em estudo, inicialmente procurou-se verificar nas extrações protéicas bandas com P.M. aproximado a 34,5 kDa, que supostamente poderiam corresponder à fimbria PCFO2. Porém, nas provas reveladas pelos MAbs anti-PCFO2 em Western blotting, identificou-se pelas bandas relativas, que apenas as amostras 312-2 e 312-3 expressavam esta fimbria.

Com relação às demais cepas em estudo, embora apresentassem padrão de bandas protéicas com P.M. próximo a 34,5 kDa, estas não foram reativas com os MAbs específicos para PCFO2.

A diferença analisada entre o P.M. das bandas presentes nas demais amostras analisadas e PCFO2 podem auxiliar na identificação presuntiva de amostras positivas, mas dados conclusivos apenas são obtidos pelas reações Ag-Ac. Ainda com relação à eletroforese em SDS-PAGE, realizada com extratos protéicos semi-purificados das amostras em estudo, observou-se bandas de baixo P.M. em todas as extrações.

Nas provas de Western blotting, desenvolvidas para a verificação da reatividade de PCFO2 puro através dos monoclonais dos isotipos IgA e IgG2b e "pool" dos mesmos, observou-se que monoclonais do isotipo IgG2b eram capazes de reconhecer nas soluções purificadas de PCFO2 mais uma banda de aproximadamente 15 kDa, além da banda de 34,5 kDa correspondente a esta fimbria. Em relação aos monoclonais do isotipo IgA, estes reconheceram apenas as bandas de maior P.M. No que diz respeito à banda de 15 kDa, reconhecida pelos monoclonais do isotipo IgG2b, esta pode representar uma subunidade da fimbria PCFO2 ou corresponder a uma segunda adesina, possível de corresponder a um

complexo de FC expressos simultaneamente, à semelhança dos CS descritos para CFA/II e CFA/IV (Fernández & Berenguer, 2000).

A elucidação destas hipóteses referentes à banda de 15 kDa, expressa pelas cepas PCFO2 só será possível em trabalhos posteriores complementares, avaliando-se esta banda isoladamente. Desta forma, torna-se necessário, inicialmente purifica-la preparando-se soros específicos contra a mesma, a serem utilizados em observações de reações em Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Avaliando-se a reatividade dos “pools” dos MAbs anti-PCFO2, em reações frente às demais extrações semi-purificadas das amostras em estudo e das cepas padrão dos FC, resultados semelhantes aos anteriores foram observados, sendo que o “pool” dos MAbs do isotipo IgG2b reconheceu bandas próximas a 34,5 e 15 kDa nas amostras 312-2, 312-3 e 244-1.

Avaliando-se a possibilidade da banda de 15 kDa corresponder a uma nova adesina ou a uma subunidade do peptídeo de 34,5 kDa, em trabalho de Dong *et al.* (1998), os autores estudaram CS3, considerado um dos maiores antígenos fimbriais de cepas ETEC isoladas de fezes humanas. Para analisarem os genes associados com a expressão e montagem de CS3, os autores desenvolveram um mapa de restrição e experimentos de clonagem do “cluster” envolvido na expressão deste FC. Determinaram que para a expressão de CS3, 6 polipeptídios com P.M. de 15, 17, 24, 27, 48 e 90 kDa estavam envolvidos. Dentre estes, os peptídeos de 15 kDa/17 kDa correspondem à CS3, sendo que a subunidade de 17 kDa representa um precursor final de CS3. Os demais peptídeos são necessários para a construção e expressão deste fator.

No caso da verificação da expressão de mais uma subunidade de 15 kDa em cepas PCFO2, como demonstrado no trabalho mencionado, exigem estudos genéticos e imunológicos complementares, a serem realizados em estudos posteriores.

Quando à hipótese desta unidade de 15 kDa corresponder ao “tip” da fimbria, essa possibilidade torna-se improvável com base nos trabalhos desenvolvidos por Sakellaris *et al.* (1999). Estes autores analisaram modificações de aminoácidos no “tip” das subunidades de CS1 e CFA/I, que são representadas por apenas um polipeptídeo, demonstrando que modificações químicas em resíduos de arginina em CS1 alteram e inibem hemaglutinação com eritrócitos bovinos, modelo que serve para o estudo da ligação durante a colonização da

bactéria ao intestino. No mesmo trabalho ficou também demonstrado a existência de regiões apresentando aminoácidos similares no “tip” destes “pili” protéicos.

Com relação às amostras D242 e D243, o “pool” dos MAbs do isotipo IgG2b reconheceu bandas de aproximadamente 37 e 16 kDa. Nos extratos de CFA/II (CS1, CS3) estes monoclonais foram reativos com bandas próximas a 36 e 15 kDa.

Com relação ao “pool” de MAbs do isotipo IgA, nas extrações semi-purificadas das cepas 244-1, 312-2 e 312-3, este reconheceu apenas a banda de 34,5 kDa. Quanto às amostras D242 e D243, estes MAbs reconheceram uma banda de aproximadamente 37 kDa, sendo que na amostra padrão de CFA/II (CS1, CS3), apenas uma banda próxima a 36 kDa foi revelada.

Na análise das amostras D252, D253 e CFA/II (CS2), estas não foram reconhecidas por nenhum dos dois “pools” de MAbs utilizados. Em trabalhos anteriores, realizados por Delghringaro-Augusto (1998), a cepa D252 havia apresentado resultados positivos para PCFO2 na Prova de Inibição do ELISA desenvolvida com monoclonais do isotipo IgA, porém dados negativos quando esta prova era realizada com MAbs do isotipo IgG2b. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho confirmam que a amostra D252 não expressa a fímbria PCFO2.

Avaliando-se o reconhecimento da banda de 16 kDa nas amostras D242 e D243, pelo “pool” dos MAbs IgG2b, bandas com este P.M. estão geralmente relacionadas à adesina não fimbrial CS6 (Wolf *et al.*, 1989) do complexo CFA/IV. Com relação ao reconhecimento da banda de 15 kDa na amostra CFA/II (CS1, CS3), este P.M. é referente a subunidade CS3 deste complexo.

Ao observar-se a reatividade dos MAbs dos dois isotipos frente aos diferentes antígenos, verifica-se que estes reconhecem epítomos distintos, sendo que os MAbs mais específicos para o desenvolvimento de provas de identificação de PCFO2 através da Prova de Inibição do ELISA, é o IgG2b. Isto por estes MAbs serem capazes de reconhecer epítomos expressos não só pela fímbria PCFO2, como também pela adesina CS6, do complexo CFA/IV.

Os MAbs IgG2b, apesar de também reagirem com CS3 em provas de Western blotting, apresentam afinidade mais significativa com epítomos de CS6, sendo que na Prova de Inibição do ELISA, apenas este antígeno é identificado.

Ao analisar-se a reatividade das proteínas semi-purificadas extraídas das amostras em estudo frente ao soro anti-312-2, em provas de Western blotting todas as amostras com exceção da CFA/II (CS2) apresentaram bandas de P.M. próximo a 34,5 kDa, observa-se ainda revelação de fortes bandas de 15 kDa nas amostras 244-1, 312-2 e 312-3. Com relação as amostras D242 e D243, nos extratos destas, foram reveladas bandas de aproximadamente 16 kDa. Estes resultados também foram muito similares aos observados nas reações contra o “pool” de monoclonais IgG2b.

Na realização dos testes de Western blotting para o estudo das possíveis homologias de epítomos entre PCFO2 e demais FC mais freqüentemente identificados em trabalhos epidemiológicos, utilizou-se os soros anti-CFA/I, CFA/II (CS1, CS3), CFA/II (CS2) e CFA/III, contra as proteínas semi-purificadas de PCFO2 e das cepas 312-2, 312-3, D242, D243, D252, D253, CFA/II (CS1, CS3) e CFA/II (CS2), verificando-se nestas reações, apenas reatividade contra os antígenos homólogos.

Ainda com relação à similaridade de epítomos entre PCFO2 e outros FC e na confirmação da expressão do complexo CFA/IV (CS5, CS6) pelas amostras D242 e D243, realizou-se teste de Western blotting utilizando-se proteínas semi-purificadas das amostras D242, 244-1 e da amostra controle de CFA/IV (CS5, CS6) contra o soro anti-CFA/IV (CS5, CS6) sendo que os resultados obtidos demonstraram reatividade deste soro com a amostra D242 revelando bandas de aproximadamente 16 e 21 kDa, de forma muito similar a observada na amostra controle. Porém, não houve reatividade contra a amostra 244-1. Esta mesma prova foi realizada utilizando-se as mesmas amostras, porém, contra o soro anti-D242. Observou-se então, reatividade deste soro com a amostra controle D242 e CFA/IV (CS5, CS6), apresentando em ambas, bandas com P.M. próximos a 16 e 21 kDa. Não foi observada reatividade frente à amostra 244-1.

Após estas provas, realizou-se o teste de Inibição Cruzada do ELISA, sensibilizando-se placas com extratos semi-purificados de todas as amostras em estudo, na confirmação dos resultados obtidos anteriormente nos testes de Western blotting.

Foi observado nestas provas que apenas as amostras 244-1, 312-2, 312-3, D242 e D243, eram capazes de diminuir a D.O.(densidade óptica) da reação em mais de 50%, o que representa resultado positivo para PCFO2. Entretanto, a possível homologia entre PCFO2 e a

subunidade CS3 do complexo CFA/II não foi confirmada nesta prova. Por outro lado, confirmou-se a homologia entre PCFO2 e a adesina CS6 do complexo CFA/IV.

Paralelamente a estas provas, foram realizadas reações de soroaglutinação em lâmina e em tubo com as amostras em estudo, aonde foram confirmados os resultados anteriores.

Ao observar-se a alta afinidade apresentada pelo “pool” de MAbs anti-PCFO2 do isotipo IgG2b com as amostras D242 e D243 e, sendo que estas amostras apresentam a adesina CS6 do complexo CFA/IV, conseqüentemente MAbs anti-PCFO2 possuem afinidade com epítomos de CS6. Porém, soros anti-D242 e anti-CFA/IV (CS5, CS6) não foram reativos contra PCFO2 em Western blotting, o que poderia ser interpretado como devido a uma expressão conformacional do epítomo expresso por esta última fimbria, apenas reativo contra anti-CFA/IV “in natura” .

A caracterização, neste trabalho, da reatividade dos MAbs anti-PCFO2, não só com esta fimbria mas também com a adesina não fimbrial correspondente à CS6, demonstra uma maior relevância da Prova de Inibição do ELISA padronizada e desenvolvida com MAbs do isotipo IgG2b, na identificação de FC em cepas ETEC.

6 - CONCLUSÕES

A) Quanto as alterações da metodologia de purificação de PCFO2:

I – Cultivo das cepas em meio CFA, deve ser de no mínimo 48 horas objetivando-se “assembly” completa da fimbria.

II – Precipitação do sobrenadante contendo proteínas de superfície bacteriana a 60% de sulfato de amônio, resulta no maior rendimento de purificação de PCFO2.

III – Apesar de ocorrer perda da fimbria na fração DI, a etapa da purificação através da diálise contra DOC, não pode ser excluída, uma vez que no precipitado formado, o LPS é eliminado. Caso contrário, este promove arrastes das proteínas e problemas técnicos incontornáveis nas provas de Western blotting e ELISA indireto.

B) Quanto a reatividade dos MAbs dos isotipos IgG2b e IgA, estes reconhecem PCFO2 e reagem com diferentes epítomos tendo-se como base os resultados relatados a seguir:

I – Todos os 5 MAbs do isotipo IgG2b reconhecem em provas de Western blotting desenvolvidas com PCFO2 purificado pela metodologia padronizada, uma segunda subunidade de 15 kDa, o que não ocorre com os 4 MAbs do isotipo IgA. O mesmo foi verificado com o “pool” dos mesmos.

II – MAbs dos isotipos IgA e IgG2b reconhecem epítomos em CS6 nas cepas pertencentes ao complexo CFA/IV, uma vez que identificaram pela Prova de Inibição do ELISA, as cepas D242 e D243 como PCFO2+, posteriormente caracterizadas como CFA/IV (CS5, CS6).

III – Porém, nas reações de Western blotting, apenas os MAbs do isotipo IgG2b revelaram bandas de aproximadamente 16 kDa, correspondentes à fração CS6 do complexo CFA/IV nas cepas D242 e D243. Devido a isso, MAbs IgG2b devem reagir com determinantes lineares de CS6, enquanto MAbs do isotipo IgA, provavelmente reconhecem epítomos conformacionais.

IV – Nas Provas de Inibição do ELISA, MAbs do isotipo IgA reconheceram a cepa D252 (LT-; sorogrupo O2) como PCFO2+, o mesmo não ocorrendo nas reações desenvolvidas com MAbs do isotipo IgG2b (Delghringaro-Augusto, 1998). Estes resultados demonstram menor especificidade dos MAbs IgA na identificação de PCFO2, uma vez que identificou uma cepa que não expressava esta fimbria, apresentando resultados falso-positivos na Prova de Inibição do ELISA.

V – Ainda com relação a reatividade dos MAbs anti-PCFO2, em provas de Western blotting, monoclonais do isotipo IgG2b foram capazes de reagir com uma banda de cerca de 15 kDa correspondente ao “coli surface antigen” CS3 do complexo CFA/II, o mesmo não ocorrendo em relação aos MAbs IgA. As diferenças na revelação das bandas em Western blotting, evidenciam, mais uma vez, que os MAbs dos dois isotipos reagem com epítomos distintos.

C) Com base nos resultados obtidos, apenas as cepas 312-2 e 312-3 expressam PCFO2, representado por duas subunidades de P.M. correspondente a 34,5 e 15 kDa, apenas neste trabalho evidenciado.

D) Quanto as cepas D242 e D243, inicialmente identificadas como PCFO2+, estas, na realidade expressam CS5 e CS6 do complexo CFA/IV. Foram identificadas pela Prova de Inibição do ELISA desenvolvida com MAbs preparados contra a subunidade de 34,5 kDa de PCFO2, devido a homologia de epítomos lineares entre estes FC de cepas ETEC.

E) Nenhuma reação inespecífica foi verificada entre MAbs de ambos os isotipos e antígenos do sorogrupo O2.

F) A banda de 15 kDa identificada em preparados semi-purificados de PCFO2, representa realmente uma nova subunidade desta fimbria, uma vez que em trabalho anterior (Delghringaro-Augusto, 1998), o tratamento da fração fimbrial de 34,5 kDa com Guanidina-HCl, não alterou o perfil eletroforético da mesma e tampouco a reatividade desta banda revelada em Western blotting com “pool”de MAbs de ambos isotipos. Esta segunda

subunidade pode também representar uma segunda adesina expressa ou não simultaneamente com a banda de 34,5 kDa, à semelhança dos CS descritos para os FC CFA/II e CFA/IV.

G) A comprovação, através dos resultados obtidos neste trabalho, de que a Prova de Inibição do ELISA desenvolvida com MAbs do isotipo IgG2b é capaz de identificar não apenas as duas subunidades de PCFO2 em cepas ETEC, como também CS6, FC dentre os mais freqüentemente identificados nas diferentes regiões geográficas, releva ainda mais a utilização desta prova na caracterização destes enteropatógenos.

H) As condições estabelecidas para a realização desta prova podem ser desenvolvidas nos Laboratórios de Análises Clínicas de forma acessível, distribuindo-se a placa de ELISA já sensibilizada com PCFO2 e os demais reativos em forma de “KIT”. Resultados positivos devem ser confirmados através de soroaglutinação em lâmina utilizando-se soros policlonais anti-PCFO2 e anti-CS6 na identificação final do FC expresso pela cepa de *Escherichia coli*.

7- APÊNDICE

7.1- MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

7.1.1- Meio Ágar Simples

Extrato de carne	5,0g
Peptona	10,0g
NaCl	5,0g
Ágar bacteriológico	5,0g
H ₂ O destilada	1000mL
pH final 7,4	

7.1.2- Meio BHI

Meio BHI	3,7g
Água destilada q.s.p.	100mL

7.1.3- Meio de Dorset

Ovo de galinha	4 volumes
NaCl 0,15M	1 volume

Na preparação final do meio, após ter sido distribuído assepticamente em tubos estéreis, esse meio foi autoclavado em autoclave “fria”, por 15 minutos, até a pressão de 2 atmosferas.

7.1.4- Meio LB (Luria Bertani Medium)

Triptona	10g
Extrato de levedura	5g
NaCl	5g
H ₂ O destilada	1000mL
pH final 7,4.	

7.1.5- Meio LA (Luria Bertani Agar)

Ágar bacteriológico-----15g

Meio LB pH 7,4-----1000mL

No caso do meio LA semi-sólido, utilizou-se 0,8% de ágar bacteriológico.

7.1.6- Meio CFA (“Colonization Factor Agar”)

Meio Base

Casaminoácidos-----10g

Extrato de levedura-----1,5g

Água destilada-----1000mL

Solução A

MgSO₄ 7H₂O-----1,0g

Água destilada-----100mL

Solução B

MnCl₂ 4H₂O-----0,78g

Água destilada-----100mL

No caso do meio CFA sólido, adicionou-se ágar bacteriológico na concentração final de 2,0% ao meio final antes deste ser autoclavado. Para cada 100 mL do meio base, adicionou-se 1 mL da solução A e 1 mL da solução B. Ajustar o pH para 7,4 com NaOH 1N. Esterilizar em autoclave durante 20 minutos a 120°C.

7.1.7- Meio MILI (Motilidade - Indol - Lisina)

Extrato de levedura-----3,0g

Peptona-----10,0g

Triptona-----10,0g

L-lisina-----10,0g

Glicose-----1,0g

Ágar-----2,0g

Bromocresol púrpura-----0,02 g

Água destilada q.s.p.-----1000mL

Preparo: Adicionam-se todos os componentes à água destilada e aquece-se a mistura até dissolução completa do ágar. Ajusta-se o pH do meio a 6,5 e procede-se a esterilização em autoclave a 121° C durante 15 minutos. Por fim, distribui-se o meio em volumes de 4,0 mL, em tubos de 10 x 100 mm estéreis, deixando-se solidificar em posição vertical e armazenar a 4° C. O meio pronto apresenta a coloração roxa.

7.1.8- Meio Ágar Citrato de Simmons (DIFCO)

Ágar citrato de Simmons (DIFCO)-----24,2g

Água destilada q.s.p .-----1000mL

Todos os elementos foram dissolvidos em água destilada e distribuídos em alíquotas de 2 mL em tubos de 13X100 mm. O meio foi esterilizado a 121°C por 20 minutos e deixado solidificar em posição inclinada de forma a se obter um induto extenso. (OBS: o meio pronto apresenta-se de cor verde).

7.1.9- Meio EPM

A – Base

Triptona-----10,0g

Extrato de carne-----2,0g

NaCl-----5,0g

Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)-----2,0g

L-triptofano-----1,0g

Solução alcoólica de azul de bromotimol a 1,5%-----2,0mL

Ágar-----11,0g

Água destilada q.s.p.-----1000mL

Todos os componentes foram adicionados à água e a mistura foi aquecida até a dissolução do ágar. O pH do meio foi ajustado para 7,4 com HCl 2%. O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C, durante 20 minutos.

B – Solução de indicadores e substratos

Citrato de ferro amoniacal-----2,0g

Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)-----2,0g

Glicose-----	10,0g
Uréia-----	40,0g
Água destilada-----	85,0mL

A mistura foi aquecida em banho-maria a 65°C, com agitação constante, até completa dissolução.

C – Preparo final do meio

Base (A)-----	800,0mL
Solução (B)-----	14,0mL

Após o resfriamento da base a aproximadamente 65°C, adicionou-se, assepticamente a solução. A mistura foi homogenizada e distribuída em volume de 4,0 mL, em tubos de 12x120 mm estéreis, deixando-se solidificar em posição inclinada de maneira a se obter uma base de pelo menos 3,5 cm. (OBS: O meio pronto apresenta coloração verde).

7.1.10- Meio Ágar MacConkey

Ágar MacConkey (DIFCO)-----	7,5g
Água destilada-----	150mL

A mistura foi elevada ao fogo para homogeneização, em um balão de fundo chato. Em seguida, foi distribuído em placas previamente autoclavadas, segundo as regras de assepsia. Após solidificação, o meio foi conservado sob refrigeração.

7.2.-SOLUÇÕES UTILIZADAS

7.2.1- Salina 3M

Cloreto de sódio-----	175,32g
Água destilada q.s.p-----	1000mL

7.2.2- Salina 0,15M

Salina 3M-----	50mL
Água destilada-----	950 mL

7.2.3- Tampão PBS 0,05M pH 7.4

Salina 3M-----	50mL
----------------	------

Tampão Fosfato 0,5M-----	100mL
Água destilada q.s.p.-----	850mL

7.2.4.- Tampão fosfato de sódio 0,5M pH 7,4

Preparado através do tampão fosfato de sódio bibásico 0,5M com seu pH acertado para 7,4 adicionando-se lentamente tampão fosfato de sódio monobásico 0,5M utilizando-se um potenciômetro.

7.2.5- Tampão fosfato de sódio bibásico 0,5M

Fosfato de sódio bibásico-----	70,98g
Água destilada q.s.p.-----	1000mL

7.2.6- Tampão fosfato de sódio monobásico 0,5M

Fosfato de sódio monobásico-----	69g
Água destilada q.s.p.-----	1000mL

7.2.7- Solução de PBS 0,05M pH 7,4 acrescido de 5% de desoxicolato de sódio

Desoxicolato de sódio puro (DOC)-----	5g
Tampão PBS 0,05M pH 7,4-----	1000mL

7.2.8- Solução de PBS 0,05M pH 7,4 acrescido de 4M de uréia

Uréia-----	240,24g
Tampão PBS 0,05M pH 7,4-----	1000mL

7.2.2- SOLUÇÕES PARA SDS- PAGE

7.2.2.1- Solução de Acrilamida

Acrilamida-----	30,0g
Bis-acrilamida-----	0,8g
H ₂ O bidestilada q.s.p.-----	100mL

Filtrar em papel filtro e armazenar a solução a 4°C em frasco escuro

7.2.2.2- Solução TRIS HCl 1,0 M pH 8,8

Tris-----	30,27g
Água bidestilada q.s.p.-----	250mL

Ajustar o pH para 8,8 com HCl

7.2.2.3- Solução TRIS HCl 1,0 M pH 6,8

Tris-----	30,27g
Água bidestilada q.s.p.-----	250mL

Ajustar o pH para 6,8 com HCl

7.2.2.4- Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 20%

SDS -----	20,0g
Água bidestilada q.s.p -----	100mL

OBS: dissolver em banho a 37°C

7.2.2.5- Solução de persulfato de amônio (10%)

Persulfato de amônio-----	0,1g
Água bidestilada q.s.p.-----	1,0mL

7.2.2.6- Tampão de amostra (3x)

Tris HCl 1,0 M pH 6,8 -----	400µL
SDS 20% -----	500µL
Glicerol a 87%-----	500µL
Azul de bromofenol a 0,02%-----	100µL
2-Mercaptaetanol -----	150µL

Conservar em freezer.

7.2.2.7- Tampão de Corrida para gel de poliacrilamida (10X)

Tris-----	15,2g
Glicina -----	67,66g

SDS -----5,0g
H₂O bidestilada q.s.p.-----500mL
Acertar pH para 8,3 com HCl

7.2.2.8- Solução Fixadora

Metanol-----500mL
Ácido acético glacial -----50mL
Água destilada -----450mL

7.2.2.9- Solução corante

Coomassie blue -----1,25g
Ácido acético -----46mL
Metanol a 5% -----454mL
Deixar de 30 a 60 minutos

7.2.2.10- Solução descorante

Ácido acético glacial -----75mL
Metanol -----50mL
Água destilada q.s.p.-----1000mL

7.2.3- SOLUÇÕES PARA O TESTE DE WESTERN BLOTTING

7.2.3.1- Solução de transferência para Western blotting

Tris-----5,81g
Glicina-----2,92g
SDS-----0,4g
Metanol-----200mL
Água destilada q.s.p.-----1000mL
Acertar o pH para 8,3 com HCl

7.2.3.2- Solução de bloqueio para Western blotting

NaCl-----	0,9g
Tris-----	1,21g
Leite desnatado Molico-----	5,0g
Água destilada q.s.p.-----	100mL

Acertar o pH para 7,5 com HCl

7.2.3.3- Solução para diluição de anticorpos para Western blotting

NaCl-----	0,9g
Tris-----	1,21g
Leite desnatado Molico-----	5,0g
Tween 20-----	0,1mL
Água destilada q.s.p.-----	100mL

Acertar o pH para 7,5 com HCl

7.2.3.4- Solução de lavagem para Western blotting

NaCl-----	0,9g
Tris-----	1,21g
Tween 20-----	0,1mL
Água destilada q.s.p.-----	100mL

Acertar o pH para 7,5 com HCl

7.2.3.5- Solução Ponceau 3R

Ponceau 3R -----	0,2g
Ácido acético glacial -----	1,0mL
Água bidestilada -----	100mL

7.2.3.6- Solução reveladora Sigma Fast™ DAB Tablet Set

3,3' - diaminobenzidine -----	10mg (1tablete)
Urea Hydrogen Peroxide -----	2,8 mg (1tablete)
Água bidestilada q.s.p.-----	15mL

7.2.4- SOLUÇÕES PARA O TESTE DE ELISA

7.2.4.1- Solução de lavagem para ELISA

Tween 20 -----	0,5mL
PBS 0,05 M pH 7,4 -----	1000mL

7.2.4.2- Solução de diluição de anticorpos para ELISA

Leite molico desnatado -----	3,0g
Tween 20 -----	0,1mL
PBS 0,05M pH 7,4 -----	100mL

7.2.4.3- Phosphate-Citrate Buffer Tablets 0,05M, pH 5.0 (Sigma)

Phosphate-Citrate Buffer Tablets -----	1290mg (1tablete)
Água bidestilada -----	100mL

7.2.4.4- Solução de o-Phenylenediamine (OPD) dihydrochloride (Sigma)

orto-Phenylenediamine (OPD) dihydrochloride -----	2mg (2tabletes)
Água bidestilada -----	5mL
H ₂ O ₂ 3% -----	40µL

7.2.4.5- Solução de Bloqueio para ELISA

Leite Molico desnatado -----	5g
PBS 0,05M pH 7,4 -----	100mL

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTMAN, M.; MERCER, A.; KUSECEK, B.; POHL, A.; HEUZENROEDER, M.; AARONSON, W.; SUTTON, A. & SILVER, R.P. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. **Infect. Immun.**, **39**: 315-335, 1983.
- ADACHI, J. Á.; JIANG, Z.; COX, M.; WOOD, L.; DU PONT, H.L.; MATHEWSON, J.J. Serun antibody response induced in mice after oral administration of three different antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* in enteric coated microparticles. **J. Travel Med.**, **7(6)**: 304-8, 2000.
- AHRÉN, C.M.; GOTHEFORS, L.; STOLL, B.J.; SALEK, M.A. & SVENNERHOLM, A.M. Comparison of methods for detection of colonization factor antigens on enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, **23**: 586-591, 1986.
- ALDERETE, J.F. & ROBERTSON, D.C. Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **19**: 1021-1030, 1978.
- ARRIAGA, Y. L.; HARVILLE, B.A. and DREYFUS, L. A. Contribution of individual disulfite bonds to biological action of *Echecrichia coli* heat-stable enterotoxin B. **Infect. Immun.**, **63**: 4715-4720, 1995.
- AUBEL, D.; DARFEUILLE. A.M. & JOLY, B. New adhesive factor (antigen 8786) on a human enterotoxigenic *Escherichia coli* 0117:H4 strain isolated in Africa. **Infect. Immun.**, **59**: 1290-1299, 1991.
- BHAN, M.K.; KHOSHOO, V.; SOMMERFELT, H.; RAJ, P.; SAZAWAL, S. & SRIVASTAVA, R. Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. **J. Infect. Dis.**, **159**: 1061-1064, 1989.

BIEBER, D.; RAMER, S.W.; WU, C.Y.; MURRAY, W.J., TOBE, T.; FERNADEZ, R. & SCHOOLNICK, G. K. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science.**, **280**:2114-2118, 1998.

BILGE, S.S.; CLAUSEN, C.R.; LAU, W. & MOSELEY, S.L. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to Hep-2 cells. **J. Bacteriol.**, **171**: 4281-4289, 1989.

BLACK, R. W. The epidemiology of cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrheal disease. In: Development of vaccine and drugs against diarrhea. 11th Nobel Conference. Holmgren, J.; Lindberg, A. & Mollby, R., p. 23-32, Studentlitteratur, Lund, Sweden, 1986.

BLACK, R.E. Epidemiology of traveller's diarrhea and relative importance of various pathogens. **Rev. Infect. Dis.**, **12**: S73-S79, 1990.

BLANCO, J. & GONZÁLES, E.A. Características de los *Escherichia coli* que causan diarrea en seres humanos. **Enf. Infec. y Microbiol. Clin.**, **3**: 145-150, 1985.

BLANCO, J.; BLANCO, M; GARABAL, J.I. & GONZÁLES, E.A. Enterotoxins, colonization factors and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* from human and animals. **Microbiologia Sem.**, **7**: 57-72, 1991.

BLANCO, J. & BLANCO, M. *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino Patogénesis, epidemiologia y diagnóstico microbiológico. In: Materiales y métodos, Lugo: Servicio de Publicaciones diputacion Provincial San Marcos, pp. 89-90, 1993.

CASSELS, F.J.; DEAL, C.D.; REID, R.H.; JARBOE, D.L.; NAUSS, J.L.; CARTER, J.M. & BOEDEKER, E.C. Analysis of *Escherichia coli* colonization factor antigen I linear B-cell epitopes, as determined by primate responses, following protein sequence verification. **Infect. Immun.**, **60**: 2174-2181, 1992.

CLEMENTS, J.D. & FINKELSTEIN, R.A. Demonstration of shared and unique immunological determinants in enterotoxin from *Vibrio cholerae*. **Infect. Immun.**, **22**: 760-769, 1978a.

CLEMENTS, J.D. & FINKELSTEIN, R.A. Immunological cross reactivity between a heat-labile enterotoxin(s) of *Escherichia coli* and subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. **Infect. Immun.**, **21**: 1036-1039, 1978b.

CLEMENTS, J.D. & FINKELSTEIN, R.A. Isolation and characterization of homogeneous heat-stable enterotoxin with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. **Infect. Immun.**, **24**: 706-709, 1979.

CRAVIOTO, A.; REYS, R.E.; ORTEGA, R.; FERNANDEZ, G.; HERNANDEZ, R. & LÓPEZ, D. Prospective study of diarrhoea disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. **Epidemiol. Infect.** **101**: 123-134, 1988.

DARFEUILLE-MICHAUD, A.; FORESTIER, C.; JOLY, B. & CLUZEL, R. Identification of a nonfimbrial adhesive factor of an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain. **Infect. Immun.**, **52**: 468-475, 1986.

DEAN, A.G.; CHING, Y.C.; WILLIAMS, R.G. & HARDEN, L.B. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. **J. Infect. Dis.** **125**: 407-411, 1972.

DELGHRINGARO-AUGUSTO, V. Estudo da reatividade de anticorpos monoclonais contra a fimbria PCFO2 de *Escherichia coli* enterotoxigênica. Tese de Mestrado defendida pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas na Área de Microbiologia, 1998.

- DICKINSON, B. L., & J. P. CLEMENTS. Dissociation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin adjuvanticity from ADP-ribosyltransferase activity. **Infect. Immun.**, **63**: 1617-1623, 1995.
- DONG, Z.; ZHANG, Z.; LI, S. & HUANG, C. Study on the genetic determinants responsible for expression and assembly of CS3 fimbrial. **Chin. J. Biotechnol.**, **14**: 67-74, 1998.
- DRASAR, B.S. & HILL, M.J. Human intestinal flora. In: The distribution of bacterial flora in the intestine. London, Academic Press. pp. 36-43, 1974.
- ECHVERRIA, P.; SERIWATANA, J.; TAYLOR, D.N.; TYRAPAT, C. & ROWE, B. *Escherichia coli* contains plasmids coding for heat-stable b, other enterotoxins, and antibiotic resistance. **Infect. Immun.**, **48**: 843-6, 1985.
- ELSINGHORST, E.A. & KOPECKO. Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **60**: 2409-2417, 1992.
- ELSINGHORST, E. A. & WEITZ, J.A. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* *tib* locus is associated with a 104-Kilodalton outer membrane protein. **Infect. Immun.**, **62**: 3463-3471, 1994.
- EVANS, D.G.; SILVEIRA, R.P.; EVANS JR., D.J.; CHASE, D.G. & GORBACH, S.L. Plasmid controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for human. **Infect. Immun.**, **12**: 656-657, 1975.
- EVANS, D.G. & EVANS JR., D.J. Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* using passive immune haemolysis. **Infect. Immun.**, **16**: 604-609, 1977.
- EVANS, D.G. & EVANS JR., D.J. New surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA-II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. **Infect. Immun.**, **21**: 638-647, 1978.

FERNANDEZ, L.A & BERENQUER, J. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. **FEMS Microb. Reviews**, 24:21-44, 2000.

FINLAY, B.B. & FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity revised. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 61:136-169, 1997.

FLECKENSTEIN, J.M.; KOPECKO, D.J.; WARREN, R.L. & ELSINGHORST, E.A. Molecular characterization of the *tia* invasion locus from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 62: 2256-2265, 1996.

GAASTRA, W. & GRAAF, F.S. Host-specific fimbriae adhesin of non invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiol. Rev.**, 46: 129-161, 1982.

GARIEPY, J.; LANE, A.; FRAYMAN, F.; WILBUR, D.; ROBIEN, W.; SCHOOLNIK, G.K. & JARDETZKI, O. Structure of the toxin domain of the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST-I. **Biochem.**, 25: 7854-7866, 1986.

GEYID, A; OLSVIK, O; LJUNGH, A. Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from Ethiopian patients with acute or persistent diarrhoea. **Ethiop. Med. J.**, 36(2): 123-39, 1998.

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

GIRÓN, J.A.; LEVINE, M.M. & KAPER, J. Longus: a long pilus ultra structure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, 12:71-82, 1994.

GIRÓN, J.A.; VIBOUD, G.I.; SPERANDIO, V.; GÓMEZ-DUARTE, O.G.; MANEVAL, D.R.; ALBERT, M.J.; LEVINE, M.M. & KAPER, J.B. Prevalence and association of the Longus pilus structural gene (*lngA*) with colonization factor antigens, enterotoxin types, and serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 63: 4195-4198, 1995.

- GIRÓN, J.A.; GÓMEZ-DUARTE, O.G.; JARVIS, K.G. & KAPER, J.B. Longus pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* and its relatedness to other type-4 pili - a minireview. **Gene**, **192**: 39-43, 1997.
- GONZÁLES, E.A. & BLANCO, J. Propiedades de los *Escherichia coli* causantes de diarrea em seres humanos: *Escherichia coli* enterotoxigênicos (ETEC), enteropatogênicos clássicos (EPEC) y enteroinvasores (EIEC). Monografía n. 27 de La Universidad de Santiago de Compostela, 1987.
- GOOSNEY, DL; GRUENHEID, S.; FINLAY, B.B. Gut feelings: enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interations with the host. **Annu Ver Cell Dev Biol.**, **16**: 173-89, 2000. Review.
- GREWAL, H.M.S.; VALVETANE, H.; BHAN, M.K.; van DICK, L.; GAASTRA, W. & SOMMERFELT, H. A new putative fimbrial colonization factor, CS19, of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **65**: 507-513, 1997.
- GYLES, C.L.; PALCHAUDHURI, S. & MAAS, W.A. A conjugative plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. **Science**, **198**: 198-9, 1977.
- HALL, E.R.; WIERZBA, T.F.; AHREN, C; RAO, M.R.; BASSILY, S.; FRANCIS, W.; GIRGIS, F.Y.; SAFWAT, M; LEE, Y.J.; SVENNERHOLM, A. M.; CLEMENS, J.D.; SAVARINO, S.J. Induction of systemic antifimbria and antitoxin antibody responses in Egyptian children and adults by na oral, killed enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine. **Infect. Immun.**, **69(5)**: 2853-7, 2001.
- HELANDER, A.; GREWAL, H.M.S.; GAASTRA, W & SVENNERHOLM, A.M. Detection and characterization of the coli surface antigen 6 of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains by using monoclonal antibodies. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 867-872, 1997.

HEUZENROEDER, M.W.; ELLIOT, T.R.; THOMAS,C.J.; HALTER, R. & MANNING, P.A. A new fimbrial type (PCFO9) on enterotoxigenic *Escherichia coli* O9:H⁻ LT⁺ isolated from a case of infant diarrhea in central Australia. **FEMS Microbiol. Lett.**, **66**: 55-60, 1990.

HIBBERD, M.L.; McCONNELL, M.M.; FIELD, A.M. & ROWE, B. The fimbriae of human enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 334 are related to CS5 fimbriae. **J. Gen. Microbiol.**, **136**: 2449-2456, 1990.

HINSON, G. & WILLIAMS, P.H. Adhesins of pathogenic *Escherichia coli*. In: Genetics of bacterial diversity, Hopwood, D.A. & Charter, K.E. (Ed.), cap. 14, pp. 287-307, Academic Press Limited, London, U.K., 1989.

HONDA, T.; MIWATANI, I & NISHIBUCHI, M. Comparison of preservation methods for enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, **29**: 2326-2328, 1991.

HONDA T; WELTPPASIT, N.; ARITA, M & MIWATANI, T. Production and characterization of monoclonal antibodies to a pilus colonization factor (Colonization factor antigen III) of human enterotoxigenic *Eschechia coli*. **Infect. Immun.**, **57**: 3452-3457, 1989b

JOHNSON, J.R.; ROBERTS, P.L. & STAMM, W.L.P. Fimbriae and other virulence factors in *Escherichia coli* urosepsis: association with patients' characteristics. **J. Infect. Dis.**, **156**: 225-233, 1987.

KAUFFMANN, F. The serology of the *coli* group. **J. Immunol.**, **57**: 71-100, 1947.

KIM, K.S.; ITABASHI, H.; GEMSKI, P.; SADOFF, J.; WARREN, R.L. & CROSS, A.S. The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. **J. Clin. Invest.**, **90**: 897-905, 1992.

KLEMM, P. & MIKKELSEN, L. Prediction of antigenic determinants and secondary structures of the K88 and CFA/I fimbrial proteins from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 38: 41-45, 1982.

KLEMM, P. Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. **Rev. Infect. Dis.**, 7: 321-40, 1985.

KNUTTON, S.; LLOYD, D.R. & McNEISH, A.S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. **Infect. Immun.**, 55: 69-77, 1987

KÖHLER, G. & MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, 256: 495-497, 1975.

KORHONEN, T. K.; ALTONEN, M. V.; PARKKINEN, J.; VAISANEN-RHEN, V.; FINNE, J.; ORSKOV, F.; ORSKOV, I. SVENSON, S. B. & MAKELA, P.H. Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. **Infect. Immun.**, 48: 486-491, 1985.

KROGFELT, K.A. Bacterial adhesion: genetics, biogenesis, and role in pathogenesis of fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. **Rev. Infect. Dis.**, 13: 721-35, 1991.

LANGERMANN, S. *et al.* Prevention of *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systematic vaccination. **Science.**, 276:607-611, 1996.

LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, 155: 377-389, 1987.

LEVINE, M.M. Vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. Vaccines based predominantly or entirely on antibacterial immunity. *In: New generation vaccines.* Woodrow, G.C. & Levine, M.M., p. 649-660, Marcel Dekker, New York, 1990.

LEVINE, M.M.; FERRECCIO, C.; PRADO, V.; CAYAZZO, M.; ABREGO, P.; MARTINEZ, J.; MAGGI, L.; BALDINI, M.M.; MARTIN, W.; MANEVAL, D. & NATARO, J.P. Epidemiologic studies of *Escherichia coli* diarrheal infections in low socio-economic level peri-urban community in Santiago, Chile. *Am. J. Epidemiol.*, **138**: 849-869, 1993

LEVINE, M.M.; GIRÓN, J.A. & NORIEGA, F. Fimbrial vaccines. In: *Fimbriae: Adhesion, Biogenics, Genetics and Vaccines*. Klemm, P. (Ed.), pp. 225-270, CRC Press, Boca Raton, FL, 1995.

LEVINE, M.M.; FERRECCIO, C.; PRADO, V.; CAYAZZO, M.; ABREGO, P.; MARTINEZ, J.; MAGGI, L.; BALDINI, M.M.; LIOR, H. 1996 Classification of *Escherichia coli*, p.31-72. In C. L. Gyles (ed), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Cab International, Wallingford, United Kingdom.

LOPEZ-VIDAL, Y.; KLEMM, P. & SVENNERHOLM, A.M. Monoclonal antibodies against different epitopes on colonization factor antigen I of enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, **26**: 1967-72, 1988.

LORY, S. Secretion of proteins and assembly of bacterial surface organelles: shared pathways of extracellular protein targeting. *Curr. Opin. Microbiol.*, **1**:27-35, 1998.

LOW, D.; BRAATEN, B. & VAN DER WOUDE, M. Fimbriae. In: *Escherichia coli* and *Salmonella* : Cellular and Molecular Biology . NEIDHARTS, F. C. , Ed., ASM Press, Washington, DC., pp:146-157, 1996.

LUNA, M.G.; MARTINS, M.M.; NEWTON, S.M.C.; COSTA, S.O.P.; ALMEIDA, D.F. & FERREIRA, L.C.S. Cloning and expression of colonization factor antigen I (CFA/I) epitopes of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in *Salmonella flagellin*. *Res. Microbiol.*, **148**: 217-228, 1997.

- MATHEWSON, J.J.; JOHNSON, P. C.; DUPONT, H.L. MORGAN, D.R.; THORNTON, S.A.; WOOD, L.V. & ERICSSON, C. D. A newly recognized cause of traveller's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, **151**: 471-475, 1985.
- McCONNELL, J.S.; COHEN, J. Release of endotoxin from *Escherichia coli* by quinolones. **J. Antimicrob Chemother.**, **18**: 765-6, 1986.
- McCONNELL, M.M.; THOMAS, L.V.; WILLSHAW, G.A; SMITH, H.R. & ROWE, B. Genetic control and properties of coli surface antigens IV (PCF8775) of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **56**: 1974-1980, 1988.
- McCONNELL, M.M.; CHART, H.; FIEL, A.M.; HIBBERD, M. & ROWE, B. Characterization of a putative colonization factor (PCFO166) of enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroup O166. **J. Gen. Microbiol.**, **135**: 1135-1144, 1989.
- McCONNELL, M.M. & ROWE, B. Prevalence of the putative colonization factors CFA/III and PCFO159:H4 in enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, **159**: 582-586, 1989.
- McCONNELL, M.M.; HIBAD, M.; FIELD, A.M.; CHART, H. & ROWE, B. Characterization of a new putative colonization factor (CS17) from human enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O114: H21 which produces only heat-labile enterotoxin. **J. Infect. Dis.**, **161**: 347-377, 1990.
- MELLIES, JL; NAVARRO-GARCIA, F; OKEKE, I; FREDERICKSON, J; NATARO, JP; KAPER, JB. espC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. **Infect. Immun.**, **69**(1): 315-324, 2001.
- NATARO, J.P.; KAPER, J.B.; ROBINS-BROWNE, R.; PRADO, V. & LEVINE, M.M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Pediatr. Infect. Dis.**, **6**: 829-831, 1987.

NATARO, V.P. & KAPER, V.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Cl. Microb.*, **11**: 142-201, Review 1998.

OLIVEIRA, E.M. Obtenção e caracterização de anticorpos monoclonais específicos para o fator de colonização PCFO2, produzido por amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1996.

PICHEL, M.; BINSZTEIN, N. & VIBOUD, G. CS22, A novel human enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesin, isolated to CS15., *Infect. Immun.* **68**: 3280-3285, 2000.

PICHEL, M.; BINSZTEIN, N.; GUTKIND, G.; VIBOUD, G; Identification of clusters of strains bearing a new adhesin among genetically diverse enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates of serogroup O20., *J. Clin. Microbiol.* **39**(2): 782-786, 2001.

PRUSS, B.M. & MATSUMURA, P. Cell cycle regulation of flagellar genes. *J. Bacteriol.*, **179**:555602-5604, 1997.

RICCI, L.C. Provável novo fator de colonização, PCFO2, em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas de origem humana. Tese de Livre Docência. Universidade Estadual de Campinas, 1995.

RICCI, L.C.; FARIA, F.P. DE; OLIVEIRA, E.M.G.; PORTO, P.S. & CASTRO, A.F.P. A new fimbrial putative colonization factor (PCFO2) in human enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in Brazil. *Res. Microbiol.*, **148**: 65-69, 1997.

ROBINS-BROWNE, R.M. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Infect. Dis.*, **9**:28-53, 1987.

- RODRIGUES, J.; SCALETSKY, I.C.A.; CAMPOS, L.C.; GOMES, T.A.T.; WHITTAM, T.S. & TRABULSI, L.R. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic sorogroup O55. **Infect. Immun.**, **64**: 2680-2686, 1996.
- RUDIN, A.; McCONNELL, M.M. & SVENNERHOLM, A.-M. Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* colonization factor antigen I (CFA/I) that cross-react immunologically with heterologous CFAs. **Infect. Immun.** **62**:4339-46, 1994.
- SACK, R.B. The epidemiology of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, **137**: 639-640, 1978.
- SAKELLARIS, H.; MUNSON, G.P. & SCOTT J.R. A conserved residue in the tip proteins of CS1 and CFA/I pili of enterotoxigenic *Escherichia coli* that is essential for adherence. **Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)** **96**: 12828-32, 1999.
- SALYERS, A.A. & WHITT, D.D. Virulence factors that promote colonization. In: Bacterial pathogenesis. A molecular approach. ASM Press., Washington, United States, PP. 30-45, 1994.
- SAMI, B KHALIL; FREDERICK, J.; CASSELS; HIND, I.; SHAHEEN; LEWIS, K.; PANNELL, NEMAT; EL-GHORAB; KARIM, KAMAL; MOUSTAFA, MANSOUR; STEPHEN, J.; SAVARINO; and LEONARD F. PERUSKI JR. Characterization of an enterotoxigenic *Escherichia coli* strain from Africa expressing a putative colonization factor. **Infect. Immun**, **8**: 4019-4026, 1999.
- SARFF, L.D.; McCracken, G.H.; SCHIFFER JR., M.S.; GLODE, M.P.; ROBBINS, J.B.; ORSKOV, I. & ORSKOV, F. Epidemiology of *Escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns. **Lancet**, **1**: 1099-1104, 1975.
- SAVARINO, S.J.; McVEIGH, A; WATSON, J.; MOLINA, J.; CRAVIOTO, A.; ESCHEVERRIA, P.; BHAN, M. K.; LEVINE, M. M. and FASANO, A. Enteroaggregative

Escherichia coli heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, **173**: 1019-1022, 1996.

SEARS, C.L.; KAPER, J.B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage intestinal secretion. **Microbiol. Rev.** **60** (1): 167-215, 1996.

SCHAECHTERFER, M.; MEDOFF, G. & EISENSTEIN, B. Mechanisms of microbial disease. 2^a ed., Williams & Wilkins, Baltimore, United States, 973p., 1993.

SCHLAGER, T.A.; WANKE, C.A., GUERRANT, R.L. Net fluid secretion and impaired villous function induced by colonization of the small intestine by nontoxigenic colonizing *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **58**: 1337-1343, 1990.

SMYTH, C.J. Serologically distinct fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6:K15:H16 or H. **FEMS Microbiol. Lett.**, **21**: 51-57, 1984.

SOTO, G.E. & HULTGREN, S. J. Bacterial Adhesins: Common themes and variation in architecture and assembly. **J. Bacteriol.**, **181**:1059-1071, 1999.

SPERANDIO, V.; TORRES, A.G.; GIRON, J.A.; KAPER, J.B. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **J. Bacteriol.**, **183**(17): 5187-97, 2001.

SUSSMAN, M. The virulence of *Escherichia coli*: Reviews and Methods. The Society for General Microbiology, by Academic Press, 1985.

SVENNERHOLM, A.M., HOLMGREN, J. & SACK, D. A Development of oral vaccines against enterotoxigenic of *Escherichia coli* diarrhea. **Vaccine**, **7**: 196-198, 1989.

SVENNERHOLM, A. M.; WENNERAS, C.; HOLMGREN, J.; McCONNELL, M.M. & ROWE, B. Roles of different coli surface antigens of colonization factor antigen II in

colonization by and protective immunogenicity of enterotoxigenic *Escherichia coli* in rabbits. **Infect. Immun.**, **58**: 341-346, 1990.

TENEBER, G.S.; HIR, ST. T.R.; ANGTION, J. and KARLSSON, K.A. Comparison of the glycolipid-binding specificities of cholera toxin and porcine *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin identification of a receptor-active non-ganglioside glycolipid for the heat-labile toxin in infant rabbit small intestine. **Glycoconjugate J.**, **11**: 533-540, 1994.

THOMAS, L.V.; CRAVIOTO, A.; SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. New fimbrial antigenic type (E8775) that may represent a colonization factor in enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans. **Infect. Immun.** **35**: 1119-1124, 1982.

THOMAS, L.V.; MACCONNEL, M.M.; ROWE, B. & FIELD, A.M. The possession of three novel coli surface antigens by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains positive for the putative colonization factor PCF 8775. **J. Gen. Microbiol.**, **131**: 2319-26, 1985.

TRABULSI, L.R.; CAMPOS, L.C.; WHITTAM, T.S.; GOMES, T.A.T.; RODRIGUES, J. & GONÇALVES, A.G. Traditional and non-traditional enteropathogenic *Escherichia coli* serogroup. **Rev. Microbiol., São Paulo**, **27 (Suppl.)**: 1-6, 1996.

UZZAU, S; FASANO, A; Cross-talk between enteric pathogens and the intestine. **Cell Microbiol.**, **2(2)**: 83-89, 2000

VAAN DRAGER, A. B.; VAN DER WIEL, E; HORN, M. L.; LUT HJENS, L. H. and JORGE, H. R. Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is na oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. **J. Biol. Chem.**, **269**: 16409-16415, 1994.

VALVATNE, H.; SOMMERFELT, H.; GAASTRA, W.; BHAN, M.K. & GREWAL, H.M.S. Identification and characterization of CS20, a new putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **64**: 2635-2642, 1996.

VIBOUD, G.I.; BINSZTEN, N. & SVENNERHOLM, A. M. A new fimbrial putative colonization factor, PCFO20, in human enterotoxigenic *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease **J. Infect. Dis.**, **158**: 70-79, 1993.

VIBOUD, G.I.; BINSZTEN, N. & SVENNERHOLM, A. M. Characterization of monoclonal antibodies against Putative Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their use on epidemiological study. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 558-564, 1994.

VIBOUD, G.I., JOUVE, M.J.; BINSZTEIN, N.; VERGARA, M.; QUIROGA, M.; SVENNERHOLM, A.M.; Prospective cohort study of enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in Argentina children. **J. Clin. Microbiol.**, **37(9)**: 2829-2833, 1999.

WANKE, C. & GUERRANT, R. Small-bowel colonization alone is a cause of diarrhea. **Infect. Immun.**, **55**: 1924-1926, 1987.

WILLSHAW, G. A.; SMITH, H.R.; McCONNEL, M.M.; BARCLAY, E.A.; KRNJULAC, J. & ROWE, B. Genetic and molecular studies of plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in several *Escherichia coli* serotypes. **Infect. Immun.**; **37**: 858-868, 1982.

WINZER, K.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and the regulation of virulence gene expresspathogenic bacteria. **J. Med. Microbiol.**, **291(2)**: 131-143,2001.

WOLF, M.K.; TAYLOR, D.N.; BOEDEKER, E.C.; HYAMS, K.C.; MANEVAL, D.R.; LEVINE, M.M., TAMURA, K.; WILSON, R.A. & ECHEVERIA, P. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from U. S. troops deployed to the Middle East. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 851-856, 1993.

WOLF, M. K., Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol.**, **10**: 569-584. Rev., 1997.