

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Imunologia



Viviane Delghingaro Augusto

ESTUDO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA A FÍMBRIA PCFO2 DE *Escherichia coli*
ENTEROTOXIGÊNICA

Este exemplar constitui a cópia final
da tese de
Viviane Delghingaro
Augusto
apresentada ao Departamento de
Microbiologia e Imunologia.

06/02/98
Antônio Carlos Pereira

Tese apresentada ao Departamento de
Microbiologia e Imunologia do Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas na Área de Microbiologia.

1998

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Imunologia

Viviane Delghingaro Augusto

**ESTUDO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS MONOCLONAIS
CONTRA A FÍMBRIA PCFO2 DE *Escherichia coli*
ENTEROTOXIGÊNICA**

Tese apresentada ao Departamento de
Microbiologia e Imunologia do Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas na Área de Microbiologia.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. LUCILA COSTALLAT RICCI
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. WIRLA M. S. CUNHA TAMASHIRO

1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	17211111
	Au45e
V.	E.
TUM	34147
PROCO	395/98
C	D ☒
PRECO	89.11.00
DATA	05/06/98
N.º CPD	

CM-00112888-2

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

Augusto, Viviane Delghingaro

Au45e Estudo da reatividade de anticorpos monoclonais contra a fimbria
PCFO2 de *Escherichia coli* enterotoxigênica / Viviane Delghingaro
Augusto. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
130f.: ilus.

Orientadora: Lucila Costallat Ricci

Co-Orientadora: Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

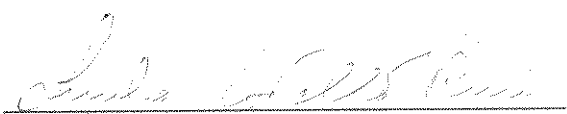
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

1. *Escherichia coli*. 2. Anticorpos monoclonais. 3. Diarréia.
I. Ricci, Lucila Costallat. II. Tamashiro, Wirla Maria da Silva Cunha.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

BANCA EXAMINADORA:

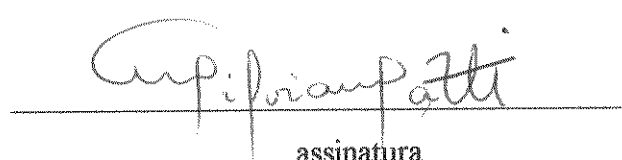
TITULARES:

Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci (orientadora)



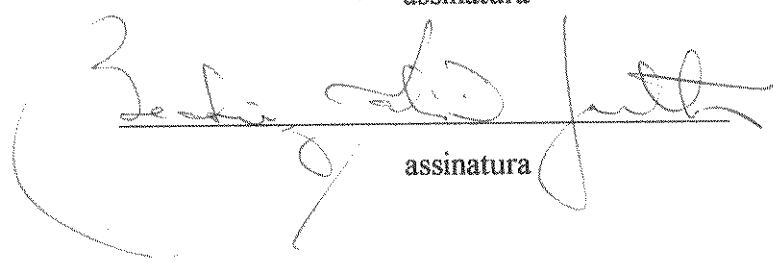
assinatura

Profa. Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti



assinatura

Profa. Dra. Beatriz E. C. Guth



assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Áureo Yamada



assinatura

Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro



assinatura

Este trabalho foi desenvolvido no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas e contou com o auxílio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À minha mãe e minha avó, pelos seus inesquecíveis ensinamentos de amor, luta e coragem. Aos meus irmãos, pela força, união e contínuo incentivo.

Ao Saul, pelo amor, companheirismo, apoio e por tudo que ele representa para mim.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci pela orientação, amizade e pelos ensinamentos que me transmitiu durante todos esses anos de convívio.

À Profa. Dra. Wirla M. S. Cunha Tamashiro pela co-orientação, amizade e importantes sugestões.

À Profa. Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti pela confiança, amizade, importantes sugestões e participação no exame de qualificação, bancas prévia e definitiva.

À Profa. Dra. Maria Terezinha Serrão Peraçoli, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, pela participação e sugestões na banca prévia.

À Profa. Dra. Beatriz E. C. Guth, do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de São Paulo, pelas importantes sugestões e participação na banca definitiva.

Ao Prof. Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro, pela confiança, estímulo, amizade e conselhos na orientação deste trabalho e participação na banca definitiva.

Ao Prof. Dr. Aureo T. Yamada do Centro de Microscopia do IB, UNICAMP pelo apoio na realização das reações de imunomicroscopia, além da participação nas bancas prévia e definitiva.

À Profa. Dra. Maria Sumiko Arita Matsuura, pela amizade, grande auxílio prestado e participação como membro da banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pelo valioso auxílio prestado durante os processos cromatográficos e por toda a atenção no desenvolvimento da parte prática desta Tese.

Ao Prof. Dr. Tonomasa Yano pela amizade, colaboração como membro da banca de qualificação e apoio técnico no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, pelo auxílio durante os processos eletroforéticos.

À Paula, pela amizade, colaboração, paciência e valioso auxílio técnico na execução deste trabalho.

À Juliana, Márcia e Maria Amélia pela amizade, apoio de todas as horas, valioso auxílio na prática laboratorial e excelente convivência.

Ao Evandro, pela amizade e colaboração no preparo dos soros policlonais.

Ao Marcelo pelo teste de “Western blot”, Heloisa e Pan pelo auxílio nas cromatografias e a todos os demais colegas que, de alguma maneira, contribuíram para a realização desta Tese.

Às amigas Adriana e Leila, pelo grande auxílio prestado, apoio e agradável convivência.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas na Área de Microbiologia (UNICAMP), pelo apoio e agradável convivência.

Aos amigos Stella, Mirtis, Airton, Beth e Alessandra pela colaboração e agradável convivência.

Às amigas Antonia e Adriane, do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, por todo o auxílio e atenção dispensados.

À Lourdes pela atenção, ajuda e paciência na solução de problemas burocráticos.

Aos demais funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas, que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), nossos sinceros agradecimentos pela Bolsa de Mestrado concedida (processo: 94/4250-9) e pelo Auxílio à Pesquisa (96/1568-3), fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq e à FAEP (Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa/UNICAMP), nossos agradecimentos pelo apoio na aprovação de projetos relacionados a este trabalho.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Lucila Costallat Ricci pela orientação, amizade, orientação e ensinamentos que me transmitiu durante todos esses anos de convívio.

À Profa. Dra. Wirla M. S. Cunha Tamashiro pela co-orientação, amizade e importantes sugestões.

À Prof. Dra. Maria Sílvia Viccari Gatti pela amizade, importantes sugestões, participação no exame de qualificação, banca prévia e definitiva.

À Profa. Dra. Beatriz E. C. Guth pelas importantes sugestões e participação na banca prévia e definitiva.

Ao Prof. Dr. Áureo Yamada do Centro de Microscopia do IB, UNICAMP por todo apoio dado nos testes de microscopia eletrônica, além da participação na banca prévia.

À Profa. Dra. Maria S. Arita Matsuura, pela amizade, pelo grande auxílio prestado e participação como membro da banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, pela amizade, valioso auxílio prestado durante os processos cromatográficos e por toda a atenção que me dispensou nas fases de elaboração desta tese.

Ao Prof. Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro, pela confiança, estímulo, amizade e conselhos na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Tonomasa Yano pela amizade, colaboração como membro da banca de qualificação e apoio técnico durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira pela amizade e auxílio durante os processos eletroforéticos.

À Paula, pela amizade, colaboração, paciência e valioso auxílio técnico na execução deste trabalho.

À Juliana, Márcia e Maria Amélia pela amizade, apoio de todas as horas, valioso auxílio na prática laboratorial e excelente convivência.

Ao Evandro, pela amizade e colaboração no preparo dos soros policlonais.

Ao Marcelo pelo teste de Western Blot, Heloísa e Pan pelo auxílio nas cromatografias, a todos os demais colegas que de alguma maneira, contribuíram para a realização desta tese.

Às amigas Adriana e Leila, pelo grande auxílio prestado, apoio e agradável convivência.

Aos colegas do Curso de Pós Graduação em Microbiologia (UNICAMP) pelo apoio e agradável convivência.

Aos funcionários Stella, Mirtis, Airton, Beth e Alessandra pela amizade, colaboração sempre que possível e agradável convivência.

Às funcionárias Antonia e Adriane do Departamento de Microscopia Eletrônica pela amizade, por todo o auxílio e atenção prestado.

À Lourdes pela atenção, ajuda e paciência na solução de problemas burocráticos.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Estadual de Campinas que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), nossos agradecimentos pela Bolsa de Mestrado concedida (processo: 94/4250-9) e apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

ABREVIATURAS

Sigla	Descrição
MAbs	Anticorpos monoclonais
BSA	Soroalbumina bovina
CS	“Coli surface antigen”
DAB	Diaminobenzidina
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EAggEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> que adere difusamente
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
FC	Fator de colonização
DI	DOC-Insolúvel
DOC	Desoxicolato de Sódio
DS	DOC-Solúvel
ELISA	“Enzyme linked immunoasorbent assay”
M.E.T	Microscópio eletrônico de transmissão
HMR	Hemaglutinação D-manose resistente
PCF	Possível fator de colonização
PTA	Ácido fosfotúngstico
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
ST	Toxina termo-estável de <i>Escherichia coli</i>
TC	Toxina colérica
LT	Toxina termo-lábil de <i>Escherichia coli</i>

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2. VIROTIPOS OU GRUPOS DIARREIOGÊNICOS DE CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATOGÊNICAS PARA O HOMEM	4
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica clássica (EPEC)	4
1.2.2. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	7
1.2.3. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	9
1.2.4. <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAggEC)	10
1.2.5. <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica com aderência difusa (DAEC)	13
1.2.6. <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	14
1.2.6.1. Enterotoxinas	15
1.2.6.2. Fatores de Colonização	17
1.2.6.3. Utilização de anticorpos monoclonais na caracterização e provas de identificação de FC em amostras ETEC	22
2. OBJETIVOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. AMOSTRAS UTILIZADAS	28
3.1.1. Cepas padrão de FC	28
3.1.2. Amostras controle	28
3.1.3. Amostras teste	30
3.1.3.1. Provas para detecção de enterotoxinas	30
3.1.3.1.1. Prova do camundongo recém-nascido	30
3.1.3.1.2. Prova do GMI-ELISA para a detecção da enterotoxina LT-I	31
3.1.3.3. Detecção da enterotoxina LT-I em cultura de células Vero	31
3.2. PURIFICAÇÃO DOS FC	32
3.2.1. Cultivo bacteriano	32
3.3. SDS-PAGE	34
3.3.1. Preparo dos géis	34
3.4. PREPARO DE SOROS POLICLONAIS CONTRA OS DIFERENTES FC	35
3.5. OBTENÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PCFO2	36
3.5.1. Expansão dos hibridomas	36
3.5.2. Congelamento dos hibridomas	36
3.5.3. Purificação e concentração dos monoclonais a partir dos ascites	37
3.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA	37
3.7. ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	38
3.8. PROVA DE INIBIÇÃO DO ELISA	39

3.9. TRATAMENTO DA FÍMBRIA PCFO2 EXTRAÍDA DA AMOSTRA 244-1 COM 6M DE GUANIDINA-HCL	40
3.10. "WESTERN BLOT"	40
3.11- IMUNOMICROSCOPIA ELETRÔNICA	42
3.11.1- Preparo das telas	42
3.12. MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	44
3.13. SOLUÇÕES UTILIZADAS	48
4. RESULTADOS	54
4.1. PURIFICAÇÃO DOS FC	54
4.1.1. Avaliação em SDS-PAGE	54
4.1.2. "Western blot"	60
4.1.2.1. Reatividade dos soros policlonais frente aos antígenos homólogos	60
4.1.2.2. Reatividade dos soros anti-FC frente à fimbria PCFO2 purificada	61
4.2. DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DOS DIFERENTES SOROS POLICLONAIS ANTI-FC E DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PCFO2	62
4.2.1. Titulação por soroaglutinação	62
4.2.2. Titulação por ELISA indireto	63
4.2.2.1. Soros policlonais	63
4.2.2.2. Anticorpos monoclonais	65
4.3. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS EM ELISA INDIRETO	65
4.4. AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS EM "WESTERN BLOT"	68
4.4.1. Frente à fimbria PCFO2	68
4.4.2. Frente aos diferentes FC	69
4.5. REATIVIDADE DOS MABS FRENTE A PCFO2 TRATADA COM GUANIDINA HCL	70
4.6. IMUNOMICROSCOPIA ELETRÔNICA	72
4.7. PADRONIZAÇÃO DA PROVA DE INIBIÇÃO DO ELISA	75
4.7.1. Avaliação fenotípica de cepas de Escherichia coli	75
4.7.2. Realização das provas	77
5. DISCUSSÃO	90
6. CONCLUSÕES	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

TABELA I- CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DE AMOSTRAS PADRÃO DE FATORES DE COLONIZAÇÃO DESCRITOS EM CEPAS ETEC ISOLADAS DE QUADROS DE DIARRÉIA HUMANO.....	29
TABELA II- PREPARO DOS GÊIS DE POLIACRILAMIDA.....	35
TABELA III- TÍTULO DOS SOROS POLICLONAIS DETERMINADO POR SOROAGLUTINAÇÃO EM LÂMINA	62
TABELA IV- DETERMINAÇÃO EM ELISA INDIRETO DOS TÍTULOS DOS SOROS POLICLONAIS ANTI-FC, FRENTE AOS ANTÍGENOS HOMÓLOGOS..	63
TABELA V- DETERMINAÇÃO EM ELISA INDIRETO DO TÍTULO DOS SOROS POLICLONAIS ANTI-FC, EM PLACAS SENSIBILIZADAS COM A FÍMBRIA PCFO2....	64
TABELA VI - DOSAGEM PROTÉICA E DETERMINAÇÃO DOS TÍTULO DAS SOLUÇÕES DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS; ANTES E APÓS PURIFICAÇÃO EM SEPHAROSE-PROTEÍNA A.	66
TABELA VII- AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DO “POOL” DE MABS DO ISOTIPO IgA, EM PROVAS DE ELISA INDIRETO, FRENTE A PCFO2 E DEMAIS FC	67
TABELA VIII- AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DO “POOL” DE MABS DO ISOTIPO IgG2B, EM PROVAS DE ELISA INDIRETO, FRENTE A PCFO2 E DEMAIS FC.....	67
TABELA IX- CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS CEPAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ISOLADAS DE FEZES HUMANAS, AVALIADAS NA PROVA DE INIBIÇÃO DO ELISA.....	76
FIGURA 1- SDS-PAGE A 15% DAS FRAÇÕES DS E DI DOS EXTRATOS SEMI-PURIFICADOS DOS DIFERENTES FATORES DE COLONIZAÇÃO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOXIGÊNICA.	56
FIGURA 2- CROMATOGRAFIA EM SEPHAROSE 4B DA FRAÇÃO DS DA FÍMBRIA PCFO2 EXTRAÍDA A PARTIR DA AMOSTRA 244-1 DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	57
FIGURA 3- RE-CROMATOGRAFIA EM SEPHAROSE 4B DA FRAÇÃO DS DA FÍMBRIA PCFO2 EXTRAÍDA A PARTIR DA AMOSTRA 244-1 DE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	58
FIGURA 4 - AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO DE PCFO2 EM SDS-PAGE A 15%, APÓS CROMATOGRAFIAS EM SEPHAROSE 4B.	59
FIGURA 5- ANÁLISE DA REATIVIDADE DOS DIFERENTES SOROS POLICLONAIS FRENTE AOS FC HOMÓLOGOS.....	60
FIGURA 6- REAÇÕES DA FÍMBRIA PCFO2 COM SOROS POLICLONAIS PRODUZIDOS CONTRA DIFERENTES FC.	61
FIGURA 7- REAÇÕES DE “WESTERN BLOT” ENTRE A FÍMBRIA PCFO2 PURIFICADA A PARTIR DA AMOSTRA 244-1 E MABS.....	68
FIGURA 8- VERIFICAÇÃO EM PROVAS DE “WESTERN BLOT” DA REATIVIDADE DE “POOLS” DOS ISOTIPOS IgA FRENTE À DIFERENTES FC SEMI-PURIFICADOS.	69
FIGURA 9 - ANÁLISE EM SDS-PAGE A 15%, DOS POLIPEPTÍDEOS OBTIDOS APÓS TRATAMENTO DA FÍMBRIA PCFO2 COM GUANIDINA-HCL.	70
FIGURA 10 - REAÇÕES DE “WESTERN BLOT” COM MATERIAL OBTIDO APÓS TRATAMENTO DE SOLUÇÕES DE PCFO2 PURIFICADA COM GUANIDINA-HCL.....	71
FIGURA 11 - IMUNOMICROSCOPIA ELETRÔNICA REVELADA COM O ANTICORPO MONOCLONAL 1D1C5, DO ISOTIPO IgA.....	73

FIGURA 12 - IMUNOMICROSCOPIA ELETRÔNICA REVELADA COM O ANTICORPO MONOCLONAL 2C4F12, DO ISOTIPO IgG2B. 74

FIGURA 13 - DADOS PERCENTUAIS DAS AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE FEZES HUMANAS..... 75

FIGURA 14 - PROVAS DE INIBIÇÃO DO ELISA REALIZADAS COM AMOSTRAS PADRÃO DE DIFERENTES FC E REVELADAS COM “POOL” DE MABS DO ISOTIPO IgA, EM DIFERENTES DILUIÇÕES 78

FIGURA 15 - PROVAS DE INIBIÇÃO DO ELISA REALIZADAS COM AMOSTRAS PADRÃO DE DIFERENTES FC E REVELADAS COM “POOL” DE MABS DO ISOTIPO IgG2B, EM DIFERENTES DILUIÇÕES..... 79

FIGURA 16 A,B,C - PROVAS DE INIBIÇÃO DO ELISA, REALIZADAS COM MABS 1D1C5 DO ISOTIPO IgA 80, 81, 82

FIGURA 17 A, B, C - PROVAS DE INIBIÇÃO DO ELISA REVELADAS COM MABS 2C4F12 DO ISOTIPO IgG2B... 83, 84, 85

FIGURA 18 A, B - PROVAS DE INIBIÇÃO DO ELISA REVELADAS COM SORO POLICLONAL ANTI-PCFO2 OBTIDO A PARTIR DA AMOSTRA 275-1 86, 87

FIGURA 19 A, B - PROVAS DE INIBIÇÃO DO ELISA REVELADAS COM O SORO POLICLONAL ANTI-PCFO2 OBTIDO A PARTIR DA AMOSTRA, 244-1 88, 89

RESUMO

Neste trabalho, foram criteriosamente avaliados nove anticorpos monoclonais (MAbs) reativos para PCFO2, quanto ao reconhecimento de epítomos na fimbria purificada a partir de duas amostras diferentes, produtoras da mesma e também frente a outros fatores de colonização (FC) purificados, expressos por amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) associada à diarreia humana. Em provas preliminares de “Western blot”, este fator apresentou reações positivas não apenas frente aos soros policlonais anti-PCFO2 como com anti-CFA/I, anti-CFA/II (CS1, CS3), anti-CFA/II (CS2, CS3), anti-CFA/III, anti-CFA/IV (CS4, CS6) e anti-PCFO159. Provas de ELISA indireto, desenvolvidas tanto com os 4 MAbs pertencentes ao isotipo IgA, como com os 5 do isotipo IgG2b, confirmaram estes resultados, apenas frente aos FC do complexo CFA/II. Porém, em revelações no “Western blot” apenas bandas com pesos moleculares (P.M.) correspondentes à CS1, CS2, CS3, CFA/III, CS4 e CS6 foram reveladas, demonstrando apresentarem estes antígenos homologia de epítomos com PCFO2. Estes resultados foram confirmados, também de forma direta, em reações de imunomicroscopia eletrônica reveladas com os MAbs 1D1C5, do isotipo IgA e 2C4F12, do isotipo IgG2b. Pesquisando-se diferenças de reconhecimento de epítomos entre os MAbs, buscou-se obter subunidades protéicas da fimbria PCFO2 após tratamento com 6M de Guanidina HCl-0,05M Tris. As frações obtidas após ultrafiltrações deste material, em membranas XM50 e YM10, foram analisadas em SDS-PAGE e em provas de “Western blot”. Pelos resultados obtidos, verificou-se a presença de uma única banda reconhecida pelos MAbs apresentando P.M. correspondente à PCFO2. Estes dados comprovam ser esta fimbria constituída por uma única subunidade protéica de 34,5 kDa. Após a avaliação da afinidade e especificidade das soluções preparadas com os 9 anticorpos monoclonais em “Western blot”, estes foram titulados por ELISA indireto, determinando-se que as preparações dos MAbs 1D1C5 e 2C4F12 apresentavam maior título. Desta forma, estes foram selecionados para a padronização da Prova de Inibição do ELISA, avaliando-se, paralelamente, também os “pools” preparados com a mistura dos líquidos ascíticos dos dois diferentes isotipos. Assim sendo, a concentração do antígeno e dos MAbs foi padronizada, de tal forma que amostras expressando PCFO2 reduzissem a D.O. da reação controle para valores superiores a 50%. Na adequação da técnica, 66 cepas de *E. coli*, sendo 51 amostras ETEC e 16 não ETEC, foram avaliadas. Destas, 4 cepas isoladas de dois casos de diarreia no nosso meio, foram identificadas como produtoras de PCFO2.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

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

Apesar de ser a espécie predominante entre as bactérias gram-negativas anaeróbicas facultativas presentes na flora normal do intestino, algumas cepas de *E. coli* podem apresentar mecanismos e fatores de virulência diversos tornando-se, muitas vezes, patogênicas ao hospedeiro, causando no homem, principalmente, infecções intestinais representadas por quadros de diarreia aguda e/ou disenteria (Sack, 1978; Blanco & Gonzáles, 1985; Gonzáles & Blanco, 1987; Levine, 1987; Robins-Browne, 1987; Blanco & Blanco, 1993).

Em animais, amostras de *E. coli* são também importantes agentes diarreiogênicos, sendo que nestes casos convencionou-se denominar as infecções como colibaciloses, termo usualmente não empregado para os quadros humanos. Desta forma, a colibacilose suína e bovina (Wilson, 1984; Nielsen, 1984; Yano *et al.*, 1986; Burnensa *et al.*, 1995), causam grandes perdas econômicas, bem como infecções septicêmicas associadas, em aves, a quadros respiratórios levando à Síndrome da Cabeça Inchada (Levine, 1984; Parreira, 1994).

Com relação às infecções extra-intestinais no homem, cepas de *E. coli*, apresentando diversos mecanismos e fatores de virulência, também estão associadas à várias doenças, tais como pielonefrite (Johnson *et al.*, 1987) e meningite do recém-nascido. Esta última associada geralmente à cepas apresentando o antígeno colomínico K1 (ácido poli-acetil neuramínico), que apresenta epítomos comuns aos concentrados na cápsula da *Neisseria meningitidis*, grupo B (Sussman, 1985).

Neste sentido, pela enorme versatilidade de suas cepas, em termos de aquisição de genes e expressão de diferentes mecanismos e fatores de virulência a *E. coli* é, dentre o grupo das bactérias gram-negativas, o mais significativo exemplo de “uma bactéria relacionada a várias doenças”.

Inicialmente, Kauffmann (1947) objetivando identificar as diferentes cepas patogênicas isoladas 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 e H representando, respectivamente, o lipopolissacarídeo (LPS) termo-estável da membrana externa da parede bacteriana de bactérias gram negativas e a proteína do flagelo (destruída a 100°C por 30 minutos). A estes, somam-se os antígenos capsulares, genericamente denominados de K, encontrados nos tipos A, B e L, por representarem variedades de termo-resistência.

Na sorogrupagem determina-se o antígeno O, sendo que nos procedimentos desta identificação deve-se eliminar o antígeno K, por tratamento a 121°C durante 1 hora (Gaastra & Graaf, 1982). Porém, quando possível, a sorogrupagem pode também incluir o antígeno K. Por outro lado, na determinação do sorotipo, obrigatoriamente, o antígeno H deve ser pesquisado caracterizando-se, portanto, a amostra em O:H ou O:K:H (Blanco & Blanco, 1993).

A identificação sorológica tem permitido estabelecer-se a correlação de cepas distintas de *E. coli* com algumas das doenças causadas por esta bactéria, como por exemplo septicemias e meningite do recém-nascido, onde a maioria das cepas envolvidas, são pertencentes ao sorogrupo O18:K1 (Achtman *et al.*, 1983; Kim *et al.*, 1992; Korhonen *et al.*, 1985; Sarff *et al.*, 1975).

Porém, nos quadros diarreio gênicos, doenças a que estão mais frequentemente associadas, a sorogupagem pode auxiliar, mas não fecha a identificação da cepa como patogênica, tendo-se que pesquisar nas mesmas a expressão de diferentes fatores e mecanismos de virulência (Levine *et al.*, 1993; Blanco & Blanco, 1993).

Traçando-se um paralelo entre o estudo da enteropatogenicidade de *E. coli* no homem e em animais, amostras isoladas de enteropatias humanas têm sido melhor estudadas e mais didaticamente caracterizadas. Atualmente, as linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas para o homem podem ser, tendo-se como base seus mecanismos de virulência, didaticamente classificadas em pelo menos sete grupos de patogenicidade ou

virotipos (Trabulsi *et al.*, 1996), a saber: *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, 1994b), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC) (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 diversos grupos 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).

Os mecanismos de patogenicidade podem ser interpretados como as estratégias dos microrganismos para infectarem o hospedeiro e, dependendo da relação entre este e o parasita, causarem doença ou apenas quadros sub-clínicos (Schaechterfer *et al.*, 1993). Os fatores de virulência correspondem aos produtos e às estruturas dos microrganismos, capazes de contribuir para os mecanismos de virulência do patógeno.

A caracterização dos fatores de virulência dos agentes infecciosos tem demonstrado uma grande pluridade de aspectos que variam desde a comprovação da capacidade de adesão e colonização às superfícies mucosas, até a produção de proteínas que apresentem conexões claras e diretas com o processo infeccioso e com as lesões do hospedeiro, incluindo exacerbação e alteração da resposta imune do mesmo (Salyers & Whitt, 1994b; Schaechterfer *et al.*, 1993).

No caso da *E. coli* enteropatogênica para o homem, o estudo aprofundado das cepas isoladas tem demonstrado a existência de uma gama muito variada de mecanismos e fatores de virulência envolvidos. Esta complexidade, de maneira didática, é atualmente separada na definição dos virotipos. Contudo, isto não significa uma divisão precisa e definitiva destes grupos, uma vez que novos fatores de virulência têm sido descritos nas cepas isoladas, tais como os Fatores Necrotizantes Citotóxicos (CNF1 e CNF2) (Blanco *et al.*, 1990, 1992), Toxina Citoletal Distensora (CLDT) (Johnson & Lior, 1988) e diferentes Verotoxinas (VT) (O'Brien & Holmes, 1987; Blanco & Blanco, 1993).

Apesar destes novos fatores terem sido descritos em amostras de *E. coli* isoladas de fezes diarréicas no homem, ainda não estão incluídos em nenhuma das atuais

definições de virotipos. Por outro lado, mecanismos e fatores de virulência associados a virotipos distintos já foram identificados em uma mesma cepa, tais como produção de enterotoxinas e invasão celular (Elsinghorst & Kopecko, 1992; Elsinghorst & Weitz, 1994; Fleckenstein *et al.*, 1996).

Portanto, vários trabalhos têm demonstrado que, nas amostras de *E. coli* enteropatogênicas, estas características de virulência não são constantes, mas sim, variam dentre as cepas. A pesquisa de um número maior de fatores de virulência, por diferentes abordagens, modelos de estudo e condições de cultivo, podem revelar fatores e mecanismos diversos, misturando as características do que atualmente é definido nos virotipos das cepas enteropatogênicas causadoras dos quadros entéricos no homem (Scaletsky *et al.*, 1996; Fleckenstein *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 1996).

Esta enorme variabilidade de fatores demonstram que, em co-evolução com o hospedeiro, cepas de *E. coli* são selecionadas revelando a grande complexidade do assunto, dificultando a identificação das cepas patogênicas e aumentando a relevância da padronização de provas factíveis e rápidas na identificação dos principais fatores relacionados aos virotipos, cujas principais características são apresentadas a seguir.

1.2. Virotipos ou grupos diarreio gênicos de cepas de *Escherichia coli* patogênicas para o homem

1.2.1. *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC)

A *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) constitui um dos virotipos mais importantes para o homem, representando isolados de enteropatógenos mais frequentemente associados à diarreia aguda de crianças com menos de um ano de idade, tanto em países subdesenvolvidos como em países desenvolvidos (Sack, 1975; Trabulsi, 1981).

No que diz respeito ao quadro clínico da infecção causada por este grupo, ocorre uma diarreia aguda, aquosa, com vômitos e febre. As amostras EPEC são, atualmente, conhecidas como capazes de colonizar o intestino delgado de crianças, aderindo-se firmemente às células da mucosa intestinal, provocando destruição das microvilosidades, sem produzirem toxinas detectáveis pelos métodos convencionais, mas capazes de alterar

morfo-fisiologicamente as células do hospedeiro (Knutton *et al.*, 1987; Levine, 1987; Kaper & Jarvis, 1996).

Objetivando melhor identificação destas amostras, que apenas eram identificadas pelo sorogrupo, Baldini *et al.* (1983) pesquisaram e caracterizaram a existência de um mecanismo de adesão destas cepas à culturas celulares. Porém, foi através dos trabalhos desenvolvidos por Scaletsky *et al.* (1984), que os primeiros resultados objetivos, demonstrando variações nas mesmas, quanto ao padrão adesivo, foram obtidos pela primeira vez. Desta forma, dois padrões de aderência foram definidos e relacionados com amostras dos diferentes sorogrupos e sorotipos de EPEC, caracterizando-se um padrão de aderência localizada (LA) e outro de aderência difusa (DA).

Observações de preparados para Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.) de culturas celulares HEp-2 e culturas de mucosa intestinal humana infectadas com estas cepas, revelaram nas células hospedeiras que apresentavam bactérias aderidas, alterações intracelulares semelhantes a pedestais, lesão que foi denominada de “attaching-effacing” (A/E) (Knutton *et al.*, 1987, 1989).

Quanto à adesão do tipo LA, esta é mediada por genes localizados em um plasmídio de aproximadamente 60 MDa, sendo estes os responsáveis pela expressão do fator de adesão de EPEC (EAF) (Baldini *et al.*, 1983). Em estudos realizados por Jerse *et al.* (1990) e Jerse & Kaper (1991), os genes associados à adesão localizada foram identificados, clonados e denominados de *eae*. Posteriormente, verificou-se que outros genes estariam envolvidos e, dentre estes, o gene *eaeA* localizado no cromossomo bacteriano, demonstrando-se ser o mesmo responsável pela codificação de uma proteína de 94 kDa (Levine *et al.*, 1985), denominada de “intimina”.

Atualmente, após inúmeros trabalhos desenvolvidos foi caracterizado que o processo de interação entre cepas EPEC e células hospedeiras, corresponde a três estágios principais:

Um primeiro estágio compreende a adesão, não íntima, entre a bactéria e a célula hospedeira. Esta adesão é proporcionada por uma fimbria do tipo IV, denominada “bundle forming pilus” (BFP) (Girón *et al.*, 1993). Esta fimbria permite que as amostras EPEC formem microcolônias na superfície da célula hospedeira, representada pelo padrão de adesão de aderência localizada (LA). Os genes responsáveis pela produção do BFP estão associados a um plasmídio de 60 MDa, denominado de EAF (EPEC Adherence Factor)

(Nataro *et al.*, 1985; Scaletsky *et al.*, 1988) sendo que a identificação do mesmo, tem sido realizada através de provas de hibridização molecular, na caracterização de amostras EPEC (Stuart *et al.*, 1995).

O segundo estágio, refere-se aos processos de sinalização de eventos na célula hospedeira induzidos pela bactéria EPEC aderida. Estes sinais compreendem a um aumento do nível de íons Ca^{++} (Baldwin *et al.*, 1991), aumento do fluxo de inositol fosfato, fosforilação de proteínas celulares, sendo a mais relevante, uma proteína de 90 kDa denominada de Hp90, envolvida na iniciação do processo de modificação do citoesqueleto da célula hospedeira e internalização da bactéria (Rosenshine *et al.*, 1992).

O último e terceiro estágio, envolve a atividade do gene cromossômica *eaeA* (Jerse *et al.*, 1990). Este gene codifica a proteína de membrana intimina, de 94 kDa. Esta proteína é responsável pelo íntimo contato entre a bactéria e a célula epitelial, induzindo no local da adesão um acúmulo de filamentos de actina e de outras proteínas do citoesqueleto tais como miosina, talina e ezdrina (Finlay *et al.*, 1992). Estas modificações permitem a formação de pedestais, onde as fibras alongadas são representadas por projeções semelhantes aos pseudópodes (Donnenberg *et al.*, 1997). O rearranjo da actina está, também, envolvido na internalização de sub-populações de EPEC por células epiteliais (Donnenberg *et al.*, 1990).

Portanto, após a aderência à superfície das células epiteliais, a EPEC promoveria a adesão "Attaching effacing" (A/E), envolvendo degeneração das microvilosidades do "brush border" e polimerização das estruturas altamente organizadas do citoesqueleto da célula hospedeira, no local da adesão bacteriana. Nesta fase, a EPEC torna-se positiva para o teste de "fluorescent actin staining" ou teste de FAS, capaz de detectar a actina polimerizada (Knutton *et al.*, 1991).

Atualmente, uma vez que a patogenicidade das linhagens de *E. coli* deste grupo é melhor conhecida, o virotipo EPEC pode ser subdividido em duas sub-classes (Trabulsi *et al.*, 1996). As da classe I, ou clássica, exibem obrigatoriamente o fenótipo de aderência localizada às células HeLa ou HEP-2, possuem o gene *eaeA* do plasmídio EAF e o gene *bfp* enquanto que as da classe II apresentam aderência difusa ou uma adesão denominada de LAL (Localized Adherence-Like) (Rodrigues *et al.*, 1996) por exigir maior tempo de infecção além do gene *eaeA*.

Um outro padrão de adesão, também foi descrito em amostras de sorogrupos típicos de EPEC e é caracterizado por apresentar, simultaneamente, adesão do tipo localizada e difusa. Este padrão, denominado de LA/DA, apresenta amostras que reagiram positivamente em provas moleculares de detecção de EAF, A/E e DA (Scaletsky *et al.*, 1996).

Em estágios avançados da infecção, o processo diarreico pode ser mais evidente, devido à perda das junções interdigitais entre os enterócitos, morte destas células e danos na mucosa. Desta forma, a infecção por cepas EPEC pode apresentar diferentes aspectos na dependência da interação da bactéria com o hospedeiro e do estágio da doença.

A caracterização de diferentes fatores de virulência em cepas EPEC tem permitido o desenvolvimento e aperfeiçoamento de novos métodos de identificação das amostras pertencentes a este virotipo, tais como sondas de DNA e utilização da técnica do PCR, capazes de permitirem que um grande número de cepas sejam pesquisadas (Kaper & Jarvis, 1996).

Embora tenha sido demonstrada a presença intracelular de algumas cepas de sorotipos clássicos de EPEC à linhagens celulares, ao contrário de outros patógenos bacterianos intracelulares facultativos, tais como a *Shigella* sp, as amostras EPEC não se multiplicam intracelularmente, nem sobrevivem em fagócitos. Estes resultados sugerem que estas não são adequadamente adaptadas às condições intracelulares, promovendo lesões pelos mecanismos já descritos.

1.2.2. *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Em 1971, Dupont *et al.* descreveram um novo grupo de amostras de *E. coli*, capazes de provocar um quadro febril na pessoa infectada, diarreia sangüinolenta e capacidade de invadir as células do intestino grosso.

Estas amostras, denominadas de EIEC, invadem ativamente culturas celulares, espalhando-se lateralmente pelas células adjacentes. Quanto ao processo de invasão intracelular desta bactéria, estes parecem ser idênticos aos descritos para a *Shigella dysenteriae* (Dupont *et al.*, 1971; Formal & Hornick, 1978; Wagner *et al.*, 1988). Porém, ao contrário das amostras de *Shigella*, as cepas EIEC não produzem a “Toxina da *Shigella*” ou “Shiga toxin” (ST), fato que pode explicar a ausência da Síndrome Urinária Hemolítica

(HUS), na infecção por este grupo, doença associada como uma complicação da disenteria causada por amostras do virotipo EHEC.

Contudo, cepas EIEC expressam outros fatores de virulência tais como produção de mucinases, superóxido dismutase e aerobactina, que contribuem para a severidade da infecção (Rico-Martinez, 1995).

A *Escherichia coli* enteroinvasiva e espécies de *Shigella* sp. são importantes agentes causais de disenteria também em pessoas adultas, verificando-se nas fezes das mesmas, a presença de muco, sangue e leucócitos. Com relação aos países subdesenvolvidos, estes quadros são descritos principalmente em crianças e, nos países desenvolvidos, encontram-se mais relacionados a indivíduos adultos (Levine, 1987).

Estas bactérias penetram na mucosa intestinal através das células M do sistema linfocitário específico da mucosa (MALT), no interior de vesículas. A seguir, a membrana destas vesículas é lisada e, através de alterações do citoesqueleto celular por polimerização da rede de actina, estes patógenos migram para as células laterais, representadas pelos enterócitos. Desta forma, não penetram no hospedeiro através das microvilosidades, como também não são capazes de invadir culturas celulares polarizadas, que apresentam diferenciação baso-apical (Salyers & Whitt, 1994a).

O processo de invasão celular da mucosa intestinal pelas EIEC promove intensa reação inflamatória tecidual e o quadro disentérico (Formal & Hornick, 1978; Levine, 1987; Wagner *et al.*, 1988). À semelhança da *Shigella* sp, a infecção pode ser adquirida não só pela ingestão de água e alimentos contaminados, como também por contato pessoal ou por vetores mecânicos, devido à baixa dose infectante necessária. A fonte de infecção deste grupo, como para a *Shigella* sp, é o próprio homem (Levine *et al.*, 1983).

Ainda hoje, a identificação deste grupo de enteropatógenos é realizada por provas bioquímicas e sorológicas, neste último caso pesquisando-se não só o sorogrupo, como também o sorotipo (Toledo & Trabulsi, 1983). Inicialmente, em modelos animais, o fenótipo de invasão era pesquisado pelo clássico teste de Séreny, realizado em olho de cobaia albina (Day *et al.*, 1981). Atualmente, verifica-se a capacidade de invasão destas cepas em experimentos realizados principalmente com culturas de células HEp-2 (Day *et al.*, 1981) e HeLa (Bessen & Gotsslich, 1987), além de provas de ELISA, utilizando-se anticorpos específicos contra proteínas de membrana externa (Pál *et al.*, 1985).

Este grupo pode ser, também identificado através de técnicas moleculares tais como PCR ou por provas de hibridização utilizando-se sondas específicas de DNA, representadas pelos genes *inv*, presentes em um plasmídio de 140 MDa responsável pela invasão (Gomes *et al.*, 1987; Small & Falkow, 1986).

1.2.3. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

A principal manifestação clínica provocada na infecção por amostras EHEC é a diarreia sanguinolenta (Levine, 1987). Esta doença, também denominada colite hemorrágica, foi descrita inicialmente nos Estados Unidos e Canadá, associada à ingestão de “hamburguers” contaminados com cepas de *Escherichia coli* do sorogrupo O157:H7 (Spika *et al.*, 1986). As amostras de *E. coli*, pertencentes ao virotipo EHEC são reconhecidas como agentes de doenças graves, podendo resultar em óbito, por provocarem falha do sistema renal, representada pela Síndrome Urêmica Hemolítica (HUS) (Riley, 1987).

As amostras EHEC são produtoras de duas citotoxinas, atualmente denominadas de “Shiga-like toxin I e II” (SLT-I e SLT-II) ou “verotoxinas I e II” (VT-I e VT-II), ambas codificadas por conversão fágica e ativas em culturas de células Vero e HeLa (O’Brien & Holmes, 1987).

As SLTs possuem estrutura AB, sendo que a subunidade A é a responsável pela inibição da síntese protéica da célula eucariótica e as cinco subunidades B, responsáveis pela ligação aos receptores da célula dos eucariotos (O’Brien & Holmes, 1987; Endo *et al.*, 1988). A toxina SLT-I difere da ST, produzida pela *Shigella dysenteriae* do tipo I, apenas pela alteração de um aminoácido (Strockbine *et al.*, 1988) sendo que, devido a isto, ambas são consideradas por muitos autores como uma mesma toxina.

A partir de 1990, uma grande variedade de diferentes SLT-II têm sido descritas. Genericamente, são denominadas de SLT-IIv (Shiga-like toxin II variante), apresentando cerca de 97% de homologia com a SLT-II, sendo codificadas por genes cromossômicos (Woodward *et al.*, 1990). Dentre estas toxinas, encontram-se descritas a SLT-IIvha, (VT2vha), SLT-IIvhb (VT2vhb) e SLT-IIc (Jackson *et al.*, 1987; Ito *et al.*, 1990).

No grupo das EHEC os sorotipos predominantes são O157:H7, O157:H- e O126:H11 (Blanco *et al.*, 1988), apesar de cepas do sorogrupo O30 também estarem envolvidas nestes quadros (Blanco & Blanco, 1993).

As amostras EHEC ligam-se firmemente às culturas de células de mamíferos e produzem o mesmo tipo de lesão “attaching-effacing” verificado em amostras EPEC (Pedroso *et al.*, 1993). Porém, a adesão de linhagens EHEC restringe-se ao cécon e ao cólon, enquanto que as linhagens de EPEC aderem-se a toda extensão do intestino (Levine, 1987).

Atualmente, na identificação deste virotipo, uma sonda obtida de um plasmídeo de 60 MDa tem sido usada com grande especificidade para a detecção de amostras EHEC do sorotipo O157:H7 e O26:H11 e de 81% das amostras verotoxigênicas pertencentes a outros sorotipos (Toth *et al.*, 1990).

Porém, a identificação deste virotipo também é normalmente realizada através das seguintes abordagens: pesquisa da produção de citotoxinas ativas em células Vero e HeLa (Karmali *et al.*, 1985; Konowalchuk *et al.*, 1977); testes de hibridização com DNA pesquisando-se o gene *eaeA* (Brown *et al.*, 1989; Gicquelais *et al.*, 1990; Karch & Meyer, 1989; Willshaw *et al.*, 1987); provas de ELISA utilizando-se anticorpos monoclonais (Downes *et al.*, 1989; Padhye & Doyle, 1991; Perera *et al.* 1988); provas de ELISA em placas sensibilizadas com receptores para as toxinas SLT-I e SLT-II (Ashkenazi & Cleary, 1989; Basta *et al.*, 1989); determinação do sorogrupo e também do sorotipo (Farmer III & Davis, 1985; March & Ratnam, 1989; Tison, 1990).

Alguns trabalhos também propõem a identificação presuntiva deste grupo, verificando-se a presença das toxinas SLT-I e SLT-II diretamente nas amostras fecais (Maniar *et al.*, 1990).

1.2.4. *Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC)

O virotipo da *Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC) (Mathewson *et al.*, 1985, 1986) representa um grupo diarreiogênico recentemente descrito, com definições ainda controvertidas. Nos trabalhos desenvolvidos, as cepas EAggEC isoladas principalmente de quadros clínicos descritos em crianças, estão associadas a um tipo persistente de diarreia, que não apresenta sangue e/ou leucócitos nas fezes.

Modelos animais (Tzipori *et al.*, 1992), culturas de células HEp-2 (Nataro *et al.*, 1992) e de células T84 (Nataro *et al.*, 1996) têm sido utilizados, mais frequentemente, na identificação de amostras pertencentes a este virotipo permitindo, também, o estudo de sua patogenicidade. Nos diversos trabalhos realizados, têm sido ressaltado que a característica principal deste virotipo é a expressão do fenótipo de adesão agregativa, representada pela presença de um padrão de aderência semelhante à “tijolos empilhados”, onde as células bacterianas apresentam-se bem definidas e unidas, uma ao lado da outra. Este padrão de aderência pode ser observado tanto na superfície das células HEp-2 como nas superfícies de vidro ou plástico, suportes dos experimentos de infecção celular e, portanto, sem a presença de tecidos.

Além do padrão de adesão às células HEp-2, estas cepas têm sido caracterizadas também pela hemaglutinação D-manose resistente com hemácias humanas (Nataro *et al.*, 1992), autoaglutinação em meios de culturas líquidos, com formação de grumos (Albert *et al.*, 1993) e presença de um plasmídio de 60 MDa (Vial *et al.*, 1988).

Em trabalho de Nataro *et al.* (1993), foi demonstrado que a capacidade de adesão destas amostras era devida à expressão de uma adesina denominada de AAF/I (Aggregative Adherence Fimbriae I), cujas fimbrias formavam feixes a partir da célula bacteriana, de maneira similar às “bundle-forming pili” descritas por Girón *et al.* (1993), em cepas EPEC da classe I.

Estes autores também determinaram que esta adesina era codificada por genes presentes em um plasmídio de 60 MDa (Nataro *et al.* 1993). Paralelamente, caracterizaram que o mesmo plasmídio era responsável também pela produção de uma enterotoxina termo-estável, denominada EAST1, identificada em 40% das cepas estudadas. Segundo Savarino *et al.* (1991), esta toxina apresenta função similar à toxina ST de ETEC. Inclusive, como descrito por Yamamoto & Echeverria (1996), a EAST1 também pode ser encontrada em amostras de origem humana pertencentes ao virotipo ETEC, capazes de expressar os antígenos de aderência CFA/I, CFA/II, CFA/IV, além de PCFO9. Em amostras ETEC de origem animal, esta toxina foi detectada somente naquelas capazes de expressar a fimbria K88.

Posteriormente, Nataro (1996a) demonstrou que cepas EAggEC poderiam expressar fimbrias distintas de AAF/I, caracterizando uma segunda adesina, pelo mesmo denominada de AAF/II (Aggregative Adherence Fimbriae II). Enquanto que a fimbria AAF/I

seria representada por fimbrias flexíveis, formando feixes e apresentando de 2 a 3 nm de diâmetro, a fimbria AAF/II apresentaria 5 nm de diâmetro. Estudos comparativos demonstraram que as fimbrias AAF/I e II eram distintas morfológica, genética e antigenicamente.

Quanto ao processo de colonização, verificou-se que estas bactérias ligam-se às células do intestino delgado humano, mas não são capazes de induzir as lesões características do “attaching and effacing”, descritas nos processos de colonização de amostras de *E. coli* dos grupos EPEC e EHEC (Knutton *et al.*, 1989). Apesar do grupo EAggEC ser considerado um virotipo não invasivo, Benjamin *et al.* (1994) observaram, em experimentos com células HEp-2, processo de invasão intracelular por amostras consideradas como pertencentes ao mesmo.

Por outro lado, não foram identificadas nas amostras consideradas como EAggEC, a produção de toxinas do tipo LT (termo-lábil) ou do tipo “Shiga-like” (Levine, 1987; Vial *et al.*, 1988), embora tenha sido observada a produção da toxina EAST1, ou toxina enteroagregativa ST, cujo papel na virulência ainda não está bem esclarecido (Savarino *et al.*, 1991). Além desta, também foi descrita a produção de uma toxina termo-lábil de 120 kDa, muito semelhante à hemolisina produzida por linhagens de *E. coli* associadas à infecções no trato urinário (Baldwin *et al.*, 1992). Estes autores verificaram que esta última toxina não era capaz de lisar eritrócitos, mas induzia o aparecimento de poros na membrana das células do hospedeiro, sendo que a ligação desta hemolisina às células HEp-2 provocava também um aumento dos níveis de cálcio intracelular.

Recentemente, Nataro (1996a), através de experimentos com eritrócitos, observou efeito citotóxico causado por uma proteína de 108 kDa, associada à presença de um plasmídeo denominado PAC, cuja função na enteropatogenicidade do grupo também ainda não está claramente definida.

Através de estudos em eletroforese de gel de poliacrilamida, análises de proteínas da membrana externa de cepas deste virotipo revelaram a existência de uma proteína comum, apresentando 38 kDa (Wai *et al.*, 1996). Neste trabalho também foi observada a perda do caráter hidrofóbico das amostras EAggEC, quando submetidas à tratamentos de extração desta proteína sugerindo, desta forma, que a proteína de 38 kDa deva ter um papel importante na expressão do fenótipo auto-agregativo.

Wanke *et al.* (1990), analisando lesões intestinais, demonstraram uma forte aderência de amostras EAaggEC ao muco intestinal, sugerindo que no intestino delgado a aderência ao muco é também um fenômeno importante na colonização destes patógenos.

Por outro lado, a identificação molecular deste virotipo, a sonda pCVD432 tem sido utilizada na identificação de genes para AAF/I e a aglutinação de eritrócitos humanos (Nataro *et al.*, 1992), além de toxinas produzidas por estas amostras (Savarino *et al.*, 1991). Apesar destas provas serem altamente específicas são, no entanto, menos sensíveis que os testes de adesão, uma vez que, como já verificado no trabalho de Nataro (1996a), outras adesinas devem estar envolvidas no fenótipo agregativo, característica considerada como a mais relevante deste virotipo.

1.2.5. *Escherichia coli* enteropatogênica com aderência difusa (DAEC)

A *Escherichia coli* do grupo DAEC constitui o mais recente virotipo descrito. Nos primeiros estudos realizados com amostras DAEC, este grupo foi caracterizado por apresentar um padrão de adesão difusa em experimentos desenvolvidos com a linhagem de células HEp-2, não tendo sido verificado, na época, nenhuma associação deste virotipo com casos de diarreia (Bhan *et al.*, 1989; Cravioto *et al.*, 1991; Nataro *et al.*, 1987). Entretanto, pesquisas recentes demonstraram que estas cepas de *E. coli* estão, de fato, relacionadas a casos de diarreia em crianças (Gunzburg *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1993).

Quanto aos mecanismos de patogenicidade das amostras DAEC, estes ainda não são conhecidos. Bilge *et al.* (1989) caracterizaram, em algumas cepas com este padrão de aderência, uma fimbria denominada F1845, que seria a responsável pela adesão e pelo padrão de aderência difusa na maioria das amostras DAEC pesquisadas.

Estudos complementares demonstraram que amostras pertencentes a este grupo induziam na célula hospedeira, um processo característico de alongamento, provavelmente com a finalidade de englobar as bactérias DAEC (Yamamoto *et al.*, 1992).

Jallat *et al.* (1993), pesquisando amostras de *E. coli* envolvidas em casos de diarreia, verificaram uma associação entre o efeito citotóxico em células HEp-2 e atividade hemolítica de amostras DAEC. Observaram, também, um fenômeno de descolamento do tapete celular, quando na presença destas amostras.

Recentemente, Yano *et al.* (1996) extraíram e purificaram um fator hemaglutinante D-manose resistente (HAF), a partir de amostras DAEC. O peso molecular das subunidades deste fator foi determinado como de 18 kDa em SDS-PAGE e de 66 kDa em Sephadex G100, sugerindo que a forma nativa do HAF seja representada por 3 a 4 monômeros.

Marcações pela técnica do “Immunegold”, com antissoro específico anti-HAF, revelaram que esta proteína, de forma distinta das fimbrias bacterianas, não é representada por uma estrutura definida, sendo que as revelações observadas foram sugestivas de que o HAF possa ser um possível fator de adesão não fimbrial de amostras DAEC. Dentre os virotipos descritos para amostras enteropatogênicas de *E. coli*, este grupo é o que ainda apresenta maiores indefinições (Yano *et al.*, 1996).

1.2.6. *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

As amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) representam um dos grupos de maior importância na patogenia da diarreia aquosa em crianças, adultos e viajantes de áreas endêmicas, principalmente nos países em desenvolvimento (Levine, 1987; Black, 1990).

A patogenicidade deste grupo é devida à combinação de dois fatores principais de virulência, sendo o primeiro relacionado à colonização da bactéria na mucosa do intestino delgado. O processo de colonização ocorre devido à presença de adesinas na superfície da célula bacteriana, capazes de interagir com receptores das células do hospedeiro, podendo variar morfológica e antigenicamente sendo, genericamente, denominadas de Fatores de Colonização (FC).

Esta interação é considerada como espécie-específica e confere à bactéria a habilidade de resistir aos movimentos peristálticos intestinais do hospedeiro. O segundo evento, envolvido nas enteropatias causadas por ETEC, é a produção de enterotoxinas, que podem ser termo-estáveis (ST) ou termo-lábeis (LT).

1.2.6.1. Enterotoxinas

Smith & Halls (1967) foram os primeiros a verificar que sobrenadantes de cultura de amostras de *E. coli* provocavam acúmulo de líquido, em alça ligada de intestino de porco. Mais tarde, Smith & Gyles (1970) demonstraram a existência de dois tipos de enterotoxinas: termo-lábeis (LT), por serem inativadas pelo calor a 60°C por 15 minutos e termo-estáveis (ST), por resistirem ao tratamento a 100°C por 30 minutos.

Dentre as enterotoxinas termo-estáveis a STa, também denominada por alguns autores de STI, é solúvel em água e em solventes orgânicos, além de ser resistente à ação de enzimas proteolíticas (Alderete & Robertson, 1978; Clements & Finkelstein, 1978a) e apresenta atividade em intestino de camundongo recém-nascido (Dean *et al.*, 1972).

Por outro lado, a enterotoxina STb, também denominada de STII, 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).

Apenas STa, dentre as enterotoxinas termoestáveis, é comprovadamente associada a casos diarreicos humanos (Clements & Finkelstein, 1978a; Blanco & Blanco, 1993), sendo representada por um peptídeo de 17 a 18 aminoácidos, sendo os 13 resíduos da região carboxi-terminal responsáveis pela ligação da toxina aos receptores celulares e pela característica de toxigenicidade (Garipey *et al.*, 1986). Os genes para STa têm sido encontrados, normalmente, em plasmídios de alto peso molecular, geralmente associados a genes responsáveis pela codificação de FC e/ou genes associados a fenótipos de resistência a antimicrobianos (Clements & Finkelstein, 1978a; Evans & Evans, 1978; Gyles *et al.*, 1977; McConnel *et al.*, 1989).

A STa pode ser biologicamente identificada pelo teste do camundongo recém-nascido (Dean *et al.*, 1972), através de provas sorológicas de ELISA (Svennerholm *et al.*, 1986), pelo uso de sondas genéticas utilizando-se o método de hibridização de colônias (Echeverria *et al.*, 1986), ou por PCR (Hammermueller *et al.*, 1995).

Quanto ao mecanismo de ação a enterotoxina STa é capaz de ativar a enzima guanilato ciclase nas vilosidades das células epiteliais do intestino, o que leva a uma elevação dos níveis de GMPc, resultando em secreção de líquido para a luz intestinal e subsequente diarreia (Fukuta *et al.*, 1988; Hughes *et al.*, 1978).

Com relação à STb, em trabalho desenvolvido por Whipp (1990), verificou-se que esta enterotoxina era sensível às proteases intestinais e poderia ser detectada em alças ligadas de ratos e camundongos, desde que os sobrenadantes das culturas fossem tratados com inibidores de tripsina de soja. No que diz respeito ao estímulo da secreção intestinal, a enterotoxina STb atua por mecanismos que não envolvem alterações das concentrações de nucleotídeos cíclicos (Kennedy *et al.*, 1984).

Quanto às enterotoxinas termolábeis, estas também apresentam heterogeneidade, constituindo-se em 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 à da toxina colérica (TC) (Clements & Finkelstein, 1978b).

Desta forma, enquanto a subunidade B liga-se ao receptor de membrana, no caso representado principalmente pelo gangliosídeo GM1 (Svennerholm & Holmgren, 1978), a subunidade A é responsável pela atividade tóxica. A ação desta subunidade baseia-se na estimulação da 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; Garipey *et al.*, 1986; Ricci *et al.*, 1992).

A toxina LT-I, além de ser estruturalmente semelhante à TC, também tem atividade biológica semelhante, além de apresentar determinantes antigênicos comuns (Clements & Finkelstein, 1978b; 1979). Assim, soros policlonais produzidos contra estas duas toxinas, apresentam reações cruzadas.

Uma vez que a LT-I é uma proteína imunogênica, apresentando cerca de 85 a 90 kDa, várias reações antígeno-anticorpo foram desenvolvidas para a sua identificação, variando desde as que utilizam hemácias de carneiro como suporte, tais como a imunohemólise radial modificada (Serafim *et al.*, 1981) e a hemaglutinação indireta (Ricci & Castro, 1986), até provas mais sensíveis como GM1-ELISA (Sommerfelt *et al.*, 1988).

Quanto à codificação gênica da LT-I, esta tem sido descrita como associada a genes presentes em plasmídios de alto peso molecular (Gyles *et al.*, 1974), alguns apresentando também genes capazes de codificar marcas de resistência a antimicrobianos e fatores de colonização (Gyles *et al.*, 1977).

Posteriormente, uma segunda toxina termo-lábil produzida por amostras de *E. coli* isoladas de fezes de búfalo foi identificada por Holmes *et al.* (1986) e denominada de

LT-II. Após purificação, esta demonstrou apresentar P.M. de 87 kDa, sendo composta por uma subunidade A e cinco subunidades B, com P.M. respectivamente de 28 kDa e 11 kDa. Trabalhando com amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes humanas, animais e de alimentos, Guth *et al.* (1986) descreveram duas variedades antigênicas da LT-II, a saber: LT-IIa e LT-IIb.

Trabalhos desenvolvidos por diferentes autores (Elsinghorst & Kopecko, 1992; 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. Apesar destas observações, o papel da invasão na patogenicidade deste virotipo continua indefinido.

1.2.6.2. Fatores de Colonização

Vários fatores de colonização (FC) ou possíveis fatores de colonização (PCF) têm sido identificados e caracterizados em cepas ETEC de origem humana. Porém, em muitas das amostras ETEC isoladas de fezes diarreicas humanas, os principais FC descritos até o momento não foram identificados (Levine *et al.*, 1995; McConnell & Rowe, 1989).

O primeiro FC, detectado em amostras ETEC de origem humana, foi descrito por Evans *et al.* (1975). Este fator apresenta uma estrutura fimbrial e foi denominado por estes autores de fator antigênico de colonização I (CFA/I). Através de observações em Microscopia Eletrônica de Transmissão, verificou-se que CFA/I era uma estrutura rígida, de 0,5 a 1 μ m de comprimento, com diâmetro de 7nm (Mooi & Graaf, 1985; Ørskov *et al.*, 1971). Esta fimbria é representada por mais de 100 subunidades idênticas, constituídas por 147 resíduos de aminoácidos cada, sendo que cada subunidade apresenta um peso molecular de 15,1 kDa (Klemm & Mikkelsen, 1982).

Posteriormente, foram descritos os seguintes FC: CFA/II (Evans & Evans, 1978), CFA/III (Honda *et al.*, 1984), CFA/IV ou PCF8775 (Thomas *et al.*, 1982), PCFO159 (Tacket *et al.*, 1987), 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), PCFO20 (Viboud *et al.*, 1993a), CS20 (Valvatne *et al.*, 1996), CS19 (Grewal *et al.*, 1997), PCFO148 (Knutton *et al.*, 1987), CS7 (Hibberd *et al.*, 1990) e

PCFO2 (Ricci *et al.*, 1995; 1997). Normalmente, os FC apresentam estrutura fimbrial ou fibrilar. Contudo, os antígenos 2230 e 8786 foram descritos como adesinas não fimbriais.

De maneira geral, na caracterização dos fatores de colonização descritos em amostras enterotoxigênicas, isoladas em diferentes partes do mundo, observa-se grande variação na frequência dos mesmos (Levine *et al.*, 1995; McConnell *et al.*, 1990; Clements *et al.*, 1990; López-Vidal & Svennerholm, 1990; Binsztein *et al.*, 1991; Viboud *et al.*, 1993a; Nirdnoy *et al.*, 1997).

Esta variação poderia estar parcialmente relacionada às regiões geográficas, onde as cepas ETEC endêmicas seriam diferentes, expressando distintos FC. Contudo, nos levantamentos epidemiológicos, estes resultados também estariam associados à perda dos plasmídios responsáveis pela codificação destes fatores, após o isolamento da amostra, estocagem prolongada e subcultivos, antes da pesquisa de FC nas mesmas (Thomas *et al.*, 1982; Åhrén *et al.*, 1986).

Em estudo desenvolvido por Honda *et al.* (1991), os autores demonstraram significativa segregação dos plasmídios responsáveis pela codificação das enterotoxinas e de FC em estoques prolongados, na dependência do meio utilizado e da temperatura de cultivo. 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 já descritos em cepas ETEC isoladas de casos de diarreia humana, os mais pesquisados e melhor caracterizados, são representados pelos fatores CFA/I, CFA/II e CFA/IV. Enquanto que CFA/I é representado por uma proteína homogênea (Klemm & Mikkelsen, 1982), os FC CFA/II e CFA/IV são heterogêneos e compostos de três antígenos de superfície ou “coli surface” (CS), denominados de CS1, CS2 e CS3 para CFA/II e CS4, CS5 e CS6 para CFA/IV (Smyth, 1982; Thomas *et al.*, 1985).

No que diz respeito ao CFA/II, este expressa CS3 sozinho ou em combinação com CS1, CS2 ou CFA/III, sendo estas subunidades representadas por estruturas fimbriais rígidas, medindo de 6 a 7nm de diâmetro, enquanto que CS3 é uma estrutura fibrilar flexível, com 2 a 3nm de diâmetro (Levine *et al.*, 1984; McConnell *et al.*, 1988; Thomas *et al.*, 1985).

A subunidade CS1 tem um peso molecular aproximado de 16,8 kDa, enquanto que subunidades de 14,5 e 15,5 kDa estão presentes em material purificado de CS3. Com relação ao peso molecular da subunidade CS2 este é de 17 kDa (Honda *et al.*, 1989).

No complexo CFA/IV todas as cepas expressam CS6 sozinho ou em combinação com CS4, CS5 ou CFA/III (McConnell *et al.*, 1988). Com relação a CS4 e CS5, estas são estruturas rígidas de 6 a 7 nm de diâmetro, capazes de promover hemaglutinação D-manose resistente com eritrócitos de boi e humanos. No caso de CS5, esta fimbria também hemaglutina eritrócitos de cobaio. Por outro lado, CS6 não promove hemaglutinação D-manose resistente, mas tem sido identificada através de observações em M.E.T. pela técnica do “Immunegold” revelada com soros específicos (Thomas *et al.*, 1985). Quanto a CS6, atualmente este é considerado como um FC, uma vez que cepas expressando este antígeno demonstraram-se capazes de colonizar o intestino de coelho (Svennerholm *et al.*, 1988) e tendo sido identificadas como os únicos patógenos em pacientes com diarreia (Wolf *et al.*, 1993; Binsztein *et al.*, 1991).

No que diz respeito à subunidade CS4, esta tem peso molecular aproximado de 17 kDa, enquanto que as subunidades de 21 e 14,5 kDa estão presentes em material purificado de CS5 e CS6, respectivamente (Thomas *et al.*, 1985; McConnell *et al.*, 1988).

Recentemente, foi demonstrado que o operon de CS6 é representado por quatro seqüências (operon reading frames) representados por *cssA*, *cssB*, *cssC* e *cssD* (Cassels & Wolf, 1995). As duas primeiras, codificam proteínas estruturais de CS6, enquanto *cssC* pertence à família das “molecular chaperones” e *cssD* é uma “molecular usha”, servindo de proteína âncora, na construção e expressão da fimbria.

Quanto à morfologia dos fatores CFA/III, CS17 e PCFO159, estes foram observados como estruturas fimbriais em forma de haste, com cerca de 6 a 8 nm de diâmetro, sendo que CS17 tem uma estrutura helicoidal similar à CS5 e apresenta de 3,5 a 6,5 nm de espessura (Hibberd *et al.*, 1990; Honda *et al.*, 1984; McConnell & Rowe, 1989; McConnell *et al.*, 1990; Tacket *et al.*, 1987).

As subunidades dos fatores CFA/III, CS17 e PCFO159, em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) demonstraram ter, respectivamente, P.M. de 18, 21,5 e 19 kDa (Hibberd *et al.*, 1990; Honda *et al.*, 1984; Tacket *et al.*, 1987). Com relação à PCFO166, duas bandas polipeptídicas, coradas em mesma intensidade (17 e 15,5 kDa), foram verificadas também em SDS-PAGE (McConnell & Rowe, 1989).

De maneira geral, os FC descritos para amostras ETEC isoladas de quadros de diarreia no homem ou em animais, apresentam as seguintes características comuns: a) São constituídos de estruturas protéicas apresentando distribuição peritríquia, com 1 a 2 µm de

comprimento e 6 a 9 nm em diâmetro; b) Normalmente são codificados ou controlados por genes presentes em plasmídios de alto peso molecular, em associação com genes das enterotoxinas LT e/ou ST (Evans & Evans, 1975; 1978; Smyth, 1984; Willshaw *et al.*, 1982); c) 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, Ricci *et al.*, 1997; Girón *et al.*, 1997); d) São encontrados apenas em amostras ETEC pertencentes a determinados sorogrupos e sorotipos; e) 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); f) São termo-reguláveis, isto é, expressam-se quando as amostras de ETEC são cultivadas a 37°C mas não a 16°C (Gaastra *et al.*, 1982; Klemm *et al.*, 1985; Krogfelt, 1991); g) Têm sido identificados e caracterizados após crescimento das cepas ETEC em meio CFA ágar (Evans & Evans, 1977; Klemm, 1985).

Recentemente, Girón *et al.* (1994) descreveram e caracterizaram uma nova fimbria do tipo IV denominada de “longus”, em cepas ETEC isoladas de fezes diarréicas humanas. Observações realizadas em M.E.T., revelaram que o comprimento desta fimbria superava significativamente o comprimento das fimbrias descritas para ETEC e para outros patógenos Gram-negativos, tais como *Pseudomonas aureuginosa* e *Neisseria gonorrhoeae* (Hobbs & Mattick, 1993).

Após purificação e análise desta fimbria em SDS-PAGE e em provas de “Western blot”, reveladas com antissoro monoespecífico anti-longus, Girón *et al.* (1994) demonstraram que este é constituído de subunidades com peso molecular de 22kDa, denominadas pelos autores de LngA ou “longin”. Este PCF morfologicamente apresenta-se com distribuição polar no corpo celular bacteriano, sendo seu comprimento superior a 20 µm, demonstrando tendência a formar agregados.

Utilizando provas de hibridização de colônias, Girón *et al.* (1995) estudaram a prevalência do gene que codifica subunidades do “longus” (*lngA*) entre ETEC isoladas de diferentes áreas geográficas e a associação do mesmo com os mais prevalentes FC, enterotoxinas e sorotipos de ETEC.

No mesmo trabalho, através da comparação do sequenciamento de aminoácidos da porção N-terminal do LngA, e de subunidades fimbriais de outras bactérias, foi demonstrada similaridade com seqüências fimbriais tipo-IV classe-B (Girón *et al.*, 1997),

tais como BfpA (bundle-forming pilus) de EPEC (Girón *et al.*, 1993) e com o TCP (toxin-coregulated pili) de *Vibrio cholerae* (Herrington *et al.*, 1988).

Analisando-se os resultados de sequenciamento, o “longus” foi identificado como um novo membro da família de pili do tipo IV, classe B, caracterizada pela ausência de NMePhe como o primeiro amino-ácido da porção N-terminal da fimbria (Girón *et al.*, 1997).

Com relação à codificação genética do “longus”, aparentemente esta é plasmidial, sendo que sua expressão deve ser altamente conservada dentre as amostras ETEC. Por apresentar, aproximadamente, entre 5 a 7 nm de diâmetro e arquitetura semi-flexível, Girón *et al.* (1994) consideraram o longus como distinto dos flagelos peritríquios, característicos da família *Enterobacteriaceae*. Estes autores também demonstraram que a expressão deste fator é dependente das condições de cultivo.

Por ter sido identificada em cepas isoladas de diferentes áreas geográficas, estar relacionada a diferentes sorotipos e ser expressa concomitantemente com outros FC, associado à produção de LT e/ou ST, a possível aplicação desta fimbria em preparados de vacinas, tem sido avaliada (Girón, *et al.*, 1997).

Pelo grande problema de saúde pública, representado pela diarreia associada às ETEC, muitos autores têm procurado definir quais os FC mais frequentes para a possível construção de vacinas (Helander *et al.*, 1997; Girón *et al.*, 1997; Luna *et al.*, 1997).

Por ser a adesão e colonização do intestino delgado reconhecida como um fator importante, se não essencial, para que ocorra a diarreia (Gaastra & Graaf, 1982) e sendo estes mecanismos associados aos FC, antígenos imunogênicos capazes de induzir resposta protetora (Levine, 1984), vários trabalhos abordando produção de vacinas compostas têm sido desenvolvidos (Black, 1986; Levine, 1990; Svennerholm *et al.*, 1990). Contudo, isto só será possível quando testes de identificação dos FC permitam rapidez, especificidade e sejam acessíveis aos laboratórios de análises clínicas em cada área geográfica endêmica.

1.2.6.3. Utilização de anticorpos monoclonais na caracterização e provas de identificação de FC em amostras ETEC

Pela complexidade e variabilidade dos mecanismos e fatores de virulência apresentados pelos virotipos de amostras de *E. coli* diarreiogênicas para o homem, a identificação destes grupos e de seus antígenos só é possível com o apoio de uma infraestrutura ampla, pouco acessível aos países em desenvolvimento.

Devido a isto, na maioria das vezes, a pesquisa de enteropatógenos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* é realizada apenas através da semeadura das fezes em meios de enriquecimento e meios seletivos, seguida de isolamento de colônias, identificação bioquímica e avaliação presuntiva de alguns virotipos, pelo uso de soros poli e monoespecíficos contra os sorogrupos mais freqüentemente associados às EPEC, EIEC e EHEC.

Com relação à identificação de amostras dos virotipos ETEC, EAggEC e DAEC, além da comprovação dos demais grupos enteropatogênicos de *E. coli*, provas complementares devem ser desenvolvidas. A esta dificuldade, soma-se o efeito de que mais de uma colônia isolada deve ser pesquisada a partir de cada coprocultura.

Em estudo da amostragem ideal, Levine *et al.* (1993) verificaram que na identificação do virotipo, em casos de diarreia infantil associados às EPEC, apesar de na fase aguda da enteropatia o agente estar presente em grande número. Desta forma, estes autores pesquisando apenas uma colônia por métodos moleculares, determinaram que 62% da amostragem era identificada; pesquisando 3 colônias, este percentual aumentava para aproximadamente 95% e finalmente, avaliando 4 colônias, a sensibilidade da prova atingia 98%. Contudo, a definição do número ideal de colônias a ser analisadas é ainda assunto controvertido, uma vez que na fase aguda do quadro diarreiogênico, o agente patogênico é predominante (J. Blanco, comunicação pessoal).

Apesar do desenvolvimento de várias técnicas biológicas e moleculares sensíveis e rápidas para a identificação dos fatores de virulência característicos dos virotipos, estas não estão disponíveis para todos os laboratórios de análises clínicas, principalmente levando-se em consideração o número de colônias necessários às avaliações. Assim sendo, as provas mais viáveis de serem adquiridas e empregadas nestes laboratórios ainda são representadas pelos testes imunológicos de identificação.

A pesquisa dos antígenos associados aos fatores de virulência descritos para a *E. coli*, somadas ao sequenciamento de aminoácidos dos fatores de virulência purificados, têm contribuído de forma significativa para os estudos epidemiológicos e de possíveis vacinas a serem utilizadas na prevenção da diarreia causada por estes patógenos, em especial por cepas ETEC (Honda *et al.*, 1989; Lopez-Vidal *et al.*, 1988; Rudin *et al.*, 1994).

Quanto aos FC deste virotipo, estes foram inicialmente considerados como antigenicamente distintos, utilizando-se na identificação dos mesmos provas de MRMH frente a eritrócitos de diferentes origens, além de reações de soroaglutinação em lâmina desenvolvidas com soros policlonais absorvidos e diluídos (Evans *et al.*, 1975). Como contra-prova, reações com as mesmas amostras cultivadas a 16°C eram realizadas.

Posteriormente, técnicas mais específicas e sensíveis foram desenvolvidas, utilizando-se nas provas imunológicas de identificação destes fatores anticorpos monoclonais (MAbs) (Köhler e Milstein, 1975).

Desta forma, Lopez-Vidal *et al.* (1988) foram os primeiros a trabalhar no sentido de obtenção de MAbs contra a fimbria CFA/I, para sua utilização em provas de identificação deste fator. Os 25 MAbs obtidos por estes autores, foram também utilizados na avaliação da sua reatividade destes anticorpos frente a subunidades proteicas de CFA/I, obtidas por tratamento enzimático. Provas de aglutinação e de ELISA utilizando-se estes MAbs, foram também desenvolvidas com cepas segregantes de CFA/I e com amostras expressando CFA/II e CFA/IV.

Para verificação da especificidade e afinidade, os 25 diferentes MAbs reativos para CFA/I também foram avaliados através de provas de inibição de ELISA, utilizando-se placas de poliestireno sensibilizadas com esta fimbria, adicionava-se a seguir os anticorpos monoclonais anti-CFA/I e as cepas em teste.

Os resultados obtidos nestes testes de inibição do ELISA demonstraram ser esta técnica adequada como prova de identificação de CFA/I, reagindo os MAbs especificamente contra epítomos da fimbria. Posteriormente, estes mesmos anticorpos foram utilizados na avaliação de possíveis variações de epítomos em diferentes amostras isoladas expressando CFA/I.

Em trabalho de Bühler *et al.*, (1991), os autores verificaram que a subunidade de CFA/I localizada na extremidade das fimbrias apresentava função de adesina. Por outro lado, anticorpos monoclonais preparados contra polipeptídeos de CFA/I, obtidos por

tratamento térmico, demonstraram ser mais eficientes para bloqueio de reações de hemaglutinação, quando comparados a outros monoclonais preparados contra a fimbria nativa. Através do mapeamento dos epítomos das subunidades de CFA/I obtidas, pela utilização destes MAbs foi caracterizado um epítomo imunodominante na fração N-terminal (Cassels *et al.*, 1992).

Lopez-Vidal & Svennerholm (1990), obtiveram MAbs contra a fimbria CFA/II e verificaram que alguns destes reagiam com antígenos denominados de CS (antigen coli surface). Desta forma, esses autores demonstraram objetivamente a presença do complexo de frações antigênicas, representadas por CS1, CS2 e CS3. Portanto, a utilização dos MAbs foi fundamental para que a presença e a estrutura dos fatores CS fosse caracterizada e determinada em diferentes amostras produtoras de CFA/II. Também, permitiram identificar epítomos em comum e avaliar variabilidade antigênica entre os fatores CS, incluindo diferenças de epítomos na fração CS3 em cepas distintas.

Posteriormente, Rudin *et al.* (1994) também obtiveram MAbs contra a fimbria CFA/I purificada, assim como contra subunidades isoladas da mesma e frente a outros fatores de colonização. Os autores selecionaram 3 MAbs que reagiram cruzadamente com CS1, CS2, CS4, PCFO166 e CS17, em provas de "Dot blot" e também com subunidades destes, obtidas por tratamento enzimático.

Desta forma, verificou-se que FC com características bioquímicas distintas e antigenicamente diferentes, em avaições com soros policlonais, na realidade apresentavam epítomos comuns sendo que dentre estes, pelo menos um estaria localizado na porção N-terminal da subunidade protéica.

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. Assim sendo, com relação às regiões N-terminal de CFA/I, CS1, CS2, CS4, PCFO166 e CS17 demonstrou-se serem estas muito similares (Karjalainen *et al.*, 1989; Klemm *et al.*, 1985; Kusters & Gastra, 1994; Perez-Casal *et al.*, 1990).

Estas homologias de epítomos resultaram na verificação de reações cruzadas entre as subunidades de CFA/I, CS1, CS2, CS4 e CS17, quando reveladas em testes de "Western blot" utilizando-se anticorpos policlonais (McConnell *et al.*, 1989). Devido a estes resultados, a utilização dos MAbs tem melhorado de forma significativa a especificidade e

sensibilidade destas provas sendo que, principalmente, testes de inibição do ELISA têm sido padronizados para a identificação dos FC em enquetes epidemiológicos (Honda *et al.*, 1989; Lopez-Vidal *et al.*, 1988; Rudin *et al.*, 1994).

A identificação de cepas ETEC é inicialmente feita pela detecção da produção das enterotoxinas LT-I e STa em amostras isoladas para só, então, ser pesquisada a presença de FC. Porém, como já mencionado durante estes procedimentos as cepas são geralmente estocadas por longo período de tempo, antes de verificar-se a presença de FC.

O aprimoramento das técnicas imunológicas, utilizando-se anticorpos monoclonais em provas de inibição do ELISA, permitiram que os procedimentos fossem agilizados. Desta forma, objetivando padronização de provas específicas que permitissem melhoria na identificação dos FC menos pesquisados, Viboud *et al.* (1993b) utilizaram hibridomas secretores de monoclonais reativos contra os seguintes fatores de colonização: CFA/III (Honda *et al.*, 1984), CS7 (Hibberd *et al.*, 1990), CS17 (McConnell *et al.*, 1990), PCFO159 (Tacket *et al.*, 1987) e PCFO166 (McConnell & Rowe, 1989), na avaliação de cepas ETEC isoladas na Argentina.

Nestes estudos epidemiológicos provas de “Dot blot” também podem ser utilizada sem reações com extratos obtidos após aquecimento das amostras (Viboud *et al.*, 1993a), ou carimbos das culturas em membranas especiais (Nirdnoy *et al.*, 1997).

Em pesquisa realizada com cepas ETEC isoladas de casos de diarreia humana no nosso meio, pesquisando a produção de os mais frequentes FC, Ricci *et al.* (1997) identificaram e caracterizaram a fimbria por estes autores de PCFO2. Esta fimbria foi, inicialmente, descrita em duas cepas isoladas em Ouro Preto, sendo ambas produtoras de LT e pertencentes ao sorogrupo O2. Em trabalho subsequente, hibridomas foram preparados com o antígeno nativo, resultando na obtenção de 9 MAbs reativos contra este FC (Oliveira, 1996).

No presente trabalho, objetivou-se estudar criteriosamente estes 9 anticorpos monoclonais reativos contra PCFO2, sendo 4 pertencentes ao isotipo IgA e 5 ao isotipo IgG2b. Desta forma, avaliou-se a reatividade dos mesmos com os principais FC conhecidos, bem como frente à fimbria purificada a partir de duas cepas de *E. coli* produtoras desta adesina e frente à subunidades deste antígeno.

Paralelamente objetivou-se, também, a padronização da prova de Inibição do ELISA, como um teste altamente sensível e específico para a identificação de amostras capazes de expressar PCFO2.

2. OBJETIVOS

2.1- Avaliar a reatividade de 9 anticorpos monoclonais reativos contra PCFO2, obtidos em trabalho anterior, sendo 4 do isotipo IgA e 5 do isotipo IgG2b, frente à fimbria PCFO2 purificada a partir das amostras 244-1 e 275-1.

2.2- Avaliar a especificidade destes anticorpos frente a outros FC, em provas de ELISA e “Western blot”.

2.3- Avaliar a reatividade destes MAbs frente a possíveis subunidades de PCFO2 a serem obtidas após tratamento da fimbria com Guanidina-HCl.

2.4- Confirmar uma possível homologia de epítomos entre PCFO2 e outros FC, através de imunomicroscopia eletrônica, de preparados revelados pelos MAbs obtidos.

2.5- Padronizar a prova de Inibição do ELISA, para a identificação da fimbria PCFO2.

2.6- Avaliar a adequação da prova de Inibição do ELISA na pesquisa de PCFO2, utilizando-se 51 cepas de *E. coli* enterotoxigênica e 15 não ETEC.

2.7- Comparar os resultados obtidos no item 6 com provas similares, desenvolvidas com soros policlonais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras utilizadas

3.1.1. Cepas padrão de FC

As amostras ETEC utilizadas neste trabalho, como padrão dos mais freqüentes fatores de colonização encontram-se descritas na Tabela I, assim como as cepas padrão de PCFO2, correspondentes às amostras 244-1 e 275-1, pertencentes ao sorogrupo O2 (Ricci *et al.*, 1995). Quanto às cepas 61 (CFA/II CS2, CS3), M424-C1 (CFA/II CS1, CS3), e 0509755 (CFA/IV CS4, CS6) estas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Takeshi Honda, da Universidade de Osaka.

Como controle da expressão fenotípica dos FC, no desenvolvimento deste trabalho todas as cepas foram periodicamente avaliadas quanto ao padrão de hemaglutinação D-manose resistente (Tabela I) e através de sorologia específica, a partir de cultivos a 37 e 16°C.

Na estocagem, todas as cepas utilizadas foram mantidas em meio de Dorset, a 4°C (item 12.3) (Honda *et al.*, 1991) e em meio BHI (item 12.11) acrescido de 15% de glicerol, sendo estes últimos estoques mantidos a -25°C.

3.1.2. Amostras controle

Como controle negativo, as seguintes amostras não ETEC, isoladas de fezes diarréicas humanas obtidas em levantamentos realizados no nosso meio (Piton, 1997), foram utilizadas: *E. coli* D447; *E. coli* D448; *E. coli* D237; *E. coli* D52; *E. coli* D51, *E. coli* D4 e além da *E. coli* K12.

Tabela I- Características fenotípicas de amostras padrão de fatores de colonização descritos em cepas ETEC isoladas de quadros de diarreia humano

Amostra	Fator de colonização (FC)	HMR*	Fenótipo enterotoxigênico
TR 50/3	CFA/I	homem, boi, galinha	STa
61	CFA/II (CS2)	boi	STa
M424-C1	CFA/II (CS1, CS3)	boi, galinha	LT
260-1	CFA/III	-**	STa
0509755	CFA/IV (CS4, CS6)	homem, boi	LT/STa
O159:H7	PCFO159	-	LT
244-1	PCFO2	boi, carneiro, cavalo, homem	LT
275-1	PCFO2	boi, carneiro, cavalo, homem	LT ⁺

*Hemaglutinação D-manose resistente

**Cepa autoaglutinante

3.1.3. Amostras teste

Diversas amostras de *Escherichia coli* mantidas no Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, isoladas de fezes diarreicas humanas foram reavaliadas quanto à produção de enterotoxinas, objetivando-se.

Assim sendo, a partir dos estoques, inicialmente cultivados em meio TSB (item 14.2) e incubados durante 5 horas a 37°C, as culturas foram semeadas em placas de Ágar *MacConkey* (item 12.4) (DIFCO) pelo método de esgotamento e incubadas a 37°C durante 24 horas, a fim de obter-se colônias isoladas.

A partir de cada amostra, 3 colônias lactose positivas foram selecionadas e, posteriormente, identificadas por provas bioquímicas, utilizando-se os meios EPM (item 12.5) (Toledo *et al.*, 1983a), MILI (item 12.6) (Toledo *et al.*, 1983b) e CITRATO de SIMONS (item 12.7) (Edwards & Ewing, 1972). As colônias isoladas e identificadas como *Escherichia coli* foram, a seguir, semeadas em tubos de ensaio contendo 4,0 mL do meio de CAYE (item 12.8) e incubadas em estufa com agitação (Controlled Environment Incubator Shaker - New Brunswick Scientific CO. - modelo DUBNOFF), a 120 ciclos/minuto durante 18 horas a 37°C, a fim de manter-se as condições de aerobiose, favoráveis à produção de enterotoxinas (Giannella, 1976). Decorrido este período, as culturas foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 45 minutos em centrífuga refrigerada (Centrífuga Beckman, JA-21). Após a centrifugação, os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados em frascos rotulados e mantidos a -20°C até o momento do uso. A partir destes sobrenadantes, as colônias foram avaliadas quanto à produção de STa e LT-I. Desta forma, 51 cepas ETEC e 32 não ETEC foram utilizadas neste trabalho, em provas de inibição do ELISA (Tabela III).

3.1.3.1. Provas para detecção de enterotoxinas

3.1.3.1.1. Prova do camundongo recém-nascido

Para detectar-se a produção de enterotoxina STa foi utilizado o teste do camundongo recém-nascido, proposto por Dean *et al.* (1972), sendo que grupos de quatro camundongos de 2 a 5 dias foram inoculados com o auxílio de uma sonda de poliestireno, por via esofágica.

3.1.3.1.2. Prova do GM1-ELISA para a detecção da enterotoxina LT-I

De acordo com metodologia descrita por Svennerholm *et al.* (1983), o teste do GM1-ELISA (Ganglioside-enzyme-linked immunosorbent assay) indireto foi utilizado para a detecção da enterotoxina LT-I, com algumas modificações. Neste teste foram utilizadas placas de fundo chato de 96 cavidades (Linbro-Titertek), sensibilizadas com 100µL das soluções de GM1 a 1µg/mL. Após a reação, procedeu-se a leitura das reações a 492 nm, em aparelho Labsystems Multiskan Bichromatic (Modelo 348).

Todas as reações foram desenvolvidas em duplicata, utilizando-se como controles positivos, soluções a 10µg/mL de toxina colérica (Sigma) e de LT-humana (Sigma), além de sobrenadantes de cultura das amostras 40T e H10407 de *E. coli*, cepas padrão de produção de LT-I. Como controles negativos utilizou-se meio de CAYE e sobrenadante de cultura da amostra K12 de *E. coli*.

Na determinação do cálculo do “cut off” da prova, tomou-se como base o trabalho descrito por Albert *et al.* (1991), considerando-se como positivas as amostras que apresentaram D.O. cujos valores corresponderam à média das D.O. dos controles negativos somada a cinco vezes o desvio padrão. Desta forma, apenas os sobrenadantes de cultura das amostras que apresentaram absorbâncias $A_{492} \geq 0,470$ foram consideradas como positivas para a produção de LT-I.

3.1.3.3. Detecção da enterotoxina LT-I em cultura de células Vero

A produção de LT-I também foi determinada, observando-se o efeito dos sobrenadantes de cultura de amostras de *E. coli* sobre células Vero (Speirs *et al.*, 1977). Inicialmente, foram preparadas monocamadas confluentes de células da linhagem Vero (rim de macaco Verde da África - ATCC: CCL81) em microplacas estéreis de 96 poços. Após desprezar-se o sobrenadante dos mesmos, 75µL de meio Eagle acrescido de 1% de gentamicina (70µg/mL) foi aplicado a cada orifício e 25µL dos sobrenadantes de culturas foram acrescentados aos mesmos. As microplacas foram, a seguir, colocadas em incubadoras umidificadas contendo 5% de CO₂. Observações de alterações morfológicas da cultura celular foram realizadas com o auxílio de microscópio invertido após 24 e 48 horas da incubação a 37°C. Amostras cujos sobrenadantes apresentaram atividade citotônica, com alteração celular característica de LT-I, foram consideradas positivas quanto à produção

desta enterotoxina. Todos os experimentos foram acompanhados por controles positivos (40T e H10407) e negativos (K12).

3.2. Purificação dos FC

3.2.1. Cultivo bacteriano

Os FC utilizados neste trabalho foram preparados de acordo com o protocolo de purificação descrito por Ricci *et al.* (1997), para a obtenção de PCFO2.

Desta forma, inicialmente as diversas amostras padrão de FC foram cultivadas em meio TSB, por 6 horas a 37°C. A partir desta pré-cultura, inóculos de 1 mL foram semeados em garrafas de Roux contendo 100 mL de meio CFA ágar (Evans *et al.*, 1977) (item 12.1). Estas garrafas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas, em posição invertida. De maneira geral, nos processos de purificação trabalhou-se com lotes de suspensões bacterianas procedentes de cultivos em 20 garrafas de Roux. Para a obtenção de PCFO2, pelo menos 30 lotes foram processados. Com relação aos demais FC, pelo menos 3 lotes de cada antígeno foram preparados.

O crescimento bacteriano de cada garrafa de Roux foi ressuspenso em 10 mL de salina 0,15M (item 13.2), com o auxílio de bastões de vidro estéreis, e centrifugado a 10.000 rpm (Centrifuga Beckman, JA-14) por 15 minutos. O sedimento bacteriano obtido de cada lote de 20 garrafas foi ressuspenso em um volume de 20 mL de tampão fosfato 0,05 M pH 7,4 (item 13.4) contendo 1M de NaCl e submetido a um tratamento de 30 minutos em banho-maria a 60°C, sob agitação constante.

Após a extração, a suspensão foi centrifugada a 10.000 rpm (Centrifuga Beckman, JA-14), por 30 minutos e o sobrenadante precipitado com 60% de sulfato de amônio pela adição lenta do sal macerado ao sobrenadante que foi mantido a 4°C sob agitação constante.

Após adição completa do sal, a agitação foi mantida por mais 1 hora, permanecendo a solução em repouso por 18 horas a 4°C para estabilização dos precipitados. Na sequência, o material foi centrifugado a 10.000 rpm (Centrifuga Beckman, JA-21), por 30 minutos, e o sedimento ressuspenso em um volume aproximado de 5 mL de PBS 0,05M

pH 7,4. A seguir, a solução foi dialisada contra o mesmo tampão, durante 48 horas a 4°C, procedendo-se várias trocas do mesmo, a fim de retirar-se o excesso de sulfato de amônio.

A seguir, o material obtido no item anterior foi dialisado por 72 horas a 4°C contra PBS 0,05M pH 7,4 acrescido de 0,5% de desoxicolato de sódio (DOC) (item 13.6), sob agitação constante. Após este período, o material foi centrifugado a 10.000 rpm (Centrífuga Beckman, JA-21), durante 30 minutos. Deste material, separou-se o sobrenadante que corresponde normalmente à fração fimbrial, denominada de fração DOC-solúvel (DS) e o precipitado, fração DOC-insolúvel (DI), representado principalmente pelo LPS bacteriano.

Na sequência, a fração DS foi novamente dialisada contra o mesmo tampão por mais 48 horas, com trocas freqüentes, para eliminação do excesso de DOC. Paralelamente, as frações DI foram ressuspensas, dialisadas em PBS e estocadas para análise em SDS-PAGE.

Apenas as frações DS da fimbria PCFO2 foram, posteriormente, dialisados contra PBS 0,05M pH 7,4 acrescido de 4M de uréia (item 13.5), durante um período de 24 horas. Esta última diálise teve a finalidade de equilibrar o material a ser aplicado na coluna de Sepharose 4B.

A seguir, alíquotas de 3 mL destas soluções foram aplicadas em coluna (2 x 80 cm) de Sepharose 4B (Pharmacia), equilibrada com PBS 0,05M pH 7,4 acrescido de 4M de uréia. Em seguida, o material foi eluído no mesmo tampão, tendo sido coletadas frações de aproximadamente 5mL por tubo, determinando-se a absorbância das mesmas a 280nm, em espectrofotômetro Beckman (Modelo DU-65). As frações correspondentes ao antígeno PCFO2 foram reunidas e, posteriormente, concentradas através de ultrafiltração em membrana PM 10, em aparelho AMICON. Na sequência, foram novamente dialisadas em PBS 0,05M pH 7,4 e analisadas em SDS-PAGE.

Os preparados que apresentaram mais de uma banda em SDS-PAGE, foram novamente dialisados em tampão PBS acrescido de uréia e re-cromatografados na mesma coluna, sob as mesmas condições. Considerou-se como purificados os preparados que apresentaram apenas uma banda protéica, após eletroforese em SDS-PAGE de géis corados por solução de coomassie blue.

3.3. SDS-PAGE

3.3.1. Preparo dos géis

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 “Hoefer Eletroforesis Catalog and Exercises” (1990-1991). Nas análises desenvolvidas, foram utilizados géis de separação contendo 10, 12,5 e 15% de acrilamida e gel de empacotamento a 4% , preparados como descrito na Tabela II.

Para a eletroforese, as amostras foram diluídas v/v em tampão de amostra (item 13.12) e aquecidas a 100°C durante 3 minutos, antes de sua aplicação no gel. A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-glicina (item 13.13), 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 4 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, utilizou-se 2 kits contendo peptídeos de baixo peso molecular: “Pre-stained protein molecular weight standards” (GIBCO BRL), contendo o primeiro 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) e o segundo: lisozima (14,3 kDa); α -lactoalbumina (18,4 kDa); anidrase carbônica (29 kDa); ovalbumina (43,0 kDa); soroalbumina bovina (68,0 kDa); fosforilase B (97,4 kDa) e miosina (200,0 kDa).

Após a corrida eletroforética, os géis eram retirados da cuba e imersos, inicialmente, em solução fixadora (item 13.14), permanecendo na mesma “overnight”. A seguir, os géis eram colocados na solução corante (item 13.15) por 60 minutos. Para remoção do excesso de corante, estes eram mergulhados em solução descorante (item 13.16), com trocas ocasionais da mesma, até a completa remoção da cor de fundo.

Após estes procedimentos, os géis foram imediatamente fotografados e, em alguns casos, desidratados pelo tratamento em solução de desidratação (item 13.17) por duas horas, seguida de montagem em papel celofane.

Tabela II- Preparo dos géis de poliacrilamida

Soluções	Gel de Separação			Gel de Empacotamento
	10%	12,5%	15%	4%
Solução 30%Acrilamida / 2,7% Bis-acrilamida	20mL	25mL	30mL	2,66mL
Tris-HCl pH 8,8	15mL	15mL	15mL	---
Tris-HCl pH 6,8	---	---	---	5,0mL
S.D.S. ¹	600µL	600µL	600µL	200µL
Água destilada	24,1mL	19,1mL	14,1 mL	12mL
Persulfato de amônia 10%	300µL	300µL	300µL	100µL
TEMED ²	20µL	20µL	20µL	10µL

- 1- Dodecil Sulfato de Sódio
2- N, N, N, N-Tetradimetilenodiamina

3.4. Preparo de soros policlonais contra os diferentes FC

No preparo dos soros anti-CFA/I, anti-CFA/II (CS2, CS3), anti-CFA/II (CS1, CS3), anti-CFA/III, anti-CFA/IV (CS4, CS6), anti-PCFO159 e anti-PCFO2 utilizou-se como antígenos amostras bacterianas cultivadas a 37°C e mortas em solução de salina formolada a 0,5% (Ricci *et al.*, 1997).

As imunizações foram realizadas em coelhos albinos, com pesos aproximados de 2 a 3 kg, aplicando-se cinco doses do antígeno, padronizado em suspensões segundo a escala 3 de MacFarland. Utilizou-se como via de inoculação a veia marginal da orelha, aplicando-se os volumes de 0,2 mL, 0,5 mL, 1,0 mL, 2,0 mL, 2,0 mL, com intervalos de quatro dias entre cada aplicação. Após 10 dias da última inoculação, procedeu-se a sangria de prova e em seguida a sangria total dos animais. Os soros obtidos foram, então, descomplementados, exaustivamente absorvidos com as mesmas cepas cultivadas a 16°C e estocados a -20°C até o uso.

3.5. Obtenção de anticorpos monoclonais anti-PCFO2

3.5.1. Expansão dos hibridomas

A partir dos estoques dos nove hibridomas produtores de MAbs reativos contra PCFO2, preparados em suspensões de contendo 1×10^6 células/mL e mantidos em “container” de nitrogênio líquido, as células foram rapidamente descongeladas a 37°C. A seguir, as suspensões celulares dos tubos de congelamento, contendo 1×10^6 células/mL, foram diluídas a 1/10 em meio RPMI completo (item 12.9) e centrifugadas a 1.500 rpm (Centrífuga Revan CR, SH-4X), à temperatura ambiente por 10 minutos. Os sedimentos foram, então, ressuspensos em 10 mL de meio RPMI completo, e as células transferidas para garrafas de cultura (T75, Corning), incubadas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂.

Para a indução de ascite contendo os MAbs anti-PCFO2, os hibridomas crescidos em cultura foram inoculados intraperitonealmente (i.p.) em camundongos BALB/c, que haviam sido previamente estimulados por injeção i.p. de 0,5mL de óleo mineral (NUJOL) por animal, cerca de 7 dias antes. Desta forma, alíquotas de 1,0mL da suspensão celular padonizada para 1×10^6 células/mL, foram injetadas em grupos de 5 a 10 camundongos, para cada tipo de hibridoma. Aproximadamente 10 dias após a inoculação das células, iniciou-se a coleta dos líquidos ascíticos, através da punção peritoneal do exudato acumulado. Foram realizadas cerca de 2 a 3 coletas de líquido ascítico de cada animal, antes que este fosse sacrificado.

Após cada coleta, o material de cada animal foi centrifugado a 1.500 rpm (Centrífuga Revan CR, SH-4X) por 10 minutos. Os sobrenadante das várias coletas, de cada tipo de hibridoma, foram no final reunidos, alíquotados (100uL/eppendorf) e estocados a -20°C até o momento do uso.

3.5.2. Congelamento dos hibridomas

Para re-estocagem, os clones de hibridomas secretores dos MAbs reativos com PCFO2, expandidos durante este trabalho foram, inicialmente, removidos das garrafas de cultura, após obtenção de monocamadas em semi-confluência. Após obtenção da suspensão celular, esta foi centrifugada a 1.500 rpm (Centrífuga Revan CR, SH-4X) por 10 minutos, à temperatura ambiente e o “pellet” celular ressuspenso em meio de congelamento

(item 12.10) acertando-se a concentração celular para 1×10^6 células/mL, aliquotada em tubos de congelamento (1mL/tubo). A seguir, os hibridomas permaneceram em “biofreezer” (-70°C) por 24 horas e foram transferidos para “container” com nitrogênio líquido (-196°C).

3.5.3. Purificação e concentração dos monoclonais a partir dos ascites

Neste trabalho, apenas os MAbs do isotipo IgG2b puderam ser purificados. Brevemente, nestes procedimentos cerca de 5 mL de líquido ascítico de cada clone foram aplicados em coluna de Sepharose Proteína-A (Sigma), equilibrada com tampão PBS 0,1M pH 8,0. Após 30 minutos de contato com a resina, o material não adsorvido foi removido por lavagem com o tampão de PBS 0,1M pH 8,0. A remoção de todo o material não adsorvido à resina foi monitorada em espectrofotômetro a 280 nm, até obter-se D.O(s) inferiores a 0,05. A seguir, procedeu-se a eluição da proteína retida na coluna, com tampão Glicina-HCl 0,1M pH 2,8 (item 13.28) coletando-se alíquotas de 5 mL em tubos contendo 400 μL de Tris-HCl pH 8,5, volume suficiente para neutralizar o tampão ácido. A eluição dos materiais adsorvidos à coluna foi acompanhada através de leituras cromatográficas a 280nm, as frações correspondentes aos picos cromatográficos foram reunidas e dialisadas contra tampão PBS 0,05M pH 7,4.

Com relação aos monoclonais do isotipo IgA, estes não foram purificados por não ter sido possível utilizar-se resinas específicas capazes de adsorver estes anticorpos.

3.6. Determinação da concentração protéica

As concentrações protéicas das soluções dos FC purificados ou semi-purificados, bem como dos anticorpos monoclonais obtidos, foram determinadas pelo método de Lowry modificado (Hartree, 1972).

3.7. ELISA (Enzyme linked immunoasorbent assay)

Inicialmente, ensaios imunoenzimáticos foram realizados para se determinar o título dos diferentes soros policlonais e das soluções de MAbs, frente aos antígenos homólogos e/ou heterólogos. Para esta finalidade, reações de ELISA indireto foram desenvolvidos, de acordo com os procedimentos indicados por Voller *et al.* (1976). Utilizou-se nestes testes, microplacas rígidas de 96 cavidades com fundo chato (Linbro/Titertek), sensibilizadas “overnight”, em câmara úmida a 4°C, com 50 µl das seguintes concentrações dos FC por orifícios: 10, 25 e 50 µg/mL, em se tratando da amostra PCFO2, e 50 e 100 µg/mL para as demais fimbrias semi-purificadas. A seguir, o excesso de antígeno foi removido e 3 lavagens consecutivas foram realizadas, em intervalos de 3 minutos cada, com solução de PBS/Tween (item 13.22).

O bloqueio de sítios ainda disponíveis nas placas foi realizado através da adição de 100µL/cavidade de solução PBS/Molico (item 13.26), incubando-se as mesmas durante 30 minutos a 37°C em câmara úmida. As placas foram lavadas como já descrito adicionando-se, a seguir, diferentes diluições dos anticorpos primários (monoclonal ou policlonal), preparados na razão de 1:2, em solução de PBS/Molico/Tween (item 13.27). Na sequência, as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C em câmara úmida. Após uma nova série de lavagens adicionou-se o anticorpo secundário correspondente conjugado à peroxidase (anti-IgG, anti-IgA de camundongo ou anti-IgG de coelho ligados à HRPO), em diluição de 1:1.000 para todos os conjugados. As placas foram incubadas por 1 hora, a 37°C, em câmara úmida. Após nova série de 3 lavagens, revelou-se a reação pela adição de 100µL da solução contendo 0,01% de H₂O₂ (Sigma) e diaminobenzidina (OPD - o-Phenylenediamine dihydrochloride - Sigma) (item 13.25) na concentração de 0,4mg/mL, em tampão citrato-fosfato 0,01M pH 5,0 (item 13.24) (Phosphate-Citrate Buffer Tablets - Sigma) preparado minutos antes do uso. As microplacas foram, a seguir, mantidas à temperatura ambiente durante 5 minutos, em ambiente escuro. Após este período, adicionou-se 50µL de H₂SO₄ 4M por cavidade, para bloquear a reação, procedendo-se a leitura das placas a 492 nm, em aparelho Labsystems Multiskan Bichromatic (Modelo 348).

Considerou-se como resultados positivos valores de D.O. superiores a 4 vezes a média 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.

3.8. Prova de Inibição do ELISA

Após a titulação dos soros policlonais e das soluções dos MABs, a capacidade de amostras de *Escherichia coli* produtoras de PCFO2 em inibir a ligação dos anticorpos às placas sensibilizadas com a fimbria PCFO2 purificada, foi analisada através da prova de Inibição do ELISA.

Nestes procedimentos, placas de ELISA de 96 cavidades (Limbro/Titertek) foram sensibilizadas “overnight”, a 4°C, com 10, 25 e 50µg/mL da fimbria PCFO2 purificada seguida de bloqueio como descrito no item anterior. Os MABs (“pool” dos isotipos IgA ou IgG2b), foram empregados em diluições que variaram entre 10 a 100 vezes mais concentrados que o título determinado anteriormente nas provas de ELISA indireta. Separadamente, em outra microplaca, as suspensões dos anticorpos foram misturadas v/v às suspensões bacterianas padronizadas a 10^{10} bactérias/mL. 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 tampão PBS/Tween 20 (item 13.22) durante três minutos cada e, adicionou-se o anticorpo secundário apropriado, conjugado à peroxidase (anti-IgG, anti-IgA de camundongo ou anti-IgG de coelho ligados à HRPO), diluído a 1:1000.

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 adicionou-se 100µL de solução contendo 0,01% de H₂O₂ (Sigma) e OPD (item 13.25) na concentração de 0,4mg/mL preparada em tampão citrato-fosfato 0,01M pH 5,0 (item 13.24), preparado minutos antes do uso. Na seqüência, as microplacas foram mantidas à temperatura ambiente durante 5 minutos, no escuro. Após este período adicionou-se 50µL de H₂SO₄ 4M por orifício, como bloqueador da reação, procedendo-se a leitura das reações a 492 nm, em leitor de placas (Labsystems Multiskan Bichromatic - Modelo 348).

Como controle das reações foram utilizados orifícios sensibilizados com PCFO2 purificada, em reações desenvolvidas de maneira similar, sem contudo misturar-se as bactérias aos anticorpos.

Em experimentos pilotos, foram considerados adequados os resultados nos quais as D.O dos controles foram superiores a 1,0. Apenas as amostras bacterianas que foram capazes de alterar a D.O. do controle, diminuindo-a em 50%, ou seja, obtendo-se $D.O. \leq 0,5$, foram consideradas positivas quanto à expressão da fimbria correspondente.

Com relação aos soros policlonais, procedimentos idênticos foram desenvolvidos com placas sensibilizadas com 25 e 50µg/mL de PCFO2.

Posteriormente, as provas foram desenvolvidas avaliando-se individualmente as soluções dos MAbs quanto à afinidade a epítopos de PCFO2. Desta forma, o título das mesmas foi determinado, bem como a melhor concentração da fimbria para a sensibilização das placas de ELISA.

Na avaliação da adequação da técnica, foram testadas 66 amostras de *E. coli*, sendo 51 cepas ETEC isoladas de fezes diarreicas humanas. As demais 15 cepas de *E. coli* não enterotoxigênicas testadas foram isoladas de fezes humanas diarreicas e normais.

Amostras positivas na Inibição do ELISA foram re-avaliadas quanto ao padrão HMR de PCFO2, frente a hemáceas de boi, galinha, cavalo, carneiro e humano.

3.9. Tratamento da fimbria PCFO2 extraída da amostra 244-1 com 6M de guanidina-HCl

A partir de um lote purificado e liofilizado da fimbria PCFO2, a partir da cepa 244-1, preparou-se uma suspensão a 1mg/mL em 6M de guanidina HCl-0,05M Tris (item 13.33). Esta solução foi incubada a 25°C, durante 2 horas. Para separação das possíveis subunidades livres, a solução tratada foi ultrafiltrada através de uma membrana XM 50 (Amicon) e após diálise do ultrafiltrado em PBS 0,05M pH 7,2, este foi novamente ultrafiltrado em membrana YM 10 (Amicon). O material retido na primeira e na última membrana foram coletados e analisados em SDS-PAGE, seguido por coloração com Coomassie Blue, e avaliados também em “Western blot”.

3.10. “Western blot”

A reatividade e a diluição adequada dos anticorpos policlonais anti-CFA/I, anti-CFA/II (CS1, CS3), CFA/II (CS2, CS3), CFA/III, CFA/IV (CS4, CS6), anti-PCFO159 produzidos em coelho, foram inicialmente avaliados frente aos FC homólogos em “Western blot”, realizado segundo indicações de Towbin *et al.* (1979). Desta forma, estando estes

antígenos semi-purificados, apenas as diluições capazes de revelar as bandas de P.M. correspondentes a estes FC foram utilizadas em análises posteriores.

A seguir, estes soros policlonais e anticorpos monoclonais anti-PCFO2 foram avaliados frente às fimbrias homólogas e heterólogas. Quanto à PCFO2, esta foi analisada após ter sido purificada a partir de amostras de *Escherichia coli* das cepas 275-1 e 244-1. Apenas a fimbria obtida da amostra 244-1 foi também avaliada após tratamento com guanidina-HCl 6M.

Na verificação de reconhecimento de epítomos, as fimbrias purificadas e semi-purificadas foram, inicialmente, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, conforme descrito no item 3.1. A seguir, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose com poros de 0,45µm (Amersham Life Science, Hybond™ - C), empregando-se uma diferença de potencial de 30V, durante 22 horas.

Após este período, o sistema foi desmontado e o gel corado com Coomassie Blue, para confirmar-se a eficiência da transferência. Paralelamente a membrana de nitrocelulose foi imersa em solução de Ponceau 3R (item 13.20) durante 5 minutos, também para confirmação da transferência das bandas existentes no gel para a membrana. A seguir, as membranas foram cortadas em diversas tiras e imersas em solução PBS/Molico/Triton (item 13.19), durante 40 minutos à temperatura ambiente.

Com relação à fita correspondente às proteínas do padrão de peso molecular, após ter sido revelada com a solução de Ponceau 3R por 5 minutos, à temperatura ambiente, esta foi posteriormente seca entre folhas de papel de filtro. As demais tiras em teste foram incubadas com os diferentes soros e MAbs diluídos em diversas concentrações em PBS/Triton/Molico “overnight” à temperatura ambiente. Decorrido este período, as tiras foram lavadas 2 vezes com PBS/Triton (item 13.32), por 20 minutos cada, sob agitação constante. Em seguida, estas foram incubadas com soluções diluídas dos anticorpos secundários, correspondentes aos conjugados diluídos a 1:1.000 em solução de PBS/Triton/Molico, permanecendo a reação durante 1 hora e meia à temperatura ambiente, com agitação constante.

A seguir, após remoção dos conjugados, as tiras foram lavadas com solução de PBS/Triton (item 13.32) durante 1 hora, seguida de mais duas lavagens com solução de Tris-HCl 0,05M pH 7,4 (item 13.23) durante 20 minutos cada. Procedeu-se a revelação das bandas mediante a adição de solução contendo 0,01% de H₂O₂ e diaminobenzidina (DAB-

Peroxidase Substrate Tablet Set - Sigma) (item 13.21). Após 5 minutos, as tiras de nitrocelulose foram lavadas em água de torneira, para bloqueio imediato 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.

3.11- Imunomicroscopia eletrônica

3.11.1- Preparo das telas

As amostras bacterianas 244-1 e 275-1, além das cepas CFA/II (CS2, CS3) CFA/II (CS1, CS3), CFA/III e CFA/IV (CS4, CS6) foram, inicialmente, cultivadas em meio CFA líquido (Evans *et al.*, 1975). Padronizou-se para as observações os cultivos destas amostras por 18 h a 37°C em 3 ml deste meio. Como controles, foram utilizadas culturas das mesmas cepas a 16°C, por 48 h (após pré-cultura na mesma temperatura).

Para o preparo das suspensões bacterianas, alíquotas de 1 mL das culturas foram transferidas para tubos eppendorf e submetidas à centrifugação de 2.500 rpm (Centrífuga para eppendorfs, Revan) por 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensão em 20µL de tampão PBS 0,05 M, pH 7,4. A seguir, uma gota de cada suspensão bacteriana foi colocada sobre a superfície de uma tira de “parafilm” e com o auxílio de uma pinça de ponta fina, telas de cobre de 400 “mesh”, recobertas com película de parlódio, foram depositadas individualmente sobre as suspensões e removidas após 20 minutos, tirando-se o excesso de líquido das mesmas com o auxílio de papel de filtro.

A seguir, para a observação da(s) estrutura(s) bacterianas marcadas pelos anticorpos monoclonais, utilizou-se a técnica do “immunegold”, empregando-se na revelação das reações antígeno-anticorpo, um segundo anticorpo reativo contra o primeiro conjugado com ouro coloidal (Viboud *et al.*, 1993b).

Desta forma, as telas de cobre contendo as bactérias foram depositadas, individualmente, sobre 20µL de soluções dos anticorpos monoclonais 1D1C5 e 2C4F12 (Tabela IV) diluídos a 1/50 em tampão PBS-BSA 1% (item 13.31) e depositadas, também, sobre “parafilm”. A seguir, as telas foram mantidas em câmara úmida, à temperatura

ambiente, por 1 hora. Após esse período, o excesso de líquido foi removido e as telas lavadas cinco vezes em tampão PBS-BSA 1%.

As reações desenvolvidas com os anticorpos monoclonais do isotipo IgG2b foram reveladas de forma indireta, com anti-IgG de camundongo conjugado com ouro coloidal (SIGMA, partículas de 10 nm de diâmetro), diluído a 1/50 em PBS 0,05M pH 7,4 e incubadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 1 hora. A seguir, o excesso de líquido das telas foi removido com papel de filtro e lavadas por cinco vezes, em tampão PBS 0,05M pH 7,4, tendo sido o excesso de líquido removido com papel de filtro.

Com relação às telas incubadas com MAbs do isotipo IgA, estas foram, inicialmente, depositadas sobre 20 µL de soro anti-imunoglobulina total de camundongo, preparado em coelho, diluído a 1/50 em PBS-BSA 1%, por uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Após este período, as telas foram lavadas por cinco vezes em tampão PBS-BSA 1%. Após remoção do excesso de líquido, as telas foram depositadas sobre 20µL de soro anti-IgG de coelho conjugado com ouro coloidal (SIGMA, partículas de 10 nm de diâmetro), a 1/50 em PBS-BSA 1% e incubadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 1 hora. Após remoção do excesso de líquido, as telas foram lavadas por cinco vezes em tampão PBS 0,05M pH 7,4.

Para fixação da reação, as telas foram depositadas por 1 minuto sobre 20µL de solução de glutaraldeído a 2% (item 13.29), utilizando-se “parafilm” como suporte da reação. Após este período, as telas foram lavadas por duas vezes em água Milli-Q estéril, o excesso de líquido removido, colocando-se as mesmas sobre aliquotas de 20µL de ácido fosfotúngstico a 1% (item 13.30) para contraste da reação, por 20 minutos. Finalmente, as telas foram lavadas, secas e guardadas em porta-telas apropriado.

A observação destas preparações foi realizada em M.E.T. (Microscópio Zeiss, modelo LEO-906), tendo sido as fotomicrografias eletrônicas obtidas, reveladas e ampliadas em papel fotográfico Kodabrome print RC-F3.

3.12. Meios de cultura utilizados

3.12.1. Meio CFA (“Colonization Factor Agar”)

Meio Base

Casaminoácidos-----10 g
 Extrato de levedura-----1,5 g
 Água destilada-----1000 mL

Solução A

MgSO₄ . 7H₂O-----0,1 g
 Água destilada-----100 mL

Solução B

MnCl₂ . 4H₂O-----0,78 g
 Água destilada-----100 mL

No caso do meio CFA sólido, adicionou-se ágar bacteriológico na concentração final de 2,0%.

Para cada 100 mL do meio base, adicionou-se 1 mL da solução A e 1 mL da solução B. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 1N. O meio foi esterilizado em autoclave durante 20 minutos a 120°C.

3.12.2. Meio TSB

Tryptic Soy Broth -----30 g
 Água destilada-----1000 mL

Após dissolução completa, o meio foi esterilizado em autoclave durante 20 minutos a 120°C.

3.12.3. Meio de Dorset

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

Após ter sido distribuído assepticamente em tubos estéreis, esse meio foi esterilizado em autoclave por vapor fluente por 15 minutos, até a pressão de 2 atmosferas.

3.12.4. Meio Ágar MacConkey

Ágar MacConkey-----7,5 g
 Água destilada-----150 mL

A mistura foi levada 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.

3.12.5. Meio EPM

A - Base

Triptona-----10,0 g
 Extrato de carne-----2,0 g
 Cloreto de sódio-----5,0 g
 Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)-----2,0 g
 L-triptofano-----1,0 g
 Solução alcoólica de azul de bromotimol a 1,5%-----2,0 mL
 Ágar-----11,0 g
 Água destilada q.s.p.-----1000 mL

Todos os componentes foram adicionados à água, e a mistura foi aquecida até fusão 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-----2,0 g
 Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)-----2,0 g
 Glicose-----10,0 g
 Uréia-----40,0 g
 Água destilada-----85,0 mL

A mistura foi aquecida em banho-maria a 65°C, com agitação constante, até completa dissolução e esterilizada na mesma temperatura durante 20 minutos.

C - Preparo final do meio

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

Após o resfriamento da base (A) a aproximadamente 65°C, adicionou-se, assepticamente a solução (B). A mistura foi homogenizada e distribuída em volumes de 4,0 mL, em tubos de 12 x 120 mm estéreis, deixando-se solidificar em posição inclinada de maneira a se obter uma base de pelo menos 3,5 cm. (Obs: meio pronto apresenta coloração verde).

3.12.6. Meio MILI (Motilidade - Indol - Lisina)

Extrato de levedura-----	3,0 g
Peptona-----	10,0 g
Triptona-----	10,0 g
L-lisina-----	10,0 g
Glicose-----	1,0 g
Ágar-----	2,0 g
Bromocresol púrpura-----	0,02 g
Água destilada q.s.p.-----	1000 mL

Todos os componentes foram adicionados à água destilada e a mistura foi aquecida até dissolução completa do ágar. O pH do meio foi ajustado para 6,5 e procedeu-se a esterilização em autoclave a 121°C, durante 20 minutos. O meio esterilizado foi distribuído o meio em volumes de 4,0 mL, em tubos de 10 x 100 mm estéreis, deixando-se solidificar em posição vertical. Os tubos foram armazenados a 4°C. (Obs: o meio pronto apresenta a coloração roxa).

3.12.7. Meio Ágar Citrato de Simmons (DIFCO)

Ágar citrato de Simmons-----	24,2 g
Água destilada q.s.p.-----	1000 mL

Todos os elementos foram dissolvidos em água destilada e distribuídos em alíquotas de 2 mL em tubos 13 x 100 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).

3.12.8. Meio de CAYE ("Casamino Acids Yeast Extract")

Meio Base

Extrato de levedura -----	6,0 g
Casaminoácidos -----	20,0 g
NaCl -----	2,5 g
K ₂ HPO ₄ -----	8,75 g
H ₂ O destilada q.s.p. -----	1000 mL

O pH foi ajustado para 8,5.

Solução de sais

MgSO ₄ -----	5,0%
MnCl ₂ . 4H ₂ O -----	0,5%
FeCl ₃ -----	0,5%

A solução foi preparada dissolvendo-se os sais em 100 mL de H₂SO₄ 0,001M e esterilizada por filtração em membrana Millipore 0,22µm. Adicionou-se 1,0 mL da solução de sais para cada 1000 mL do meio base esterilizado.

3.12.9. Meio RPMI completo

RPMI - Sigma -----	10,4 g
Bicarbonato de sódio -----	2,0 g
HEPES (0,125 mM) -----	2,95 g
(N-2 hidroxietilpiperazina-N-2-ácido-etano-sulfônico)	
2-mercaptoetanol -----	2,0 µL
gentamicina -----	50 mg
soro fetal bovino -----	100 mg
água bidestilada q.s.p. -----	1000 mL

3.12.10. Meio de congelamento

Soro fetal bovino -----	2,0 mL
dimetilsulfóxido -----	2,0 mL
Meio RPMI q.s.p. -----	20 mL

3.12.11. Meio BHI

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

3.13. Soluções utilizadas**3.13.1. Salina 3M**

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

3.13.2. Salina 0,15M

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

3.13.3. Tampão PBS 0,05M pH 7.4

Salina 3M-----50 mL
 Tampão Fosfato 0,5M-----100 mL
 Água destilada q.s.p-----850 mL

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

O tampão fosfato de sódio foi preparado ajustando-se a solução de fosfato bibásico (item 15.4) para pH 7,4 com auxílio do potenciômetro, com a solução fosfato de sódio monobásico (item 15.5).

3.13.4.1. Solução de fosfato de sódio bibásico 0,5M

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

3.13.4.2. Solução de fosfato de sódio monobásico 0,5M

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

3.13.5. Solução de PBS 0,05M pH 7,4 acrescido de 4M de uréia

Uréia-----240,24 g

Tampão fosfato de sódio 0,5M pH 7,4 q.s.p-----1000 mL

3.13.6. Solução de PBS 0,05M pH 7,4 com DOC a 5%

Desoxicolato de sódio puro (DOC)-----5 g

Tampão PBS 0,05M pH 7,4-----1000 mL

3.13.7. Solução de Acrilamida (30%) bis-acrilamida (2,7%)

Acrilamida-----58,4 g

Bis-acrilamida-----1,6 g

H₂O bidestilada q.s.p.-----200 mL

Armazenada a 4°C em frasco escuro

3.13.8. Tampão TRIS HCl 1,5M pH 8,8

Tris-----36,3 g

Água bidestilada q.s.p.-----200 mL

O pH foi ajustado para 8,8 com HCl.

3.13.9. Tampão TRIS HCl 0,5M pH 6,8

Tris-----3,0 g

Água bidestilada q.s.p.-----50 mL

O pH foi ajustado para 6,8 com HCl.

3.13.10. Solução de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%

SDS -----10 g

Água bidestilada q.s.p -----100 mL

OBS: A solução foi aquecida a 37°C, até completa dissolução.

3.13.11. Solução de persulfato de amônio (10%)

Persulfato de amônio-----0,5 g

Água bidestilada q.s.p.-----5 mL

3.13.12. Tampão de amostra (2x)

TRIS HCl 0,5M pH 6,8 -----2,5 mL
 SDS 10% -----4 mL
 Glicerol -----2 mL
 2-Mercaptaetanol -----1 mL
 Azul de bromofenol -----0,025%
 Água bidestilada q.s.p. -----10 mL

A solução foi dividida em aliquotas e armazenada em freezer a -20°C.

3.13.13. Tampão de Corrida Tris 0,025M pH 8,3; Glicina 0,192M; SDS 0,1%

Trizma -----3 g
 Glicina -----14,4 g
 SDS 10% -----10 mL
 H₂O bidestilada q.s.p.-----1000 mL

3.13.14. Solução Fixadora

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

3.13.15. Solução corante

Coomassie blue -----1,25 g
 Ácido acético -----46 mL
 Metanol a 5% -----454 mL

3.13.16. Solução descorante

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

3.13.17. Solução de desidratação

Metanol -----	65%
Glicerol -----	0,5%
Água destilada -----	345%

3.13.18. Solução de transferência

Metanol -----	200 mL
Trizma -----	3,0 g
Glicina -----	14,4 g
Água destilada q.s.p.-----	1000 mL

3.13.19. Solução PBS/Molico/Triton

Leite desnatado Molico -----	3,0 g
Triton X-100 -----	0,1 mL
Tampão PBS 0,05M pH 7,4 q.s.p.-----	100 mL

3.13.20. Solução de Ponceau 3R

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

3.13.21. Solução reveladora Sigma Fast™ DAB Tablet Set

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

3.13.22. Solução PBS/Tween

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

3.13.23. Tris-HCl 0,05M pH 7,4

Trizma -----0,6g
 Água destilada -----100 mL
 O pH da solução foi ajustado para 7,4 com HCl 0,1M

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

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

3.13.25. Solução de o-Phenylenediamine (OPD) dihydrochloride (Sigma)

o-Phenylenediamine (OPD) dihydrochloride -----2mg (2 tabletes)
 Água bidestilada -----5 mL
 H₂O₂ 3% -----40 µl

3.13.26. Solução PBS/Molico

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

3.13.27. Solução PBS/Molico/Tween

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

3.13.28. Tampão Glicina-HCl 0,1M pH 8,0

Glicina -----0,75g
 Água destilada -----100mL
 O pH foi ajustado para 2,8 com HCl 0,1M

3.13.29. Solução glutaraldeído 2%

Glutaraldeído (25%) -----8mL
 PBS 0,1M pH 7,4 -----100mL

3.13.30. Solução de ácido fosfotúngstico (PTA)

Ácido fosfotúngstico (PTA) -----0,5g

Água Milli-Q q.s.p. -----50mL

O pH da solução foi ajustado para 7,4 com solução de hidróxido de potássio (KOH) 10N, e a solução final filtrada em membrana 0,22 μ m (Millipore).

3.13.31. Tampão PBS-BSA 1%

Soro Albumina Bovina (BSA) -----1g

PBS 0,05M pH 7,4 -----100mL

3.13.32. PBS/Triton

PBS 0,05 pH 7,4 -----100mL

Triton X100 -----0,1mL

3.13.33. 6M de Guanidina HCl-0,05M Tris

Guanidina-HCl -----5,73g

Tris 0,05M -----10mL

4. RESULTADOS

4.1. Purificação dos FC

4.1.1. Avaliação em SDS-PAGE

Após obtenção e purificação da fimbria PCFO2, verifica-se pela Figura 1 o padrão de bandas dos materiais obtidos após precipitação dos extratos bacterianos e diálise contra desoxicolato de sódio (DOC). Desta forma, é possível observar-se que na fração DOC-solúvel (DS) (1A, linhas h e i), é visível a presença de uma banda de P.M. de 34,5 kDa, correspondente à fimbria PCFO2. Por outro lado, na fração DOC-insolúvel (DI) esta banda aparece com maior intensidade, porém com maior número de contaminantes. Durante as diversas avaliações destas frações, estes resultados não foram constantes, apresentando-se as mesmas com a banda de PCFO2 revelada com igual intensidade tanto na fração DS como DI (resultados não apresentados).

Na mesma Figura, pode-se também verificar o perfil eletroforético das frações DS e DI das fimbrias CFA/I, CFA/II (CS2, CS3), CFA/II (CS1, CS3), CFA/III, CFA/IV (CS4, CS6) e PCFO159, obtidas pelos mesmos procedimentos empregados na purificação de PCFO2. Com relação aos demais fatores, nas diversas avaliações de CFA/I (Fig. 1A, linhas b, c), CFA/II (CS1, CS3) (Fig. 1A, linhas e, f), CFA/IV (CS4, CS6) (Fig. 1B, linhas d, e) e PCFO159 (Fig. 1B, linhas f, g), verificou-se que na fração DS o processo de purificação dos fatores de colonização apresentou-se adequado, com eliminação de muitos contaminantes, quando comparados às frações DI. Nesta última fração, apesar de na maioria destas ter sido coradas bandas de P.M. correspondentes ao FC, o número de contaminantes torna esta fração inadequada.

Por outro lado, a fração DI dos preparados dos FC CFA/II (CS2, CS3) e CFA/III foi mais adequada, levando-se em consideração a concentração protéica das bandas obtidas. Inclusive, com relação à CFA/III, em ambas as frações, a presença de duas bandas foram observadas.

No caso dos purificados de CFA/III, estes foram avaliados também frente aos soros anti-CFA/II, demonstrando-se ser a banda de menor peso molecular correspondente à CS2 (dados não mostrados).

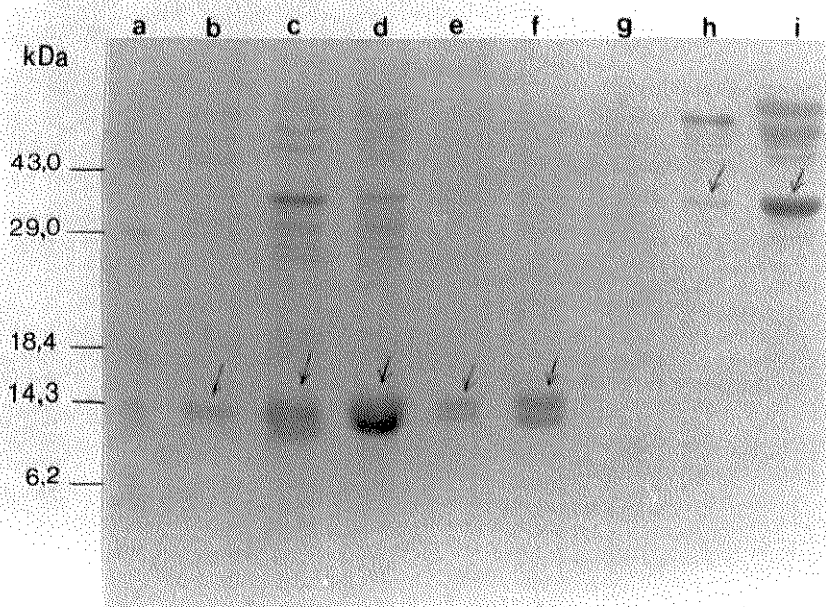
Com base nestes resultados, frações DS ou DI dos diferentes FC foram utilizadas nos testes posteriores.

Com relação à fimbria PCFO2, fração DS dos extratos obtidos a partir das amostras 244-1 e 275-1 foram submetidas a duas cromatografias consecutivas em Sepharose 4B (Figuras 2 e 3).

Desta forma, após leitura a 280 nm, os picos de cromatografia foram reunidos, concentrados e analisados. As frações correspondentes à PCFO2, quando não apresentaram apenas uma banda, foram novamente re-cromatografadas

Pela Figura 4, pode-se verificar em SDS-PAGE, que após a segunda cromatografia em coluna de Sepharose 4B a fimbria PCFO2 apresentou-se purificada, após coloração do gel com Coomassie blue.

1A



1B

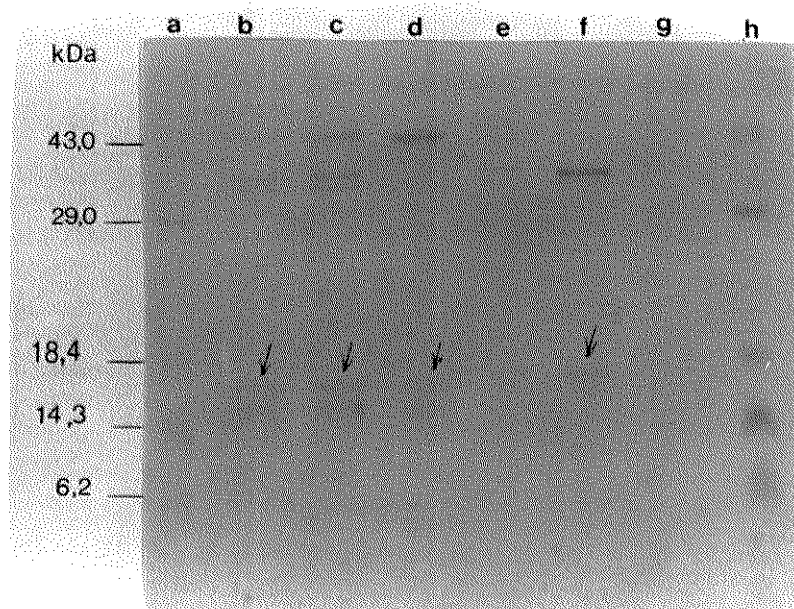


Figura 1- SDS-PAGE a 15% das frações DS e DI dos extratos semi-purificados dos diferentes fatores de colonização de *Escherichia coli* enterotoxigênica.

Legenda: 1A- a) Padrão de Peso Molecular (GIBCO BRL); b) CFA/I fração (DS); c) CFA/I (DI); d) CFA/II (CS2, CS3)(DS); e) CFA/II (CS2, CS3) (DI); f) CFA/II (CS1, CS3) (DS); g) CFA/II (CS1, CS3) (DI); h) PCFO2 244-1 (DS); i) PCFO2 244-1 (DI).

Legenda: 1B- a e h) Padrão de Peso Molecular (GIBCO BRL); b) CFA/III (DS); c) CFA/III (DI); d) CFA/IV (CS5, CS6)(DS); e) CFA/IV (CS4, CS6)(DI); f) PCFO159 (DS); g) PCFO159 (DI). Flechas indicativas das bandas correspondentes aos respectivos FC.

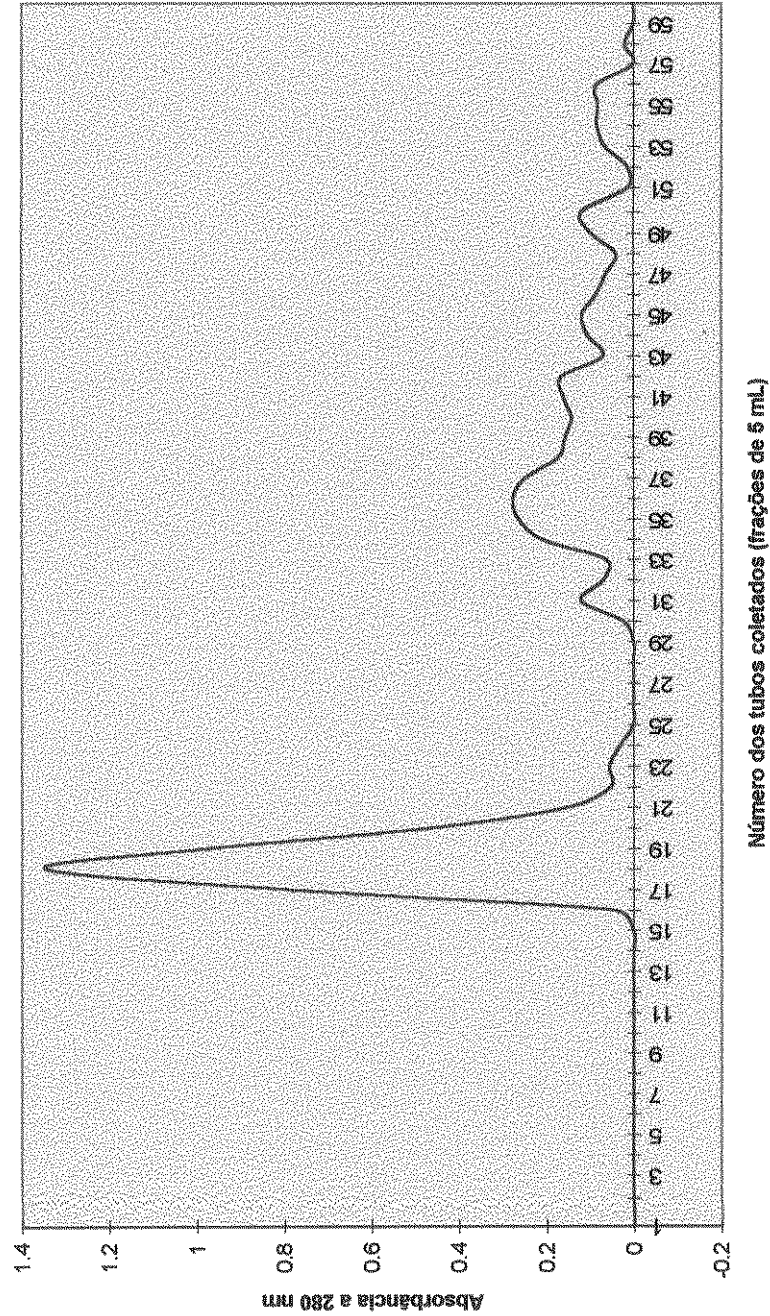


Figura 2 - Cromatografia em Sepharose 4B da fração DS da fimbria PCFO2 extraída a partir da amostra 244-1 de *Escherichia coli*

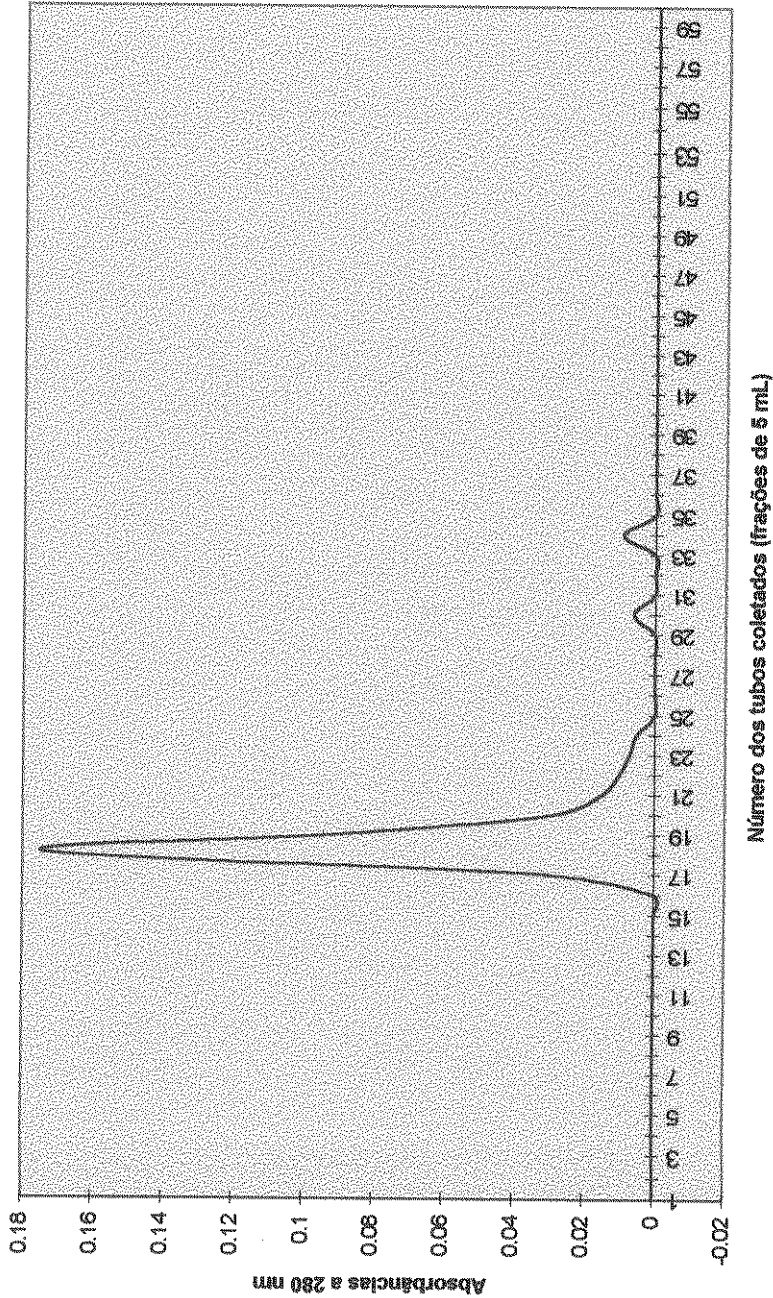


FIGURA 3 - Re-cromatografia em Sepharose 4B de frações eluídas da fimbria PCFO2 extraída da amostra 244-1 de *Escherichia coli*.

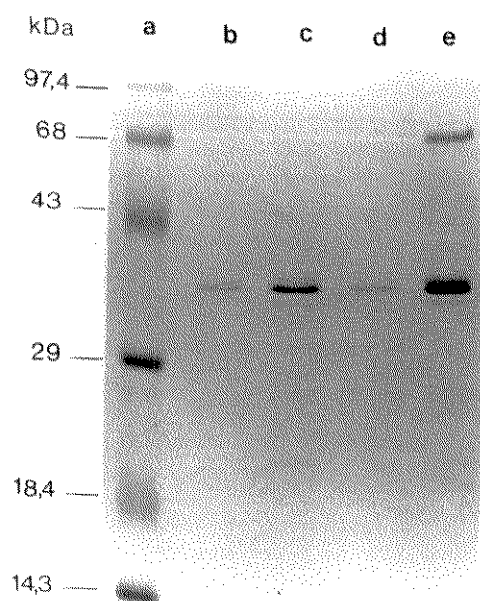


Figura 4 - Avaliação da purificação de PCFO2 em SDS-PAGE a 15%, após cromatografias em Sepharose 4B.

Legenda: a) Padrão de Peso Molecular (GIBCO BRL); b) PCFO2 purificada a partir da amostra 244-1; c) PCFO2 purificada a partir da amostra 244-1, após a primeira cromatografia em Sepharose 4B; d) PCFO2 purificada a partir da amostra 275-1; e) PCFO2 purificada a partir da amostra 275-1, após a primeira cromatografia em Sepharose 4B.

4.1.2. “Western blot”

4.1.2.1. Reatividade dos soros policlonais frente aos antígenos homólogos

Os soros policlonais anti-CFA/I, anti-CFA/II (CS2, CS3), anti-CFA/II (CS1, CS3), anti-CFA/III, anti-CFA/IV (CS4, CS6), anti-PCFO159 e anti-PCFO2, após terem sido exaustivamente absorvidos com as cepas homólogas de *E. coli* cultivadas a 16°C foram avaliados quanto a sua reatividade frente aos fatores homólogos semi-purificados (Figura 5). Estes soros reagiram com várias bandas presentes, porém reações com maior intensidade foram observadas com bandas de P.M. compatíveis aos descritos na literatura.

Os soros policlonais anti-PCFO2, preparados com as amostras 244-1 e 275-1, foram avaliados quanto a sua reatividade frente às fimbrias purificadas a partir de ambas as cepas através de reações de “Western blot”. A reatividade destes soros pode ser observada na Figura 6 (linhas g e h), onde além da presença da banda de P.M. 34,5 kDa foi detectada pelos anticorpos contidos nos soros imunes, uma banda de P.M. 52 kDa.

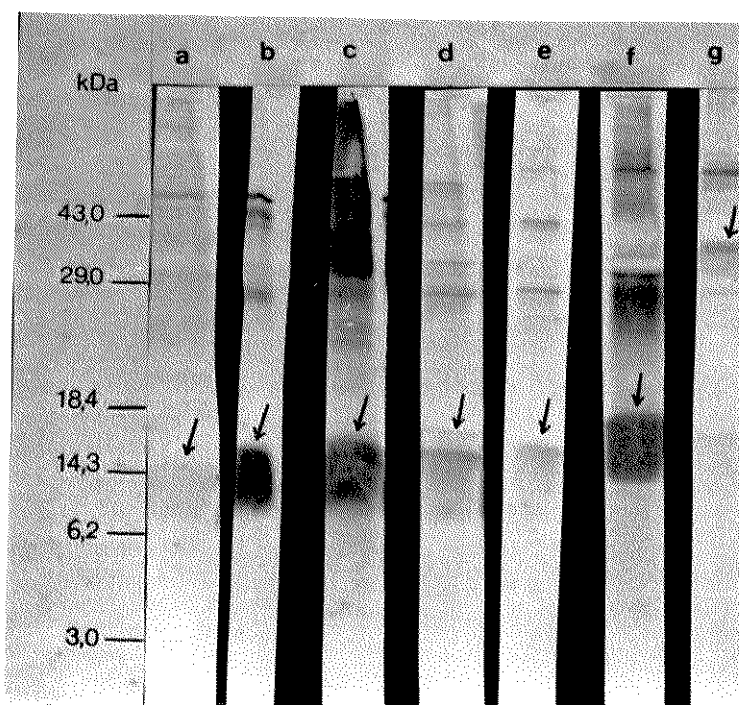


Figura 5- Análise da reatividade dos diferentes soros policlonais frente aos FC homólogos.

Legenda: Padrão de peso molecular (GIBCO BRL); a) CFA/I; b) CFA/II (CS2, CS3); c) CFA/II (CS1, CS3); d) CFA/III; e) CFA/IV (CS4, CS6); f) PCFO159; g) PCFO2. Flechas indicativas das reações positivas, correspondentes ao P.M. dos respectivos FC.

4.1.2.2. Reatividade dos soros anti-FC frente à fímbria PCFO2

purificada

Os soros policlonais anti-CFA/I, anti-CFA/II (CS2, CS3), anti-CFA/II (CS1, CS3), anti-CFA/III, anti-CFA/IV (CS4, CS6) e anti-PCFO159 foram empregados para a investigação de sua reatividade com a fímbria PCFO2, através de reações de “Western blot”. Na Figura 6 (linhas a, b, c, d, e, f) pode-se verificar que estes soros foram capazes de detectar a banda de 34,5 kDa, na preparação purificada de PCFO2, além de bandas de P.M. aproximado de 52 kDa, transferidas para o papel de nitrocelulose. Somente o soro anti-CFA/IV (CS4, CS6) reconheceu apenas a banda de 34,5 kDa (linha e).

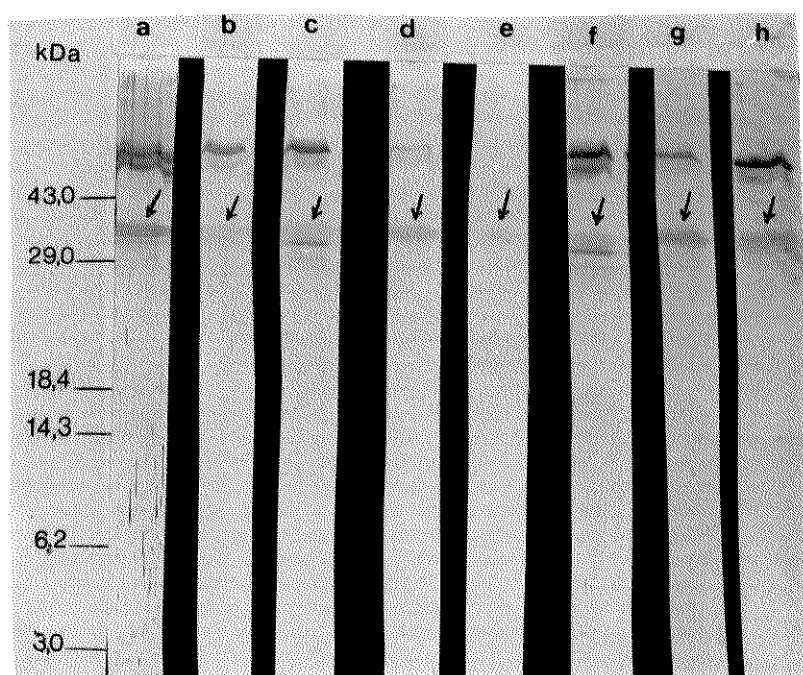


Figura 6- Reações da fímbria PCFO2 com soros policlonais produzidos contra diferentes FC.

Legenda: Padrão de peso molecular (GIBCO BRL); a) anti-CFA/I; b) anti-CFA/II (CS2, CS3); c) anti-CFA/II (CS1, CS3); d) anti-CFA/III; e) anti-CFA/IV (CS4, CS6); f) anti-PCFO159; g) anti-PCFO2 (244-1); h) anti-PCFO2 (275-1). Flechas indicativas de bandas correspondentes ao P.M. de PCFO2

4.2. Determinação dos títulos dos diferentes soros policlonais anti-FC e dos anticorpos monoclonais anti-PCFO2

4.2.1. Titulação por soroaglutinação

Apenas os soros policlonais produzidos em coelhos imunizados com os diversos FC foram titulados através de soroaglutinação em lâmina. Somente a amostra padrão do FC CFA/III foi titulada através da técnica de imunodifusão em gel, uma vez que a cepa apresenta característica autoaglutinante, quando ressuspensa em salina.

Os resultados destas titulações estão apresentados na Tabela III. Como pode-se observar, os títulos desses soros frente às cepas homólogas variaram de 1:1.280 a 1:6.400. Contra cepas heterólogas não foram observadas reações positivas. Todos os soros foram utilizados após exaustiva absorção com a cepa homóloga crescida a 16°C.

Tabela III- Título dos soros policlonais determinado por soroaglutinação em lâmina

Antissoro	Título
anti-CFA/I	1:3.200
anti-CFA/II (CS2, CS3)	1:2.560
anti-CFA/II (CS1, CS3)	1:1.280
anti-CFA/III	nd
anti-CFA/IV (CS4, CS6)	1:3.200
anti-PCFO159	1:1.280
anti-PCFO2 (244-1**)	1:6.400
anti-PCFO2 (275-1**)	1:5.120

** Amostra utilizada na obtenção do soro

4.2.2. Titulação por ELISA indireto

4.2.2.1. Soros policlonais

A reatividade dos diferentes soros policlonais anti-FC obtidos, foi também determinada, titulando-se os mesmos em ELISA indireto, em placas sensibilizadas com os antígenos homólogos e com PCFO2.

Como pode ser observado na Tabela IV, os títulos obtidos variaram de 1:160 até 1:640, mesmo quando o antígeno foi utilizado puro, como no caso da PCFO2.

Determinando-se os títulos dos demais soros anti-FC frente à PCFO2, pode-se verificar pelas Tabelas IV e V, que os soros anti-CFA/II (CS2, CS3) e CFA/II (CS1, CS3) foram equivalentes aos obtidos com seus antígenos homólogos, sugerindo homologia de epítomos entre estes FC.

Tabela IV- Determinação em ELISA indireto dos títulos dos soros policlonais anti-FC, frente aos antígenos homólogos*.

Antissoro	Título
anti-CFA/I	1:320
anti-CFA/II (CS2, CS3)	1:640
anti-CFA/II (CS1, CS3)	1:640
anti-CFA/III	1:160
anti-CFA/IV (CS4, CS6)	1:160
anti-PCFO159	1:640
anti-PCFO2 (244-1**)	1:320
anti-PCFO2 (275-1)**	1:640

*Placas sensibilizadas com 100µg/mL das soluções semi-purificadas dos diversos FC, exceto PCFO2 (50µg/mL); com base nos resultados anteriores, frações DS ou DI foram utilizadas.

** Amostra utilizada no preparo do soro.

Tabela V- Determinação em ELISA indireto do título dos soros policlonais anti-FC, em placas sensibilizadas com a fimbria PCFO2*.

Antissoro	Título
anti-CFA/I	1:10
anti-CFA/II (CS2, CS3)	1:320
anti-CFA/II (CS1, CS3)	1:320
anti-CFA/III	1:20
anti-CFA/IV (CS4, CS6)	1:10
anti-PCFO159	1:20

* Placas sensibilizadas com 50µg/mL de PCFO2 purificado

4.2.2.2. Anticorpos monoclonais

Verifica-se na Tabela VI os títulos dos MAb's anti-PCFO2 determinados em ELISA indireto. Com relação a alguns MAb's do isotipo IgG2b, estes foram avaliados antes e depois da purificação dos líquidos ascíticos em coluna de Sepharose Proteína-A. Na mesma Tabela são apresentadas as concentrações protéicas das soluções obtidas, incluindo os títulos das soluções de MAb's anti-PCFO2, pertencentes ao isotipo IgA, não purificadas. Desta forma, é possível observar-se que os títulos das soluções de MAb's do isotipo IgA foram, em média, superiores aos do isotipo IgG2b, empregando-se a fimbria PCFO2 purificada a 50µg/mL na sensibilização das placas. O título médio das soluções de anticorpos do isotipo IgG2b foi correspondente a 1:480.000 e do isotipo IgA a 1:704.000. Quanto à purificação dos anticorpos IgG2b por cromatografia em Sepharose-Proteína O processo resultou em diminuição de aproximadamente 30% dos títulos dos respectivos anticorpos, provavelmente devido à desnaturação do anticorpo durante a sua eluição em tampão de pH ácido (pH 2,8).

“Pools” das soluções dos MAb's dos isotipos IgG2b e IgA foram preparados pela mistura dos ascites, tendo-se como base as concentrações protéicas de cada material. Após serem titulados por ELISA indireto, verificou-se títulos superiores no “pool” de IgA, quando comparados aos de IgG2b (Tabela VI). Pela mesma Tabela, não foi verificada correlação direta entre concentração protéica e título no ELISA indireto. Uma vez que os anticorpos 1D1C5 e 1D1E7, do isotipo IgA, além do anticorpo 2C4F12 apresentaram os maiores títulos no ELISA indireto (Tabela VI), estes foram selecionados, além dos “pools”, para as avaliações subsequentes.

4.3. Avaliação da reatividade dos anticorpos monoclonais em ELISA indireto

Ensaio de ELISA indireto também foram empregados para se avaliar a reatividade dos MAb's anti-PCFO2, utilizando-se os “pools” das soluções dos isotipos IgA e IgG2b, frente aos demais FC semi-purificados. Desta forma, como apresentado nas Tabelas VII e VIII, reações positivas contra os FC heterólogos foram verificadas quando o “pool” de MAb's do isotipo IgA foi utilizado no teste, em especial frente à CFA/II (CS1, CS3) e CFA/IV (CS4, CS6). Com relação ao “pool” de MAb's do isotipo IgG2b, este foi capaz de reagir apenas com orifícios sensibilizados com PCFO2.

Tabela VI - Dosagem protéica e determinação dos título das soluções dos anticorpos monoclonais; antes e após purificação em Sepharose-Proteína A *

Designação dos MAb	Isotipo	Líquido ascítico		Soluções purificadas	
		Dosagem protéica total (mg)	Título***	Dosagem protéica total (mg)**	Título
2C4E10	IgG2b	48,5	1:320.000	15,9	1:128.000
2C4B2	IgG2b	56	1:320.000	20	1:128.000
2C4F12	IgG2b	51,5	1:800.000	nd***	nd
2C4G10	IgG2b	61,7	1:320.000	nd	nd
2C4B9	IgG2b	57,4	1:640.000	34,9	1:256.000
1D1C5	IgA	134,1	1:1.024.000	nd	nd
1D1D10	IgA	128,2	1:512.000	nd	nd
1D1D4	IgA	127,6	1:256.000	nd	nd
1D1E7	IgA	129,8	1:1024.000	nd	nd
“pool”	IgA	128,8	1:700.000	nd	nd
“pool”	IgG2b	54,2	1:256.000	nd	nd

* MABs do isotipo IgG2b foram purificados em coluna de Sepharose-Proteína A

** nd - não determinado

*** Título determinado em placas sensibilizadas com 50µg/mL de PCFO2, considerando-se a concentração protéica/mL e o volume obtido

Tabela VII- Avaliação da reatividade do “pool” de MAbs do isotipo IgA, em provas de ELISA indireto, frente a PCFO2 e demais FC *

FC utilizados na sensibilização das placas	Diluição do “pool” de MAbs do isotipo IgA		
	1:1000	1:4000	1:8000
CFA/I	0,233**	0,165	0,145
CFA/II (CS2, CS3)	0,322	0,269	0,247
CFA/II (CS1, CS3)	0,624	0,555	0,561
CFA/III	0,482	0,475	0,451
CFA/IV (CS4, CS6)	0,615	0,550	0,450
PCFO159	0,406	0,327	0,279
PCFO2	2,470	2,440	2,244

* Placas sensibilizadas com soluções protéicas a 100µg/mL dos diferentes FC

** D.O. determinada a 492 nm

Tabela VIII- Avaliação da reatividade do “pool” de MAbs do isotipo IgG2b, em provas de ELISA indireto, frente a PCFO2 e demais FC

FC utilizados na sensibilização das placas	Diluições do “pool” de MAbs IgG2b		
	1:1000	1:4000	1:8.000
CFA/I	0,043	0,046	0,055
CFA/II (CS2, CS3)	0,043	0,046	0,042
CFA/II (CS1, CS3)	0,042	0,044	0,044
CFA/III	0,043	0,043	0,04
CFA/IV (CS4, CS6)	0,048	0,04	0,041
PCFO159	0,041	0,04	0,04
PCFO2	2,027	1,76	1,162

* Placas sensibilizadas com soluções a 100µg/mL dos diferentes FC

** D.O. determinada a 492 nm

4.4. Avaliação da reatividade dos anticorpos monoclonais em “Western blot”

4.4.1. Frente à fimbria PCFO2

A reatividade dos MAb's anti-PCFO2, isoladamente ou em “pools” (“pool” IgA e IgG2b) foi também investigada por “Western blot”, utilizando-se a fimbria purificada como antígeno. Na Figura 7 são apresentadas as reações obtidas nestes experimentos, que confirmam resultados anteriormente obtidos (Oliveira, 1996), demonstrando que os MAb's anti-PCFO2 reconhecem a banda de P.M. aparente de 34,5 kDa, correspondente à PCFO2.

Além da banda de 34,5 kDa, os MAb's do isotipo IgA foram capazes de revelar uma banda de P.M. aproximado de 52 kDa no material purificado. Esta banda não havia sido revelada anteriormente em SDS-PAGE pelo método de coloração empregado como acompanhamento dos procedimentos de purificação das fimbrias.

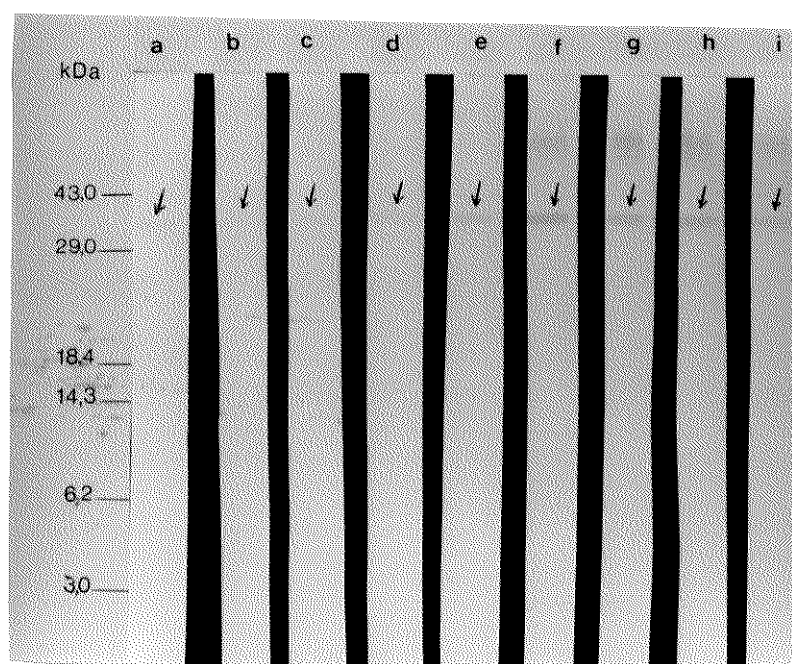


Figura 7- Reações de “Western blot” entre a fimbria PCFO2 purificada a partir da amostra 244-1 e MAb's.

Legenda: Padrão de peso molecular (GIBCO Brl); reações com os MAb's: **a)** 2C4E10; **b)** 2C4B2; **c)** 2C4F12; **d)** 2C4G10; **e)** 2C4B9; **f)** 1D1C5; **g)** 1D1D10; **h)** 1D1D4; **i)** 1D1E7. Flechas indicativas da fimbria PCFO2. Flechas indicativas das reações positivas.

4.4.2. Frente aos diferentes FC

Na Figura 8 pode-se verificar a reatividade do “pool” de MAb anti-PCFO2 do isotipo IgA, frente às fimbrias PCFO2, CFA/I, CFA/II (CS1, CS3), CFA/II (CS2, CS3), CFA/III, CFA/IV (CS4, CS6) e PCFO159. Apesar de na linha d ter sido aplicado material obtido da cepa padrão de CFA/IV (CS5, CS6), estes resultados não devem ser considerados por não ter sido observada a presença de bandas correspondentes a estas frações nas extrações e semi-purificações realizadas (resultados não apresentados). Porém, como é possível observar-se, esses anticorpos foram capazes de detectar componentes antigênicos nestes FC, correspondentes às bandas de P.M. determinados para as respectivas fimbrias (flechas). Da mesma forma que já havia sido verificado em reações com os soros policlonais, os MAb anti-PCFO2 foram capazes de reagir com outros componentes antigênicos das preparações, de P.M. mais elevado, sugerindo a presença de precursores das fimbrias ou de material antigênico distinto, mas que compartilham este epítipo com a PCFO2. Desta forma, com base na intensidade da reação, os MAb reconheceram epítipos em CS4, CS6, CFA/III, CS1, CS2 e CS3. Por outro lado, não foram reativos PCFO159 e com CFA/I. No que diz respeito às extrações de CFA/III, embora esta amostra também expressa CS6, pela Figura 14, linha e, não se observa nítida banda de menor P.M., correspondente a este fator.

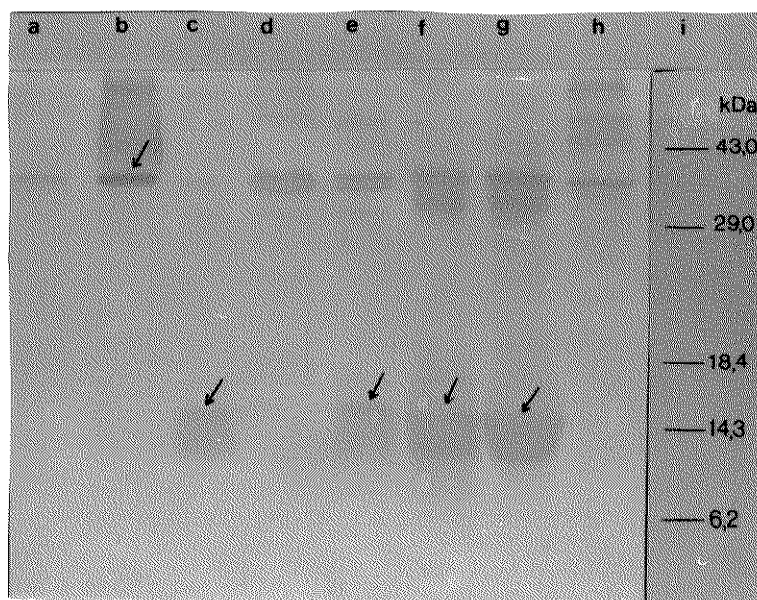


Figura 8- Verificação em provas de “Western blot” da reatividade de “pools” dos isotipos IgA frente à diferentes FC semi-purificados.

Legenda: a) PCFO159; b) PCFO2; c) CFA/IV (CS4, CS6); d) CFA/IV (CS5, CS6); e) CFA/III; f) CFA/II (CS1, CS3); g) CFA/II (CS2, CS3); h) CFA/I; i) Padrão de Peso Molecular (GIBCO BRL). Flechas indicativas das reações positivas.

4.5. Reatividade dos MABs frente a PCFO2 tratada com Guanidina HCl

Após o tratamento com 6M de Guanidina HCl, que à semelhança de tratamentos com uréia, desagrega as fimbrias sem alterar a estrutura quaternária da molécula, não foi possível observar-se em SDS-PAGE a presença de outras bandas, além da correspondente a 34,5 kDa (Figura 9).

Através de experimentos de “Western blot”, desenvolvidos com os materiais retidos e com os ultrafiltrados concentrados após o tratamento com Guanidina-HCl pode-se observar nas Figuras 10 a presença de apenas uma banda de 34,5 kDa, correspondente à PCFO2 quando se utilizou quaisquer dos 9 MABs individualmente.

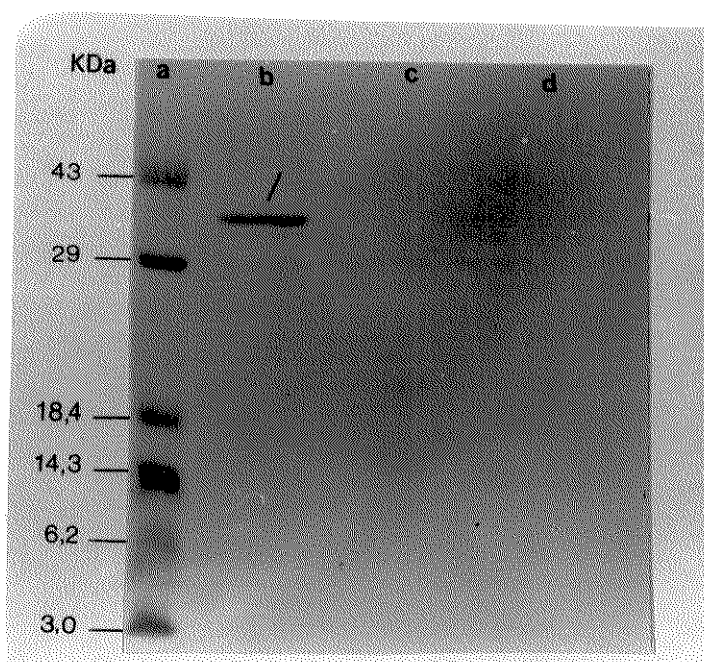


Figura 9 - Análise em SDS-PAGE a 15%, dos polipeptídeos obtidos após tratamento da fimbria PCFO2 com Guanidina-HCl.

Legenda: a) Padrão de Peso molecular (GIBCO BRI); b) material retido em membrana de ultrafiltração XM50; c) material ultrafiltrado na membrana XM50; d) material retido em membrana de ultrafiltração YM10. Flecha indicativa da banda revelada por coloração em Coomassie blue.

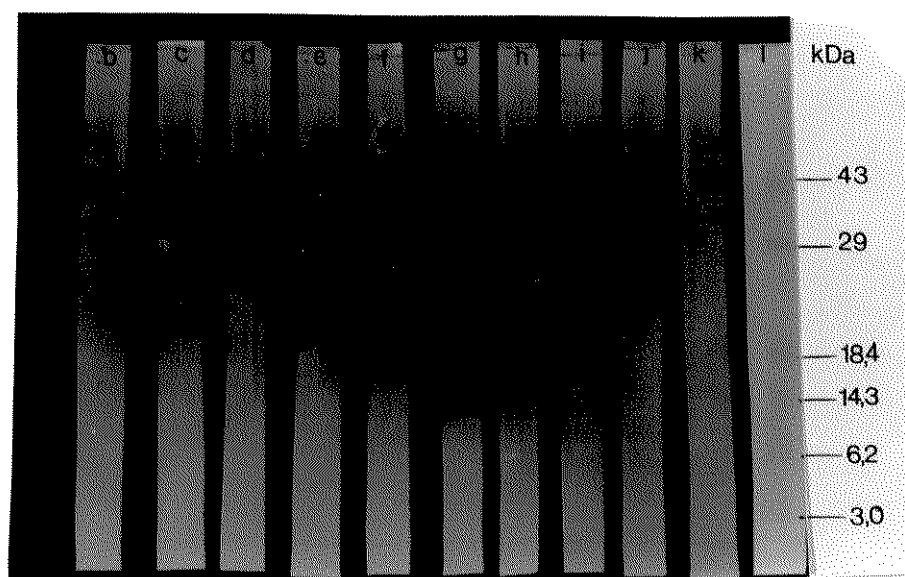


Figura 10 - Reações de “Western blot” com material obtido após tratamento de soluções de PCFO2 purificada com Guanidina-HCl.

Legenda: a) fimbria PCFO2 purificada, corada com Amido Black.; c), e), g), i), k) - material retido em membrana XM50 revelado com os MAbs 1D1D10, 1D1E7, 1D1C5, 1D1D4 e “pool” de IgA respectivamente; b), d), f), g), j) - fimbria PCFO2 purificada em reações com os MAbs 1D1D10, 1D1E7, 1D1C5, 1D1D4 e “pool” de IgA, respectivamente; l) Padrão de Peso Molecular (Gibco Brl).

4.6. Imunomicroscopia eletrônica

Inicialmente, as amostras de *E. coli* produtoras de PCFO2, CFA/II (CS2, CS3), CFA/II (CS1, CS3), CFA/III e CFA/IV (CS4, CS6) foram cultivadas a 37°C e a 16°C verificando-se que estas apenas expressavam os FC nos cultivos a 37°C (resultados não apresentados). Estas observações foram concordantes com a literatura consultada (Honda *et al.*, 1989; Levine *et al.*, 1984; Wolf *et al.*, 1989).

O conjunto de experimentos, descritos a seguir, foram realizados para verificar-se se os MABs, reativos também contra as fimbrias CFA/II (CS2, CS3), CFA/II (CS1, CS3), CFA/III e CFA/IV (CS4, CS6) por provas de ELISA e “Western blot”, eram também capazes de marcar as estruturas expressas na superfície das amostras padrão de *E. coli* produtoras destes FC. Com base nos títulos determinados, os MABs 2C4F12 e 1D1C5, respectivamente dos isotipos IgG2b e IgA, foram utilizados como anticorpos primários na marcação das bactérias, nas reações reveladas posteriormente pelo anticorpo conjugado com ouro coloidal.

A observação dos preparados em imunomicroscopia, encontram-se apresentados nas Figuras 11 e 12. Desta forma, observa-se nestas Figuras que os MABs anti-PCFO2 são capazes de reagir com epítomos das estruturas de superfície destas diferentes amostras bacterianas, confirmando as reações cruzadas entre PCFO2 e os FC presentes nestas cepas. Nas Figuras 11 e 12 (a e b) é possível verificar-se ainda que os MABs 2C4F12 (IgG2b) e 1D1C5 (IgA) reagem de maneira homogênea com epítomos dos FC em toda a superfície das amostras padrão de PCFO2, confirmando dados anteriormente obtidos (Oliveira, 1996).

Também verifica-se nas Figuras 11 e 12 que de maneira geral, as partículas de ouro coloidal marcaram nos demais FC expressos, em sua forma nativa, maior número de epítomos nas reações desenvolvidas pelo anticorpo monoclonal 1D1C5, do isotipo IgA, quando comparada às revelações com 2C4F12. Porém, cabe-se ressaltar que nas reações com IgA, um segundo anticorpo (anti-Ig de camundongo), foi utilizado.

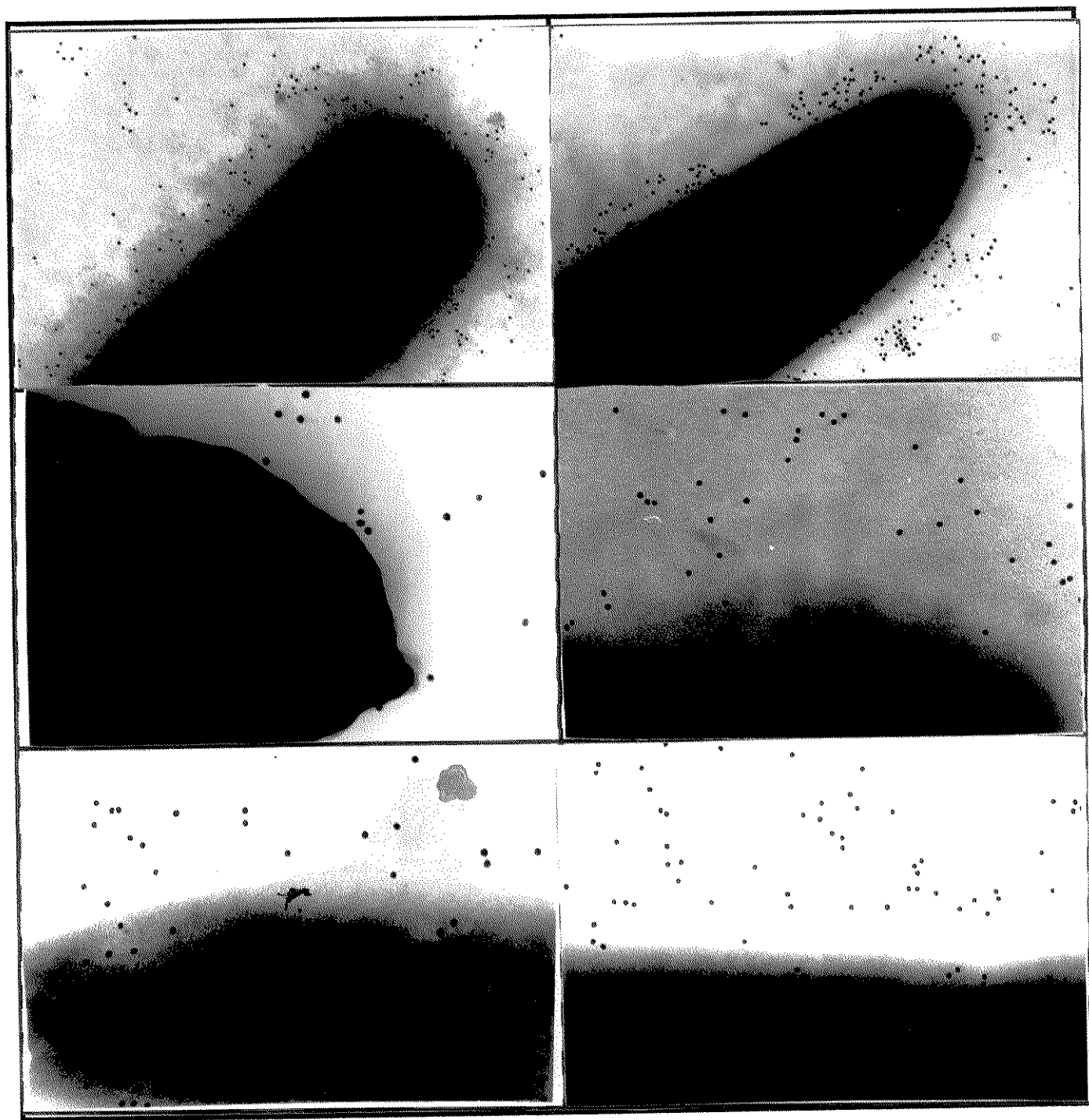


Figura 11 - Imunomicroscopia eletrônica revelada com o anticorpo monoclonal 1D1C5, do isotipo IgA.
 Legenda: a) PCFO2 (amostra 244-1) (52.820x); b) PCFO2 (amostra 275-1) (47.260x); c) CFA/II (CS2, CS3) (139.500x); d) CFA/II (CS1, CS3) (90.552x); e) CFA/III (93.520x); f) CFA/IV (CS4, CS6) (83.400x).

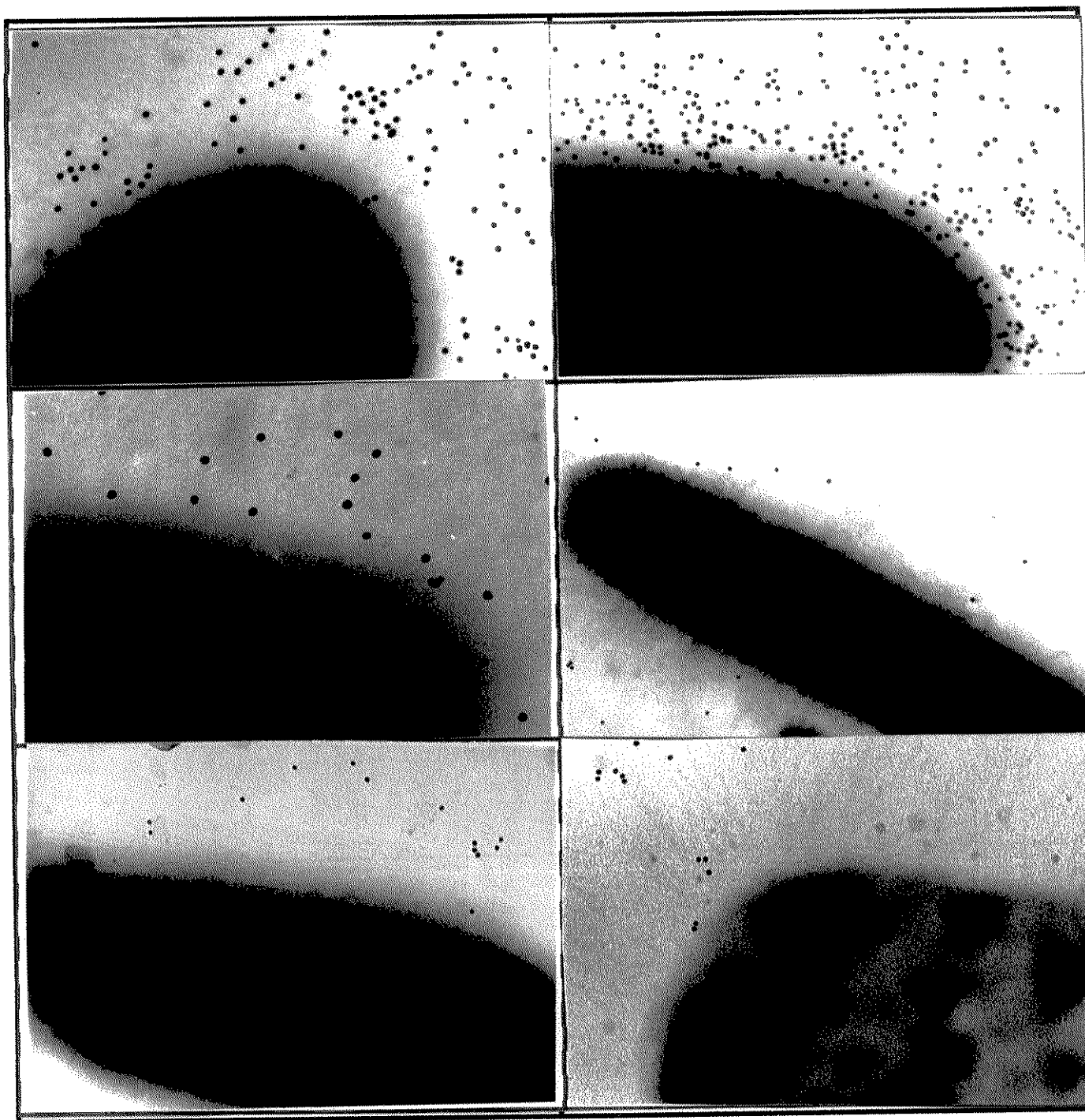


Figura 12 - Imunomicroscopia eletrônica revelada com o anticorpo monoclonal 2C4F12, do isotipo IgG2b.

Legenda: a) PCFO2 (amostra 244-1) (97.566x); b) PCFO2 (amostra 275-1) (88.396x); c) CFA/II (CS2, CS3) (97.566x); d) CFA/II (CS1, CS3) (40.080x); e) CFA/III (60.120x); f) CFA/IV (CS4, CS6) (64.680x).

4.7. Padronização da prova de Inibição do ELISA

4.7.1. Avaliação fenotípica de cepas de *Escherichia coli*

Dentre os estoques analisados apenas 51 cepas apresentaram-se como produtoras das enterotoxinas LT-I e/ou STa, através de testes do Camundongo recém-nascido, GM1-ELISA e presença de atividade citotônica em células Vero (Tabela IX). A análise percentual das cepas produtoras de enterotoxinas está representada na Figura 13, onde 45,8% (38 amostras) foram produtoras apenas da enterotoxina termo-lábil, 12% (10 amostras) produziram toxina termo-estável e apenas 3,6% (3 amostras) produziram as enterotoxinas STa e LT-I ao mesmo tempo.

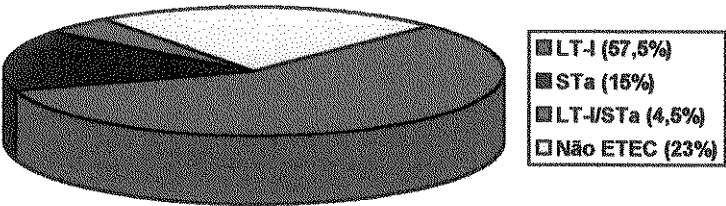


Figura 13 - Dados percentuais das amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes humanas.

Tabela IX- Características fenotípicas das cepas de *Escherichia coli* isoladas de fezes humanas, avaliadas na prova de Inibição do ELISA

Características das amostras	Amostras	Total
ETEC - STa ⁺ /LT-I ⁻	5141 (764); CFA/II L89; Veva; 19T; 22; 185-1 4; 0509756; 61; 260-1; TR50/3	10
ETEC - STa ⁺ /LT-I ⁺	244-1* ; 275-1* ; 10.407-16; CFA/II PB175; 40T19; 185-1 27; CFA/III J; 10.407-18; TR269/7; TR 13D; F24-2; H23/654; 104; 10407-21; 0509755; 10.407-14; 418-20; 433-1; 412-3; 5534-2 787; 5056-716; 102B; 312-3** ; 312-2** ; 240-1; 115B; 5602-1 783; 5602-2; H10.487; 459-1; 459 16/6; 504/1 15/4; D447; D448; D384; D253; CFA/III 19; M424-C1	38
ETEC - STa ⁺ /LT-I ⁺	244-1J; 185-1 27; CFA/II TR298 J	3
Cepas não ETEC, isoladas de fezes diarreicas	D237; D52; D51; D4; Ec 13D; D456; D220; D40; D43; D246; D252*; D243* ; D242*	13
Cepas não ETEC, isoladas de fezes normais	K12; C32	2
Total		66

* Cepas pertencentes ao sorogrupo O2, determinado pelo Prof. Dr. Jorge Blanco, Lugo, Espanha.

** Cepas não sorogrupadas.

4.7.2. Realização das provas

Na padronização desta prova, objetivou-se verificar se os MAb's anti-PCFO2 poderiam ser capazes de reagir com amostras produtoras desta fimbria, na sua forma nativa, inibindo a reação do ELISA por competição com o antígeno purificado utilizado na sensibilização das placas.

Nesses experimentos foram empregadas placas de ELISA sensibilizadas com PCFO2 purificado nas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL, a depender do MAb utilizado (IgA ou IgG2b, respectivamente). Soluções dos MAb's foram previamente incubadas com as cepas padrão de PCFO2 e com as produtoras dos demais fatores de colonização, em três diluições distintas.

Apenas foram consideradas amostras produtoras de PCFO2 aquelas capazes de reduzir a D.O. da reação entre os MAb's e a fase sólida, representada pelos controles, em níveis iguais ou superiores a 50%. Os resultados dos experimentos desenvolvidos estão apresentados nas Figuras 14 a 17.

Desta forma, quando as amostras produtoras de PCFO2 (244-1 e 275-1) foram empregadas nos ensaios de competição, observou-se a completa inibição da reação entre os MAb's e a fimbria adsorvida à fase sólida (Figuras 14 e 15). Por outro lado, verifica-se nas mesmas Figuras, que as demais cepas padrão não foram capazes de inibir as reações desenvolvidas com os MAb's dos dois diferentes isotipos.

Com relação às amostras de *E. coli* ETEC e não ETEC isoladas em casos de diarreia humana e de fezes normais, quando avaliadas nesta prova revelaram os resultados apresentados nas Figuras 16 (a, b, c) e 17 (a, b, c).

Assim sendo, como pode ser verificado, apenas as amostras 312-3, 312-2, D252, D243 e D242 foram capazes de reduzir significativamente as reações entre o MAb IgA e a fimbria na fase sólida (Figuras 16 a, b, c), apresentando inibições superiores a 50% da D.O. das reações desenvolvidas com todos os MAb's estudados.

Na comprovação destas amostras como produtoras de PCFO2, reações de HMR em lâminas foram realizadas frente à hemácias de carneiro, boi, humana e cavalo. Todas as cinco amostras correspondentes à D243, D252, 312-2, 312-3 e D242 apresentaram padrão hemaglutinante compatível ao descrito para PCFO2 (Ricci *et al.*, 1997).

apresentando reações falso-positivas e falso-negativas (Figuras 18 e 19). Como é possível observar-se um grande número de amostras foam capazes de inibir essas reações, porém de forma inespecífica e totalmente incoerente. Os controles também não apresentaram resultados compatíveis, uma vez que não houve inibição total das amostras 244-1 e 275-1, padrão de PCFO2.

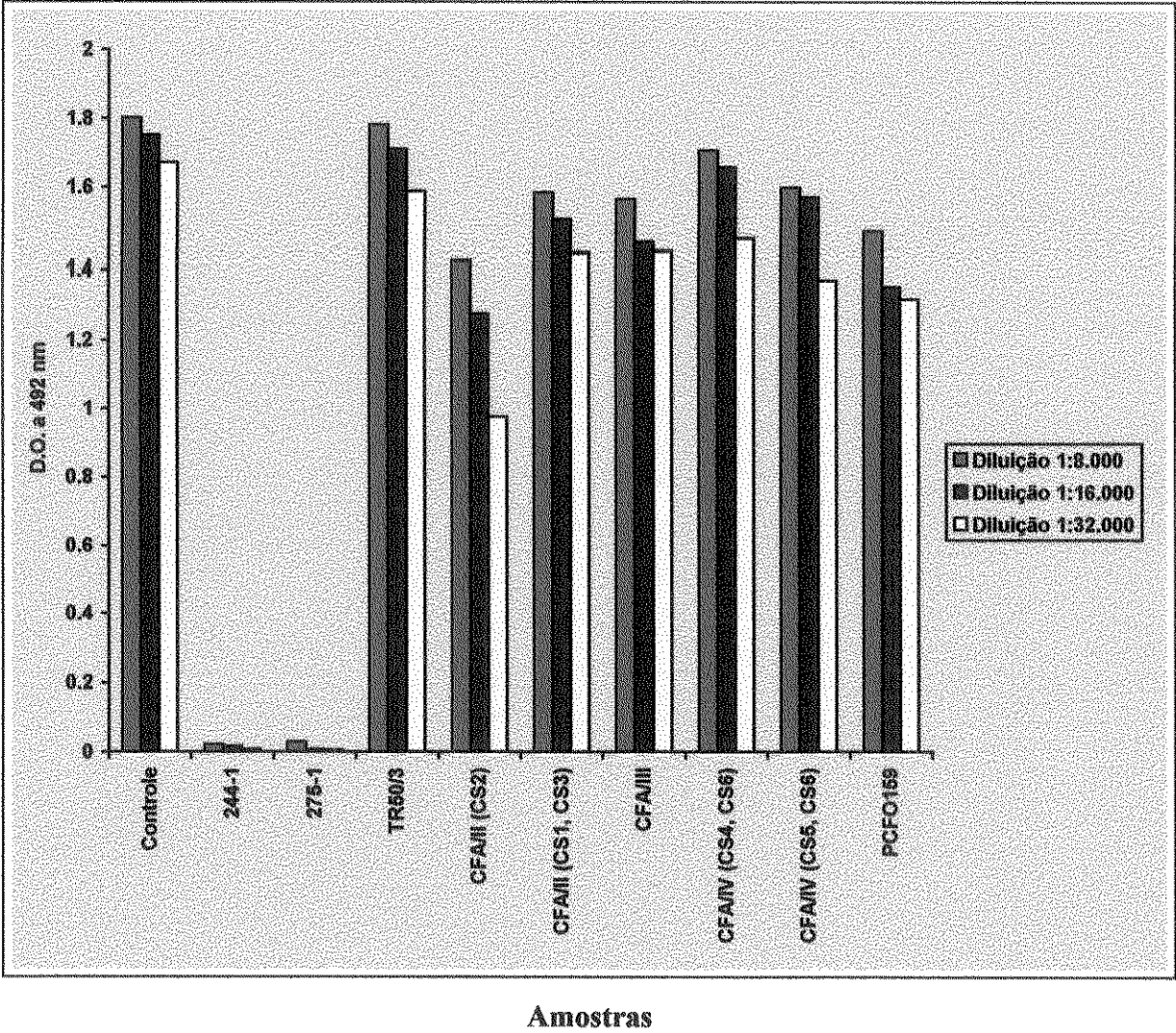
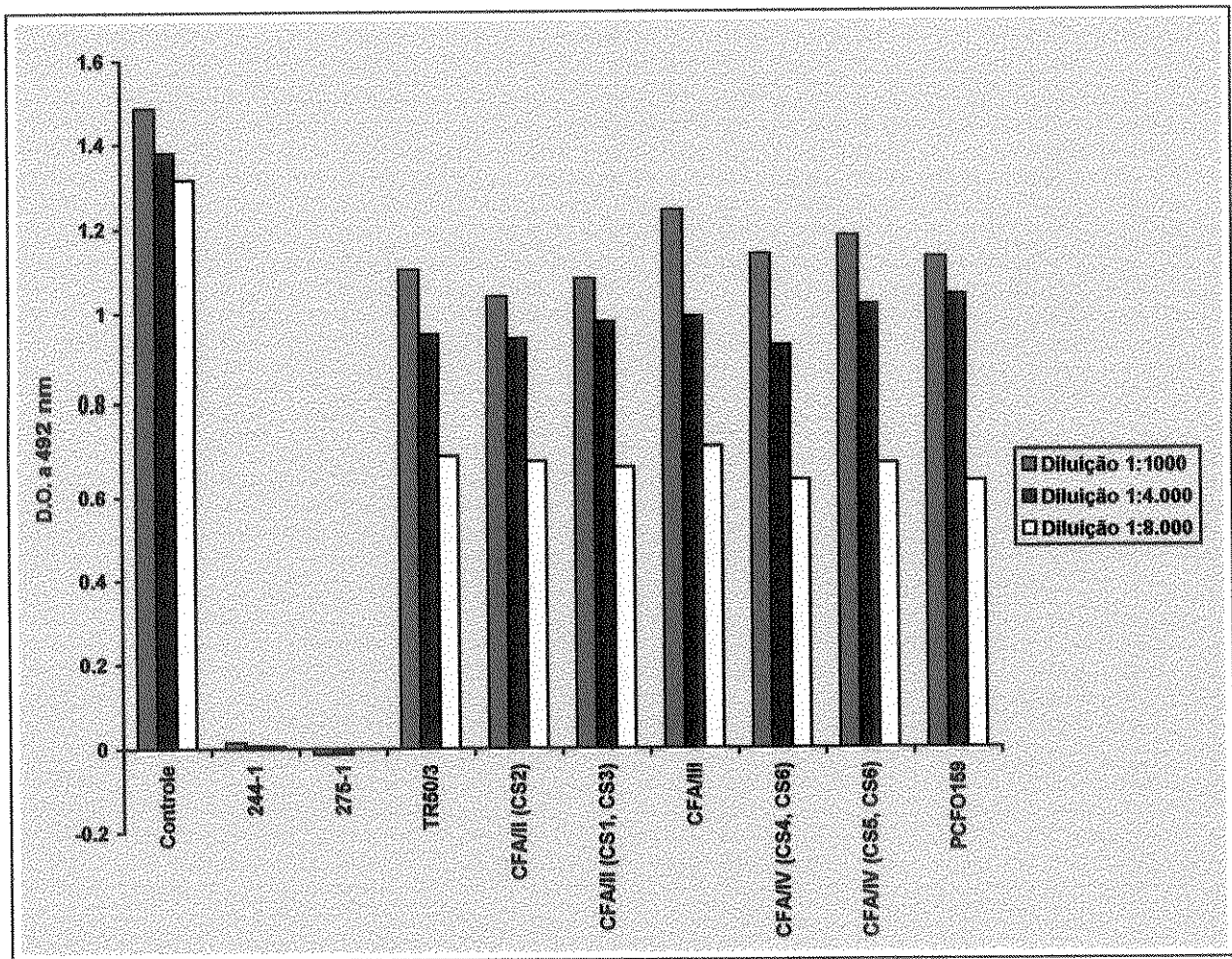
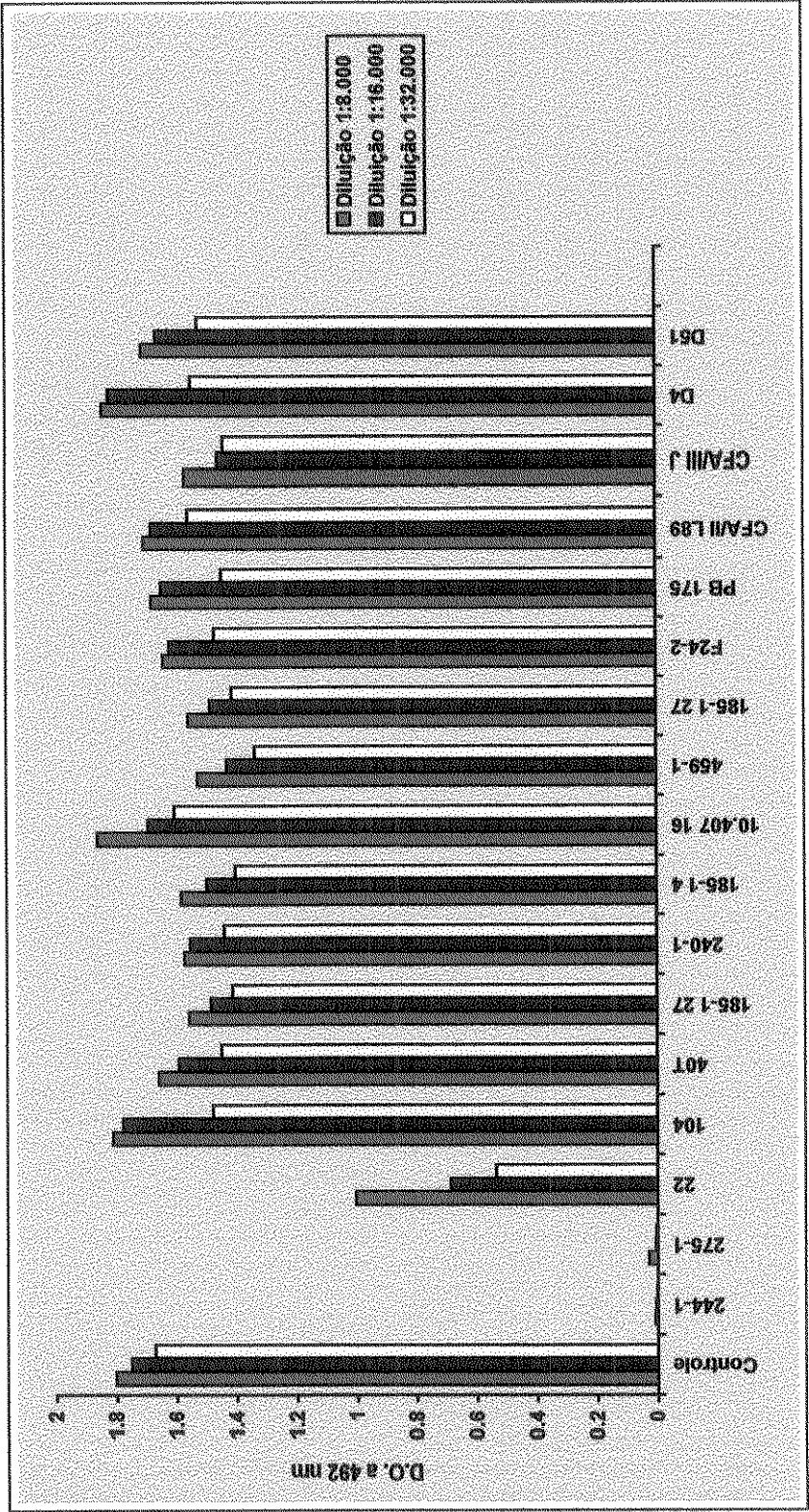


Figura 14 - Provas de Inibição do ELISA realizadas com amostras padrão de diferentes FC e reveladas com “pool” de MAbs do isotipo IgA, em diferentes diluições



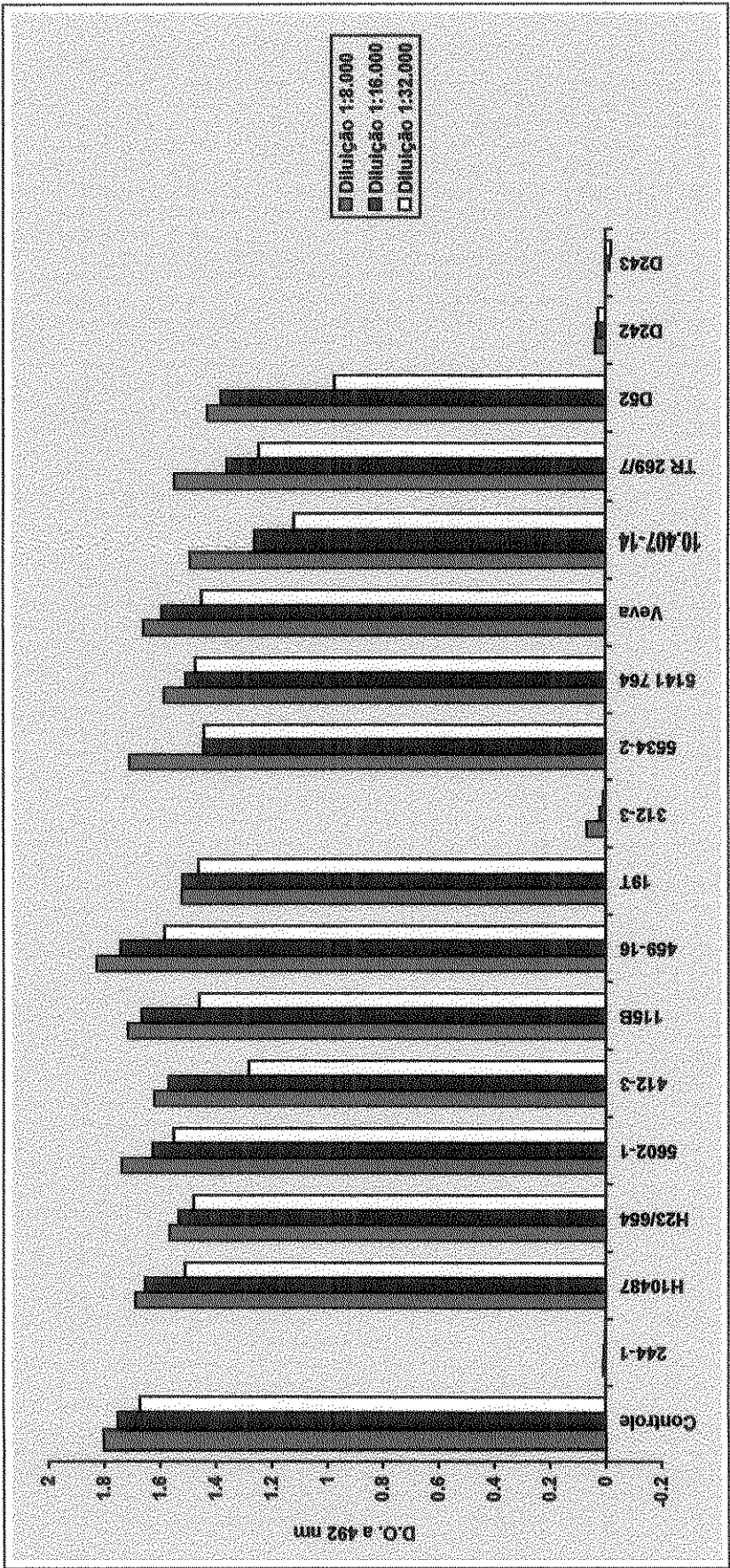
Amostras

Figura 15 - Provas de Inibição do ELISA realizadas com amostras padrão de diferentes FC e reveladas com “pool” de MAbs do isotipo IgG2b, em diferentes diluições



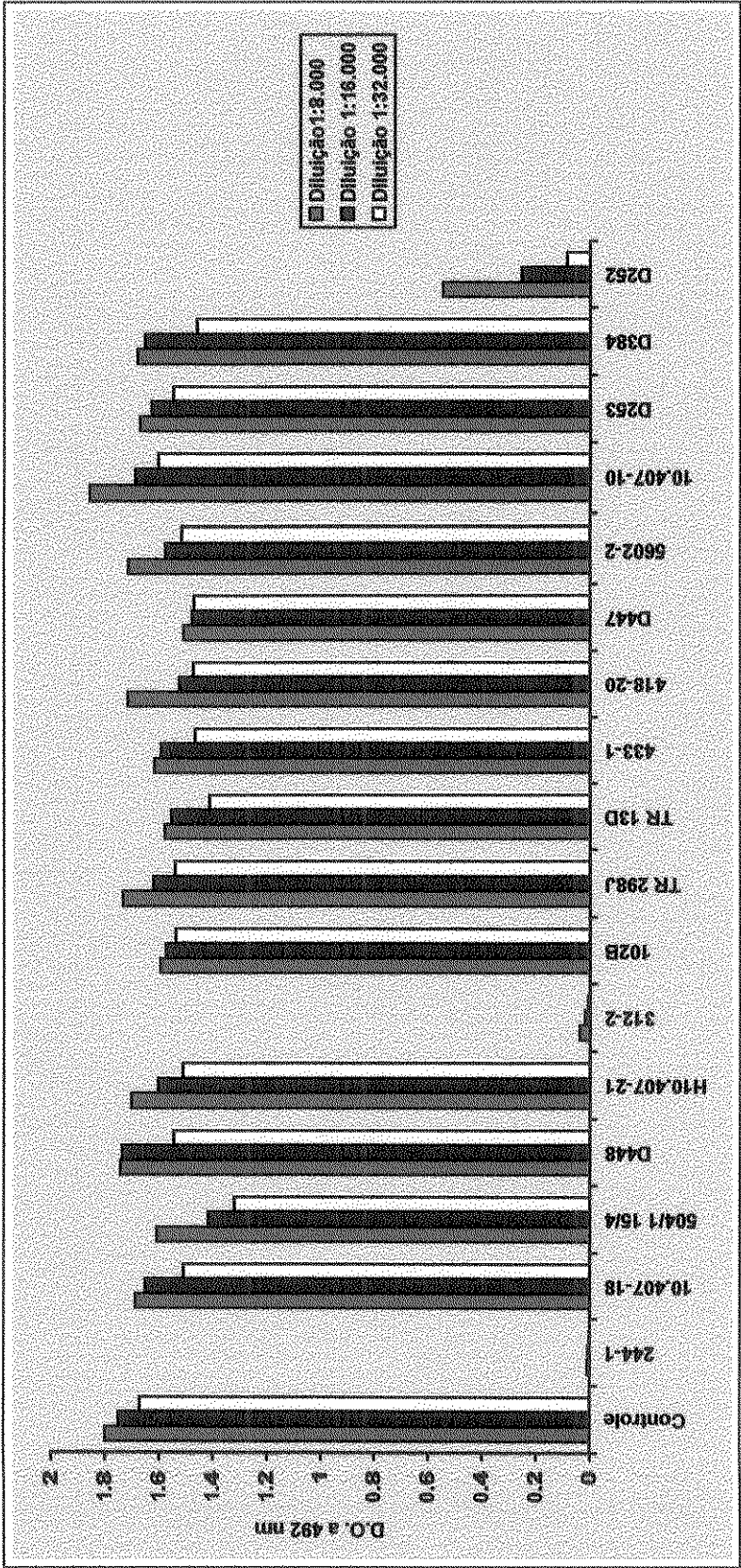
Amostras

Figura 16A - Provas de Inibição do ELISA, realizadas com MAb 1D1C5 do isotipo IgA



Amostras

Figura 16B - Provas de Inibição do ELISA, reveladas com MAb 1D1C5 do isótipo IgA



Amostras

Figura 16C - Provas de Inibição do ELISA, reveladas com MAbs 1D1C5 do isotipo IgA

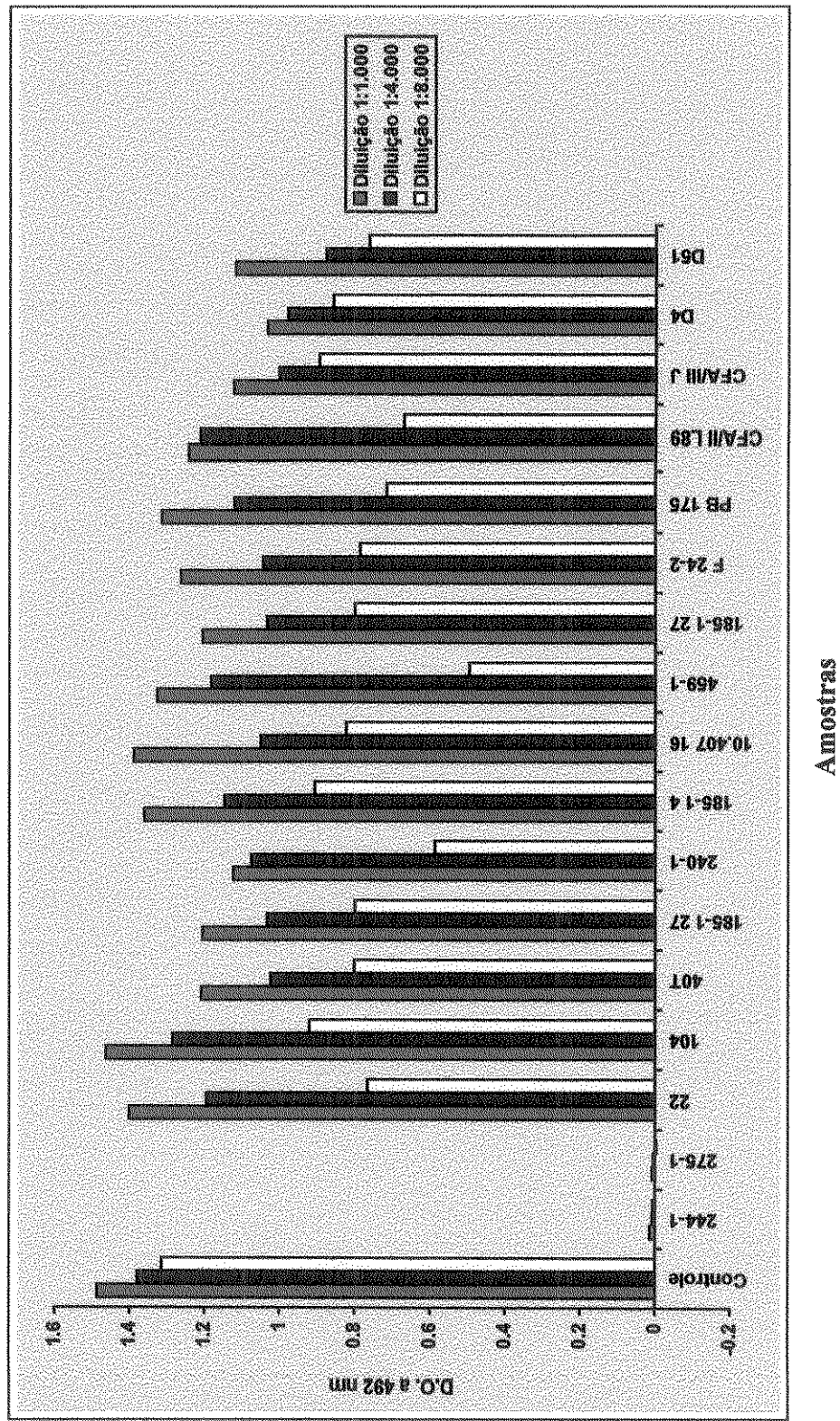


Figura 17A - Provas de Inibição do ELISA reveladas com MAbs 2C4F12 do isótipo IgG2b

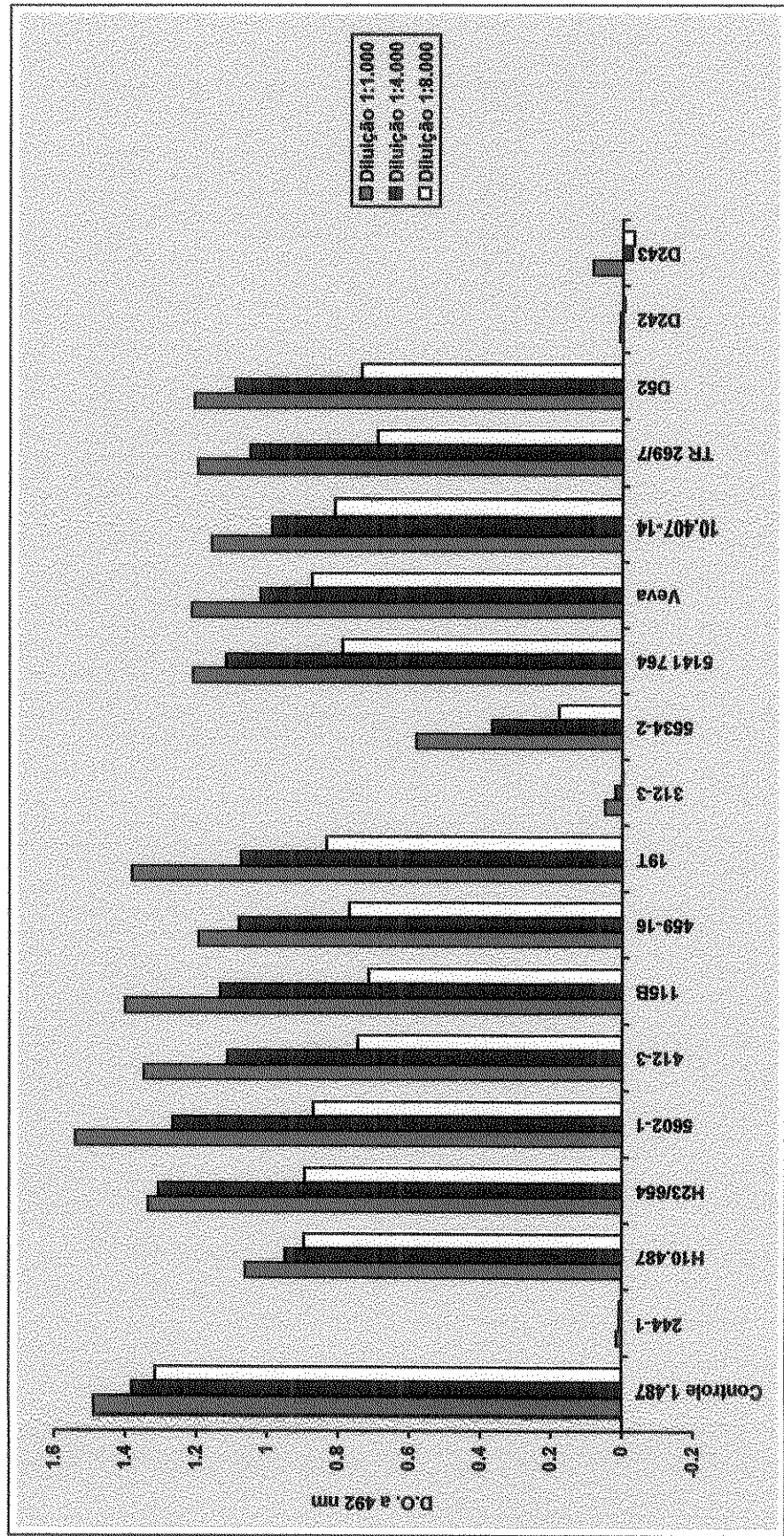
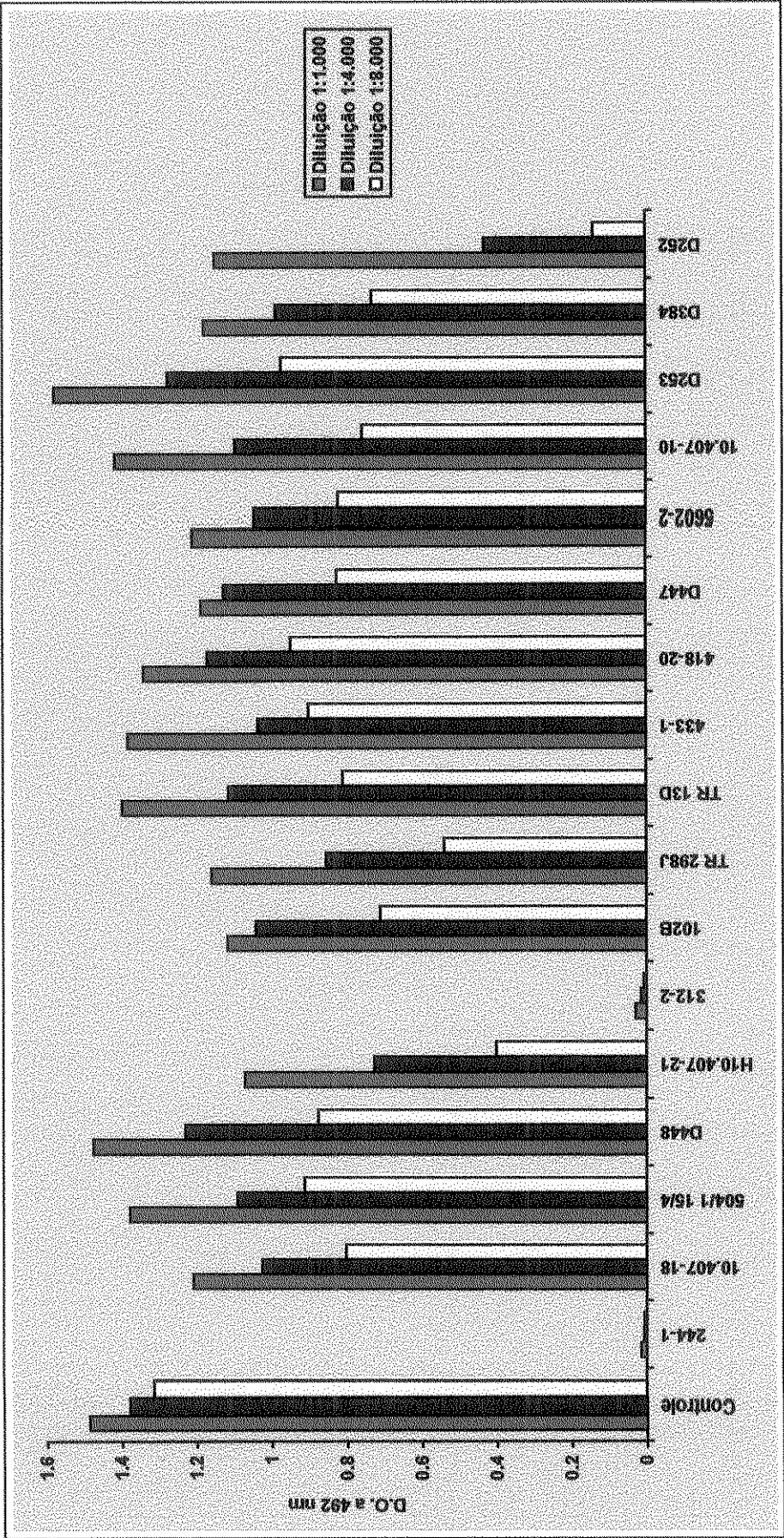


Figura 17B - Provas de Inibição do ELISA reveladas com o MAbs 2C4F12 do isotipo IgG2b



Amostras

Figura 17C - Provas de Inibição do ELISA reveladas com MAbs 2C4F12 do isotipo IgG2b

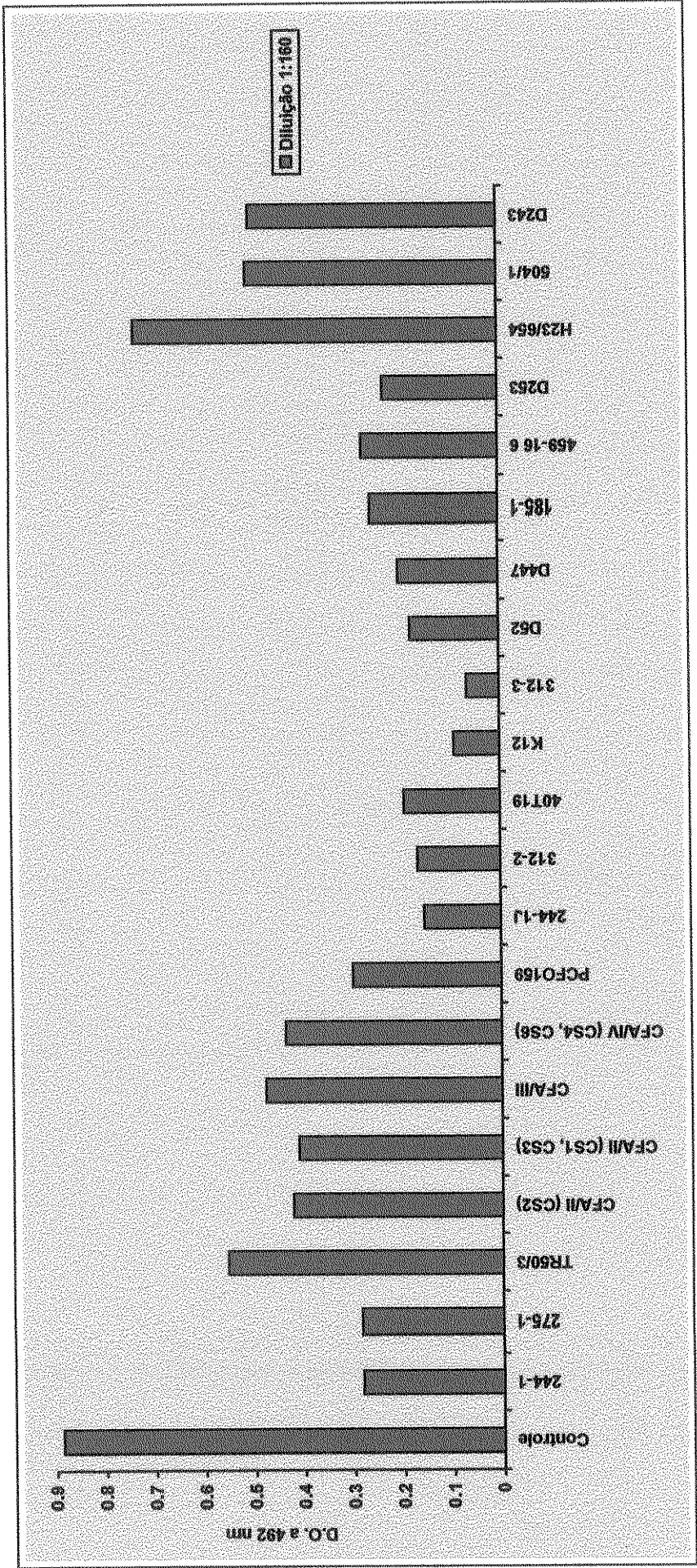


Figura 18A - Provas de Inibição do ELISA reveladas com soro policlonal anti-PCFO2 obido a partir da amostra 275-1

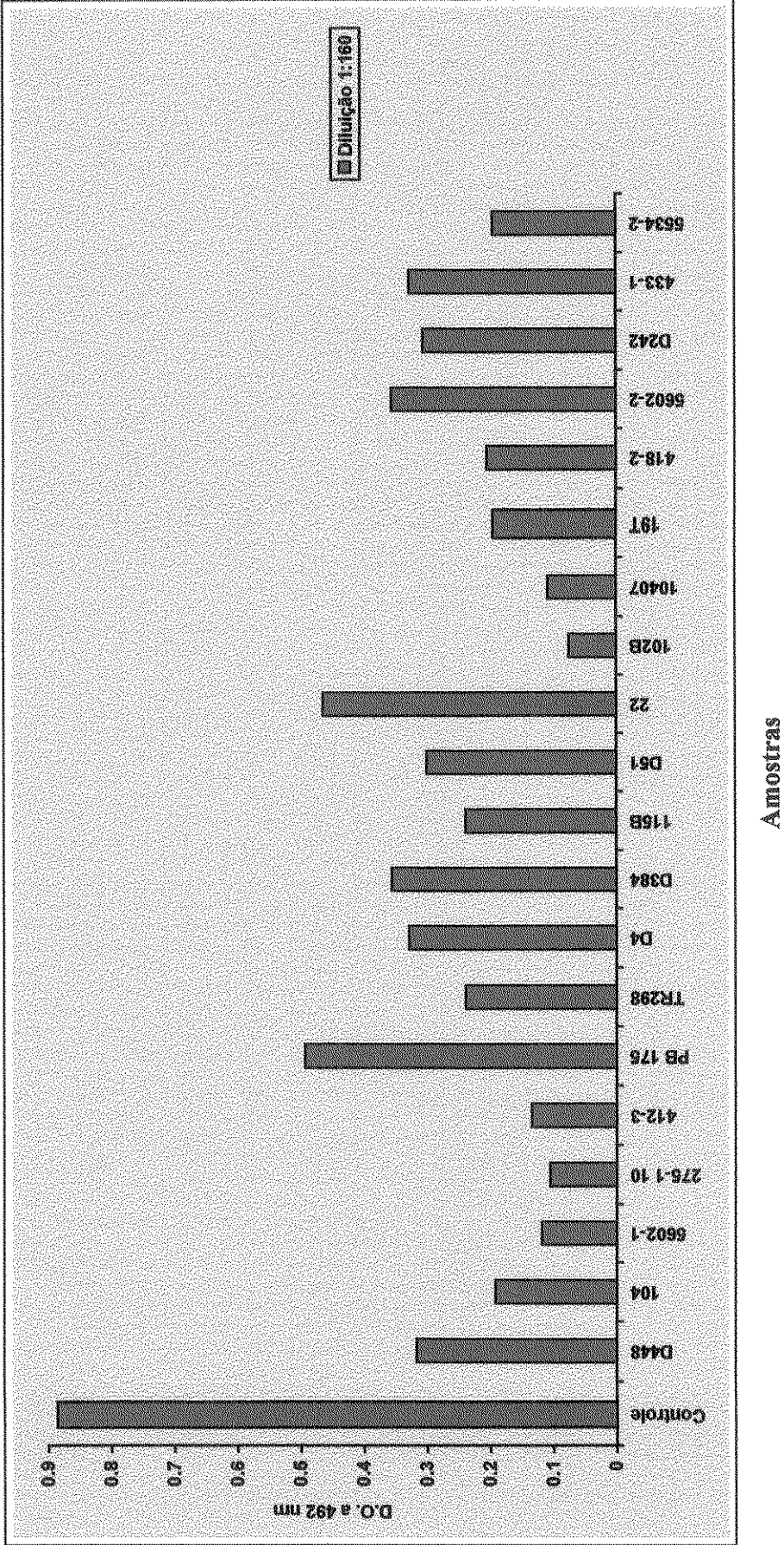
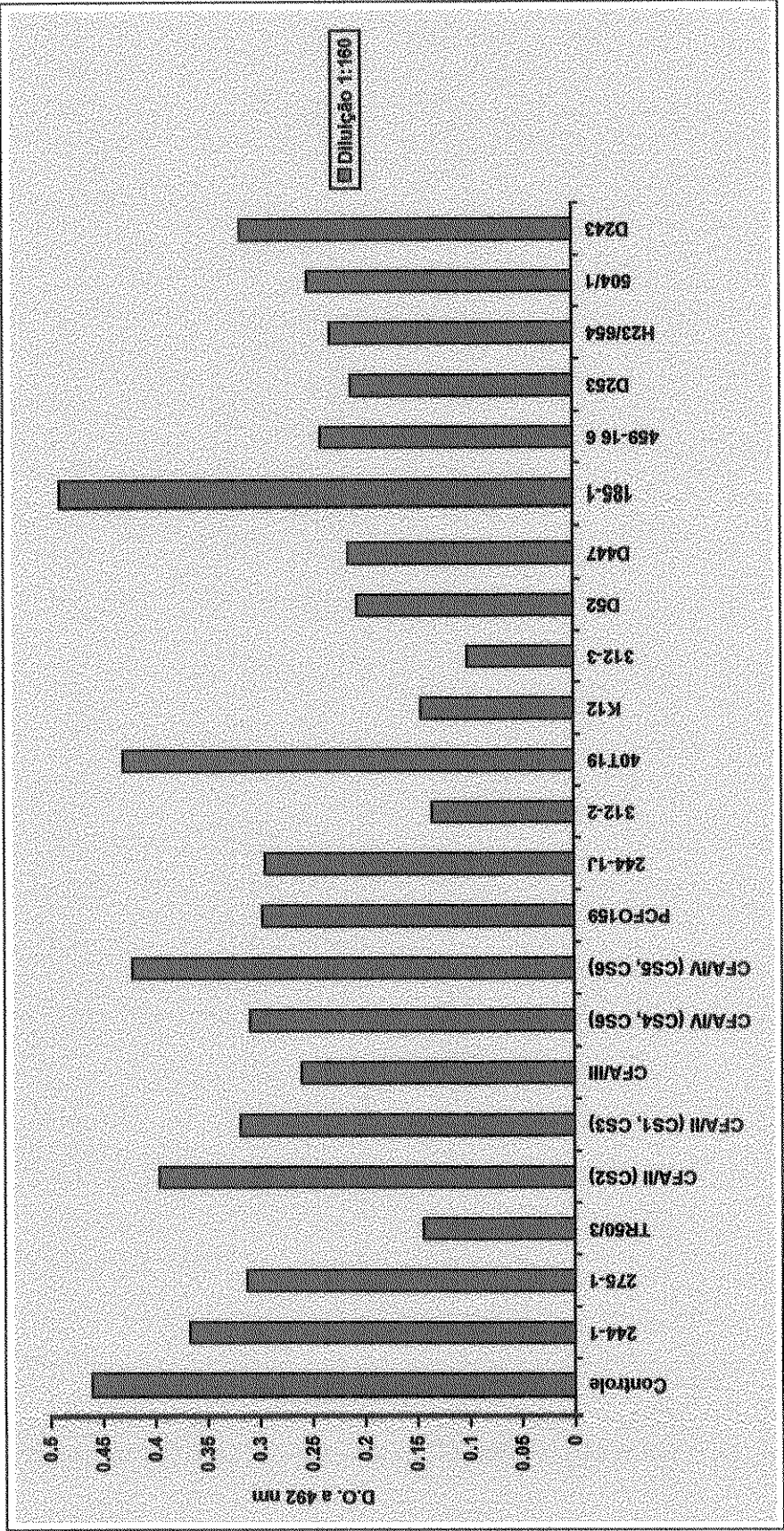
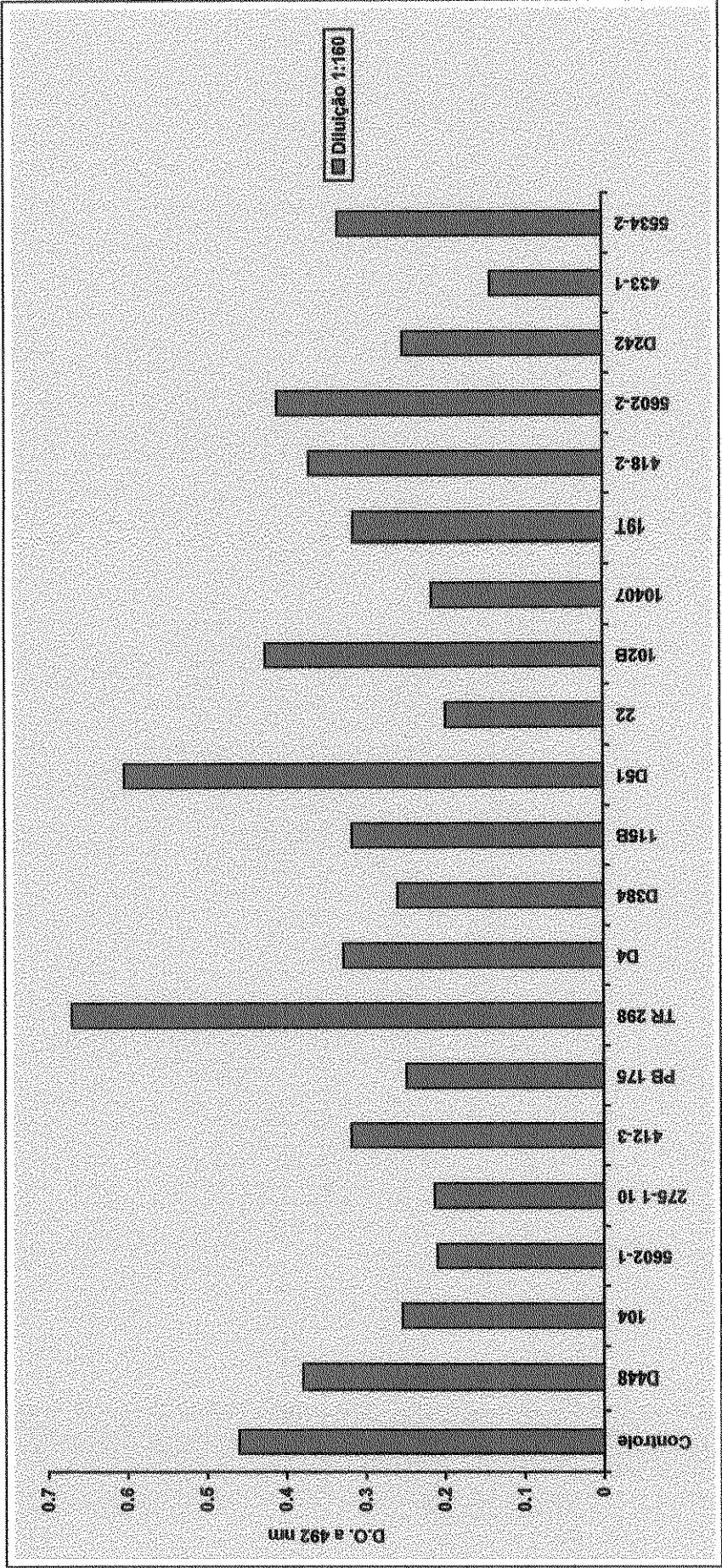


Figura 18B - Provas de Inibição do ELISA reveladas com soro policlonal anti-PCFO2 obtido a partir da amostra 275-1



Amostras

Figura 19A - Provas de Inibição do ELISA reveladas com o soro policlonal anti-PCFO2 obtido a partir da amostra 244-1



Amostras

Figura 19B - Provas de Inibição do ELISA reveladas com soro poiclonal anti-PCFO2 obtido a partir da amostra 244-1

5. Discussão

Vários estudos epidemiológicos recentes, desenvolvidos em diferentes regiões associadas principalmente aos países de terceiro mundo, têm comprovado que a *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) ainda é um importante agente da diarreia infantil em várias regiões e também de quadros semelhantes em adultos, principalmente quando estes são visitantes de áreas endêmicas, representadas principalmente pelos países em desenvolvimento (Levine *et al.*, 1993; López-Vidal *et al.*, 1990; Wolf *et al.*, 1993).

Análises das cepas isoladas, nas distintas áreas geográficas, revelaram frequências muito variáveis quanto às enterotoxinas e FC expressos por estas cepas, além de permitirem, nestas avaliações, que novos fatores antigenicamente distintos dos já descritos, fossem identificados (Ricci *et al.*, 1997; Viboud *et al.*, 1993a).

Após a colonização do intestino delgado através destes antígenos, a bactéria deste virotipo potencializa a ação das enterotoxinas LT e/ou STa secretadas, causando o quadro diarreico. Preparo de vacinas capazes de estimular a produção de IgA secretora contra fatores de virulência pelo sistema de defesa GALT, presente no intestino, tem sido uma alternativa promissora já desenvolvida com sucesso no controle da diarreia em animais por cepas ETEC expressando determinados FC (Evans *et al.*, 1984). Através de recursos de engenharia genética, preparo de proteínas quiméricas, associando antígenos de diferentes enteropatógenos com seqüências de oligonucleotídeos dos mais frequentes FC identificados em amostras ETEC isoladas do homem, também têm sido avaliadas (Luna *et al.*, 1997).

Contudo, vacinas efetivas contra cepas ETEC devem ser constituídas, segundo muitos pesquisadores, pelos mais prevalentes FC, em combinação com toxóides de LT e STa (Svennerholm *et al.*, 1989). Entretanto, o maior problema na produção destas vacinas é a existência de um grande número de adesinas antigenicamente heterogêneas e a variação regional na frequência das mesmas, sendo que os FC melhor caracterizados e pesquisados, correspondem aos primeiros descritos, representados por CFA/I, CFA/II e CFA/IV. Devido a isto, estes aparentemente apresentam maior frequência.

Porém, vários outros FC foram posteriormente descritos tais como CFA/III, PCFO159, PCFO166, CS7, PCFO9, PCFO20 e PCFO2, sendo que por não serem pesquisados, não tem a sua real frequência determinada. Além disto, de maneira geral, os estudos epidemiológicos indicam que em um considerável número das cepas ETEC pesquisadas, se não a

maioria, não expressam nenhum dos FC até agora caracterizados (Viboud *et al.*, 1993a; Nirdnoy *et al.*, 1997).

A não identificação de FC na maioria destas cepas ETEC isoladas pode envolver várias implicações, que variam desde a perda dos plasmídios codificadores destes fatores, durante a estocagem das amostras e repiques, até a não identificação e caracterização de FC expressos pelas cepas enterotoxigênicas nas áreas geográficas pesquisadas.

Sem a correta determinação da frequência dos FC nas regiões endêmicas deste virotipo, utilização e adequação de vacinas é prática preventiva impossível de ser realizada. A primeira dificuldade existente nestas avaliações é pesquisar-se a presença de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênicas a partir de quadros diarreicos, devido à complexidade da patogenicidade deste agente.

Na identificação de cepas ETEC pesquisa-se, inicialmente, a produção das enterotoxinas LT-I e/ou STa. Só quando isto é confirmado é que verifica-se, então, a presença de FC. Por serem as adesinas normalmente de codificação plasmidial, estes procedimentos deveriam ser subsequentes, mas como os laboratórios, mesmo os de pesquisa, apenas raramente dispõem dos soros policlonais reativos para os principais FC correspondentes à CFA/I, CFA/II e CFA/IV, as cepas ficam muito tempo estocadas. O conhecimento correto dos FC produzidos pelas cepas identificadas como enterotoxigênicas exigiria, portanto, uma infra-estrutura complexa, mas mesmo os trabalhos desenvolvidos com muitos recursos têm demonstrado e confirmado grande variação nas frequências dos FC expressos nas ETEC isoladas nas diferentes áreas geográficas.

Recentemente, Nirdnoy *et al.* (1997), trabalhando com 13.341 cepas ETEC isoladas de fezes diarreicas no Nepal, Indonésia, Peru e Tailândia, obtidas no período de 1994-1995, identificaram FC em apenas 55% das amostras LT/STa (361 isolados), em 48% das produtoras de STa (337 isolados) e em apenas 14% das que expressavam exclusivamente a enterotoxina LT (620 isolados). Nestas amostras, pesquisadas por provas de hibridização de colônias, verificou-se que as isoladas no Nepal, correspondentes a 170 cepas ETEC, apenas 21% eram produtoras de CFA/I, 11% de CFA/II, 17% de CFA/IV, 14% de CS17 e 37% não tiveram seus FC identificados. Nas procedentes da Indonésia, dentre as 674 cepas, apenas 1% apresentou CFA/I, 16% CFA/II, 21% CFA/IV, 9% CS17 e em 53% das amostras nenhum destes FC foram identificados. No Peru, dentre 10.849 amostras, apenas 1% expressou CFA/I, 15% CFA/II, 11% CFA/IV, 5% CS17 e em 68% nenhum FC foi identificado. Comprovando a grande variação da frequência destes quatro FC pesquisados, na Tailândia dentre as 1.648 amostras ETEC estudadas,

apenas 1% apresentou CFA/I, 14% CFA/II, 7% CFA/IV e 2% CS17. Nas demais 76% das amostras nenhum destes fatores foi identificado.

Anteriormente, em estudo desenvolvido na Argentina (Betley *et al.*, 1986), 109 amostras ETEC isoladas de 1.212 casos de diarreia pesquisados em crianças abaixo de 4 anos de idade, foi identificado 23% de CFA/I, 17% de CFA/IV (CS5, CS6) e 12% de CFA/II (11 amostras CS1, CS3; uma amostra CS2, CS3 e uma CS3), sendo que em 48%, também nenhum destes FC foi caracterizado. Portanto, a não identificação dos FC em cepas ETEC é característica comum destes trabalhos, ressaltando-se que estes são significativamente menos caracterizados nas amostras produtoras exclusivamente de LT.

Nos estudos epidemiológico realizados no Brasil, envolvendo pesquisa de FC em ETEC, Reis *et al.* (1982) foram os primeiros a identificar, em amostragem obtida na cidade de São Paulo, 32 amostras ETEC, correspondentes a 13,4% de 245 casos de diarreia infantil. Com relação ao grupo controle, este foi representado por fezes normais de 96 crianças, sendo que neste grupo 11 amostras ETEC também foram identificadas (11,4%). Nas cepas isoladas, através de provas de HMR e sorologia específica, os fatores CFA/I e CFA/II foram identificados em apenas 10 amostras.

Investigações posteriores sobre a frequência dos FC em cepas ETEC isoladas no Brasil, relataram variações na frequência dos mesmos em amostras procedentes de crianças e adultos com diarreia. Com amostragem procedente da cidade de São Paulo (maio de 1985 a junho de 1986), Gomes *et al.* (1991) identificaram amostras ETEC LT-I, STa e LT/STa em respectivamente 2,8%, 3% e 0,8%, dentre 500 casos de diarreia pesquisados em crianças abaixo de um ano de idade. Em estudo da distribuição dos FC nestas amostras, CFA/IV (CS5, CS6) foi encontrado em 12% destas ETEC (Giraldi & Guth, 1993).

Em estudo anterior, desenvolvido por Guth *et al.* (1989) com amostras ETEC isoladas de casos diarreicos em crianças, produtoras de STa e pertencentes ao sorotipo O29:H21, estes autores pesquisaram, mas não identificaram, os fatores CFA/I e CFA/II.

Ricci *et al.* (1994), pesquisando os fatores CFA/I, CFA/II (CS2, CS3) e CFA/IV (CS4, CS6) em 87 amostras ETEC isoladas na cidade de Paulínia e Ouro Preto, identificaram o fator CFA/I em apenas duas amostras (uma produtora de STa e outra de LT/STa). Portanto, em apenas 2,3% das amostras conseguiu-se determinar o FC, sendo que em amostras exclusivamente produtoras de LT-I, nenhum dos 3 FC pesquisados foi encontrado.

Suspeitando-se da existência, dentre estas 87 amostras estudadas, de possíveis novos fatores de colonização duas cepas foram selecionadas por apresentarem padrão de HMR distinto dos descritos para os demais FC (Ricci *et al.*, 1995). Após purificação e caracterização da fimbria expressa por estas amostras, PCFO2 foi identificado como uma nova adesina (Ricci *et al.*, 1997).

Pelo exposto, devido à grande complexidade da pesquisa de FC e objetivando-se agilização destes testes, grande número de provas moleculares e imunológicas têm sido desenvolvidas para a detecção dos fatores de colonização mais prevalentes nas ETEC isoladas. Dentre as provas envolvendo métodos moleculares, principalmente o PCR tem sido utilizado (Nirdnoy *et al.*, 1997). Porém, estas investigações nas áreas endêmicas, representadas principalmente pela América do Sul e por outros países de terceiro mundo, são limitadas pela escassez dos recursos necessários, incluindo reativos e equipamentos sendo, portanto, impraticáveis nos Laboratórios Clínicos.

Desta forma, a identificação de amostras ETEC isoladas dos enquetes epidemiológicos necessita, obrigatoriamente, do apoio de Laboratórios de Pesquisa com infraestrutura adequada. Neste sentido, muitos pesquisadores têm utilizado para a identificação dos FC, provas sorológicas desenvolvidas com anticorpos monoclonais (Nirdnoy *et al.*, 1997).

Assim sendo, Viboud *et al.* (1993b) desenvolveram os primeiros trabalhos epidemiológicos com monoclonais, demonstrando também a especificidade dos mesmos contra CFA/III, CS7, CS17, PCFO159 e PCFO166 em provas de “Western blot”, “Immunegold” e Inibição do ELISA.

A vantagem da utilização de anticorpos monoclonais, ao invés dos policlonais, em testes de imunodiagnóstico, é a alta especificidade dos mesmos, podendo ser estes produzidos em quantidades ilimitadas, através da expansão de hibridomas estocados.

Como no preparo dos soros policlonais, uma gama muito grande de diferentes anticorpos são produzidos, sendo que esta variação reflete na obtenção de baixos títulos em diversas reações, além de diminuir a especificidade da técnica por apresentarem muitas reações falso-positivas e falso negativas.

A relevância de uma melhor caracterização e utilização dos MAbs anti-PCFO2 neste trabalho deve-se, principalmente, ao fato da fimbria PCFO2 ter sido identificada e caracterizada em cepas ETEC isoladas no nosso meio (Ricci *et al.*, 1997). Para estes estudos, investiu-se muito no preparo da infra-estrutura necessária, expandindo-se os hibridomas e purificando-se os diversos FC.

No que diz respeito à purificação destes FC, vários métodos têm sido descritos, baseados nas características físico-químicas destes antígenos. Porém, utilizou-se no preparo dos mesmos, a mesma metodologia desenvolvida para PCFO2, até a etapa de obtenção das frações DS e DI.

Desta forma, pelos resultados obtidos a metodologia utilizada, apresentou-se adequada para PCFO2, extraído e purificado a partir de duas cepas padrão de PCFO2. Por outro lado, avaliando-se a mesma metodologia na purificação dos demais FC e tendo-se como critério o número de bandas observadas em SDS-PAGE, para o preparo de CFA/I, CFA/II (CS1, CS3), CFA/IV (CS4, CS6) e PCFO159, a fração DS demonstrou ser mais adequada para os estudos subsequentes. Quanto à fração DI, nos preparados CFA/II (CS2, CS3) e CFA/III, menor número de bandas contaminantes foi encontrado. Estes resultados devem refletir concentrações diferentes de aminoácidos hidrofóbicos, como já descrito para diferentes cepas produtoras de CFA/I (Fleckenstein *et al.*, 1996).

Com base nestes resultados e tendo-se em vista a dificuldade de infra-estrutura para a purificação total destes FC, estes foram utilizados nos experimentos realizados processados até as frações DS ou DI. Com relação à PCFO2, apesar de observar-se, de maneira geral, menor número de bandas nas frações DS, perda significativa do material extraído foi observada nas frações DI. Estes resultados demonstram que a utilização, ou não da diálise com DOC na metodologia de purificação de PCFO2 dever ser re-avaliada.

Com relação ao preparo das soluções dos MAb's obtidos nos líquidos ascíticos, apenas os pertencentes ao isotipo IgG2b puderam ser purificados em coluna de Sepharose-Proteína A, uma vez que esta é incapaz de adsorver anticorpos do isotipo IgA. Entretanto, comparando-se as concentrações protéicas e os títulos determinados dos MAb's em provas de ELISA indireto, utilizando-se placas sensibilizadas com PCFO2 antes e depois da purificação, verificou-se que o procedimento de purificação de IgG2b era desnecessário e improdutivo. Isto, uma vez que após purificados, os títulos destes monoclonais apresentaram-se até 16 vezes menores que os dos líquidos ascíticos correspondentes, sendo que nenhuma reação inespecífica foi observada utilizando-se estes últimos diretamente nos testes desenvolvidos. Com base nestes resultados, os experimentos e avaliações subsequentes foram realizados com os líquidos ascíticos.

No estudo da provável homologia de epítomos entre PCFO2 e os demais FC, inicialmente os soros policlonais foram utilizados em provas de ELISA indireto e em reações de "Western blot".

Inicialmente, comparando-se os títulos dos soros policlonais anti-FC, determinado nas provas de aglutinação em lâmina e ELISA indireto, verificou-se que estes foram homogêneos na primeira prova e muito variáveis e mais baixos na segunda. Uma vez que no ELISA os diversos FC foram utilizados semi-purificados, estes resultados já refletem inadequação da utilização de preparados semi-purificados nesta prova, padronizando-se a sensibilização das placas com base na concentração protéica total e não na concentração real dos FC.

Contudo, com relação à PCFO2, apesar de estar esta fimbria purificada, títulos semelhantes aos demais foram determinados no ELISA.

Quanto aos títulos determinados com os soros policlonais anti-PCFO2, frente às amostras CFA/II (CS1, CS3) e CFA/II (CS2, CS3), em provas de ELISA indireta, estes foram muito próximos aos verificados com o FC homólogo. Resultados semelhantes foram encontrados na mesma prova, revelada com os soros policlonais preparados contra estes FC, frente à PCFO2.

Esta similaridade de expressão de epítomos entre os diferentes FC, sugerida desde as avaliações com os soros policlonais, não é um fato novo, uma vez que vários trabalhos já haviam demonstrado com certos FC. Assim sendo, McConnell *et al.* (1989) trabalhando ainda com soros policlonais, foram um dos primeiros a verificar homologia antigênica entre CS1, CS2, CS4 e CS17.

Posteriormente, o mesmo foi identificado por Rudin *et al.* (1994), porém, trabalhando com MAbs preparados contra a fimbria CFA/I dissociada por tratamento com 6M de Guanidina-HCl a 25°C por 2 horas. Neste trabalho os autores demonstraram reatividade de 3 dos MAbs obtidos contra subunidades de CFA/I, com os antígenos CS2, CS4 e PCFO166, sendo estes capazes de inibir inclusive a adesão das bactérias expressando esta adesina, à linhagem celular CaCo-2.

Apoiando a similaridade de epítomos entre os diferentes FC de ETEC, a determinação da sequência N-terminal do FC PCFO20, demonstrou homologia desta fimbria de origem humana com a adesina 987P, descrita em cepas ETEC isoladas de suínos (Viboud *et al.*, 1996).

Neste trabalho, verificando-se a reatividade dos 9 MAbs em ELISA indireto e “Western blot” títulos mais elevados foram determinados na primeira prova, com monoclonais do isotipo IgA. Contudo, no “Western blot” as soluções destes MAbs reconheceram não apenas a banda de 34,5 kDa correspondente à PCFO2, como também uma banda de aproximadamente 52 kDa, à semelhança do observado frente aos soros anti-PCFO2.

Uma vez que os MAbs do isotipo IgG2b apenas foram reativos contra a banda de PCFO2, pode-se supor serem os anticorpos destes dois grupos, capazes de reconhecer epítomos

diferentes nesta fimbria. Porém, esta possibilidade precisa ser melhor investigada em trabalhos posteriores.

Desta forma, como no trabalho de Zijderveld *et al.* (1989), 23 monoclonais obtidos contra a fimbria F41, descrita em amostras ETEC isoladas de suínos, foram estudados frente à peptídeos desta adesina, obtidos por clivagem após tratamento com ultrassom. Verificou-se em provas de imunodifusão, diferenças de reatividade entre estes MAbs, em reações utilizando combinações de 2 monoclonais, frente aos polinucleotídeos obtidos. Em provas de ELISA competitivo direto, neste mesmo trabalho os autores também verificaram que 5 diferentes epítomos eram reconhecidos pelos 23 MAbs, em provas de ELISA tipo “sandwich”, reveladas simultaneamente com dois monoclonais, sendo um destes diretamente conjugado à peroxidase (Zijderveld *et al.*, 1985).

Com relação à presença de subunidades, vários fatores de colonização têm sido exaustivamente estudados com respeito às suas características bioquímicas, imunológicas, epidemiológicas e receptores específicos. Assim sendo Buhler *et al.* (1991) analisando a fimbria CFA/I, após aquecimento a 85°C por 30 minutos, na ausência de detergentes, obtiveram diferentes polipeptídeos pela incompleta dissociação da mesma. Estas subunidades apresentavam P.M. distinto e superiores aos obtidos de forma homogênea, quando a fimbria era aquecida a 100°C na presença de SDS. Portanto, estes dados demonstraram que CFA/I apresentava-se na forma monomérica, contrastando com outras fimbrias, tais como CFA/II e CFA/IV que apresentaram-se constituídas por vários tipos de subunidades protéicas. O tratamento em temperaturas inferiores a 100°C apenas não permitiu separação completa das subunidades, mas permitiu a obtenção de subunidades para a avaliação da reatividade de Mabs anti-CFA/I frente aos polipeptídeos com diferentes P.M..

No presente trabalho, resultados semelhantes aos obtidos com CFA/I foram verificados com PCFO2, que após aquecimento em solução de 6M de Guanidina-HCl 0,05M Tris, apresentou em SDS-PAGE apenas uma subunidade protéica com peso molecular correspondente a 34,5 kDa demonstrando-se, desta forma, que esta fimbria apresenta-se também na forma monomérica.

No que diz respeito à reatividade dos 9 MAbs em estudo, frente às frações obtidas, estes paenas reagiram com a banda de 34,5 kDa.

Contudo, na verificação de reconhecimento de epítomos nos demais FC, nas reações de ELISA indireto, resultados comprovados em “Western blot” foram obtidos. Desta forma, homologia entre PCFO2 e CS1, CS2, CS3, CFA/III, CS4 e CS6.

Por outro lado, reações negativas dos MAbS foram determinadas para CFA/I e PCFO159. Comprovando-se estes achados, pode-se observar em M.E.T. de preparados revelados pela técnica de “Immunegold”, que estes MAbS realmente são capazes de reconhecer epítomos nas bactérias padrão dos FC, já mencionadas como apresentando epítomos semelhantes à PCFO2.

Através destas observações, tendo-se como base o padrão de marcação, pode-se sugerir que a distribuição destes epítomos nos demais FC não é idêntica.

Quanto à padronização da Prova de Inibição do ELISA esta foi desenvolvida utilizando-se “pools” dos Mabs dos dois isotipos e pelos monoclonais 1D1C5 e 2C4F12, selecionados por terem apresentado maiores títulos. Nos experimentos realizados, todas as 66 amostras testes foram avaliadas sendo que, entretanto, apenas os resultados obtidos com as cepas enterotoxigênicas, além das cepas D252, D242 e D243, sabidamente pertencentes ao sorogrupo O2, foram apresentados.

Dentre estas, as amostras 312-2, 312-3, D242 e D243, apresentaram resultados de inibição do ELISA superiores a uma redução de 50% da D.O. do controle. Dentre estas cepas apenas as duas primeiras produtoras exclusivamente de LT, sendo que o sorogrupo das mesmas não foi pesquisado. Com relação às demais amostras positivas na Inibição do ELISA, uma sendo PCFO2 de codificação cromossômica (Faria, 1993) pode-se supor que as mesmas tenham perdido o plasmídio Ent durante estocagem e sub-cultivos.

Avaliando-se em conjunto as características fenotípicas destas cepas e os resultados obtidos nas Provas de Inibição do ELISA estes demonstraram-se, portanto, totalmente compatíveis com os verificados frente às amostras 244-1 e 275-1, padrão de PCFO2. Na comprovação destes dados, as mesmas cepas foram cultivadas a 37°C e a 16°C, apresentando reações de HMR frente às hemácias de carneiro, boi, humana e cavalo, com padrão hemaglutinante totalmente compatível à PCFO2 (resultados não apresentados). Estes dados tornam-se mais relevantes, considerando-se que as 4 cepas positivas foram isoladas de casos de diarreia em crianças no nosso meio, tendo sido as amostras 312-2 e 312-3 procedentes de Ouro Preto e as restantes do Hospital das Clínicas de Campinas.

Quanto à cepa D252, esta apesar de ser do sorogrupo O2, foi negativa dentro dos critérios padronizados para a Inibição do ELISA, considerando-se como adequadas as diluições de 1:8.000 para 1D1C5 e de 1:1.000 para 2C4F12.

Pelos resultados apresentados, a prova de Inibição do ELISA padronizada demonstrou especificidade e sensibilidade na identificação de PCFO2, cuja real frequência no

nosso meio e em ETEC isoladas de outras regiões pode ser melhor investigada através deste teste imunológico.

6. CONCLUSÕES

1. Na avaliação dos processos de purificação de PCFO2, a metodologia demonstrou-se adequada, apresentando o material purificado a partir das cepas padrão 244-1 e 275-1, apenas uma banda protéica de 34,5 kDa.
2. Tendo-se como base o número de bandas observadas em SDS-PAGE, com relação às frações DS e DI dos diferentes FC semi-purificados, verificou-se que os preparados de CFA/I, CFA/II (CS1, CS3), CFA/IV (CS4, CS6) e PCFO159 encontram-se mais adequados na fração DS.
3. No que diz respeito aos preparados de CFA/II (CS2, CS3) e CFA/III, as frações DI apresentaram-se mais purificadas, com menor número de bandas contaminantes.
4. Apesar de observar-se, de maneira geral, menor número de bandas nas frações DS de PCFO2, verificou-se significativa perda de material na fração DI, resultados que exigem uma melhor avaliação da necessidade desta etapa na metodologia de purificação deste fator.
5. Através do estudo da reatividade dos soros policlonais anti-FC, verificou-se que estes foram capazes de reagir com PCFO2. Desta forma, estes resultados foram sugestivos de homologia de epítomos entre esta fimbria e os seguintes FC: CFA/I, CFA/II (CS1 CS3), CFA/II (CS2, CS3), CFA/III, CFA/IV (CS4, CS6) e PCFO159.
6. As bandas correspondentes aos P.M. dos diferentes preparados dos FC semi-purificados foram identificados tanto em SDS-PAGE como em reações de “Western blot” reveladas pelos soros homólogos, apesar de outras bandas também terem sido observadas.
7. Com relação à fimbria PCFO2 purificada, em reações de “Western blot” os soros policlonais preparados contra este fator revelaram não só a banda de 34,5 kDa, como também uma banda com peso molecular aproximado de 52 kDa.

8. Na determinação do título dos soros policlonais, por duas diferentes provas, verificou-se pouca variação entre os mesmos. Porém, nas reações de soroaglutinação os títulos foram significativamente inferiores aos observados no ELISA indireto.
9. Verificou-se títulos equivalentes aos determinados para os soros anti-PCFO2, em reações de ELISA indireto frente à PCFO2, em reações realizadas com os soros anti-CFA/II (CS1, CS3) e anti-CFA/II (CS2, CS3), sugerindo grande homologia de epítomos entre estes FC.
10. A reatividade dos 9 diferentes MAbs anti-PCFO2 foi re-avaliada em experimentos de “Western blot”, verificando-se que os 4 MAbs do isotipo IgA reconhecem não apenas uma banda de 34,5 kDa correspondente à PCFO2, como também a banda de aproximadamente 52 kDa. Com relação aos MAbs do isotipo IgG2b, estes apenas reconhecem a banda correspondente ao PCFO2.
11. Com base na especificidade dos anticorpos monoclonais, pode-se supor a possibilidade de que a banda de 52 kDa, mencionada anteriormente, possa ser correspondente à proteínas relacionadas a este fator e apenas reveladas no “Western blot”, devido à maior sensibilidade desta técnica, quando comparada ao SDS-PAGE corado para identificação de bandas protéicas.
12. Com base na diferença de reatividade entre MAbs dos isotipos IgA e IgG2b, verificada no “Western blot”, estes dados sugerem serem os mesmos capazes de reconhecer epítomos diferentes em PCFO2.
13. Uma vez que após o tratamento e análise dos concentrados e ultrafiltrados de PCFO2 purificado com 6M de Guanidina-HCl, apenas uma banda de 34,5 kDa foi verificada em SDS-PAGE e por “Western blot”, revelado pelos 9 MAbs, conclui-se que esta fimbria é constituída por apenas um tipo de subunidade protéica.

14. Verificando-se a reatividade dos MAbs 1D1C5 e 2C4F12, respectivamente dos isotipos IgA e IgG2b, determinou-se em provas de “Western blot” que estes são capazes de reconhecer epítomos em CS1, CS2, CS3, CFA/III, CS4 e CS6. Estes dados confirmam os resultados positivos determinados frente a estes FC semi-purificados em provas de ELISA indireto reveladas pelos MAbs.
15. Por outro lado, após avaliação pelas mesmas provas, verificou-se que os 9 MAbs estudados não reconhecem epítomos em CFA/I e PCFO159.
16. Através de imunomicroscopia eletrônica revelada pelos MAbs 1D1C5 e 2C4F12, confirmou-se o reconhecimento de epítomos nos FC expressos pelas cepas padrão de CFA/II (CS1, CS3), CFA/II (CS2, CS3), CFA/III e CFA/IV (CS4, CS6).
17. Comparando-se as reações observadas e relatadas no item anterior, às obtidas frente às cepas 244-1 e 275-1, padrão de PCFO2, a reação foi menos intensa. Verificou-se também, pela distribuição da marcação, que esta é sugestiva de diferenças na expressão dos epítomos reconhecidos pelos MAbs, nas demais bactérias padrão de FC.
18. A padronização da prova de Inibição do ELISA demonstrou-se adequada tanto quando desenvolvida com “pool” dos isotipos dos MAbs como com estes, individualmente avaliados. Desta forma, apenas cepas produtoras de PCFO2 conseguiram alterar e inibir a D.O., comparada aos dos controles, para valores inferiores a 70% dos mesmos. Contudo, objetivando-se maior sensibilidade da técnica, este limite foi estabelecido e padronizado para 50% de inibição.
19. Ainda na padronização da técnica, determinou-se que na utilização dos MAbs do isotipo IgA, em especial 1D1C5, a diluição a ser utilizada com a solução preparada, deve ser de 1:8.000 e a sensibilização das placas realizada com 10µg/mL de PCFO2.
20. Por outro lado, uma vez que as soluções do isotipo IgG2b demonstraram-se menos reativas, no caso de 2C4F12, a diluição a ser utilizada como a solução preparada deve ser 1:1.000, em placas sensibilizadas com 50µg/mL de PCFO2.

21. Avaliando-se mais amplamente a prova de Inibição do ELISA, um total de 66 cepas de *E. coli*, sendo 51 destas enterotoxigênicas e 16 não ETEC, este último grupo isolado de fezes humanas diarreicas e normais, 4 amostras foram identificadas como produtoras de PCFO2.
22. As cepas identificadas mencionadas correspondem às amostras 312-2, 312-3, D242 e D243, relacionadas a dois casos de diarreia humana no nosso meio, sendo as duas primeiras procedentes de Ouro Preto e as restantes do HC-UNICAMP.
23. Com relação às amostras 312-2 e 312-3, estas produzem LT, mas ainda não foram sorogrupoas. No caso de D242 e D243, amostras sabidamente pertencentes ao sorogrupo O2, a produção de enterotoxinas não foi detectada. Porém, uma vez que PCFO2 apresenta codificação cromossômica, pode ter ocorrido perda do plasmídeo *Ent*, durante estocagem e subcultivos da cepa.
24. Com relação à D252, apesar desta cepa pertencer ao sorogrupo O2, nas condições padronizadas esta foi negativa na Inibição do ELISA.
25. Avaliando-se as cepas 312-2, 312-3, D242, D243 e D252 em provas de HMR frente à hemácias de boi, carneiro, cavalo, galinha e humanas, apenas as 4 primeiros, positivas na Inibição do ELISA, apresentaram padrão hemaglutinante ao descrito para PCFO2, a partir de cultivos a 37°C, mas não a 16°C.
26. Pelo exposto, a prova de Inibição do ELISA padronizada e avaliada, demonstrou ser um teste altamente específico e sensível para a identificação da fimbria PCFO2, cuja real frequência nas ETEC isoladas no nosso meio deve ser melhor avaliada.
27. Pelos resultados obtidos na Inibição do ELISA desenvolvida com soros policlonais, pode-se concluir a total inadequação e impossibilidade da utilização dos mesmos nestas provas, o que revela ainda mais a importância da obtenção de anticorpos monoclonais anti-FC, na caracterização e identificação dos mesmos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHTMAN, M.; MERCER, A. KUSECEK; B.; POHL, A.; HEUZENROEDER, M.; ARONSON, W.; SUTTON, A. & SILVER, R.P. Six widespred bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. **Infect Immun.**, **39**: 315-335, 1983.
- ÅHRÉN, 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.
- ALBERT, M.J.; ANSARUZZAMAN, M.; FARUQUE, S.M.; NEOGI, P.K.B.; HAIDER, K. & TZIPORI, S. An ELISA for detection of localized adherent classic enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. **J. Infect. Dis.**, **164**: 986-989, 1991.
- ALBERT, M.J.; QADRI, F.; HAQUE, A. & BHUIYAN, N.A. Bacterial clump formation at the surface of liquid culture as a rapid test for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 1397-1399, 1993.
- 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.
- ASHKENAZI, S. & CLEARY, T.G. Rapid method to detect Shiga toxin I based on binding to globotriosyl ceramid (Gb3), their natural receptor. **J. Clin. Microbiol.**, **27**: 1145-1150, 1989.
- 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.

- BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; LEVINE, M.M.; CANDY, D.C.A. & MOON, H.W. Plasmid-mediated adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli*. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, 2: 534-538, 1983.
- BALDWIN, T.J.; KNUTTON, S.; SELLERS, L.; HERNANDEZ, H.A.M.; AIKEN, A. & WILLIAMS, P.H. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a heat-labile toxin antigenically related to *E. coli* hemolysin. **Infect. Immun.**, 60: 2092-2095, 1992.
- BALDWIN, T.J.; WARD, W.; AITKEN, A.; KNUTTON, S. & WILHAMS P.H. Elevation of intracellular free calcium levels in HEP-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** 59: 1599-1604, 1991.
- BASTA, M.; KARMALI, M. & LINGWOOD, C. Sensitive receptor-specified enzyme-linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* verocytotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, 27: 1617-1622, 1989.
- BENJAMIN, P.M.; CRONAN, S.; MILLER, S.I. & WANKE, C.A. Characterization of an invasive genetic locus in enteroaggregative *Escherichia coli*. 94th General Meeting of the American Society for Microbiology, Las Vegas, p.83, 1994.
- BESSEN, D. & GOTSSHLICH, E.C. Enhanced invasion by enteroinvasive *Escherichia coli* of multinucleated HeLa cells. **FEMS Microbiol. Lett.**, 44: 313-316, 1987.
- BETLEY, M.J.; MILLER, V.L. & MIKELANOS, J.J. Genetics of bacterial enterotoxins. **Ann. Rev. Microbiol.**, 40: 577-608, 1986.
- 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.

- 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.
- BINSZTEIN, N.; JOUVE, M. J.; VIBOUD, G. I.; LOPEZ MORAL, L.; RIVAS, M.; ØRSKOV, I.; ÅHRÉN, C.M. & SEVENNERHOLM, A.-M. Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Argentina. **J. Clin. Microbiol.**, **29**: 1893-1898, 1991.
- 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., ALONSO, M.P.; GONZÁLES, E.A.; BLANCO, M. & GARABAL, J.I. Virulence factors of bacteraemic *Escherichia coli* with particular reference to cytotoxic necrotizing factor (CNF) production by P-fimbriated strains. **J. Med. Microbiol.**, **31**: 175-183, 1990.
- 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.
- BLANCO, J.; BLANCO, M.; ALONSO, M.P.; BLANCO, J.E.; GARABAL, J.I. & GONZÁLES, E.A. Serogroups of *Escherichia coli* strains producing cytotoxic necrotizing factors CNF1 and CNF2. **FEMS Microbiol. Lett.**, **96**: 155-160, 1992.
- 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. & 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.; GONZÁLES, E.A.; GARCÍA, S.; BLANCO, M.; REGUEIRO, B. & BERNÁZDEZ, I. Production of toxin by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (North-western Spain). **Vet. Microbiol.**, 18: 297-311, 1988.
- BROWN, J.E.; SETHABUTR, O.; JACKSON, M.P.; LOLEKHA, S. & ECHEVERRIA, P. Hybridization of *Escherichia coli* producing Shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II, and a variant of Shiga-like toxin II with synthetic oligonucleotide probes. **Infect. Immun.**, 57: 2811-2814, 1989.
- BURNENSA, A.; FREY, A.; LIOR, H. & NICOLET, J. Prevalence and clinical significance of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from cattle in herds with and without calf diarrhoea. **J. Vet. Med. B.**, 42: 301-318, 1995.
- BÜHLER, T.; HOSCHÜTZKY, H. & JANN, K. Analysis of colonization factor antigen I, an adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli* O78:H11: fimbrial morphology and location of the receptor-binding site. **Infect. Immun.**, 59: 3876-3882, 1991.
- CASSELS, F. J. & WOLF, M. K. Colonization factors of diarrheagenic *Escherichia coli* and their intestinal receptors. **J. Ind. Microbiol.**, 15: 214-226, 1995.
- 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 epitops, 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.
- CLEMENTS, J.D.; SVENNERHOLM, A.-M.; HARRIS, J.R.; HUDA, S.; RAO, M.; NEOGY, P.K.; KLAN, M.R.; ANZARUZZAMAN, M.; RAHAMAN, S.; ASHAMED, F.; SACK, D.A.; KAY, B.; LOON, F.V. & HOLMGREN, J. Seroepidemiologic evaluation of anti-toxic and anti-colonization factor immunity against infections by LT-producing *Escherichia coli* in rural Bangladesh. **J. Infect. Dis.**, 162: 448-453, 1990.
- 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.
- CRAVIOTO, A.; TELLO, A.; NAVARRO, A.; RUIZ, J.; VILLAFAN, H.; URIBE, F. & ESLAVA, C. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. **Lancet**, 2: 262-264, 1991.
- 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.
- DAY, N.P.; SCOTLAND, S.M. & ROWE, B. Comparison of a HEp-2 tissue culture test with the Serény test for detection of enteroinvasiveness in *Shigella spp.* and *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, 13: 596-597, 1981.

- 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.
- DONNENBERG, M.S.; CALDERWOOD, S.B.; DONOHUE-ROLFE, A.; KEUSCH, G.T. & KAPER, J.B. Construction and analysis of Tn*phoA* mutants of enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEp-2 cells. *Infect. Immun.*, **58**: 1565-1571, 1990.
- DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. & FINLAY, B.B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.*, **5**: 109-114, 1997.
- DOWNES, F.P.; GREEN, J.H.; GREENE, K.; STROCKBINE, N.; WELLS, J.G. & WACHSMUTH, I.K. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II. *J. Clin. Microbiol.*, **27**: 1292-1297, 1989.
- 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.
- DUPONT, H.L.; FORMAL, S.B.; HORNICKE, R.B.; SNYDER, M.J.; LIBONATI, J.P.; SHEAHAN, D.G.; LABREC, E.H. & KALAS, J.P. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. *N. Engl. J. Med.*, **285**: 1-9, 1971.
- ECHEVERRIA, P.; SERIWATANA, J.; TAYLOR, D.N.; CHANGCHAWALIT, S.; SMYTH, C.J.; TWOHIG, J. & ROWE, B. Plasmids coding for colonization factor antigens I and II, heat-labile enterotoxin and heat-stable enterotoxin A2 in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **51**: 626-630, 1986.
- ECHEVERRIA, 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.

EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. ed., **Burgess Publishing Co.**, Minneapolis, 1972.

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.

ENDO, Y.; TSURUGI, K.; YUTSUDO, T.; TAKEDA, Y.; OGASAWARA, K. & IGARASHI, K. Site of action of a Verotoxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. **Eur. J. Biochem.**, **171**: 45-50, 1988.

EVANS, D.J. & EVANS JR., D.G. 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.

EVANS, D.G.; GRAHAM, D.Y.; EVANS, D.J.; JR & OPEKUN, A. Administration of purified colonization factor antigens (CFA/I, CFA/II) of enterotoxigenic *Escherichia coli* to volunteers. **Gastroenterology**, **87**: 934-940, 1984.

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* of enterotoxigenic for human. **Infect. Immun.**, **12**: 656-657, 1975.

EWING, W.H. EDWARDS and EWING'S identification of Enterobacteriaceae, 4 ed. Capítulo 6. The genus *Escherichia coli*; pp 93-134. Elsiever, Nova York, 1986.

- FARIA, F.P. de Evidências da codificação cromossômica de um possível novo fator de colonização (PCFACC84) em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas isoladas de casos de diarreia humana. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1993.
- FARMER III, J.J. & DAVIS, R.B. H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. **J. Clin. Microbiol.**, 22: 620-625, 1985.
- FINLAY, B.B.; ROSENSHINE, I.; DONNEMBERG, M.S. & KAPER, J.B. Cytoesqueletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. **Infect. Immun.**, 60: 2541-2543, 1992.
- 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.
- FORMAL, S.B. & HORNICK, R.B. Invasive *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, 137: 641-644, 1978.
- FUKUTA, S.; MAGNANI, J.L.; TWISSY, E.M.; HOLMES, R.K. & GINSBURG, V. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins LTh-I, LT-IIa and LT-IIb. **Infect. Immun.**, 56: 1748-53, 1988.
- 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.

- GICQUELAIS, K.G.; BALDINI, M.M.; MARTÍNEZ, J.; MAGGI, L.; MARTÍN, W.C.; PRADO, V.; KAPER, J.B. & LEVINE, M.M. Practical and economical method for using biotinylated DNA probes with bacterial colony blots to identify diarrhea-causing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 2485-2490, 1990.
- GIRALDI, R. & GUTH, B.E.C. Presence of colonization factor antigen IV (CS5, CS6) in O29:H21 enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Brazil. **Brazilian Med. Biol. Res.**, **26**: 1251-1259, 1993.
- GIRÓN, J.A.; DONNEMBERG, M.S.; MARTIN, W.C.; JARVIS, K.G. & KAPER J.B. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfp*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. **J.Infect. Dis.**, **168**: 1037-1041, 1993.
- 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 ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, **12**: 71-82, 1994.
- 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.
- 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.
- GOMES, T.A.T; RASSI, V.; MACDONALD, K.L.; RAMOS, S.R.T.S.; TRABULSI, L.R.; VIEIRA, M.A.M.; GUTH, B.E.C.; CANDEIAS, J.A.N.; IVEY, C.; TOLEDO, MR.F. & BLAKE, P.A. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, **164**: 331-337, 1991.

- GOMES, T.A.T.; TOLEDO, M.R.F.; TRABULSI, L.R.; WOOD, P.K. & MORRIS JR., J.G. DNA probes for identification of enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **25**: 2025-2027, 1987.
- GONZÁLES, E.A. & BLANCO, J. Propriedades de los *Escherichia coli* causantes de diarrea en seres humanos: *Escherichia coli* enterotoxigênicos (ETEC), enteropatogênicos clássicos (EPEC) y enteroinvasores (EIEC). Monografia nº 27 de La Universidad de Santiago de Compostela, 1987.
- 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.
- GUNZBURG, S.T.; CHANG, B.J.; ELLIOT, S.J.; BURKE, V. & GRACEY, M. Diffuse and enteroaggregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. **J. Infect. Dis.**, **167**: 755-758, 1993.
- GUTH, B.E.C.; SILVA, R.M.; TOLEDO, M.R.F.; LIMA, T.M.O. & TRABULSI, L.R. Virulence factors and biochemical characteristics of serotypes of *Escherichia coli* serogroup O29. **J. Clin. Microbiol.**, **27**: 2161-2164, 1989.
- GUTH, B.E.C.; TWIDDY, E.M.; TRABULSI, L.R. & HOLMES, R.K. Variation in chemical properties and antigenic determinants among type II heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **54**: 529-536, 1986.
- GYLES, C.L.; SO, M. & FALKOW, S. The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, **130**: 40-9, 1974.
- GYLES, C.L.; PALCHAUDHURI, S. & MAAS, W.A. A conjugative plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. **Science**, **198**: 198-9, 1977.

- HAMMERMUELLER, J.; KRUTH, S.; PRESCOTT, J. & GYLES, C. Detection of toxin genes in *Escherichia coli* isolated from normal dogs and dogs with diarrhea. **Can. J. Vet. Res.**, **59**: 265-270, 1995.
- HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, **48**: 422-427, 1972.
- 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.
- HERRINGTON, D.A.; HALL, R.H.; LOSONSKY, G.; MELLKALANOS, J.J.; TAYLOR, R. K. & LEVINE; M.M. Toxin, Toxin-coregulated pili, and the *tox R* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. **J. Exp. Med.**, **168**: 1487-1492, 1988.
- 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. cap. 14, pp. 287-307, Academic Press Limited, London, U.K., 1989.
- HOBBS, M. & MATTICK, J.S. Common components in the assembly of type 4 fimbriae, DNA transfer systems, filamentous phage and protein-secretion apparatus: a general system for the formation of surface-associated protein complexes. **Mol. Microbiol.**, **10**: 233-243, 1993.

- HOLMES, T.K.; TWIDDY, E.M. & PICKETT, C.L. Purification and characterization of type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.** **53**: 464-473, 1986.
- HONDA, T.; ARITA, M. & MIWATANI, T. Characterization of new hydrophobic pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*: a possible new colonization factor. **Infect. Immun.**, **43**: 959-965, 1984.
- HONDA, T.; CAKIR, N.; ARITA, M. & MIWATANI, T. Purification and characterization of the CS2 pili of colonization factor antigen II produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Microbiol. Immunol.**, **33**: 65-75, 1989.
- HONDA, T.; MIWATANI, I & NISHIBUCHI, M. Comparison of preservation methods for enterotoxigenic *Escherichia* producing heat-labile enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, **29**: 2326-2328, 1991.
- HONDA, T.; WELTPRASIT, N.; ARITA, M. & MIWATANI, T. Production and characteriazation of monoclonal antibodies to a pilus colonization factor (Colonization factor antigen III) of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **57**: 3452-3457, 1989.
- HUGHES, J.M.; MURAD, F.; CHANG, B. & GUERRANT, R.L. Role of cyclic GMP in the activity of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. **Nature**, **271**:755-6, 1978.
- ITO, H.; TERA, H.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y. & NISHIBUCHI, M. Cloning and nucleotide sequencing of verotoxin 2 variant genes from *Escherichia coli* O91:H21 isolated from a patient with the hemolytic uremic syndrome. **Microbiol. Pathog.** **8**: 47-60, 1990.
- JACKSON, M.P.; NEILL, R.J.; O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. & NEWLAND, J.W. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. **FEMS Microbiol. Lett.** **44**: 109-114, 1987.

- JALLAT, C.; LIVRELLI, V.; DARFEUILLE-MICHAUD, A.; RICH, C. & JOLY, B. *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 2031-2037, 1993.
- JERSE, A.E. & KAPER, J.B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-Kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infect. Immun.**, **59**: 4302-4309, 1991.
- JERSE, A.E.; YU, J.; TALL, B.D. & KAPER, J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **87**: 7839-7843, 1990.
- JOHNSON, W.M. & LIOR, H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. **Microb. Pathogen.**, **4**: 103-113, 1988.
- 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.
- KAPER, J.B. & JARVIS, K.G. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. **Infect. Immun.**, **64**: 4826-4829, 1996.
- KARCH, H. & MEYER, T. Evaluation of oligonucleotide probes for identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, **27**: 1180-1186, 1989.
- KARJALAINEN, T.K.; EVANS, D.G.; SO, M. & LEE, C.H. Molecular cloning and nucleotide sequence of the colonization factor antigen I gene of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **57**: 1126-1130, 1989.
- KARMALI, M.A.; PETRIC, M.; LIM, C.; FLEMING, P.C.; ARBUS, G.S. & LIOR, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, **151**: 775-782, 1985.

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

KENNEDY, D.J.; GREENBERG, R.N.; DUNN, J.A.; ALBERTHY, R.; RYERSE, J.S. & GUERRANT, R.L. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STb on the intestine of mice, rats, rabbits and piglets. **Infect. Immun.**, **46**:639-646, 1984.

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

KLEMM, P.; GAASTRA, W.; McCONNEL, M.M. & SMITH, H.R. The CS2 fimbrial antigen from *Escherichia coli*, purification, characterization and partial covalent structure. **FEMS. Microbiol. Lett.**, **26**: 207-210, 1985.

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.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P.H. & McNEISH, A.S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **57**: 1290-1298, 1989.

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.

KNUTTON, S.; PHILLIPS, A.D.; SMITH, H.R.; GROSS, R.J.; SHAW, R.; WATSON, P. & PRICE, E. Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. **Infect. Immun.**, **59**: 365-371, 1991.

- KONOWALCHUCK, J.; SPEIRS, J.I. & STAVRIC, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **18**: 775-779, 1977.
- KORHONEN, T. K.; ALTONEN, M. V.; PARKKINEN, J.; VÄISÄNEN-RHEN, V.; FINNE, J.; ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I. SVENSON, S. B. & MÄKELÄ, 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.
- KUSTERS, J.G. & GAASTRA, W. Fimbrial operons and evolution, *In* Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis, and vaccines. Klemm, P., p. 189-207. CRC Press Inc., Boca Raton, Fla, 1994.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227**: 680-5, 1988.
- LEVINE, M.M. *Escherichia coli* infections. In: Bacterial Vaccines, cap. 7 pp.187-235, London, Academic Press, 1984.
- LEVINE, M.M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **J. Infect. Dis.**, **155**: 377-389, 1987.
- 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 *Echerichia coli* diarrheal infections in a 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.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 225-270, 1995.

- LEVINE, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E. & CLEMENTS, M.L. New knowledge on pathogenic of bacterial enteric infections as applied to vaccine developments. **Microbiol. Rev.** **147**: 510-550, 1983.
- LEVINE, M.M.; NATARO, J.P.; BALDINI, M.M.; KAPER, J.B.; BLACK, R.E.; CLEMENTS, M.L. & O'BRIEN, A.D. The diarrheal response of humans to some classical serotype enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **J. Infect. Dis.**, **152**: 550-559, 1985.
- 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.
- 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.
- LOPEZ-VIDAL, Y. & SVENNERHOLM, A.-M. Monoclonal antibodies against the the different subcomponents of colonization factor antigen II of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 1906-1912, 1990.
- 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.
- MANIAR, A.C.; WILLIAMS, T.; ANAND, C.M. & HAMMOND, G.W. Detection of verotoxin in stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 134-135, 1990.
- MARCH, S.B. & RATNAM, S. Latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* serotype O157. **J. Clin. Microbiol.**, **27**: 1675-1677, 1989.

- 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.
- MATHEWSON, J.J.; JOHNSON, P.C.; DUPONT, H.L.; SATTERWHITE, T.K. & WINSOR, D.K. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. **J. Infect. Dis.**, **154**: 524-527, 1986.
- 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.; 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.
- 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.; 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.
- MOOI, F.R. & de GRAAF, F.K. Molecular biology of fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **118**: 119-138, 1985.
- NATARO, J.P.; DENG, Y.; MANEVAL, D.R.; GERMAN, A.L.; MARTIN, W.C. & LEVINE, M.M. Aggregative adherence fimbrial I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infect. Immun.**, **60**: 2297-2304, 1992.

- NATARO, J.P.; HICKS, S.; PHILLIPS, A.D.; VIAL, P.A. & SEARS, C.L. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Infect. Immun.**, **64**: 4761-4768, 1996.
- 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, J.P. Non-EPEC *Escherichia coli* that adhere to HEp-2 Cells. **Rev. Microbiol., São Paulo**, **27 (Suppl.1)**: 67-71, 1996a.
- NATARO, J.P. Molecular diagnosis of EPEC. **Rev. Microbiol., São Paulo**, **27 (Suppl.1)**: 54-57, 1996b.
- NATARO, J.P.; YIKANG, D.; COOKSON, S.; CRAVIOTO, A.; SAVARINO, S.J.; GUERS, L.D.; LEVINE, M.M. & TACKET, C.O. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. **J. Infect. Dis.**, **171**: 465-468, 1995.
- NATARO, J.P.; YIKANG, D.; GIRÓN, J.A.; SAVARINO, S.J.; KOTHARY, M.H. & HALL, R. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. **Infect. Immun.**, **61**: 1126-1131, 1993.
- NIELSEN, N.O. Edema disease. In: Disease of Swine 5th ed., cap 45, pp. 478-490, Iowa State University Press, 1984.
- NIRDNOY, W.; SERICHANTALERGS, O.; CRAVIOTO, A.; LEBRON, C.; WOLF, M.; HOGE, C.W.; SVENNERHOLM, A.-M.; TAYLOR, D.N. & ECHEVERRIA, P. Distribution of colonization factor antigens among enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with diarrhea in Nepal, Indonesia, Peru, and Thailand. **J. Clin. Microbiol.**, **35**: 527-530, 1997.
- O'BRIEN, A.D. & HOLMES, R.K. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.**, **51**: 206-220, 1987.

- 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.
- ØRSKOV, F.; ØRSKOV, I.; JANN, B. & JANN, K. Immunoelectrophoretic patterns of extracts from all *Escherichia coli* O and K antigen test strains: correlation with pathogenicity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.*, 79: 142-152, 1971.
- PADHYE, N.V. & DOYLE, M.P. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotypes O157:H7 and O126:H11. *J. Clin. Microbiol.*, 29: 99-103, 1991.
- PÁL, T.; PÁCSA, A.S.; EMÖDY, L.; VÖRÖS, S. & SÉLLEY, E. Modified enzyme-linked immunosorbent assay for detecting enteroinvasive *Escherichia coli* and virulent *Shigella* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 21: 415-418, 1985.
- PARREIRA, V.R. Síndrome da cabeça inchada (SCI) em galinhas - Detecção sorológica do vírus da rinotraqueíte de perus (TRTV) e caracterização dos fatores de virulência de *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 1994.
- PEDROSO, M.Z.; FREYMULLER, E.; TRABULSI, L.R. & GOMES, T.A.T. Attaching-effacing lesions and intracellular penetration in HeLa cells and human duodenal mucosa by two *Escherichia coli* strains not belonging to the classical enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. *Infect. Immun.*, 61: 1152-1156, 1993.
- PERERA, L.P.; MARQUES, L.R.M.; O'BRIEN, A.D. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to Shiga-like toxin II of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and use of the monoclonal antibodies in a colony enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 2127-2131, 1988.

- PEREZ-CASAL, J.; SWARTLEY, J.S. & SCOTT, J.R. Gene encoding the major subunit of CS1 pili of human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, **58**: 3594-3600, 1990
- PITON, M.A. de J. Caracterização de amostras de *Escherichia coli* isoladas de casos de diarreia em pacientes encaminhados ao hospital das clínicas da UNICAMP. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, 1997.
- REIS, M.H.; GUTH, B.E.C.; GOMES, T.A.T.; MURAHORSCHI, J. & TRABULSI, L.R. Frequency of *Escherichia coli* strains producing heat-labile toxins or heat-stable toxins or both in children with and without diarrhea in São Paulo. **J. Clin. Microbiol.**, **15**: 1062-1064, 1982.
- 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. & CASTRO, A.F.P. Indirect haemagglutination test for the detection of thermolabile (LT) from enterotoxin *Escherichia coli*. **Med. Microbiol. Immun.**, **175**: 251-260, 1986.
- 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.
- RICCI, L.C.; FARIA, F.P. DE; TAVARES, G.R.E.; PORTO, P.S.S. & CASTRO, A.F.P. DE Colonization factors among enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated from diarrheic children in Ouro Preto (Minas Gerais state) and Paulínia (São Paulo state), Brazil. **Rev. Microbiol.**, **25**: 11-15, 1994.
- RICCI, L.C.; SIQUEIRA, P.S.; CASTRO, A.F.P. Gangliosides inhibit serological reactions for the detection of cholera and heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **25**: 805-807, 1992.

- RICO-MARTINEZ, M.G. Molecular biology in the pathogenesis of *Shigella* sp and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Rev. Lat. Microbiol.**, **37**: 367-385, 1995.
- RILEY, L.W. The epidemiologic, clinical and microbiologic features of hemorrhagic colitis. **Ann. Rev. Microbiol.**, **41**:383-407, 1987.
- 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 serogroup O55. **Infect. Immun.**, **64**: 2680-2686, 1996.
- ROSENSHINE, I.; DONNENBERG, M.S.; KAPER, J.B. & FINLAY, B.B. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. **EMBO J.**, **11**: 3551-3560, 1992.
- 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. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Ann. Rev. Microbiol.** **29**: 333-353, 1975.
- SACK, R.B. The epidemiology of diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Infect. Dis.**, **137**: 639-640, 1978.
- SALYERS, A.A. & WHITH, D.D. *Escherichia coli* gastrointestinal infections. *In*: Bacterial pathogenesis. A Molecular approach. Washington, United States, ASM Press. pp. 190-203, 1994a.

- SALYERS, A.A. & WHITH, D.D. Virulence factors that promote colonization. *In: Bacterial pathogenesis. A Molecular approach.* Washington, United States, ASM Press. pp. 30-45, 1994b.
- SARFF, L.D.; McCRACKEN, G.H.; SCHIFFER JR., M.S.; GLODE, M.P.; ROBBINS, J.B.; ØRSKOV, I. & ØRSKOV, F. Epidemiology of *Escherichia coli* K1 in healthy and diseased newborns. **Lancet.**, 1: 1099-1104, 1975.
- SAVARINO, S.J.; FASANO, A.; ROBERTSON, D.C. & LEVINE, M.M. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. **J. Clin. Invest.**, 87: 1450-1455, 1991.
- SCALETISKY, I.C.A.; PELAYO, J.S.; GIRALDI, R.; RODRIGUES, J.; PEDROSO, M.Z. & TRABULSI, L.R. EPEC adherence to HEp-2 cells. **Rev. Microbiol., São Paulo**, 27 (Suppl.1): 58-62, 1996.
- SCALETISKY, I.C.A.; SILVA, M.L.M. & TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infect. Immun.**, 45: 534-536, 1984.
- SCALETISKY, I.C.A.; MILANI, S.R.; TRABULSI, L.R. & TRAVASSOS, L.R. Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infect. Immun.**, 56: 2979-2983, 1988.
- SCHAECHTERFER, M.; MEDOFF, G. & EISENSTEIN, B. Mechanisms of microbiol disease. 2nd 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.
- SERAFIM, M.B.; CASTRO, A.F.P.; LEONARDO, M.B. & MONTEIRO, A.R. A single radial immune haemolysis (SRHI) test for the detection of thermolabile (LT) enterotoxins of *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, 14: 473-478, 1981.

- SMALL, P.L.C. & FALKOW, S. Development of a DNA probe for the virulence plasmid of *Shigella* spp and enteroinvasive *Escherichia coli*. In Microbiology. Leite, L., Am. Soc. for Microbiol., Washington, D.C., pp.121-124, 1986.
- SMITH, H.W. & GYLES, C.L. The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. **J. Med. Microbiol.**, 3: 387-401, 1970.
- SMITH, H.W. & HALLS, S. Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. **J. Pathol. Bacteriol.**, 93: 499-529, 1967.
- SMYTH, C.J. Serologically distinct fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* of sorotype O6:K15:H16 or H⁻. **FEMS Microbiol. Lett.**, 21: 51-57, 1984.
- SMYTH, C.J. Two mannose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6:H16 or H⁻ isolated from travellers and infantile diarrhoea. **J. Gen. Microbiol.**, 128: 2081-2096, 1982.
- SOMMERFELT, H.; SVENNERHOLM, A.-M.; KALLAND, K.H.; HAUKANES, B.I. & BJORVATN, B. Comparative study of colony hybridization with synthetic oligonucleotide probes and enzyme-linked immunosorbent assay for identification of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 530-534, 1988.
- SPEIRS, J.I.; STAVRIC, S. & KONOWALCHUK, J. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells. **Infect. Immun.** 16: 617-622, 1977.
- SPIKA, J.S.; PARSONS, J.E.; NORDENBERG, D.; WELLS, J.G.; GUNN, R.A. & BLAKE, P.A. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with *Escherichia coli* O157:H7 in a day care center. **J. Pediatr.**, 109: 287-291, 1986.

- STROCKBINE, N.A.; JACKSON, M.P.; SUNG, L.M.; HOLMES, R.K. & O'BIEN, A.D. Cloning and sequencing of the genes for Shiga toxin from *Shigella dysenteriae* type I. **J. Bacteriol.** 170: 1116-1122, 1988.
- STUART, T.; GUNZBURG, N.G.T. & ANDLEE, W.R. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. **J.Clin.Microbiol.**, 33: 1375-1377, 1995.
- SUSSMAN, M. The virulence of *Escherichia coli*. Reviews and Methods. The Society for General Microbiology by Academic Press, 1985.
- SVENNERHOLM, A.-M. & HOLMGREN, J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM1-ELISA) produce. **Curr. Microbiol.**, 1:19-23, 1978.
- 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.; LOPEZ-VIDAL, J.H.Y; McCONNELL, M.M. & ROWE, B. Role of PCF8775 antigen and its coli surface components for colonization, disease, and protective immunogenicity of *Escherichia coli* in rabbits. **Infect. Immun.**, 56: 523-528, 1988.
- SVENNERHOLM, A.-M.; WENNERÅS, 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.
- SVENNERHOLM, A.-M. & WIKLUND, G. Rapid GM1-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. **J. Clin. Microbiol.**, 17: 596-600, 1983.

- SVENNERHOLM, A.-M.; WILKTROM, M.; LINDBLAD, M. & HOLMGREN, J. Monoclonal antibodies to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins: neutralizing activity and differentiation of human and porcine LTs and cholera toxin. **Med. Biol.**, **64**:23-30, 1986
- TACKET, C.O.; MANNEUAL, D.R. & LEVINE, M.M. Purification, morphology and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. **Infect. Immun.**, **55**: 1963-1969, 1987.
- 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.
- TISON, D.L. Culture confirmation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by direct immunofluorescence. **J. Clin. Microbiol.**, **28**: 612-613, 1990.
- TOLEDO, M.R.F.; ALVARIZA, M.D.C.B.; MURAHOVSKI, J.; RAMOS, S.R.T.S. & TRABULSI, L.R. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infect. Immun.**, **39**: 586-589, 1983.
- TOLEDO, M.R.F. & TRABULSI, L.R. Correlation between biochemical and serological characteristics of *Escherichia coli* and results of the Sereny test. **J. Clin. Microbiol.**, **17**: 419-421, 1983.
- TOWBIN, H.; STAECHELIN, T. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Science**, **76**: 4350-4354, 1979.
- TRABULSI, L.R. **Microbiologia Básica**, 2ª ed., ed. Atheneu, Rio de Janeiro. 355p., 1981.

- 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* serogroups. **Rev. Microbiol., São Paulo**, **27 (Suppl.)**: 1-6, 1996.
- TZIPORI, S.J.; MONTANARO; ROBINS-BROWNE, R.M.; VIAL, P.A.; GIBSON, R. & LEVINE, M.M. Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model. **Infect. Immun.**, **60**: 5302-5306, 1992.
- 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.
- VAN ZIJDERVELD, F.G.; WESTENBRINK, F.; ANAKOTTA, J.; BROUWERS, R.A.M. & VAN ZIJDERVELD, A.M. Characterization of the F41 fimbrial antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli* by using monoclonal antibodies. **Infect. Immun.**, **57**: 1192-1199, 1989.
- VIAL, P.A.; ROBINS-BROWNE, R.M.; LIOR, H.; PRADO, V.; KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MANEVAL, D.; ELSAYED, A. & LEVINE, M.M. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. **J. Infect. Dis.**, **158**: 70-79, 1988.
- VIBOUD, G.I.; BINSZTEN, N. & SVENNERHOLM, A.-M. A new fimbrial putative colonization factor PCF020, in human enterotoxigenic *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol.** **61**: 5190-5197, 1993a.
- VIBOUD, G.I.; BINSZTEN, N. & SVENNERHOLM, A.-M. Characterization of monoclonal antibodies against putative colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their use in an Epidemiological Study. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 558-564, 1993b.
- VIBOUD, G.I.; JONSON, G.; DEAN-NYSTROM, E. & SEVENNERHOLM, A.-M. The structural gene encoding human enterotoxigenic *Escherichia coli* PCFO20 is homologous to that for porcine 987P. **Infect. Immun.**, **64**: 1233-1239, 1996

- VOLLER, G.; BIDWELL, D. E. & BARTLETT, A. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. In: Manual of clinical immunologic. Rose, N. R. & Friedman, H.; ed. Washington, American Society for Microbiology. cap. 69, p. 506, 1976.
- WAGNER, A.R.; MURRAY, B.E.; ECHEVERRIA, P.; MATHERWSON, J.J. & DUPONT, H.L. Enteroinvasive *Escherichia coli* in travellers diarrhea. **J. Infect. Dis.**, **158**: 640-642, 1988.
- WAI, S.N.; TAKADE, A. & ZMAKO, K. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiol. Lett.** **135**: 17-22, 1996.
- WANKE, C. & GUERRANT, R. Small-bowel colonization alone is a cause of diarrhea. **Infect. Immun.**, **55**: 1924-1926, 1987.
- WHIPP, S.C. Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. **Infect. Immun.**, **58**: 930-934, 1990.
- WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R.; McCONNELL, 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.
- WILLSHAW, G.A.; SMITH, H.R.; SCOTLAND, S.M.; FIELD, A.M. & ROWE, B. Heterogeneity of *Escherichia coli* phages encoding verocytotoxin: comparison of cloned sequence determining VT1 and VT2 and development of specific gene probes. **J. Gen. Microbiol.**, **133**: 1309-1317, 1987.
- WILSON, M.R. Enteric colibacillosis. In: Disease of Swine, 5th ed., cap 44, pp. 471-477 - Iowa State University Press, 1984.

- WOLF, M.K.; TAYLOR, D.N.; BOEDEKER, E.C.; HYAMS, K.C.; MANEVAL, D.R.; LEVINE, M.M.; TAMURA, K; WILSON, R.A. & ECHEVERRIA, P. Characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from U. S. troops deployed to the Middle East. **J. Clin. Microbiol.**, **31**: 851-856, 1993.
- WOODWARD, M.J.; WRAY, C.; RIDHA, G.A. & WALTON, J.R. Plasmid and chromosomal related toxin polymorphism of *Escherichia coli* serogroup O138; plasmid transfer and co-integration with pRP4. **J. Med. Microbiol.**, **31**: 241-249, 1990.
- YAMAMOTO, T. & ECHEVERRIA, P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains pathogenic for humans. **Infect. Immun.**, **64**: 1441-1445, 1996.
- YAMAMOTO, T.; KOYAMA, Y.; MATSUMOTO, M.; SONODA, E.; NAKAYAMA, S.; UCHIMURA, M.; PAVEENKITTIPORN, W.; TAMURA, K.; YOKOTA, T. & ECHEVERRIA, P. Localized, aggregative, and diffuse adherence to HeLa cells, plastic, and human small intestines by *Escherichia coli* isolated from patients with diarrhea. **J. Infect. Dis.**, **166**: 1295-1310, 1992.
- YANO, T.; CATANI, C.F.; ARITA, M.; HONDA, T. & MIWATANI, T. Purification and partial characterization of a hemagglutinating factor (HAF): a possible adhesive factor of the diffuse adherence of *Escherichia coli* (DAEC). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **38**: 401-406, 1996.
- YANO, T.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; GARCIA, M.; CASTRO, A.F.P. de Detecção de Vero citotoxina (VT) em amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarréia. **Rev. Microbiol., São Paulo**, **17**: 339-341, 1986.