

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

Anticorpos anti-intimina: análise da reatividade dos anticorpos policlonal e monoclonal, clonagem e expressão do fragmento variável de cadeia simples (scFv) do anticorpo monoclonal

Márcio Anunciação Menezes

Tese para obtenção de grau de DOUTOR
Orientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo
2009

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

Anticorpos anti-intimina: análise da reatividade dos anticorpos policlonal e monoclonal, clonagem e expressão do fragmento variável de cadeia simples (scFv) do anticorpo monoclonal

Márcio Anuniação Menezes

Tese para obtenção de grau de DOUTOR
Orientadora: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo
2009

Márcio Anuniação Menezes

Anticorpos anti-intimina: análise da reatividade dos anticorpos policlonal e monoclonal, clonagem e expressão do fragmento variável de cadeia simples (scFv) do anticorpo monoclonal

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção de grau de Doutor

Dra. Roxane Maria Fontes Piazza
Orientadora/presidente

1º Examinador (a)

2º Examinador (a)

3º Examinador (a)

4º Examinador (a)

São Paulo, __ de _____ de 2009.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP), com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos 05/56293-0 e 04/12136-5).

Aos meus queridos pais, Silas e Arilda, pelos valores adquiridos, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim e me apoiarem financeiramente em todos os momentos da minha vida acadêmica.

Às minhas queridas irmãs, Caroline e
Fernanda, que sempre me apoiaram e foram
cúmplices em todos os momentos da minha
vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado sabedoria, saúde e me abençoado em todos os momentos da minha vida.

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, por ter me orientado no doutorado e me acolhido em seu laboratório.

À Dra. Karina Araujo Aires, pela paciência de me ensinar biologia molecular e por toda ajuda sem medir esforços.

Ao Dr. Waldir Pereira Elias Jr., à Dra. Patrícia Antônia Estima Abreu pelo apoio e ensinamento de biologia molecular.

Aos amigos do core, Renato, Diego e Luciano, pela amizade, cumplicidade, pelo companheirismo nos momentos étlicos e pelo apoio nos bons e maus momentos.

Às amigas do core, Gabi, Marina, Silvia, Ana Cláudia e Dani, pelo carinho, apoio e ajuda nos experimentos.

Aos colegas de bancada, Júlia, Cristiane, Michele, Natália, Chris, Letícia, Milton e Sarita, por toda a colaboração nos experimentos e pela amizade.

Aos amigos, Renato e Chris, pela amizade e ajuda na minha introdução à biologia molecular.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia, Sérgio, Fran, Keyde, Priscila, Cynthia e Tati, pela amizade e bons momentos de bandeirão.

Aos demais colegas do Laboratório de Bacteriologia, pela colaboração e amizade.

Aos inúmeros amigos do Instituto Butantan, pela amizade e carinho.

Às amigas e ex-colegas do Laboratório de Bacteriologia, Vanessa e Bianca, pelo carinho, amizade e companheirismo.

Aos demais pesquisadores do Laboratório de Bacteriologia, pelo apoio científico.

Aos funcionários do Laboratório de Bacteriologia, pelo apoio técnico prestado durante o doutorado.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo apoio e dedicação prestados.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelos ensinamentos e sugestões durante o doutorado.

Aos meus amigos e familiares de Curitiba, pelos bons momentos compartilhados durante os momentos de descanso.

Às minhas colegas de apartamento, Caroline e Luciana, pelo carinho, apoio, companheirismo e paciência em todos os momentos do doutorado.

RESUMO

Intimina é o principal fator de virulência envolvido na patogênese de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). A detecção de EHEC e EPEC típica ou atípica é de fundamental importância na definição da conduta terapêutica das infecções promovidas por *E. coli*, que ainda são a principal causa de diarreia aguda em crianças e adultos em muitos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Anticorpos são ferramentas importantes na detecção de diversos patógenos. Neste trabalho avaliou-se a sensibilidade e especificidade dos anticorpos policlonal e monoclonal anti-intimina frente a isolados de EPEC e EHEC por *immunoblotting*. Os anticorpos apresentaram 100% de especificidade e a sensibilidade foi de 97%, 92% e 78%, quando se utilizou a fração enriquecida em IgG do soro de coelho, antissoro de rato e anticorpo monoclonal, respectivamente. Esse anticorpo monoclonal anti-intimina foi caracterizado como IgG2b e 1 µg desse anticorpo reconheceu 0,6 µg de intimina purificada com uma constante de dissociação de 1.3×10^{-8} M. A menor reatividade do anticorpo monoclonal em relação aos anticorpos policlonais levou-nos à clonagem e expressão do fragmento variável de cadeia simples desse anticorpo (scFv). Para isso, o mRNA do hibridoma anti-intimina foi extraído, reversamente transcrito para cDNA e amplificadas as cadeias leve e pesada da fração variável do anticorpo, utilizando iniciadores aleatórios comerciais. As cadeias amplificadas foram ligadas ao vetor *pGEM-T Easy* e sequenciadas. Iniciadores específicos foram desenhados e utilizados em uma estratégia de amplificação e união das cadeias, formando o scFv, que por sua vez foi clonado no vetor de expressão pAE. Linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLys foi transformada com o plasmídeo pAE-scFv anti-intimina e submetida à indução protéica. O scFv anti-intimina foi expresso de forma insolúvel, solubilizado, purificado e submetido ao ensaio de *refolding*. O rendimento obtido foi de 1 mg de proteína por 100 mL de cultivo bacteriano. Para testar a funcionalidade do scFv, foram realizados ensaios de ELISA de captura e imunofluorescência. Os resultados mostraram que 275 ng de scFv reagiram com 2 µg de intimina purificada a uma absorbância de aproximadamente 0,75 e por imunofluorescência mostrou uma forte reatividade ao isolado de EPEC típica E2348/69. Este estudo demonstrou que o anticorpo recombinante anti-intimina obtido foi capaz de reconhecer a região conservada de intimina (Int₃₈₈₋₆₆₇) na forma purificada e a intimina α no isolado de EPEC típica, e se mostrou mais eficiente que o anticorpo monoclonal nativo.

Palavras chave: EPEC. EHEC. Intimina. Anticorpo monoclonal. scFv

Anti-intimin antibodies: polyclonal and monoclonal reactivity analyzes, cloning and expression of single chain fragment variable (scFv) of monoclonal antibodies

Intimin is the major virulence factor involved in the pathogenesis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). The detection of EHEC and typical or atypical EPEC has fundamental importance in defining the therapeutic management of infections caused by *E. coli*, which are still the leading cause of acute diarrhea in children and adults in many developed and developing countries. Antibodies are important tools in the detection of several pathogens. In this study it was evaluated the sensitivity and specificity of polyclonal and monoclonal antibodies against intimin in the detection of EPEC and EHEC by immunoblotting. All employed antibodies showed 100% specificity and the sensitivity was 97%, 92% and 78% for rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction, rat antisera and monoclonal antibody, respectively. This anti-intimin monoclonal was characterized as IgG2b and 1 μg recognized 0.6 μg of purified intimin with a dissociation constant of 1.3×10^{-8} M. The less extent reactivity of monoclonal led us to clone and express the single chain fragment variable of this antibody (scFv). Thus, the anti-intimin hybridoma mRNA was extracted, reverse transcribed to cDNA and the light and heavy chains of variable fragment of the antibody were amplified using commercial random primers. The chains were amplified, ligated to the *pGEM-T Easy* vector and the insert was sequenced. Specific primers were designed and used in a strategy to amplify and link the chains, obtaining the scFv, which was cloned into the pAE expression vector. *E. coli* BL21(DE3)plys was transformed with the pAE-scFv anti-intimin plasmid and subjected to induction of protein expression. The scFv anti-intimin, expressed in the insoluble fraction, was purified and submitted to refolding. The yield was 1 mg of protein per 100 mL of bacterial culture. To test the functionality of the scFv, ELISA and immunofluorescence assays were performed. The results showed that 275 ng of scFv reacted with 2 μg of purified intimin resulting in an absorbance of 0.75. By immunofluorescence it was observed a strong reactivity to the typical EPEC isolate E2348/69. This study demonstrated that the recombinant anti-intimin antibody obtained was able to recognize the conserved region of intimin (Int₃₈₈₋₆₆₇) in its purified form and α intimin in a typical EPEC isolate, and was more efficient than the native monoclonal antibody.

Key-words: EPEC. EHEC. Intimin. Monoclonal antibody. scFv

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores, as respectivas sequências de nucleotídeos e temperaturas de anelamento. Ao iniciador *Forward* de cadeia pesada foi inserido o sítio de restrição *Bam* HI (verde). Ao iniciador *Reverse* da cadeia leve foi inserido o sítio de restrição *Hind* III (azul) e um códon de terminação (vermelho)

Tabela 2: Reatividade por *immunoblotting* do anticorpo monoclonal contra isolados eae positivos que apresentam diferentes tipos de intimina

Tabela 3: Sequência de nucleotídeos referente à CP, *linker* e CL da fração variável anti-intimina

Tabela 4: Sequência de aminoácidos referente à CP, *linker* e CL da fração variável anti-intimina sem a presença de códons de terminação

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema resumido do processo de clonagem: extração do mRNA a partir de hibridoma anti-intimina; síntese de cDNA; amplificação das cadeias pesada e leve da fração variável do anticorpo; isolamento e amplificação das bandas; ligação das bandas ao *linker* para a formação do scFv, contendo os sítios de restrição *Bam* HI e *Hind* III

Figura 2: Esquema das reações de PCR: na 1ª etapa a amplificação de CL e CP utilizando iniciadores contendo uma região complementar ao *linker*. Na 2ª etapa a ligação da CL ao *linker*. Na 3ª etapa a ligação da CP a CL-*linker* e amplificação da cadeia única para a formação do scFv. Para as reações de PCR foi utilizada a enzima *Platinum Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen, EUA)

Figura 3: Perfil eletroforético da intimina conservada recombinante após purificação em coluna de Níquel-Sepharose. Eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo SDS (SDS/PAGE) a 12%, corado por *Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution* (Bio-Rad, EUA) **1.** Marcador de massa molecular (LMW 97 – 14,4 kDa) **2.** Intimina purificada de aproximadamente 33,6 kDa indicado pela seta

Figura 4: Reatividade dos sobrenadantes das culturas dos hibridomas anti-intimina por ELISA. Placas de poliestireno sensibilizadas com 15 µg/mL de intimina conservada recombinante, incubadas com os sobrenadantes dos hibridomas anti-intimina, seguido da reação com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase e revelação com OPD e H₂O₂

Figura 5: Gráficos apresentando o resultado da primeira etapa do ensaio de ELISA usado para a obtenção do valor da constante de afinidade. Uma placa de poliestireno foi sensibilizada com 15 µg/mL de intimina purificada e incubada com os anticorpos monoclonais purificados anti-intimina e com anticorpos de cabra anti-camundongo conjugados à peroxidase (1:10000) e revelado com OPD e H₂O₂. Os valores da concentração de anticorpo escolhidos (2 µg/mL) correspondente a diluição de 1:256

Figura 6: Gráficos apresentando o resultado da terceira etapa do ensaio de ELISA usado para a obtenção do valor da constante de afinidade. Uma placa de poliestireno foi sensibilizada com 15 µg/mL de intimina conservada e incubada com os anticorpos remanescentes da interação antígeno/anticorpo da incubação da segunda etapa e com anticorpos de cabra anti-camundongo conjugados à peroxidase (1:10000) e revelado por OPD e H₂O₂. A concentração obtida foi de 1,56 µg/mL de anticorpo monoclonal a uma DO de 0,26 para IgG2a e 0,197 para IgG2b

Figura 7: Membrana de nitrocelulose contendo extrato protéico do isolado de EPEC típica E2348/69. A membrana foi incubada com os anticorpos IgG2a (**1**) e IgG2b (**2**) anti-intimina, seguidos da incubação com soro de cabra anti-IgG de camundongo e revelados com DAB e H₂O₂

Figura 8: Limite de detecção do anticorpo monoclonal IgG2b anti-intimina. Placa de poliestireno sensibilizada com diferentes concentrações de intimina purificada a partir de 200 µg/mL em uma diluição seriada e incubada com 10 µg/mL de anticorpo monoclonal e soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:10.000), revelado com OPD e H₂O₂ e leitura a 492 nm

Figura 9: Membrana de nitrocelulose contendo frações protéicas de extratos bacterianos de **1.** E2348/69 (intimina alfa); **2.** O1:H16 (beta intimina); **3.** O20:H⁻ (intimina mu); **4.** DH5α. A membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-intimina IgG2b (8.4 µg/mL) seguido de soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:2000), e revelado com DAB e H₂O₂

Figura 10: Eletroforese em gel de agarose (1%) do mRNA extraído de hibridoma anti-intimina. **1.** 1 kb DNA *Ladder*. **2.** mRNA do hibridoma anti-intimina indicado pela seta branca

Figura 11: Reação de PCR dos fragmentos gênicos que codificam as cadeias leve e pesada da fração variável do anticorpo anti-intimina. Eletroforese em gel de agarose a 1 % apresentando amplificação do fragmento gênico da fração variável da cadeia leve (**2**) e da cadeia pesada (**3**) do anticorpo anti-intimina. As bandas apresentam um *amplicom* de aproximadamente 325 pb e 340 pb respectivamente, indicados pela seta. (**1** e **4**) Marcador de massa molecular

Figura 12: Quantificação de CL e CP clonadas em *pGEM-T Easy*. Eletroforese em gel de agarose de vetores digeridos com *Eco* RI. (**2**) CL. (**3**) CP, indicados pela seta. (**1**) *High Mass DNA Ladder*

Figura 13: Reação de PCR da amplificação da região variável das cadeias leve e pesada de scFv anti-intimina. Análise em gel de agarose 1% dos produtos de PCR, utilizando novos iniciadores, da CP (**2**) e da CL (**3**) de scFv anti-intimina, de aproximadamente 300 pb, indicados pela seta. 1 kb DNA *Ladder* (**1**)

Figura 14: Amplificação por PCR do fragmento variável de cadeia única (scFv) anti-intimina. União de CL-*linker* e CP por PCR, resultando numa banda de aproximadamente 700 pb, referente ao scFv íntegro (**2**) indicado pela seta. (**1**) 1 kb DNA *Ladder*

Figura 15: Análise de clones de *E. coli* recombinantes positivos para scFv por PCR de Suspensão Celular. Produtos de PCR de aproximadamente 700 pb (indicados pela seta), referente ao scFv, confirmando a presença do inserto em todos os cinco clones selecionados (**2-6**). 1 kb DNA *Ladder* (**1**)

Figura 16: Reação de digestão do vetor *pGEMT-Easy/scFv* com enzimas de restrição *Bam* HI e *Hind* III, liberando um inserto de aproximadamente 700 pb, confirmando a presença de um fragmento com tamanho predito para scFv (3), indicado pela seta. Como controle foi utilizado um plasmídeo não digerido (2). Marcador de massa molecular (1)

Figura 17: Perfil eletroforético da análise de expressão de scFv anti-intimina em extratos de *E. coli* BL21 (DE3) recombinantes. Frações de indução da expressão de scFv anti-intimina submetidas à eletroforese em gel SDS/PAGE a 12%. 1. Marcador de massa molecular. 2. Extrato total de BL21 competente como controle de pré-indução. 3. Extrato total de células bacterianas após indução. 4. Fração solúvel do extrato bacteriano. 5. Fração insolúvel do extrato bacteriano (corpúsculo de inclusão) tratado com 8 M de ureia. Proteína de interesse indicada pela seta

Figura 18: Análise de expressão de scFv anti-intimina em extratos de *E. coli* BL21 (DE3) (2, 3, 4) e *E. coli* BL21 (DE3) pLys (5, 6, 7). Frações de indução da expressão de scFv anti-intimina submetidas a eletroforese em gel SDS/PAGE a 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose para o ensaio de *immunoblotting*, utilizando o anticorpo anti-His. 1. Marcador de massa molecular. 2 e 5. Extrato total como controle de pré-indução. 3 e 6. Extrato total de células bacterianas após indução. 4 e 7. Fração insolúvel do extrato bacteriano (corpúsculo de inclusão) tratado com 8 M de ureia. Proteína de interesse, detectada pelo anticorpo anti-His, indicada pela seta

Figura 19: Análise de expressão de scFv anti-intimina em extratos de *E. coli* C43 (DE3). Frações proteicas de C43 recombinante submetidas à eletroforese em gel SDS/PAGE a 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose para o ensaio de *immunoblotting*, utilizando o anticorpo anti-His. 1. Marcador de massa molecular. 2. Extrato total como controle de pré-indução. 3. Extrato total de células bacterianas após indução. 4. Fração solúvel. 5. Fração insolúvel do extrato bacteriano (corpúsculo de inclusão) tratado com 8 M de ureia. Proteína de interesse detectada pelo anticorpo anti-His indicada pela seta preta. Banda referente à proteína degradada ou truncada indicada pela seta vermelha

Figura 20: Perfil eletroforético da análise de purificação de scFv anti-intimina expressa em *E. coli* BL21 (DE3) pLys. Eluato de scFv anti-intimina submetidas a eletroforese em gel SDS/PAGE a 12%. 1. Marcador de massa molecular. 2. Fração purificada de scFv anti-intimina, referente a uma banda de aproximadamente 26,5 kDa indicada pela seta

Figura 21: Reatividade do scFv anti-intimina à fração conservada da intimina. Ensaio de ELISA de captura com placa sensibilizada com 275 ng de scFv, seguido de incubação de 2 µg de intimina purificada e uma diluição seriada da fração enriquecida de IgG anti-intimina de coelho a partir de 7,5 µg, utilizando o anticorpo anti-coelho conjugado à peroxidase e revelado por OPD e H₂O₂. A leitura da absorbância foi realizada a 492 nm.

Figura 22: Reatividade do scFv e do anticorpo monoclonal anti-intimina por ensaio de imunofluorescência. Isolados de E2348/69 permeabilizados e incubados com scFv, anticorpo anti-His e anticorpo conjugado a FITC. **A:** E234869 - scFv. **B:** E234869 - anticorpo monoclonal. **C:** K12 - scFv

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 <i>Escherichia coli</i>	19
1.2 <i>E. coli</i> diarreio gênica (DEC)	19
1.3 Patogenicidade de <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC) e <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	21
1.4 Epidemiologia de EPEC e EHEC	23
1.5 Detecção de intimina	27
1.6 Fragmento variável de cadeia única (scFv)	30
1.6.1 Tecnologia de anticorpos recombinantes	30
1.6.2 Aplicação dos anticorpos recombinantes.....	32
2 OBJETIVO	35
3 CAPÍTULO I: ANÁLISE DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAL E MONOCLONAL ANTI-INTIMINA FRENTE AOS ISOLADOS DE EPEC E EHEC	36
4 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-INTIMINA E CLONAGEM, EXPRESSÃO E ANÁLISE FUNCIONAL DO FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA ÚNICA (SCFV).	47
4.1 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1.1 Amostras bacterianas e plasmídeos.....	48
4.1.2 Meios de cultura, sais e reagentes.....	48
4.1.3 Purificação de intimina recombinante	49
4.1.4 Caracterização dos anticorpos monoclonais anti-intimina	50
4.1.4.1 Subclonagem e classificação dos hibridomas	50
4.1.4.2 Purificação dos anticorpos monoclonais.....	50

4.1.4.3 Constante de afinidade	51
4.1.4.4 Limite de detecção	52
4.1.4.5 <i>Immunoblotting</i>	52
4.1.5 Clonagem do fragmento variável do anticorpo IgG2b anti-intimina	53
4.1.5.1 Extração de RNA mensageiro dos hibridomas anti-intimina	54
4.1.5.2 Síntese de cDNA	56
4.1.5.3 Amplificação das cadeias leve e pesada	56
4.1.5.4 Ligação dos fragmentos amplificados em <i>pGEM-T Easy</i>	57
4.1.5.5 Sequenciamento	58
4.1.5.6 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos	58
4.1.5.7 Amplificação das CP e CL	59
4.1.5.8 Ligação das cadeias ao <i>linker</i>	60
4.1.5.9 Ligação de scFv ao vetor de clonagem <i>pGEM-T Easy</i>	62
4.1.5.10 Ligação de scFv ao vetor de expressão pAE	63
4.1.6 Expressão de scFv	64
4.1.7 Purificação de scFv	65
4.1.8 <i>Refolding</i> de scFv desnaturada	65
4.1.9 Ensaio funcional de scFv anti-intimina	66
4.1.9.1 ELISA de captura	66
4.1.9.2 Imunofluorescência	66
4.2 RESULTADOS	67
4.2.1 Purificação de intimina recombinante	67
4.2.2 Caracterização dos anticorpos monoclonais anti-intimina	67

4.2.3 Construção do Fragmento Variável de Cadeia Única (scFv) anti-Intimina recombinante, utilizando iniciadores desenhados com base em sequências conservadas das cadeias leve e pesada.....	76
4.2.4 Expressão e purificação do scFv anti-intimina.....	83
4.2.5 Ensaio de funcionalidade do scFv.....	86
4.3 DISCUSSÃO.....	89
5 CONCLUSÕES.....	98
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
7 ANEXOS.....	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é o microorganismo facultativo predominante na microbiota intestinal humana, e coloniza o trato gastrointestinal dentro de poucas horas após o nascimento do hospedeiro. É um bacilo Gram negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*, exercendo um importante papel na manutenção da fisiologia intestinal tanto humana quanto animal (Nataro, Kaper, 1998).

E. coli normalmente permanece inofensiva confinada ao lúmen intestinal, entretanto, mesmo as cepas de *E. coli* não patogênicas podem causar infecção quando o hospedeiro encontra-se debilitado, imunodeprimido ou quando as barreiras gastrointestinais são violadas. Ao longo do tempo, cepas de *E. coli* patogênicas vêm adquirindo fatores de virulência específicos, conferindo um aumento na habilidade de se adaptar a novos nichos causando um amplo espectro de doenças em indivíduos saudáveis (Kaper *et al.*, 2004). Três síndromes clínicas podem resultar da infecção por estes patótipos: infecções do trato urinário, sepse e meningite. Além desses, há os patótipos associados a doenças entéricas conhecidos como *E. coli* diarreio gênica (DEC) (Kaper *et al.*, 2004).

1.2 *E. coli* diarreio gênica (DEC)

Isolados de *E. coli* diarreio gênicas têm grande importância médica e epidemiológica, pois representam o patógeno bacteriano mais comumente associado às formas endêmicas de diarreia. A diarreia, por sua vez, é considerada um dos grandes problemas de saúde pública mundial, com mais de dois milhões de mortes ocorridas a cada ano, particularmente entre crianças abaixo de cinco anos de idade (Clark *et al.*, 2003).

Considerando-se seus mecanismos de virulência específicos, as síndromes clínicas que causam, os sorótipos O:H, aspectos epidemiológicos e/ou tipos de interação em linhagens celulares (Nataro, Kaper, 1998), as *E. coli* diarreio gênicas são

classificadas em seis categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* que apresenta padrão de adesão difusa (DAEC). Embora essa classificação continue sendo usada pela maioria dos autores, já se torna evidente que algumas categorias incluem patótipos bastante diferentes. Desta forma, as EPEC e EAEC foram subdivididas em típicas e atípicas e as *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) passaram a constituir um subgrupo das *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC) (Kaper *et al.*, 2004).

EPEC tem sido identificada como o principal agente de diarreia aguda em países em desenvolvimento (Nataro, Kaper, 1998). Isolados de EPEC são capazes de causar um efeito histopatológico característico em biópsias intestinais, bem como em culturas celulares, conhecido como *attachment and effacement* (A/E) (Moon *et al.*, 1983).

STEC compreende todas as amostras de *Escherichia coli* que produzem as toxinas de Shiga, Stx1 e Stx2, e que estão associadas à colite hemorrágica e à síndrome hemolítica urêmica (Agbodaze, 1999). Este patógeno representa o mais importante agente etiológico de surtos diarréicos causados por alimentos, sendo prevalente principalmente em países desenvolvidos (Paton, Paton, 1998). Dentro deste patótipo está o subgrupo das EHEC que além da expressão das toxinas de Shiga, causa a lesão A/E, como as EPEC.

ETEC é um importante patógeno causador da diarreia aguda, sendo a principal causa de morbidade e mortalidade entre crianças de um a cinco anos de idade em países em desenvolvimento (Qadri *et al.*, 2005). Além disso, está associado à diarreia dos viajantes que acomete turistas e militares oriundos de países desenvolvidos em visita a regiões tropicais e subtropicais endêmicas. Estes organismos produzem a toxina termo estável (ST) e/ou a toxina termo lábil (LT) (Sears, Kaper, 1996).

EAEC é caracterizada por aderir a células epiteliais cultivadas no padrão denominado de adesão agregativa (Nataro *et al.*, 1987). Este patótipo está envolvido em surtos de diarreia persistente principalmente em crianças e idosos (Kaper *et al.*, 2004).

EIEC apresenta a capacidade de invadir e de multiplicar-se em células epiteliais, causando diarreia aquosa e quando a infecção é severa pode causar colite inflamatória, assim como a *Shigella* spp. (Levine, 1987; Nataro, Kaper, 1998).

DAEC é a categoria de *E. coli* diarreiogênica que apresenta um padrão de adesão difusa em células epiteliais em cultura. Neste padrão de adesão as bactérias encontram-se aderidas de forma difusa sobre toda a superfície celular (Elliott, Nataro, 1995). Sua patogenicidade ainda é desconhecida, uma vez que amostras de DAEC são isoladas tanto de amostras diarréicas como de fezes não diarréicas (Kaper *et al.*, 2004).

1.3 Patogenicidade de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

O mecanismo central da patogênese de EPEC e EHEC é uma lesão chamada *attaching and effacing* (A/E), que é caracterizada pela destruição das microvilosidades, aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal, polimerização da actina e de outros elementos do citoesqueleto nos sítios de ligação da bactéria no interior do enterócito, formação de um pedestal na superfície da célula. Esse mecanismo está dividido didaticamente em três estágios: (i) aderência inicial à célula hospedeira, (ii) produção e translocação das proteínas bacterianas por uma agulha formada pelo complexo de secreção do tipo III e (iii) ligação da íntima ao receptor Tir com a formação do pedestal (Chen, Frankel, 2005; Garmendia *et al.*, 2005; Nataro, Kaper, 1998; Vallance, Finlay, 2000).

Os genes associados à lesão A/E estão localizados no *locus of enterocyte effacement* (LEE), uma ilha de patogenicidade de 35,5 kb, onde estão presentes 41 *open reading frames* (ORFs), sendo que a maior parte dessas codifica o sistema de secreção tipo III (SSTT) (Jarvis *et al.*, 1995) e chaperoninas associadas – genes *esc* (*E. coli* secretion).

Em LEE também estão localizados: i) o gene *eae* (*E. coli* attachment effacement), responsável por codificar uma proteína de membrana externa de 94 kDa,

denominada intimina, que medeia a adesão íntima da bactéria à célula epitelial (Jerse *et al.*, 1990; Frankel *et al.*, 1994); ii) os genes *esp* (*EPEC secreted proteins*) e o gene *map* (*mitochondria associated protein*), responsáveis pela codificação de proteínas efetoras e estruturais como EspA, EspB, EspD, EspF, EspG, EspH e Map (Kaper *et al.*, 2004); iii) o gene *tir* (*translocated intimin receptor*) que codifica a proteína efetora de 90 kDa denominada Tir, que também é translocada para o interior da célula epitelial (Kenny, Warawa, 2001).

Muitas linhagens de EPEC produzem um padrão de aderência característico, chamado adesão localizada (AL), em cultura de células epiteliais. Neste padrão, as bactérias ligam-se em áreas localizadas da superfície celular, formando microcolônias compactas (grupos bacterianos) que podem ser visualizadas após a bactéria ter sido mantida em contato com as células epiteliais por 3 horas. Esse fenômeno está associado à presença do plasmídeo EAF (pEAF), que carrega a seqüência chamada EAF (fator de aderência de EPEC). Esse plasmídeo é o mais bem estudado fator de virulência extra LEE, presente apenas nas EPEC típicas, e ausentes nas amostras de EPEC atípicas. Em EAF encontra-se o operon *bfp* (*bundle forming pilus*) que codifica a fímbria BFP, cujo fenótipo é evidenciado pelo padrão AL em células epiteliais cultivadas *in vitro* (Giron *et al.*, 1991; Trabulsi *et al.*, 2002).

A fímbria BFP, além de possibilitar a agregação bacteriana em microcolônias, também está envolvida no evento de dispersão (Knutton *et al.*, 1999), auxiliando na infecção de outros sítios, e tornando mais eficiente a colonização. Além disso, EAF possui três ORF`s denominadas *perA*, *perB* e *perC* (*plasmid-encoded regulator*), cujas proteínas codificadas formam um complexo regulador capaz de ativar a transcrição de alguns genes de LEE, através do gene *ler* (*LEE-encoded regulator*), bem como do operon *bfp* no próprio plasmídeo EAF.

Em relação a patogênese de EHEC, além da lesão A/E, esse patotipo produz as toxinas de Shiga (Stx). A família Stx contém dois principais grupos: Stx1 e Stx2, podendo apresentar variantes. Um isolado de EHEC pode produzir somente Stx1 e/ou Stx2 ou ainda múltiplas formas de Stx1 e Stx2 (Scheutz *et al.*, 2001).

Stx1 e Stx2 são produtos dos genes *stx1* e *stx2* (O'Brien *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1999; Welinder-Olsson *et al.*, 2002) codificados por bacteriófagos lisogênicos. Essas toxinas são do tipo A₁B₅, apresentando uma subunidade A com 35 kDa e 5 subunidades B com 7,5 kDa. A subunidade A é composta por um peptídeo de 27,5 kDa (A₁) que possui atividade enzimática e um peptídeo de 7,5 kDa (A₂) que liga a subunidade A à subunidade B. A subunidade B é responsável pela ligação da toxina ao receptor globotriasilceramida (Gb₃) presente na superfície de células eucarióticas (Nataro, Kaper, 1998; Gyles, 2007). Stx1 é imunologicamente idêntica à toxina de Shiga produzida por *Shigella dysenteriae* tipo I. As subunidades A e B das toxinas Stx1 e Stx2 possuem, entre si, 55% e 57% da seqüência genética idêntica, respectivamente (Nataro, Kaper, 1998).

Além das toxinas de Shiga, existem outros fatores capazes de aumentar ou colaborar na patogenicidade de EHEC. Existe uma associação entre a presença do gene *eae* e a doença severa, no entanto, as lesões associadas à colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU) são causadas pela ação das toxinas de Shiga nas células endoteliais (O'Brien, Holmes, 1987). Stx2 tem maior participação na patogênese de SHU e é mais tóxica para célula eucariótica do que Stx1 (Nataro, Kaper, 1998).

1.4 Epidemiologia de EPEC e EHEC

EPEC foi o primeiro patotipo de *E. coli* a ser descrito. Surtos de diarreia infantil no Reino Unido levaram Bray (1945) a descrever um grupo sorologicamente distinto de linhagens de *E. coli* que foram isoladas de crianças com diarreia, mas não de crianças saudáveis. Em 1995, EPEC foi dividida em dois grupos: EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC), onde o plasmídeo EAF está presente somente no primeiro grupo (Kaper; 1996).

As EPEC atípicas, desde a década de 90, vêm substituindo as típicas em países desenvolvidos, e nos países em desenvolvimento, vêm aparecendo como um patógeno emergente (Smith *et al.*, 1996; Scaletsky *et al.*, 1999, 2002; Trabulsi *et al.*, 2002; Bueris *et al.*, 2007; Franzolin *et al.*, 2005; Ochoa *et al.*, 2008; Moreno *et al.*, 2008). A

emergência destes isolados antecedeu o desaparecimento quase total das chamadas EPEC típicas, que antes eram a principal causa de diarreia infantil em nosso meio (Gomes *et al.*, 1991).

Dados recentes sugerem que aEPEC é mais prevalente que tEPEC tanto nos países em desenvolvimento como nos desenvolvidos (Ochoa *et al.*, 2008), embora tEPEC tenha sido considerada por muitos anos como a principal causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento e considerada rara nos países do primeiro mundo.

Em países desenvolvidos as EPEC atípicas já foram relacionadas a surtos de infecção alimentar em adultos (Viljanen *et al.*, 1990; Hedberg *et al.*, 1997), à diarreia adquirida na comunidade em jovens de Melbourne na Austrália (Robins-Browne *et al.*, 2004) e a indivíduos soropositivos para HIV de várias idades (Kaper, 1996).

A associação de aEPEC com diarreia continua controversa, mas sua alta prevalência no mundo e o envolvimento de algumas cepas em surtos de diarreia confirmam que algumas cepas são patogênicas (Hernandes *et al.*, 2009) conforme demonstrado em diversos estudos.

Afset e colaboradores detectaram na Noruega linhagens de aEPEC em 31,6% dos pacientes apresentando sintomas de gastroenterite com longa duração (Afset *et al.*, 2003). Um estudo de prevalência de diarreia aguda realizado na Tunísia demonstrou que isolados de EPEC típica e atípica foram encontrados em pacientes adultos, e que houve uma positividade de 10,4% de EHEC em crianças (Al-Gallas *et al.*, 2007). Em amostras de crianças com diarreia aguda e persistente na Tanzânia, as *E. coli* diarreiogênicas apresentaram uma prevalência de 22,9%. Dentre elas as EPEC tiveram uma positividade de 4,6%, a maioria tEPEC (92,3%) (Moyo *et al.*, 2007).

No período de um ano, amostras de crianças pré-escolares de uma tribo na Índia com diarreia aguda; as *E. coli* diarreiogênicas representaram 41% de todos os patógenos isolados. Dentre as DEC, as EPEC tiveram uma prevalência de 26,2% e a EHEC de 1,9% (Anvikar *et al.*, 2008). *E. coli* diarreiogênicas também foram encontradas em amostras de crianças com diarreia em um hospital no Vietnã, das 64 DEC isoladas, 9,2% eram AEEC (*attaching/effacing Escherichia coli*) e 2,8% eram

EPEC (Hien *et al.*, 2008). Em outra investigação, em amostras de crianças com diarreia aguda no Irã foi encontrada 12,6% de prevalência de EPEC (Jafari *et al.*, 2009).

Na América Latina alguns estudos também demonstram o envolvimento de aEPEC na etiologia da diarreia. Em um estudo com crianças da periferia da Cidade do México que apresentaram diarreia aguda, a prevalência de *E. coli* diarreiogênicas foi de 16%, sendo que dentre elas 41% estava associada com aEPEC e 9% com tEPEC (Estrada-Garcia *et al.*, 2009). Em um estudo de vigilância em comunidades pobres em Lima, Peru, a prevalência de EPEC em crianças com diarreia foi de 7% (Ochoa *et al.*, 2009). Em uma investigação sobre etiologia de diarreia em crianças na Nicarágua, foi demonstrada uma positividade de 53,8% para *E. coli* diarreiogênica. Dentre elas, aEPEC foi detectada em 16% dos casos (Vilchez *et al.*, 2009).

No Brasil, cepas de aEPEC mostraram significativa associação com diarreia infantil em um hospital em São Paulo (Scaletsky *et al.*, 1999), em crianças de até 5 anos de idade em um hospital em Rondônia (Orlandi *et al.*, 2006) e também foram um dos patógenos mais prevalentes em crianças com diarreia na Bahia (Franzolin *et al.*, 2005; Bueris *et al.*, 2007). Em um estudo de detecção de DEC em amostras de crianças com diarreia no Espírito Santo, 30,3% foram positivos, dentre eles 5,5% de aEPEC e 4,6% de tEPEC (Spano *et al.*, 2008).

Embora alguns estudos tenham mostrado que pacientes infectados com aEPEC tenham uma diarreia suave, não desidratante e não inflamatória (Nguyen *et al.*, 2006), tipicamente a duração da diarreia em pacientes infectados com este patótipo é significativamente mais longa do que aquelas causadas por outros patógenos, indicando que aEPEC tem uma propensão inata em persistir no intestino por mais tempo do que outras *E. coli* diarreiogênicas (Ochoa *et al.*, 2008).

Em relação à epidemiologia das EHEC, *E. coli* O157:H7 é o sorotipo mais estudado neste patótipo, sendo considerada a mais virulenta e frequente (Riley *et al.*, 1983). Embora muita ênfase tenha sido dada a este sorotipo, o grupo das STEC compreende quase 250 sorotipos diferentes e aproximadamente 100 destes, são associados às doenças (Johnson *et al.*, 2006). Alguns como O157:NM, O26:H11, O111:NM, O121:H19, O145:NM, O111:H8 e O113:H21 possuem potencial patogênico

similar à O157:H7. Outros sorogrupos também associados são O55, O91, O103 e O119 (Paton; Paton, 1998; Vaz *et al.*, 2004; Caprioli *et al.*, 2005).

A infecção por EHEC é facilitada pela dose extremamente baixa, menor que 100 células. Estas infecções têm sido associadas ao consumo de carne, leite e derivados contaminados, pois as EHEC são comumente encontradas no intestino de animais reservatório, dentre eles o gado bovino (principal reservatório), e nos ambientes onde esses alimentos são mantidos. Surtos de EHEC também foram associados com fontes de água contaminada, consumo de vegetais frescos e produtos vegetais industrialmente processados (Caprioli *et al.*, 2005). Estudos mostraram que a presença de EHEC em nosso rebanho variou de 12% a 75%, dependendo da região estudada (Cerqueira *et al.*, 1999; Leomil *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2003; Irino *et al.*, 2005; Farah *et al.*, 2007; Timm *et al.*, 2007). Dados recentes mostram que o gado brasileiro não é somente um reservatório de EHEC, mas também uma fonte de infecção para humanos já que alguns sorotipos associados com doenças severas foram isolados destes (Aidar-Ugrinovich *et al.*, 2007).

EHEC constitui-se hoje como um dos principais problemas de saúde pública em vários países, dentre eles Argentina, Estados Unidos, Canadá e Japão, além de vários países da Europa, e existem vários relatos de casos na América Latina, principalmente Uruguai e Chile (Kaper; O'Brien, 1998; Beutin, 2006).

Irino *et al.* (2002) e Guth *et al.* (2002) descreveram alguns casos de infecções por EHEC no Brasil, principalmente em crianças. Do mesmo modo, Vaz *et al.* (2004), realizando um estudo retrospectivo em 2607 amostras isoladas de casos diarréicos entre 1976 e 1999 de crianças menores de cinco anos de idade e pacientes adultos imunocomprometidos, no estado de São Paulo, identificaram 29 STEC (1,1%) sendo que 89,6% destes apresentaram os genes *stx1* e *eae*.

Casos notificados ao Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) ou rastreados pela Autorização de Internação Hospitalar (AIH) e Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados (Fundação SEADE) do Estado de São Paulo no período de 1998 a 2006 apontaram a ocorrência de 87 casos de SHU com 35 óbitos relacionados ou não a alimentos (CVE, 2007). Infelizmente, nesses casos, nem sempre o agente etiológico foi

identificado, dificultando um panorama geral epidemiológico das EHEC. Além disso, um dos únicos agentes rastreados é a EHEC O157:H7 e como esse sorotipo é pouco encontrado em nosso país, pode haver uma falsa realidade de que a fonte de SHU não seja EHEC. Todavia, sabemos que existem outros sorotipos não-O157 associados à SHU que não são identificados nessas ocorrências.

1.5 Detecção de intimina

Em 1985 foi descrita uma adesina de 94 kDa, uma proteína de membrana externa (OMP) encontrada em EPEC e não em ETEC. No momento, achava-se que essa proteína era produto do plasmídeo EAF, pois era consistentemente observada em isolados de EPEC que continham o plasmídeo, e não em isolados curados do plasmídeo (Levine *et al.*, 1985). Jerse *et al.* (1990) identificaram o gene *eae* com hipótese de estar envolvido na atividade da lesão A/E utilizando mutantes que perderam a atividade de produzir a lesão em cultivo celular. Jerse e Kaper (1991) identificaram uma proteína de 94 kDa como produto do gene *eae* utilizando um antissoro que reconheceu essa proteína em E2348/69 [cepa protótipo de tEPEC (O127:H6)] e JPN15 (E2348/69 curado do plasmídeo EAF) e não em mutantes do gene *eae*.

McDaniel *et al.* (1995) demonstraram um grande locus cromossomal chamado LEE (*locus of enterocyte effacement*) que codifica as proteínas envolvidas na lesão A/E, e mostrou que esta região é conservada em patógenos intestinais, que produzem esta lesão (EPEC, EHEC, *E. coli* diarreiogênica de coelhos (RDEC-1), *Escherichia albertii* e *Citrobacter freundii* biotipo 4280)

Agin e Wolf (1997) obtiveram um antissoro em coelhos imunizados com a porção C-terminal da intimina de RDEC-1 clonada e expressa em *E. coli*, utilizando iniciadores específicos descritos por Frankel *et al.* (1994). O antissoro mostrou reatividade por *immunoblotting* contra extratos totais de isolados de EPEC (O111) e EHEC (O26), menos para E2348/69 e O157:H7, que mostrou baixa identidade com a porção C-terminal da intimina de RDEC-1. Este estudo sugeriu que poderiam existir diferentes

famílias de intimina e que essas diferenças não estariam correlacionadas com sorogrupo nem hospedeiro.

A partir de então, o gene *eae* de diversos isolados de EPEC e EHEC foi clonado e seqüenciado demonstrando que a região 5'-terminal é altamente conservada, mas a região 3'-terminal desta proteína apresentava uma composição variável (Frankel *et al.*, 1994). Essa região variável define os tipos e subtipos de intimina, que são conhecidos pelas letras do alfabeto grego como α , α_2 , β_1 a β_3 , γ_1 , γ_2 , δ , ϵ , ϵ_2 a ϵ_4 , ζ , η , η_2 , θ , ι , ι_2 , κ , λ , ν , ξ , \omicron , π , ρ e σ (Agin, Wolf, 1997; Adu-Bobie *et al.*, 1998; China *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 1999; Oswald *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Ramachandran *et al.*, 2003; Beutin *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2004, 2006).

Portanto, em face desta diversidade, o possível alvo comum para o diagnóstico de EPEC e EHEC foi identificado como a região conservada de intimina que compreende os aminoácidos 388-667 (Int₃₈₈₋₆₆₇) (Adu-Bobie *et al.*, 1998);

Batchelor *et al.* (1999) produziram um antissoro em coelhos para a detecção de todos os tipos de intimina conhecidos na época, através da clonagem, expressão e purificação dos 280 aminoácidos entre Gly388 a Lys667 do gene *eae* de EPEC E2348/69. O antissoro obtido foi utilizado em ensaio de *immunoblotting*, *immunogold* e imunofluorescência. Este antissoro mostrou alto grau de reatividade para diferentes isolados de EPEC e EHEC, reconhecendo os tipos α , β , γ , e δ de intimina.

Vários estudos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan buscando desenvolver metodologias para a detecção de EPEC e EHEC em nosso meio. Para a detecção de isoaldos de EPEC e EHEC e a sua análise fenotípica, Koga *et al.* (2003) produziram uma fração enriquecida em IgG contra a região conservada de intimina. O soro foi produzido em coelhos imunizados com intimina conservada (Int₃₈₈₋₆₆₇). Esse antissoro foi utilizado em ensaios de *immunoblotting*, imunofluorescência, citometria de fluxo, *immunodot* e *immunogold*, demonstrando que o anticorpo reconhece a intimina em diversos sorotipos de *E. coli* que expressam a proteína. Este estudo demonstrou que a permeabilização da membrana externa ou desnaturação da proteína bacteriana permite que o anticorpo reconheça os subtipos

α , β , γ , δ e ϵ de intimina e que o ensaio de *immunodot* poderia ser uma possível alternativa como método de captura.

Com a perspectiva da validação de um teste rápido e de baixo custo para detectar os isolados de EPEC e EHEC que expressam os diferentes subtipos de intimina, Rocha (2005) analisou uma coleção de amostras bacterianas por *colony immunoblot*. Na padronização do método demonstrou-se que a expressão de intimina foi excelente quando os isolados bacterianos foram cultivados em ágar McConkey, TSA e CFA, e que a transferência dos componentes protéicos para a membrana de nitrocelulose foi mais eficiente quando se utiliza EDTA a 0,5 M. No entanto, quando empregado na análise de um grande número de isolados este soro policlonal mostrou excelente especificidade, mas baixa sensibilidade reconhecendo somente os tipos α , β , γ , δ , ϵ e θ .

Koga (2003), além da produção e caracterização do anticorpo policlonal, obteve hibridomas a partir da fusão das células dos linfonodos dos camundongos imunizados com a porção conservada da intimina com as células mielomatosas. Essa fusão resultou em 60 hibridomas que secretavam anticorpos anti-intimina. Esses hibridomas foram submetidos a várias diluições limites e testados por ELISA, sendo classificados em IgG2a e IgG2b de acordo com seu isotipo.

Outros autores também desenvolveram diferentes métodos para detecção de intimina utilizando ensaios a partir da preparação de extrato de OMP para detectar a presença de EPEC. Vandekerchove *et al.* (2002) desenvolveram um anticorpo monoclonal anti-intimina produzido a partir de camundongos Balb/c imunizados com intimina purificada de OMP. Estes anticorpos foram utilizados no ensaio de ELISA de captura para detectar a presença de reatividade em soro de coelho. O método mostrou alta especificidade, mas uma reduzida sensibilidade se comparado com o método de ELISA direto.

Para a obtenção de um método rápido e barato, Hajra *et al.* (2007) desenvolveram um método de detecção de intimina por aglutinação. Um soro policlonal obtido em coelho reconheceu uma banda de aproximadamente 97 kDa por *immunoblotting* com cepas de EHEC. Este soro foi fixado em partículas de látex e feito o ensaio em colônias de isolados. O ensaio de aglutinação detectou facilmente organismos de *E. coli* em

uma concentração de 5×10^6 a 5×10^7 em uma diluição do soro de 1:2000, mas foi menos específico que no ensaio por *immunoblotting*.

1.6 Fragmento variável de cadeia única (scFv)

1.6.1 Tecnologia de anticorpos recombinantes

Os anticorpos monoclonais são ferramentas que têm sido utilizadas na detecção de antígenos de diferentes patógenos por apresentarem homogeneidade e poderem ser produzidos ilimitadamente (Svennerholm *et al.*, 1986). Entretanto, para a produção de anticorpos monoclonais, a partir de hibridomas, são necessárias infraestrutura para culturas celulares que são de alto custo e extremamente laboriosas.

A tecnologia dos anticorpos recombinantes é uma maneira alternativa de obter-se anticorpos com baixo custo, com afinidades e especificidades desejáveis e que podem ser obtidos a partir da manipulação da estrutura básica do domínio da molécula de imunoglobulina. Uma das abordagens é a clonagem da cadeia simples do fragmento variável do anticorpo (scFv) em fagos filamentosos (Barbas *et al.*, 1991; Clackson *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1993; Marks *et al.*, 1991, 1992; McCafferty *et al.*, 1990). O scFv é uma proteína de ligação ao antígeno composta de um domínio variável da cadeia pesada (V_H) e um domínio variável da cadeia leve (V_K ou V_L) da imunoglobulina unidas por uma ligação peptídica flexível.

Um dos sistemas utilizados para a obtenção de anticorpos recombinantes é o *phage display*, que permite a obtenção de uma biblioteca de scFv para a seleção de um anticorpo específico e com sensibilidade desejada. Este anticorpo recombinante é clonado em um vetor e transformado em um hospedeiro eucarioto ou procarioto, como células leveduriformes ou bacterianas.

A manipulação genética do anticorpo permite a criação de estruturas complexadas com moléculas funcionais de acordo com a utilidade desejada. A tecnologia de anticorpos recombinantes scFv vem sendo largamente empregada para o uso em diagnósticos, marcadores moleculares e biofármacos (Holliger, Hudson, 2005; Filpula, 2007).

A construção de um anticorpo recombinante funcional requer uma proteína solúvel, pura, com um rendimento considerável e a estrutura conformacional intacta para a perfeita interação antígeno-anticorpo. Muitas tentativas resultam na expressão de proteínas insolúveis, internalizadas em corpúsculos de inclusão, impossibilitando sua purificação, o que pode ser uma consequência da expressão de proteína heteróloga em células bacterianas. Uma alternativa para tornar essa proteína solúvel é a utilização de um tratamento com agentes desnaturantes e redutores, que liberam a proteína do corpo de inclusão, mas desestruturam a conformação da cadeia, tendo assim a necessidade de um tratamento de *refolding* para restabelecer a estrutura original da proteína (Choi *et al.*, 2004; Lamberski *et al.*, 2006; Shao, Zhang, 2008).

Alguns autores expressaram scFv solúvel a partir de vetores construídos para co-expressar estruturas que auxiliam o transporte da proteína expressa ao periplasma ou citoplasma bacteriano ou até mesmo para liberá-la no sobrenadante da cultura bacteriana. Dentre essas estruturas estão proteínas transportadoras, peptídeo sinal e chaperonas. Algumas dessas proteínas expressas requerem a clivagem desta proteína fusionada, pois pode comprometer sua purificação e até mesmo alterar a sua funcionalidade (Choi *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2006; Ye *et al.*, 2008). Algumas condições no crescimento bacteriano também influenciam a solubilidade da proteína expressa, como a temperatura e tempo de crescimento bacteriano. Em temperaturas baixas há uma tendência de expressão de maior quantidade de proteínas solúveis, porém costuma requerer maior tempo de crescimento (Skerra, Plückthun, 1991; Hamilton *et al.*, 2003).

Em alguns casos, o vetor é construído para expressar fosfatase alcalina ou até mesmo um fluoróforo complexado ao scFv, podendo assim o anticorpo recombinante ser usado para a detecção do antígeno por reação enzimática ou por fluorescência, sem a necessidade do uso de um anticorpo secundário marcado (Griep *et al.*, 1999; Casey *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2006).

1.6.2 Aplicação dos anticorpos recombinantes

Dentre os sistemas comerciais para clonagem de anticorpos, o *Recombinant Phage Antibody System* (RPAS - GE Healthcare, Reino Unido) utiliza o vetor pCANTAB 5 E para a clonagem e expressão de scFv. Este sistema permite criar uma biblioteca de fagos (bacteriófagos expressos por *E. coli* TG1 que apresentam o scFv exposto em uma das extremidades) para a seleção de clones. O plasmídeo do clone selecionado é introduzido em *E. coli* HB2151 (linhagem não supressora do códon de terminação âmbar) que expressa o scFv de forma solúvel. O sistema de purificação do scFv se dá por afinidade à cauda de E-tag, que é codificada na extremidade C-terminal do scFv.

Este sistema foi utilizado na produção de scFv anti-ricina, que demonstrou grande afinidade pelo antígeno por *immunoblotting* (Gao *et al.*, 1999) e de scFv específico contra carboidrato de superfície de espermatozóide, apresentando um padrão de aglutinação de espermatozoides pela cabeça e pela cauda observado por imunofluorescência (Norton *et al.*, 2001). Spats *et al.*, (2003) desenvolveram um scFv anti-IBVD (vírus da doença bursal infecciosa), a partir de galinhas imunizadas. Este scFv detectou todas as cepas testadas do vírus por ELISA e mostrou capacidade inibitória *in vitro*.

O sistema RPAS permitiu também criar uma biblioteca de fagos para a detecção de lúpus, mantendo a especificidade do anticorpo original (Leung *et al.*, 2000). Além disso foi construída uma biblioteca de fagos a partir de linfonodos de pacientes com câncer gástrico, demonstrando boa especificidade ao antígeno (CEA e células MKN-28) em ELISA e boa ligação por imunofluorescência e citometria de fluxo (He *et al.*, 2002). Zhang *et al.* (2003) construíram uma biblioteca de estruturas antigênicas de HVR1 (região hipervariável 1 do vírus da hepatite C) demonstrando uma reatividade dos clones de até 80% por ELISA, sugerindo que este sistema possa ser utilizado na construção de vacinas anti-HCV.

É possível também a produção de anticorpos diméricos ou conjugados a enzimas a partir da manipulação da estrutura básica da sequência de nucleotídeos. Albrecht *et al.* (2004) expressou scFv dimérico unidos por uma ponte dissulfeto. O pCANTAB foi mutado pela adição dos nucleotídeos TGT que codificam uma cisteína na porção

carbóxi-terminal do scFv. Com o grupo SH livre na porção C terminal, o scFv foi expresso formando dímeros, aumentando a eficiência em ensaios de imunohistoquímica. Da mesma forma, DeNardo *et al.* (2001) criaram um duplo scFv (*diabody*) solúvel contra antígeno tumoral, mas com baixo rendimento. Wang *et al.* (2006) utilizaram pCANTAB para expressar fagos anti-PA (antígeno protetor de *Bacillus anthracis*) e produziram biscFv-6w10-EAP (duplo scFv conjugado com fosfatase alcalina) solúvel em pOPE101-215. Em pCANTAB o rendimento foi muito baixo, mas o anticorpo recombinante produzido demonstrou alta fidelidade na detecção de PA.

Para diferentes fatores de virulência de *E. coli* diarreio gênicas também foram construídos anticorpos recombinantes com diferentes finalidades. Dentre eles, Kühne *et al.* (2004) produziram anticorpos recombinantes que reconhecem EspA e intimina de EHEC O157:H7. Esses anticorpos foram selecionados a partir de células do baço de coelhos imunizados com a porção C-terminal de intimina de O157:H7 e a molécula integral de EspA. A partir do cDNA (transcrito reversamente do RNA extraído) foram construídos os scFvs e clonados em vetor pET22b. Por *immunoblotting* o scFv anti-intimina reconheceu apenas intimina γ e o scFv anti-EspA reconheceu fracamente isolados dos sorogrupos O157 e O111, não reconhecendo isolados dos sorogrupos O127 ou O86 (Kühne *et al.*, 2004).

Bhaskaran *et al.* (2005) produziram scFv contra fímbria F5 de ETEC, que é um dos fatores de virulência para adesão no enterócito animal, utilizando o sistema pCANTAB obtendo scFv solúvel em *E coli* HB2151. O scFv demonstrou a mesma especificidade que o anticorpo monoclonal original e inibiu a hemaglutinação de HRBC (células vermelhas do sangue de cavalo) que é promovida pela fímbria F5.

Chung *et al.* (2008) produziram scFvs obtidos de uma biblioteca de fagos selecionados pela subunidade B de LT de ETEC. A subunidade B foi utilizada na forma monomérica e na forma pentamérica. Os anticorpos recombinantes mostraram diferentes especificidades na reatividade com as diferentes formas da subunidade B de LT.

A fímbria K99 é um dos fatores de adesão bacteriana de ETEC ao enterócito. A sub-unidade FanC desta fímbria foi purificada e utilizada em ensaio de seleção de

clones de uma biblioteca de fagos. Após várias etapas de seleção, o clone específico de scFv anti-FanC foi submetido à expressão de forma solúvel. O scFv anti-FanC inibiu a aglutinação de enterócitos equinos, que é produzida por *E. coli* B41, uma ETEC produtora de ST e fímbria K99 (Golchin, Aitken, 2008).

A partir de um anticorpo monoclonal anti-Stx2, Ma *et al.* (2008) construíram um scFv, que foi clonado em pCANTAB modificado (contendo 6 resíduos de histidina). Assim como o anticorpo monoclonal, o scFv reconheceu Stx2 por *immunoblotting*, neutralizou a toxina em ensaios com células HeLa e protegeu camundongos em teste de desafio. Os autores sugerem que este scFv anti-Stx2 poderá ser usado na prevenção e terapia de doenças causadas por EHEC

A necessidade de se confirmar se os anticorpos obtidos a partir da imunização de animais com intimina conservada seriam ferramentas úteis na detecção dos diferentes tipos de intimina de EPEC e EHEC levou-nos ao primeiro objetivo desse trabalho que consistiu na avaliação da sensibilidade e especificidade dos anticorpos policlonal e monoclonal anti-intimina frente a isolados de EPEC e EHEC.

Paralelamente, o desenvolvimento da tecnologia de anticorpos recombinantes surgiu como uma metodologia extremamente prática e viável para a manipulação dos mesmos, levando-nos ao segundo objetivo do presente trabalho que foi a clonagem e expressão do fragmento variável de cadeia única (scFv) do anticorpo monoclonal IgG2b anti-intimina e sua análise funcional.

2 OBJETIVO

Os objetivos desse estudo foram:

- a) Avaliar a reatividade dos anticorpos policlonal e monoclonal anti-intimina frente a isolados de *Escherichia coli* enteropatogênica e *Escherichia coli* enterohemorrágica;
- b) Clonar, expressar e analisar a funcionalidade do fragmento variável de cadeia única (scFv) do anticorpo monoclonal anti-intimina.

Esta tese de doutorado foi dividida em dois capítulos. No primeiro capítulo apresentamos a avaliação da sensibilidade e especificidade dos anticorpos policlonal e monoclonal anti-intimina na detecção de EPEC e EHEC por *immunoblotting*. Esses resultados estão apresentados na forma do artigo publicado no *Journal of Applied Microbiology* (Menezes et al., 2009, Identification of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04484.x). No segundo capítulo relatamos a clonagem, expressão e ensaios de funcionalidade do fragmento variável de cadeia única (scFv) do anticorpo monoclonal IgG2b anti-intimina.

3 CAPITULO I: ANÁLISE DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS POLICLONAL E MONOCLONAL ANTI-INTIMINA FRENTE AOS ISOLADOS DE EPEC E EHEC

Com a finalidade de avaliar a sensibilidade e a especificidade do anticorpo monoclonal e do soro policlonal de rato e coelho, 72 isolados de aEPEC, 12 isolados de tEPEC e 11 isolados de EHEC foram testados por *immunoblotting*. Todos os anticorpos demonstraram uma especificidade de 100%, não reagindo com nenhum dos isolados eae-negativos testados. A sensibilidade variou de acordo com o antissoro empregado, a fração enriquecida em IgG do soro policlonal de coelho, mostrou uma maior positividade frente as amostras testadas (97%), seguida de 92% e 78% de sensibilidade com o antissoro de rato e o monoclonal anti-intimina, respectivamente.

ORIGINAL ARTICLE

Identification of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intiminM.A. Menezes¹, L.B. Rocha¹, P.C.M. Koga¹, I. Fernandes², J.M. Nara¹, C.A. Magalhães¹, C.M. Abe¹, C.O. Ayala³, Y.K. Burgos³, W.P. Elias¹, A.F.P. Castro³ and R.M.F. Piazza¹

1 Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

2 Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

3 Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

Keywords

EHEC, EPEC, immunoblotting, intimin antibodies, monoclonal antibody, polyclonal antiserum.

Correspondence

Roxane M.F. Piazza, Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brazil 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: roxane@butantan.gov.br

2009/0635: received 7 April 2009, revised 7 July 2009 and accepted 8 July 2009

doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04484.x

Abstract**Aims:** To evaluate the sensitivity and specificity of polyclonal and monoclonal antibodies (Mabs) against intimin in the detection of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolates using immunoblotting.**Methods and Results:** Polyclonal and Mabs against the intimin-conserved region were raised, and their reactivities were compared in enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) isolates using immunoblotting analysis. In comparison with rat antiserum, rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction had a stronger recognition pattern to a wide spectrum of intimin types in different EPEC and EHEC serotypes. On the other hand, murine monoclonal IgG2b specific to intimin, with dissociation constant of $1.3 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$, failed in the detection of some of these isolates.**Conclusion:** All employed antibodies showed 100% specificity, not reacting with any of the *eae*-negative isolates. The sensitivity range was according to the employed antisera, and 97% for rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction, followed by 92% and 78% sensitivity with rat antisera and Mab.**Significance and Impact of the Study:** The rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction in immunoblotting analysis is a useful tool for EPEC and EHEC diagnoses.**Introduction**

Diarrhoea is one of the leading causes of death in children, accounting for *c.* 2 million deaths per year worldwide, particularly among infants younger than 5 years (Kosek *et al.* 2003; Bryce *et al.* 2005). Although many viruses, bacteria and parasites can cause acute and persistent diarrhoea, diarrhoeagenic *Escherichia coli* (DEC) can be considered as one of the most important groups of pathogens involved in the diarrhoeal disease (Ochoa *et al.* 2008). Amongst them, enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are responsible for this disease in developing and industrialized countries, respectively (Kaper *et al.* 2004).

Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), a subgroup of STEC, is identified as a human pathogen (Riley *et al.*

1983) and is currently considered as an emerging zoonotic pathogen (Beutin 2006) that can cause acute gastroenteritis and haemorrhagic colitis (O'Brien *et al.* 1984) and produce severe/fatal renal and neurological complications as a result of the translocation of Shiga toxins (Stx1 and Stx2) across the intestinal wall.

EPEC strains may carry the EPEC adherence factor plasmid (pEAF), which encodes the genetic determinants of the bundle-forming pilus (BFP) and Per regulators (Kaper *et al.* 2004). BFP is a type IV fimbriae that promotes the interbacterial adherence and the formation of tight microcolonies on cultured epithelial cells (Girón *et al.* 1991), Per regulates plasmid and chromosomal virulence genes (Mellies *et al.* 2007). The presence or absence of pEAF classifies EPEC in two subgroups named typical (tEPEC) and atypical (aEPEC), respectively (Kaper 1996).

tEPEC refers to certain serotypes of *E. coli* that were first incriminated in epidemiological studies as causes of epidemic and sporadic infantile diarrhoea in industrialized countries; it is still an established etiological agent of human diarrhoea and remains as an important cause of infant morbidity and mortality in developing countries (Trabulsi *et al.* 2002; Moreno *et al.* 2008; Ochoa *et al.* 2008). aEPEC has been now considered as an emerging pathogen in both industrialised and developing countries (Viljanen *et al.* 1990; Hedberg *et al.* 1997; Afset *et al.* 2003; Gomes *et al.* 2004; Franzolin *et al.* 2005; Araujo *et al.* 2007; Bueris *et al.* 2007).

EPEC and EHEC strains represent a large and heterogeneous group of *E. coli* sharing the capability of producing A/E lesions, which is characterized by microvilli effacement and intimate bacterial adherence to the enterocytes (Moon *et al.* 1983) and considered as the central mechanism of EPEC pathogenesis (Kaper *et al.* 2004). The genetic determinants for the production of the A/E lesion are located on a chromosomal pathogenicity island named the locus of enterocyte effacement or LEE region (McDaniel *et al.* 1995), which encodes a type III secretion system, secreted proteins, chaperones, regulators, intimin – an outer membrane adhesin – and its translocated receptor (Garmendia *et al.* 2005).

Intimin, the product of the *eae* gene, is responsible for the intimate adherence to the enterocyte membranes that triggers the A/E lesion (Caron *et al.* 2006). Studies of the intimin family of proteins showed that their cell-binding activity is localized at the C-terminal 280 amino acids (Int₂₈₀) (Frankel *et al.* 1994) and that a specific cysteine residue (Cys₉₃₇) in EPEC intimin is essential for binding activity (Frankel *et al.* 1995, 1998). The *eae* genes of several strains have been cloned, sequenced and described as presenting a highly conserved 5'-terminal region and a variable 3'-terminal region (Frankel *et al.* 1994). This variable region determines the intimin types and subtypes, namely, α , $\alpha 2$, $\beta 1-3$, $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ , ϵ , $\epsilon 2-4$, ζ , η , $\eta 2$, θ , ι , $\iota 2$, κ , λ , μB , νB , ξ , o , π , ρ and σ (Agin and Wolf 1997; Adu-Bobie *et al.* 1998; China *et al.* 1999; Reid *et al.* 1999; Oswald *et al.* 2000; Tarr and Whittam 2002; Zhang *et al.* 2002; Ramachandran *et al.* 2003; Beutin *et al.* 2004; Blanco *et al.* 2004, 2005, 2006; Garrido *et al.* 2006).

In face of this diversity, a promising common target for diagnostic purposes is probably the conserved region of the intimin (Int₃₈₈₋₆₆₇) (Adu-Bobie *et al.* 1998; Batchelor *et al.* 1999). Polyclonal rabbit antisera against this region has been shown to react with some tEPEC isolates by immunoblotting, immunofluorescence, immunogold or slot-blot immunoassay (Batchelor *et al.* 1999; Koga *et al.* 2003). The aim of present study was to compare the sensitivity and specificity of rabbit anti-intimin

IgG-enriched fraction, rat intimin antisera and murine monoclonal IgG2b anti-intimin in the detection of EPEC and EHEC isolates.

Materials and methods

Bacterial strains

The bacterial isolates used in this study consisted in 16 *eae*-negative strains (three enteroaggregative *E. coli*; three enterotoxigenic *E. coli*, three diffusely adherent *E. coli*, three enteroinvasive *E. coli* and four *E. coli* strains from microbiota) and 95 *eae*-positive isolates [12 tEPEC strains of serotypes O55:H6 (two strains), O55:H51 (one strain), O86:H34 (one strain), O111ab:H12 (two strains), O114:H2 (one strain), O119:H6 (two strains), O127:H40 (one strain) and O142:H34 (two strains) (Campos *et al.* 1994; Scotland *et al.* 1996; Gonçalves *et al.* 1997; Rosa *et al.* 1998), 11 EHEC strains of serotypes O157:H7 (four strains), O26:H11 (two strains), O103:H2 (one strain), O111:H8 (two strains) and O111:NM (two strains) (Mairena *et al.* 2004; Cergole-Novella *et al.* 2006; Mendes-Ledesma *et al.* 2008) and 72 aEPEC belonging to different serotypes and intimin types (Abe *et al.* 2009)].

tEPEC prototype strain E2348/69 (Levine *et al.* 1985) and *E. coli* DH5 α (Sambrook *et al.* 1989) were employed as positive and negative controls, respectively; and pET28a-intimin₃₈₈₋₆₆₇ was used to obtain the purified His-tagged Int₃₈₈₋₆₆₇ (Batchelor *et al.* 1999). The *eae* mutant CVD206 (Donnenberg and Kaper 1991) and *E. coli* DH5 α were used for sera adsorption.

Purified intimin

The conserved region of intimin (Int₃₈₈₋₆₆₇) was purified from His-pET28a-intimin as described by Batchelor *et al.* (1999). The purity of the polypeptide preparation was confirmed by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analysis (Laemmli 1970; Studier 1973), followed by Coomassie blue R-250 staining.

tEPEC and EHEC intimin typing

Intimin of EHEC and tEPEC were typed by PCR and restriction fragment length polymorphism (RFLP), using the protocol described by Jenkins *et al.* (2003). Briefly, the variable region of intimin was amplified by PCR with primers forward (GATTCAAAACGTGTTAACTCA) and reverse (TTATCAGCMTTAATCTCAGT), and the amplified fragments of c. 1852 bp were analysed using agarose gel (1%) electrophoresis. The amplified fragments were eluted from gel, digested with *Hha*I (Invitrogen), and the

digestion patterns were compared with reference strains of each intimin type.

Anti-intimin polyclonal antibodies

Polyclonal serum was obtained in rabbits and rats. Rabbits were immunized subcutaneously with 200 μg and rats intraperitoneally with 10 μg of purified intimin (Int₃₈₈₋₆₆₇) in Montanide™ ISA 50V (SEPPIC, Paris, France), respectively. After 21, 31 and 41 days, the animals were boosted with the same antigen dose without adjuvant. Serum samples were obtained just before immunization by auricular-venom method, to be used as negative control in specific antibody evaluation. Serum samples were also obtained 10 days after the last antigen injection and subsequently analysed using ELISA. The rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction was obtained as described by McKinney and Parkinson (1987). Rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction and also rat polyclonal antibody antisera were adsorbed against *E. coli* DH5 α and *E. coli* CVD206 to remove possible cross-reactivity with other *E. coli* proteins.

Sera reactivity

The reactivity of the immune sera was tested by ELISA. Microplates (Nunc-Immuno MaxiSorp, Roskilde, Denmark) were coated overnight at 4°C with 100 μl well volume of 0.05 mol l⁻¹ sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) containing 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of purified intimin (Int₃₈₈₋₆₆₇). After blocking [5% (w/v) skim milk in phosphate-buffered saline, PBS] for 30 min at 37°C, the microplates were incubated for 1 h at 37°C with anti-intimin polyclonal antiserum (rabbit, rat or mouse) diluted from 1 : 50 to 1 : 12 800. The reactions were followed by incubation with goat anti-rabbit (1 : 5000), goat anti-rat (1 : 5000) or goat anti-mouse IgG peroxidase-conjugated antibodies (1 : 10 000) (Zymed, San Francisco, CA, USA) for 1 h at room temperature. ELISA was developed with 0.5 mg ml⁻¹ of σ -phenylenediamine (OPD; Sigma Aldrich Co, St Louis, MO, USA) plus H₂O₂, and the reaction stopped by the addition of 1 mol l⁻¹ HCl. The absorbance was measured at 492 nm in a Multiskan EX ELISA reader (Labsystems, USA).

Monoclonal antibody (Mab) production

Four- to 6-week-old female Balb/c mice were immunized into footpad with 10 μg of purified intimin in Montanide™ ISA 50V (SEPPIC). After 4-week interval, mice were boosted with the same antigen dose without adjuvant. Serum samples were obtained just before the first immunization by retro-orbital sinus method, to be used

as negative control in specific antibody evaluation. Serum samples were also obtained 10 days after the last antigen injection and subsequently analysed by ELISA. The mouse with the highest antibody titre was boosted with 10 μg of purified intimin without adjuvant 4 days prior to the cell fusion and then sacrificed by cervical dislocation. Popliteal lymph nodes were removed aseptically, and single cell suspensions were prepared by mechanically disrupting the tissues through a sterile nylon cloth sieve (100 μm pore size) into RPMI medium containing penicillin/streptomycin. The popliteal lymph node cells were fused with SP2/O-Ag14 mouse myeloma cells (2 : 1) using polyethylene glycol 4000. The fused cells were suspended in HAT (hypoxanthine aminopterin thymidine)-RPMI 1640 medium containing 10% FCS (fetal calf serum) into 96-well microplates (Techno Plastic Products AG, TPP, Switzerland). The microplates were incubated at 37°C in the presence of 5% CO₂ for 12 days. To screen cultures for antibody production, 100 μl of culture supernatant was added to the wells of 96-well plate (Nunc-Immuno PolySorp, Roskilde, Denmark) previously coated with purified intimin. The ELISA test was completed as described earlier. Hybridomas from cultures showing significant antibody production were selected and cloned by limiting dilution culture.

Isotyping of Mab

A Nunc-Immuno PolySorp plate was coated overnight at 4°C with a solution (100 μl per well) containing 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of anti mouse IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA or IgM in 0.05 mol l⁻¹ sodium carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6). The reaction was followed by the incubation of the supernatants of hybridomas and then by the addition of the horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG/A/M antibody.

Purification and characterization of Mab

The supernatants from the selected clones were filtered (0.45 μm) and purified by protein A column affinity chromatography (GE Healthcare, UK). The antibodies were eluted using 0.1 mol l⁻¹ citric acid solution (pH 3.0) and harvested in 1 mol l⁻¹ Tris-solution (pH 9.8). The antibody solution was concentrated by lyophilization, and its purity was observed using SDS/PAGE 15% (Laemmli 1970; Studier 1973) after Coomassie blue R-250 staining.

Mab K_D determination and limit detection

The dissociation constant (K_D) of antibodies was determined by their affinity to conserved region of intimin (Int₃₈₈₋₆₆₇) as described by Friguet *et al.* (1985). Antibodies

were incubated in solution with different antigen concentrations until the equilibrium was reached, and the proportion of antibody that remained unsaturated at equilibrium was measured by a classical indirect ELISA method. The K_D was deduced using linear regression with the Scatchard method. To define the limits of detection of the antibody, the microplate was coated with the purified intimin at different concentrations (from 20 μg to 5.4 pg) using 1 μg of purified IgG2b anti-intimin Mab.

Bacterial culture conditions for immunoblotting

The strains were cultivated in Luria–Bertani (LB) at 37°C for 18 h. Then, each culture was inoculated in DMEM high glucose in a 1 : 100 dilution and incubated in a shaking incubator (200 rev min⁻¹) at 37°C. The bacterial growth was monitored by OD readings at 600 nm every 30 min until cultures reached to the late log phase indicated by an OD reading of 1. These bacterial cultures were diluted (1 : 10) and then centrifuged at 14 000 g for 20 min. Supernatants were discarded, and pellets were resuspended in sample buffer (0.5 mol l⁻¹ Tris, 8% (w/v) SDS, 80% (v/v) glycerol and bromophenol blue) and kept at -20°C until use.

Intimin antibodies characterization by immunoblotting

To further access the reactivity of antibodies towards EPEC/EHEC isolates, the immunoblotting analysis was performed using polyclonal (rabbit and rat) or monoclonal anti-intimin antibodies. After boiling at 100°C for 5 min, the bacterial extract (prepared as described previously) was applied to a 12% SDS-polyacrylamide gel (Laemmli 1970; Studier 1973). After electrophoresis, the separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Hybond C-Extra; Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) at 150 mA for 18 h at 4°C. The membranes were blocked with 5% (w/v) skim milk in PBS for 2 h and reacted with rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction (3 $\mu\text{g ml}^{-1}$), rat anti-intimin (1 : 100) and mouse monoclonal anti-intimin antibodies (8.4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ IgG2b) for 18 h at 4°C. The membranes were then washed and incubated for 2 h with horseradish peroxidase-conjugated with anti-rabbit (1 : 5000), anti-rat (1 : 5000) or anti-mouse IgG (1 : 2000). After washing, the substrate 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) plus hydrogen peroxide were added, and the reaction was stopped by the addition of distilled water.

Sensitivity and specificity of the assay

Sensitivity and specificity were calculated according to the method described by Crowther (2001).

Results

Intimin subtyping

PCR and RFLP were performed in tEPEC and EHEC isolates for intimin subtyping. The 12 tEPEC isolates were characterized as alpha (3), beta (3), gamma (2), delta (3) and theta (1) (Table 1). The 11 EHEC isolates were subtyped as beta (2), delta (1), gamma (3), epsilon (2) and theta (3) (Table 1). As mentioned in Material and methods, the aEPEC were previously characterized according to intimin subtype (Abe *et al.* 2009) (Table 1).

Reactivity of anti-intimin antisera by ELISA

Purified His-tagged Int_{388–667} (Fig. 1) used in the immunization protocols generated high antibody titres against intimin. The mean of optical densities (OD) at 492 nm were above 1 in sera dilutions 1 : 12 800, 1 : 6400 and 1 : 3200 in rabbits, rats and mice immunized against the conserved region of intimin, respectively.

Mab characterization

After the fusion with popliteal lymphnode and mouse myeloma cells, 60 positive hybridomas were recovered and cloned by limiting dilution. One cloned hybridoma that produced IgG2b Mab that was specific to intimin by ELISA was selected for further work. It was purified by affinity chromatography and was shown by immunoblotting to react only with the 94-kDa whole intimin molecule in bacterial isolates, with no cross-reactivity with other *E. coli* proteins (Fig. 2c). IgG2b Mab showed dissociation constant of 1.3×10^{-8} mol l⁻¹, and 1 μg of this Mab was able to detect 6 ng of intimin at an absorbance of 0.1 at 492 nm.

Reactivity of polyclonal and monoclonal anti-intimin antibodies with *Escherichia coli eae*-positive and *eae*-negative isolates by immunoblotting

The reactivity of the obtained antibodies was checked in typical and atypical EPEC, EHEC and *eae*-negative isolates cultivated in the same conditions. The polyclonal antisera recognized by immunoblotting the whole intimin molecule (94-kDa) in bacterial isolates as the major polypeptide. Despite the fact that rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction and also rat polyclonal antibody antisera were adsorbed against *E. coli* DH5 α and *E. coli* CVD206 to remove possible cross-reactivity with other *E. coli* proteins, some unspecific reactivity was observed (Fig. 2a,b).

All employed antibodies showed 100% specificity, not reacting with any of the *eae*-negative isolates. The

Table 1 Reactivity by immunoblotting of the polyclonal and monoclonal antibodies (Mabs) against the conserved region of intimin with *eae*-positive isolates presenting different intimin subtypes

Pathotype	Intimin type	Antibodies		
		IgG-enriched anti-rabbit fraction	Anti-rat	IgG2b Mab
tEPEC	Alpha	3/3	3/3	3/3
	Beta	3/3	3/3	3/3
	Gamma	2/2	2/2	1/2
	Delta	3/3	3/3	2/3
	Theta	1/1	1/1	0/1
	Total	12/12 (100%)	12/12 (100%)	9/12 (75%)
aEPEC	Alpha	2/2	2/2	1/2
	Beta	18/19	18/19	17/19
	Gamma	6/6	6/6	1/6
	Epsilon	18/20	16/20	14/20
	Eta	1/1	1/1	1/1
	Theta	8/8	7/8	8/8
	Iota	4/4	4/4	1/4
	Kappa	4/4	3/4	3/4
	Lambda	4/4	4/4	2/4
	Mu	2/2	2/2	2/2
	Pi	2/2	2/2	2/2
	Total	69/72 (95.8%)	65/72 (90.3%)	52/72 (72.2%)
	EHEC	Beta	2/2	2/2
Delta		1/1	1/1	0/1
Gamma		3/3	2/3	0/3
Epsilon		2/2	2/2	2/2
Theta		3/3	2/3	1/3
Total		11/11 (100%)	9/11 (81.8%)	5/11 (45.4%)
Total		92/95 (96.8%)	86/95 (90.5%)	66/95 (69.5%)

tEPEC, typical enteropathogenic *Escherichia coli*; aEPEC, atypical enteropathogenic *E. coli*; EHEC, enterohaemorrhagic *E. coli*.

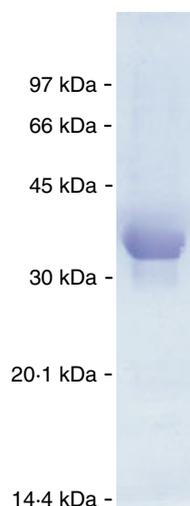


Figure 1 SDS/PAGE analyses of purified 33.5-kDa His-tagged Intimin₃₈₈₋₆₆₇ stained with Coomassie Blue R-250.

sensitivity range was according to the employed antisera was 97% for rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction, followed by 92% and 78% sensitivity with rat antisera and Mab, respectively (Table 1).

Despite the fact that IgG2b Mab was specific to purified intimin by immunoblotting, it failed in the recognition of some isolates independently of their classification, i.e., tEPEC, aEPEC or EHEC (Table 1). This occurred with nine different intimin subtypes, especially among the gamma-expressing isolates (nine strains).

The rat antiserum failed to detect two EHEC isolates, one theta (O111:HNM) and one gamma (O157:H7) (Table 1), and did not react with seven aEPEC isolates classified as belonging to intimin beta (1), epsilon (4), theta (1) and kappa (1), but recognized all typical EPEC (Table 1).

The rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction failed in the detection of only three aEPEC isolates, one beta (O23:H16) and two epsilon (ONT:H9 and O131:H4), but it recognized all typical EPEC and EHEC isolates (Table 1).

Discussion

Serotyping has been widely applied in the diagnosis of gastrointestinal diseases caused by EPEC and EHEC, but cannot be used for identifying these groups conclusively (Trabulsi *et al.* 2002). Therefore, identification of the

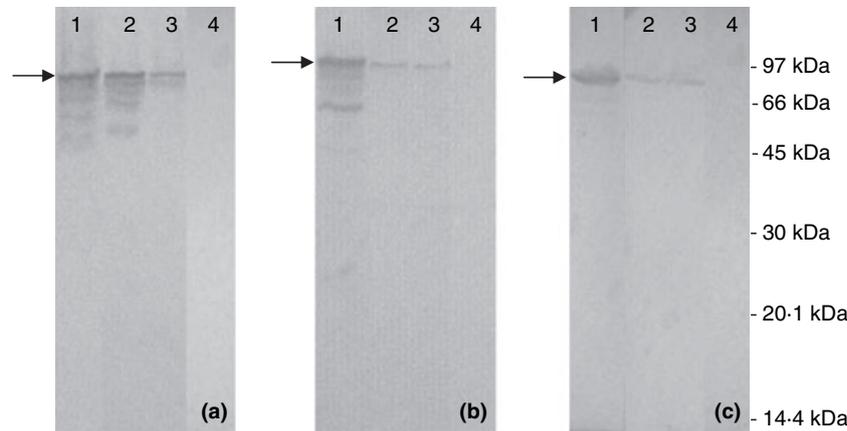


Figure 2 Nitrocellulose membranes containing protein fractions representative of *eae*-positive isolates submitted to electrophoresis by 12% SDS/PAGE. Immunoblotting reaction was carried out by incubating the membranes with: (a) rabbit IgG-enriched fraction anti-intimin ($3 \mu\text{g ml}^{-1}$), (b) rat polyclonal serum anti-intimin (1 : 100), (c) IgG2b mouse monoclonal antibody anti-intimin ($8.4 \mu\text{g ml}^{-1}$) followed by incubation with goat anti-rabbit IgG (1 : 5000), goat anti-rat IgG (1 : 5000), goat anti-mouse IgG (1 : 2000), respectively, conjugated to peroxidase and revealed with 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride. Arrows indicate intimin (94 kDa). Lanes: (1) E2348/69 (alpha intimin); (2) O1:H16 (beta intimin); (3) O20:H⁻ (mu intimin); (4) *Escherichia coli* DH5 α .

characteristic virulence genes is an obvious choice for detection. PCR to detect one or multiple virulence genes in the same reaction has been a successful method for the detection of EPEC and EHEC, as well as other DEC pathotypes (Karch and Meyer 1989; Begum *et al.* 1993; Franke *et al.* 1994; Paton and Paton 1998, 2002; Cocolin *et al.* 2000; Feng and Monday 2000; Pass *et al.* 2000; Rappelli *et al.* 2001; Rich *et al.* 2001; Osek 2003; Toma *et al.* 2003; Aranda *et al.* 2004, 2007; Kimata *et al.* 2005; Müller *et al.* 2006; Bueris *et al.* 2007; Persson *et al.* 2007). Nevertheless, gene detection does not assure the expression of corresponding virulence factor (Vilhena-Costa *et al.* 2006; Abe *et al.* 2009).

Amongst the methods for the detection of virulence factor expression, the immunoassays can be considered as first alternative, and for these purposes polyclonal and/or Mabs are raised (Koga *et al.* 2003; Menezes *et al.* 2003, 2006; Vilhena-Costa *et al.* 2006; Mendes-Ledesma *et al.* 2008). Because the common virulence factor between EPEC and EHEC strains is intimin (Adu-Bobie *et al.* 1998), we employed the conserved region of intimin (Int₃₈₈₋₆₆₇) as antigen for antibodies production, as indicated by other authors that described this antigen for development of a prospective universal anti-intimin antibody (Batchelor *et al.* 1999).

In a previous study, the reactivity of IgG-enriched fraction of rabbit anti-intimin serum with tEPEC belonging to serotypes that express α , β , γ , δ and ϵ intimin by immunoblotting had been observed. This reactivity was confirmed using immuno-dot assay, immunofluorescence, flow cytometry and immunogold labelling (Koga *et al.* 2003). A colony immunoblot assay employing IgG-enriched fraction of rabbit anti-intimin serum was

developed and used to examine different culture media as well as lyses buffers for protein transfer to nitrocellulose membranes. This assay detected only α , β , γ , δ , ϵ and θ intimin types (L.B. Rocha and R.M.F. Piazza, unpublished data). The present study was undertaken to determine whether the application of immunoblotting would detect a wider range of intimin subtypes.

The development of rat antibody was included because previous work with rabbit antiserum had shown the presence of some non-intimin cross-reactive antibodies in the reagent. Although only low levels of nonspecific cross-reactivity were observed in the rat antiserum, this reagent had a lower sensitivity to the intimin range tested than that evident in the rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction. Regardless that bacterial isolates were cultivated in DMEM, which has been reported to enhance intimin expression in comparison with LB broth (Batchelor *et al.* 1999), no expression of intimin was detected by immunoblotting with the rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction in three *eae*-positive strains. Two of these strains subtyped as ϵ intimin and one as β intimin. Also using rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction ten times more concentrated, it was not able to recognize these three isolates (data not shown).

Additionally, even after HEp-2 cells interaction of these three isolates, expression of intimin was not observed by immunofluorescence, which suggest that these isolates do not express intimin despite the presence of the gene (data not shown).

Interestingly, the lack of reactivity by IgG2b anti-intimin Mab appears to be related to serotype and not to intimin subtype, as evidenced by the gamma-expressing

isolates belonging to different serotypes. The results observed with Mab suggest that the manipulation by site-directed mutagenesis of the single chain fragment variable (ScFv) of this antibody may improve its affinity and will allow the large-scale production of recombinant antibodies with low cost and desirable sensitivity and specificity, which is currently under way in our laboratory.

Thus, taken together, our results suggest that the rabbit anti-intimin IgG-enriched fraction described in this study presenting 100% specificity and 97% sensitivity is clearly a suitable diagnostic tool for detection of EPEC and EHEC strains by immunoblotting.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr Gad Frankel (Imperial College, London, UK) for kindly providing pET28a-intimin_{388–667}. This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Grants 99/09458-0 to RMFP and 04/12136-5 to WPE and fellowship to MAM) and Financiadora de Estudos e Projetos.

References

- Abe, C.M., Blanco, M., Dhahi, G., Blanco, J.E., Blanco, J., Mora, A., Franzolin, M.R., Taddei, C.R. *et al.* (2009) Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the *eae+* EAF-negative *stx*-genetic profile. *Diagn Microbiol Infect Dis* **64**, 357–365.
- Adu-Bobie, J., Frankel, G., Bain, C., Gonçalves, A.G., Trabulsi, L.R., Douce, G., Knutton, S. and Dougan, G. (1998) Detection of intimin α , β , γ , and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* **36**, 662–668.
- Afset, J.E., Bergh, K. and Bevanger, L. (2003) High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J Med Microbiol* **11**, 1015–1019.
- Agin, T.S. and Wolf, M.K. (1997) Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans and swine. *Infect Immun* **65**, 320–326.
- Aranda, K.R., Fagundes-Neto, U. and Scaletsky, I.C. (2004) Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol* **12**, 5849–5853.
- Aranda, K.R., Fabbriotti, S.H., Fagundes-Neto, U. and Scaletsky, I.C. (2007) Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol Lett* **2**, 145–150.
- Araujo, J.M., Tabarelli, G.F., Aranda, K.R., Fabbriotti, S.H., Fagundes-Neto, U., Mendes, C.M. and Scaletsky, I.C. (2007) Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *J Clin Microbiol* **10**, 3396–3399.
- Batchelor, M., Knutton, S., Caprioli, A., Huter, V., Zanical, M., Dougan, G. and Frankel, G. (1999) Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. *J Clin Microbiol* **37**, 3822–3827.
- Begum, D., Strockbine, N.A., Sowers, E.G. and Jackson, M.P. (1993) Evaluation of a technique for identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. *J Clin Microbiol* **31**, 3153–3156.
- Beutin, L. (2006) Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **7**, 299–305.
- Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S. and Gleier, K. (2004) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol* **3**, 1099–1108.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Blanco, J., de Carvalho, V.M., Onuma, D.L. and de Castro, A.F.P. (2004) Typing of intimin (*eae*) genes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains from monkeys. *J Clin Microbiol* **42**, 1382–1383.
- Blanco, M., Schumacher, S., Tasara, T., Zweifel, C., Blanco, J.E., Dahbi, G., Blanco, J. and Stephan, R. (2005) Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-eta2*). *BMC Microbiol* **5**, 23.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Mora, A., Alonso, M.P., Varela, G., Gadea, M.P., Schelotto, F. *et al.* (2006) Typing of intimin (*eae*) genes from enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (*muB* and *xiR/beta2B*). *J Med Microbiol* **55**, 1165–1174.
- Bryce, J., Boschi-Pinto, C., Shibuya, K. and Black, R.E. (2005) WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* **9465**, 1147–1152.
- Bueris, V., Sircili, M.P., Taddei, C.R., Santos, M.F., Franzolin, M.R., Martinez, M.B., Ferrer, S.R., Barreto, M.L. *et al.* (2007) Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **6**, 839–844.
- Campos, L.C., Whittam, T.S., Gomes, T.A.T., Andrade, J.R.C. and Trabulsi, L.R. (1994) *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheogenic strains with different virulence properties. *Infect Immun* **62**, 3282–3288.
- Caron, E., Crepin, V.F., Simpson, N., Knutton, S., Garmendia, J. and Frankel, G. (2006) Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC. *Curr Opin Microbiol* **9**, 40–45.

- Cergole-Novella, M.C., Nishimura, L.S., Irino, K., Vaz, T.M., de Castro, A.F., Leomil, L. and Guth, B.E. (2006) Stx genotypes and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and foods in Brazil. *FEMS Microbiol Lett* **259**, 234–239.
- China, B., Goffaux, F., Pirson, V. and Mainil, J. (1999) Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* **1**, 177–182.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G. (2000) A multiplex-PCR method to detect enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in artificially contaminated foods. *Int J Hyg Environ Health* **203**, 159–164.
- Crowther, J.R. (2001) The ELISA Guidebook. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 149, p. 421. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B. (1991) Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**, 4310–4317.
- Feng, P. and Monday, S.R. (2000) Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Mol Cell Probes* **14**, 333–337.
- Franke, J., Franke, S., Schmidt, H., Schwarzkopf, A., Wieler, L.H., Baljer, G., Beutin, L. and Karch, H. (1994) Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J Clin Microbiol* **32**, 2460–2463.
- Frankel, G., Candy, D.C.A., Everest, P. and Dougan, G. (1994) Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect Immun* **62**, 1835–1842.
- Frankel, G., Candy, D.C., Fabiani, E., Adu-Bobie, J., Gil, S., Novakova, M., Phillips, A.D. and Dougan, G. (1995) Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**, 4323–4328.
- Frankel, G., Philips, A.D., Novakova, M., Batchelor, M., Hicks, S. and Dougan, G. (1998) Generation of *Escherichia coli* intimin derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. *Mol Microbiol* **29**, 559–570.
- Franzolin, M.R., Alves, R.C.B., Keller, R., Gomes, T.A.T., Beutin, L., Barreto, M.L., Milroy, C., Strina, A. *et al.* (2005) Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**, 359–363.
- Friguet, B., Chaffotte, A.F., Djavadi-Ohanian, L. and Goldberg, M.E. (1985) Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* **2**, 305–319.
- Garmendia, J., Ren, Z., Tennant, S., Midolli Viera, M.A., Chong, Y., Whale, A., Azzopardi, K., Dahan, S. *et al.* (2005) Distribution of *tccP* in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* **43**, 5715–5720.
- Garrido, P., Blanco, M., Moreno-Paz, M., Briones, C., Dahbi, G., Blanco, J., Blanco, J. and Parro, V. (2006) STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clin Chem* **52**, 192–201.
- Girón, J.A., Ho, A.S.Y. and Schoolnik, G.K. (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**, 710–713.
- Gomes, T.A.T., Irino, K., Girão, D.M., Girão, V.B., Guth, B.E., Vaz, T.M., Moreira, F.C., Chinarelli, S.H. *et al.* (2004) Emerging enteropathogenic *Escherichia coli* strains? *Emerg Infect Dis* **10**, 1851–1855.
- Gonçalves, A.G., Campos, L.C., Gomes, T.A., Rodrigues, J., Sperandio, V., Whittam, T.S. and Trabulsi, L.R. (1997) Virulence properties and clonal structures of strains of *Escherichia coli* O119 serotypes. *Infect Immun* **65**, 2034–2040.
- Hedberg, C., Savarino, S., Besser, J., Paulus, C., Thelen, V., Myers, L., Cameron, D.N., Barret, T.J. *et al.* (1997) An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. *J Infect Dis* **176**, 1625–1628.
- Jenkins, C., Lawson, A.J., Cheasty, T., Willshaw, G.A., Wright, P., Dougan, G., Frankel, G. and Smith, H.R. (2003) Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Ireland. *Mol Cell Probes* **17**, 149–156.
- Kaper, J.B. (1996) Defining EPEC. *Rev Microbiol* **27**, 130–133.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. and Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123–140.
- Karch, H. and Meyer, T. (1989) Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **27**, 2751–2757.
- Kimata, K., Shima, T., Shimizu, M., Tanaka, D., Isobe, J., Gyobu, Y., Watahiki, M. and Nagai, Y. (2005) Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Microbiol Immunol* **6**, 485–492.
- Koga, P.C.M., Menezes, C.A., Lima, F.A., Nara, J.M., Magalhães, C.A., Cianciarullo, A.M., Ferreira-Júnior, J.M.C., Trabulsi, L.R. *et al.* (2003) Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and its use in EPEC diagnosis. *Braz. J. Microbiol* **34**, 5–7.
- Kosek, M., Bern, C. and Guerrant, R.L. (2003) The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull World Health Organ* **3**, 197–204.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Levine, M.M., Nataro, J.P., Karch, H., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., Clements, M.L. and O'Brien, A.D. (1985) The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* **152**, 550–559.
- Mairena, E.C., Neves, B.C., Trabulsi, L.R. and Elias, W.P. (2004) Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Curr Microbiol* **48**, 412–418.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S. and Kaper, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 1664–1668.
- McKinney, M.M. and Parkinson, A. (1987) A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J Immunol Methods* **96**, 271–278.
- Mellies, J.L., Haack, K.R. and Galligan, D.C. (2007) SOS regulation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 2863–2872.
- Mendes-Ledesma, M.R., Rocha, L.B., Bueris, V., Krause, G., Beutin, L., Franzolin, M.R., Trabulsi, L.R., Elias, W.P. *et al.* (2008) Production and characterization of rabbit polyclonal sera against Shiga toxins Stx1 and Stx2 for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* **10**, 484–491.
- Menezes, C.A., Gonçalves, D.S., Amianti, J., Fernandes, I., Taddei, C.R., Koga, P.C.M., Trabulsi, L.R., Martinez, M.B. *et al.* (2003) Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. *Braz J Microbiol* **34**, 11–13.
- Menezes, C.A., Imamura, S.Y., Trabulsi, L.R., Fernandes-Filho, A., Martinez, M.B., Guth, B.E.C., Girão, D.M. and Piazza, R.M.F. (2006) Production, characterization and application of antibodies against heat-labile type-I toxin (LT-I) for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **8**, 875–880.
- Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M. and Giannella, R.A. (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**, 1340–1351.
- Moreno, A.C.R., Fernandes-Filho, A., Gomes, T.A.T., Ramos, S.T.S., Montemor, L.P.G., Tavares, V.C., Santos-Filho, L., Irino, K. *et al.* (2008) Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis* doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.017.
- Müller, D., Hagedorn, P., Brast, S., Heusipp, G., Bielaszewska, M., Friedrich, A.W., Karch, H. and Schmidt, M.A. (2006) Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. *J Clin Microbiol* **44**, 2626–2629.
- O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R.K., Smith, H.W. and Formal, S.B. (1984) Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* **226**, 694–696.
- Ochoa, T.J., Barletta, F., Contreras, C. and Mercado, E. (2008) New insights into the epidemiology of *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **102**, 852–856.
- Osek, J. (2003) Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *J Appl Microbiol* **95**, 1217–1225.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O. and Caprioli, A. (2000) Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* **68**, 64–71.
- Pass, M.A., Odedra, R. and Batt, R.M. (2000) Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol* **38**, 2001–2004.
- Paton, A.W. and Paton, J.C. (1998) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *J Clin Microbiol* **2**, 598–602.
- Paton, A.W. and Paton, J.C. (2002) Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA, and saa. *J Clin Microbiol* **40**, 271–274.
- Persson, S., Olsen, K.E.P., Scheutz, F., Krogfelt, K.A. and Gerner-Smidt, P. (2007) A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Clin Microbiol Infect* **13**, 516–524.
- Ramachandran, V., Brett, K., Hornitzky, M.A., Dowton, M., Bettelheim, K.A., Walker, M.J. and Djordjevic, S.P. (2003) Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *J Clin Microbiol* **41**, 5022–5032.
- Rappelli, P., Maddau, G., Mannu, F., Colombo, M.M., Fiori, P.L. and Cappuccinelli, P. (2001) Development of a set of multiplex PCR assays for the simultaneous identification of enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohemorrhagic and enteroinvasive *Escherichia coli*. *New Microbiol* **24**, 77–83.
- Reid, S.D., Betting, D.J. and Whittam, T.S. (1999) Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **8**, 2719–2722.
- Rich, C., Alfidja, A., Sirot, J., Joly, B. and Forestier, C. (2001) Identification of human enterovirulent *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J Clin Lab Anal* **15**, 100–103.

- Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S. *et al.* (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **12**, 681–685.
- Rosa, A.C., Mariano, A.T., Pereira, A.M., Tibana, A., Gomes, T.A.T. and Andrade, J.R. (1998) Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *J Med Microbiol* **47**, 781–790.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scotland, S.M., Smith, H.R., Cheasty, T., Said, B., Willshaw, G.A., Stokes, N. and Rowe, B. (1996) Use of gene probes and adhesion tests to characterize *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. *J Med Microbiol* **44**, 438–443.
- Studier, F.W. (1973) Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J Mol Biol* **2**, 237–248.
- Tarr, C.L. and Whittam, T.S. (2002) Molecular evolution of the intimin gene in O111 clones of pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**, 479–487.
- Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M. and Iwanaga, M. (2003) Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **6**, 2669–2671.
- Trabulsi, L.R., Keller, R. and Gomes, T.A.T. (2002) Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* **8**, 508–513.
- Vilhena-Costa, A.B., Piazza, R.M.F., Nara, J.M., Trabulsi, L.R. and Martinez, M.B. (2006) Slot blot immunoassay as a tool for plasmid-encoded toxin detection in enteroaggregative *Escherichia coli* culture supernatants. *Diagn Microbiol Infect Dis* **55**, 101–106.
- Viljanen, M., Peltola, T., Junnila, S., Olkkonen, L., Jarvinen, H., Kuistila, M. and Huovinen, P. (1990) Outbreak of diarrhoea due *Escherichia coli* O11:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. *Lancet* **336**, 381–384.
- Zhang, W.L., Köhler, B., Oswald, W., Beutin, L., Karch, H., Morabito, S., Caprioli, A., Suerbaum, S. *et al.* (2002) Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* **40**, 4486–4492.

4 CAPÍTULO II: CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-INTIMINA E CLONAGEM, EXPRESSÃO E ANÁLISE FUNCIONAL DO FRAGMENTO VARIÁVEL DE CADEIA ÚNICA (scFv).

A tecnologia de anticorpos recombinantes surgiu como uma metodologia extremamente prática e viável para a manipulação de anticorpos, os dados obtidos mostrando que o anticorpo monoclonal anti-intimina reconhece cerca de 70% dos isolados de EPEC e EHEC (Menezes *et al.*, 2009). Esses resultados levaram a clonagem e expressão do fragmento variável de cadeia única (scFv) do anticorpo monoclonal anti-intimina e análise de sua funcionalidade.

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Amostras bacterianas e plasmídeos

Os isolados bacterianos neste estudo consistiram em 16 *E. coli eae* negativos (3 *E. coli* enteroagregativas, 3 *E. coli* enterotoxigênicas, 3 *E. coli* que apresentam aderência difusa, 3 *E. coli* enteroinvasoras e 4 *E. coli* de microbiota) e 95 *eae* positivos [12 tEPEC do sorotipo O55:H6 (2 isolados), O55:H51 (1 isolado), O86:H34 (1 isolado), O111ab:H12 (2 isolados), O114:H2 (um isolado), O119:H6 (2 isolados), O127:H40 (um isolado) e O142:H34 (2 isolados) (Campos *et al.*, 1994b; Scotland *et al.*, 1996; Gonçalves *et al.*, 1997; Rosa *et al.*, 1998); 11 EHEC do sorotipo O157:H7 (4 isolados), O26:H11 (2 isolados), O103:H2 (1 isolado), O111:H8 (2 isolados) e O111:NM (2 isolados) (Mairena *et al.*, 2004; Cergole-Novella *et al.*, 2006; Mendes-Ledesma *et al.*, 2008) e 72 isolados de aEPEC pertencentes a diferentes sorotipos e apresentando diferentes tipos de intimina (Abe *et al.*, 2009)]. O protótipo de tEPEC E2348/69 (Levine *et al.*, 1985) e *E. coli* DH5a (Sambrook *et al.*, 1989) foram utilizados como controles positive e negative, respectivamente.

Os plasmídeos utilizados foram o vetor pCANTAB 5 E (GE, Healthcare, Reino Unido), o vetor pGEM-T Easy (Promega, EUA) e o vetor pAE (Ramos *et al.*, 2004).

4.1.2 Meios de cultura, sais e reagentes

Todos os meios de cultura utilizados para o cultivo e manutenção das amostras bacterianas, assim como as soluções utilizadas nas diversas técnicas descritas a seguir, exceto quando indicado, foram preparados de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Os diversos reagentes foram de procedência Merck (Merck, Alemanha), Sigma (Sigma Aldrich, EUA) ou Synth (Synth, Brasil) e os meios de cultura da Difco (Difco Laboratories, Reino Unido) ou Merck, exceto quando indicado.

4.1.3 Purificação de intimina recombinante

Escherichia coli BL21 contendo o plasmídeo pET-28a com o gene da porção conservada de intimina (Int₃₈₈₋₆₆₇) foi gentilmente cedida pelo Dr. Gad Frankel (Imperial College, Londres, Reino Unido) (Batchelor *et al.*, 1999). O clone foi cultivado em um pré inóculo em 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) contendo canamicina a 30 µg/mL e incubado a 37°C por 18 h. Após incubação, 3 mL do pré inóculo foi adicionado a 200 mL de caldo LB contendo canamicina a 30 µg/mL e incubado a 37°C sob agitação de 300 rpm até atingir a densidade óptica (DO) a 600 nm de 0,8. Uma alíquota foi retirada para controle de pré-indução. Ao meio foi adicionado 1 mM de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) (Sigma, EUA) o qual foi incubado a 37°C por 3 h sob agitação de 300 rpm, sendo retirada uma alíquota para controle da cultura induzida. A cultura foi então centrifugada a 3200 x g por 15 min a 4°C.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 30 mL de tampão de ligação (20 mM de Tris-HCl pH 7,4; 100 mM de NaCl; 5 mM de imidazol). As células bacterianas em suspensão foram rompidas por pressão em *French Pressure* (Thermo Scientific, EUA) a 2000 psi. Após o rompimento foi adicionado 1 mM de fluoreto de fenilmetilsufato (PMSF). O lisado foi centrifugado a 2000 x g por 30 min a 4°C em centrífuga 5804 R (Eppendorf, Alemanha).

O sobrenadante foi filtrado em membrana de nitrocelulose com poros de 0,45 µm e adicionado à coluna de Níquel-Sepharose (GE Healthcare, Reino Unido), previamente lavada com água destilada estéril e equilibrada com tampão de ligação. Após a passagem da amostra, a resina foi lavada com tampão de ligação para retirar as proteínas inespecíficas.

A proteína recombinante contendo a cauda de histidina se liga por afinidade ao níquel da resina, enquanto as proteínas inespecíficas são lavadas pelo tampão de ligação. A lavagem foi monitorada pelo método Bradford (1976) até o esgotamento de proteínas inespecíficas. Após lavagem a amostra foi eluída com tampão de eluição (20 mM de Tris-HCl pH 7,4; 100 mM de NaCl; 500 mM de imidazol) para a obtenção da proteína purificada. A amostra foi dialisada contra PBS pH 7,4 e concentrada com PEG 6000. Após concentração o conteúdo protéico foi dosado pelo método de Bradford

(1976) a 595 nm e por espectrofotômetro (Ultrospec 2000 - Pharmacia Biotech – GE Healthcare, Reino Unido) com leitura a 280 nm e 260 nm pelo método de Warburg-Christian (1942) e o perfil eletroforético analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS/PAGE) a 12%.

4.1.4 Caracterização dos anticorpos monoclonais anti-intimina

4.1.4.1 Subclonagem e classificação dos hibridomas

Os hibridomas produtores de anticorpos anti-intimina foram clonados por diluição limite em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) contendo 10% de soro fetal bovino em placas de 96 poços. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e diluídas de maneira a se obter 5 células por mL. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 10 a 15 dias, os sobrenadantes que teoricamente continham um só clone foram testados por ELISA (Engvall, Perlmann, 1971) para detecção da produção de anticorpos anti-intimina.

Após ocuparem metade dos poços, os hibridomas foram testados quanto ao seu isotipo. Para a determinação dos isotipos, as microplacas PolySorp (Nunc, Dinamarca) foram sensibilizadas por 18h entre 2 e 8 °C com 10 µg/ml das diferentes subclasses de imunoglobulinas anti-imunoglobulina de camundongo: anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b e anti-IgG3 e reveladas com soro de cabra anti-imunoglobulina de camundongo (IgG+A+M) (Zymed–Invitrogen, EUA) conjugado à peroxidase.

4.1.4.2 Purificação dos anticorpos monoclonais

Hibridomas anti-intimina foram cultivados em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino em garrafas de cultura para crescimento celular. O sobrenadante da cultura celular dos hibridomas anti-intimina foi coletado, centrifugado a 500 x g, filtrado em filtros de poro 0,45 µm (Millipore, EUA).

A coluna de proteína A-Sepharose (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suécia) e os aparelhos para monitorar as curvas obtidas (Econo UV Monitor e Econo-Recorder

Model 1327, Bio-Rad, EUA) foram utilizados para purificação dos sobrenadantes recolhidos da cultura de hibridomas produtores dos anticorpos monoclonais. Primeiramente, a coluna foi equilibrada com tampão borato salina (TBS) contendo 5 mM de ácido bórico, 5 mM de bórax e 150 mM de NaCl pH 8,5 e o sobrenadante do hibridoma foi então aplicado. A coluna foi lavada com TBS para descarte das proteínas não adsorvidas. Posteriormente, as proteínas ligadas à matriz da coluna (anticorpos) foram eluídas com 0,2 M de glicina pH 2,8 e a curva registrada através do aparelho (Econo-Recorder). Imediatamente, o pH da amostra coletada nessa segunda curva foi neutralizado com solução de Tris 1 M. A amostra obtida foi dialisada em PBS pH 7,4 e concentrada em PEG 6000. A dosagem do conteúdo protéico foi estimada pela leitura da absorbância a 280 nm multiplicada por 0,7 (Crowther, 2001).

4.1.4.3 Constante de afinidade

O cálculo da constante de afinidade foi empregado usando o método de Friguet *et al.* (1985) por ELISA. Placas de poliestireno *PolySorp* (Nunc, Dinamarca) foram sensibilizadas com 15 µg/mL de intimina purificada (Int₃₈₈₋₆₆₇) diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubadas a 4°C por 18 h. o bloqueio foi realizado utilizando-se Molico (Nestlé, Brasil) diluído em PBS pH 7,4. Anticorpos monoclonais purificados IgG2a e IgG2b foram submetidos a uma diluição seriada e incubados a partir de 500 µg/mL diluídos em Molico (Nestlé, Brasil) a 5% em PBS pH 7,4, seguido de incubação de soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase em uma diluição de 1:10000. O ensaio foi revelado com a utilização de diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂ e interrompida com HCl 1 N. Os valores das absorbâncias obtidas foram colocadas em um gráfico e utilizada a concentração de anticorpo em que representa a metade do valor máximo da curva. A concentração de anticorpo escolhida foi usada para ser incubada com uma diluição seriada de intimina a partir de 200 µg/mL em microtubos. Os microtubos foram incubados a 4°C por 18 h sob agitação. Novas placas de poliestireno foram sensibilizadas com 15 µg/mL de intimina e incubadas com a mistura de anticorpo/antígeno previamente incubada. O resultado das absorbâncias foi utilizado na fórmula descrita abaixo para cálculo da constante de afinidade.

$$A_{\text{título}} / A_{\text{teste}} - A_{\text{teste}} = 1 + Kd / M$$

4.1.4.4 Limite de detecção

O limite de detecção do anticorpo monoclonal anti-intimina foi obtido pelo ensaio de ELISA, como descrito previamente. Uma placa de poliestireno *PolySorp* (Nunc, Dinamarca) foi sensibilizada com diferentes concentrações de intimina purificada a partir de 200 µg/mL em uma diluição seriada. A placa foi incubada a 4°C por 18 h. O anticorpo monoclonal IgG2b anti-intimina foi adicionado à placa em uma concentração de 10 µg/mL. A absorbância foi medida em comprimento de onda de 492 nm.

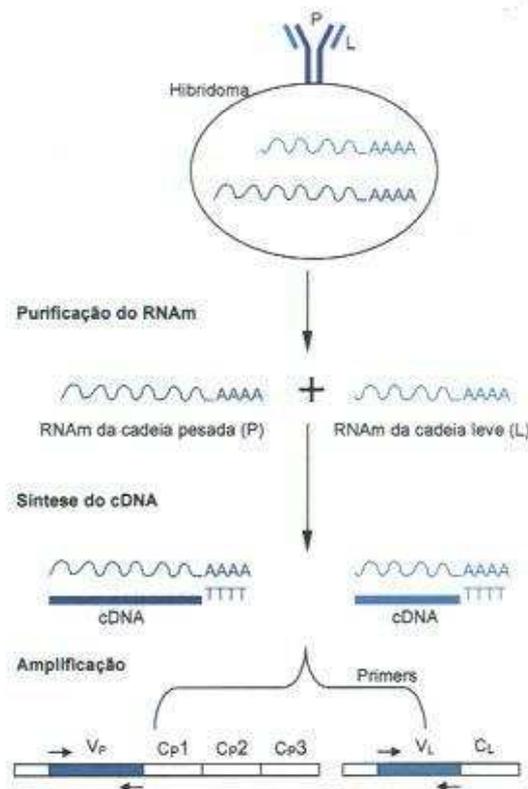
4.1.4.5 Immunoblotting

Setenta e dois isolados de aEPEC, doze isolados de tEPEC e onze isolados de EHEC, além de doze isolados de *E. coli* diarreiogênicas *eae*-negativos e quatro isolados de *E. coli* pertencentes a microbiota intestinal humana (além dos isolados E2348/69 e DH5α como controles positivo e negativo, respectivamente) foram cultivados em caldo LB por 18 h a 37°C sob agitação de 200 rpm e então repicados para o meio de cultivo Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) por 18h a 37°C sob agitação de 200 rpm. Uma quantidade equivalente a DO de 0,1 a 600 nm de células bacterianas de cada isolado foi centrifugada a 12000 x g, o sedimento foi lisado por fervura, reduzido por 2-mercaptoetanol e submetido à eletroforese em gel SDS/PAGE a 12% (Laemli, 1970; Studier, 1973). O conteúdo protéico do gel foi então transferido para membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Reino Unido) por *Western Blot* a 150 mA sob refrigeração por 18 h (Towbin *et al.*, 1979). A membrana de nitrocelulose foi retirada e incubada em tampão de bloqueio (Molico a 5% em PBS pH 7,4) por 2 h a temperatura ambiente. Após bloqueio a membrana foi lavada com PBS *Tween* a 0,05% por 3 vezes e incubada com anticorpo monoclonal IgG2b anti-intimina na concentração de 8,4 µg/ml diluída em tampão de bloqueio por 18 h a 4°C. A membrana foi então lavada 3 vezes com PBS *Tween* a 0,05% e incubada com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase em uma diluição de 1:2000 em tampão de

bloqueio por 1 h. A membrana foi então revelada com PBS contendo 0,16 mg/mL de DAB (3,3-diaminobenzidina) (Sigma, EUA) e 5 μ L/mL de peróxido de hidrogênio até a revelação das bandas. A reação foi interrompida com a adição de água destilada à membrana. Também para caracterização dos anticorpos monoclonais membranas de nitrocelulose contendo frações protéicas do isolado E2348/69 preparadas como descrito previamente foram ensaiadas com 3 μ g/mL de IgG2a e 4,2 μ g/mL de IgG2b, a reação foi realizada como previamente descrito.

4.1.5 Clonagem do fragmento variável do anticorpo IgG2b anti-intimina

As técnicas de biologia molecular que foram empregadas neste estudo estão descritas no manual do fabricante do kit *Recombinant Phage Antibody System* (GE Healthcare, Reino Unido) e por Sambrook *et al.* (1989). A Figura 1 apresenta esquematicamente as etapas de amplificação das cadeias leve e pesada do fragmento variável do anticorpo monoclonal anti-intimina para posterior clonagem no vetor de expressão.



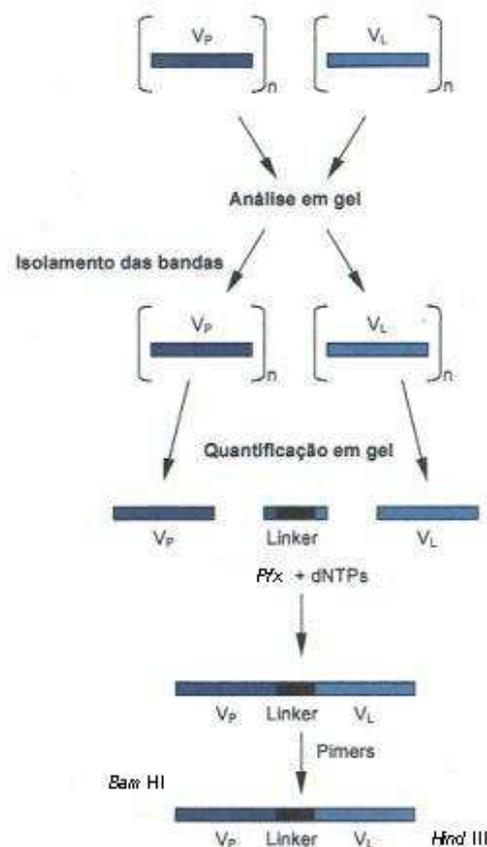


Figura 1: Esquema resumido do processo de clonagem: extração do mRNA a partir de hibridoma anti-intimina; síntese de cDNA; amplificação das cadeias pesada e leve da fração variável do anticorpo; isolamento e amplificação das bandas; ligação das bandas ao *linker* para a formação do scFv, contendo os sítios de restrição *Bam* HI e *Hind* III

4.1.5.1 Extração de RNA mensageiro dos hibridomas anti-intimina

Células dos hibridomas anti-intimina (IgG2b) foram cultivadas em garrafas de cultivo celular de 75 cm² (TPP, Suíça) contendo meio RPMI (Cultilab, Brasil) acrescido de L-glutamina, bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal bovino. A cultura de hibridomas foi ajustada à concentração de 5×10^7 células viáveis, centrifugadas a 500 x g e o sobrenadante descartado. O mRNA dos hibridomas foi extraído e purificado com a utilização do *Illustra Quickprep mRNA Purification Kit* (GE Healthcare, Reino Unido). Em resumo, o sedimento de células foi homogeneizado com 1,5 mL de tampão de extração (solução aquosa tamponada contendo tiocianato de guanidina e N-lauril

sarcosina) e lisado pela adição de 3 mL de tampão de eluição (10 mM de Tris-HCl pH 7,4; 1 mM de EDTA) com agitação em vórtex durante 20 s, sendo em seguida centrifugado a 12000 x g por 5 min.

O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de Celulose Oligo (dT) com capacidade para ligar 25 µg de RNA com poli(A) e homogeneizado por inversão. A coluna foi colocada em um tubo de 15 mL, centrifugada a 350 x g para separar a resina da suspensão e o sobrenadante descartado. A coluna foi lavada três vezes com o tampão de lavagem *High Salt* (10 mM de Tris-HCl pH 7,4; 1 mM de EDTA; 0,5 M de NaCl) e 2 vezes com o tampão de lavagem *Low Salt* (10 mM de Tris-HCl pH 7,4; 1 mM de EDTA; 0,1 M de NaCl), centrifugada a 350 x g por 2 min em cada lavagem e o sobrenadante descartado. A amostra foi eluída três vezes com 250 µL de tampão de eluição (pré-aquecido a 37°C a cada eluição) e coletada em um tubo estéril de 2 mL. A amostra eluída contendo o RNA mensageiro foi então concentrada pela adição de uma solução de 75 µL de acetato de potássio 2,5 M pH 5,0, 10µL de glicogênio (5 a 10 mg/mL) e 1,5 mL de etanol 95% resfriado. A amostra foi incubada a uma temperatura de -20°C por 30 min, centrifugada a 12000 x g a 4°C por 5 min, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em 50 µL de água livre de RNase. Após a extração, a integridade do mRNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Os géis foram preparados por aquecimento, fundindo-se agarose (Invitrogen) em tampão TBE 0,5x (tris (hidroximetil)aminometano 44,5 mM; ácido bórico 44,5 mM; ácido etilenodiaminotetracético [EDTA] 1mM), na concentração final de 0,8 ou 1%. Os fragmentos de DNA resultantes das PCR foram acrescidos de tampão de amostra 1x (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30%). Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1 kb DNA Ladder (Invitrogen) ou o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). Após a corrida eletroforética, realizada sob corrente constante de 75 V em tampão TBE 0,5x, os géis foram corados em solução de brometo de etídio na concentração de 10 µg/mL durante 10 min, observados em transiluminador de luz ultravioleta e as imagens foram registradas através do sistema de captação de imagem Alphamager 2200 (Alpha Innotech, EUA).

4.1.5.2 Síntese de cDNA

O mRNA foi transcrito reversamente para cDNA utilizando o *First Strand cDNA Synthesis Kit* (GE Healthcare, Reino Unido). O mRNA foi aquecido a 65°C por 10 min e resfriado no gelo por 2 min. Vinte microlitros de mRNA foram utilizados (entre 20 a 150 ng) e adicionados 11 µL de *Bulk first-strand reaction mix* (solução aquosa contendo transcriptase reversa murina; RNAGuardTM; BSA livre de DNase e RNase; dNTPs), 1 µL de iniciadores oligonucleotídeos, 1 µL de solução DTT 200 mM em um volume total de 33 µL. A reação foi incubada a 37°C por 1 h. Duas reações foram realizadas, uma para os genes da cadeia leve (CL) e outra para os genes da cadeia pesada (CP) da fração variável do anticorpo.

4.1.5.3 Amplificação das cadeias leve e pesada

Os genes que codificam a fração variável das cadeias leve e pesada do anticorpo foram amplificados em reações separadas, através de PCR utilizando o kit *Mouse scFv Module/Recombinant Phage Antibody System* (GE Healthcare, Reino Unido). Para a amplificação dos genes da cadeia leve foram utilizados 33 µL de cDNA, 2 µL de iniciadores (*light primer mix*) em um total de 99 µL de reação. Para a amplificação dos genes da cadeia pesada foram utilizados 33 µL de cDNA e 2 µL de cada uma das duas misturas de iniciadores (*heavy primer 1* e *heavy primer 2*) em um total de 99 µL de reação. As misturas foram aquecidas a 95°C por 5 min e adicionado 1 µL de *Pfx Platinum Polimerase* (Invitrogen, EUA) em cada reação. Após a adição da *Taq* polimerase, as amostras foram incubadas em uma reação de PCR de 30 ciclos de 94°C por 1 min; 55°C por 2 min; 72°C por 2 min e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. As reações foram purificadas utilizando o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Reino Unido) adicionado-se 500 µL do tampão 1 (contendo acetato e agente caotrópico), agitado, transferido para uma coluna GFX com matriz de fibra de vidro e centrifugado a 12000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e adicionado 500 µL de tampão de lavagem (10 mM de Tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA; 100 mL de etanol) e centrifugado a 12000 x g por 1 min. O eluato foi descartado e adicionado 50 µL de tampão de eluição (água estéril livre de nuclease) pré

aquecido a 37°C ao topo da matriz da coluna. A coluna foi incubada a temperatura ambiente por 1 min, centrifugada a 12000 x g por 1 min e o DNA coletado em tubo estéril.

4.1.5.4 Ligação dos fragmentos amplificados em *pGEM-T Easy*

O produto de PCR foi submetido à ligação em vetor *pGEM-T Easy* (Promega, EUA), utilizando 6 µL de tampão de ligação 2x (60mM de Tris-HCl pH 7,8, 20mM de MgCl₂, 20mM de DTT, 2mM de ATP, 10% de PEG 8000), 1 µL de *pGEM-T Easy* (50 ng), 4 µL do inserto (37,5 ng), 1 µL de ligase para um total de 12 µL e incubado a 4°C por 18 h. *E. coli* JM109 competentes foram transformadas por choque térmico com plasmídeo contendo o inserto. Foram utilizados 5 µL de plasmídeo para 50 µL de células competentes. A mistura foi incubada em gelo por 30 min, a 42°C por 45 s e finalmente em gelo por 2 min. A reação foi adicionada a 950 µL de meio SOC (2 % de triptona, 0.5 % de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 0,25 M de KCl, 20 mM de Mg²⁺, 20 mM de glicose) por 1 h a 37°C sob agitação (250 rpm). Após esse período 100 µL de cultura foram plaqueados em ágar LB contendo 100 µg/mL de ampicilina, 1 mM de IPTG e 50 µg/mL de X-Gal e incubada a 37°C por 18 h. As colônias isoladas que cresceram no meio foram selecionadas para crescimento em caldo Luria Bertani contendo 100 µg/mL de ampicilina. A cultura foi submetida à extração do plasmídeo utilizando o *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen, EUA). Cinco mililitros de cultura foram centrifugados a 12000 x g por 5 min e o sobrenadante removido. O sedimento foi ressuspensionado com 250 µL de tampão de ressuspensão (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 10 mM de EDTA), adicionado 250 µL de tampão de lise (200 mM de NaOH, 1% de SDS), homogeneizado e incubado por 5 min a temperatura ambiente. Foram adicionados 350 µL de tampão de precipitação (cloridrato de aminofórmamida) e homogeneizado por inversão. O lisado foi centrifugado a 12000 x g por 10 min e o sobrenadante adicionado à coluna de sílica. A coluna foi centrifugada a 12000 x g por 1 min e lavada com 700 µL de tampão de lavagem adicionado de etanol. O plasmídeo foi eluído com 30 µL de água destilada estéril e submetido à digestão para quantificação.

4.1.5.5 Sequenciamento

Cinco microlitros do plasmídeo foram digeridos, adicionando-se 1 μ L da enzima *Sa*I (Invitrogen, EUA) e 1 μ L do tampão específico fornecido pelo fabricante para um volume de 10 μ L de reação e incubados por 2 h a 37°C. O plasmídeo foi quantificado, tomados 300 ng e adicionado 3,2 pmol de iniciadores M13 *forward* (GTAAAACGACGCCAG) e *reverse* (CAGGAAACAGCTATGAC) em duas reações de 7,5 μ L, uma para cada iniciador. O sequenciamento foi realizado em seqüenciador automático 3100 *Genetic Analyzer* da *Applied Biosystems* (Hitachi) no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan.

4.1.5.6 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos

As sequências de DNA das cadeias CL e CP foram analisadas e comparadas com um banco de dados de DNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando a ferramenta BLAST, para o desenho de novos oligonucleotídeos iniciadores, com base em domínios conservados presentes no início de CP e CL já sequenciados. Novos iniciadores específicos foram desenhados pelo motivo do *kit* utilizado (*Kit Mouse scFv Module/Recombinant Phage Antibody System*, GE Healthcare, Reino Unido) possuir iniciadores aleatórios para a amplificação das cadeias e não possuir os sítios de restrição apropriados para clonagem no vetor de expressão utilizado neste estudo.

Para a CP, o iniciador *forward* foi desenhado com a inserção do sítio de restrição *Bam*HI e o iniciador *reverse* com a inserção da região complementar ao início da sequência *linker*. Para a CL, o iniciador *forward* foi desenhado com a inserção da região complementar ao final da sequência *linker* e o iniciador *reverse*, com a inserção de um códon de terminação e do sítio de restrição *Hind*III (Tabela 1) e (Figura 2). Estes sítios de restrição foram escolhidos com o intuito de ligar o inserto no vetor de expressão pAE (Ramos *et al*, 2004).

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores, as respectivas sequências de nucleotídeos e temperaturas de anelamento. Ao iniciador *Forward* de cadeia pesada foi inserido o sítio de restrição *Bam* HI (verde). Ao iniciador *Reverse* da cadeia leve foi inserido o sítio de restrição *Hind* III (azul) e um códon de terminação (vermelho).

Iniciador	Sequência	T° Anelamento
CP <i>Forward</i>	5' GGATCCGTGCAGCTGCAGGAGTCTGG 3'	60°C
CP <i>Reverse Linker</i>	5' ACCGCCTCCACCGGAGACGGTGACCGTG 3'	76°C
CL <i>Forward Linker</i>	5' GGTGGCGGATCGGACATTGTGCTGACC 3'	78°C
CL <i>Reverse</i>	5' AAGCTTTTAGTTTGATTTCCAGCTTGGTGCC 3'	70°C
L2F (<i>Linker</i>)	5'GGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGT GCGGATCG 3'	77°C

Os iniciadores sintetizados foram ressuspendidos em água milli-Q estéril com a finalidade de produzir uma solução estoque de 100 pmoles/ μ L.

4.1.5.7 Amplificação das CP e CL

As sequências gênicas que codificam a fração variável das cadeias leve e pesada do anticorpo foram amplificadas em reações separadas através de PCR (Figura 1), utilizando os iniciadores sintetizados e uma enzima de alta fidelidade. Para a amplificação de CL foram utilizados 1 μ L de plasmídeo contendo o inserto da CL, 2 μ L de cada iniciador de cadeia leve a 10 μ M (*forward* e *reverse*), 0,75 μ L de dNTPs a 20 mM, 1 μ L de MgSO₄ a 50 mM, 0,5 μ L de *Platinum Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen, EUA), 5 μ L de tampão 10x em um total de 50 μ L de reação. Para a amplificação de CP foram utilizados 1 μ L de plasmídeo contendo o inserto da CP, 2 μ L de cada iniciador de cadeia pesada a 10 μ M (*forward* e *reverse*), 0,75 μ L de dNTPs a 20 mM, 1 μ L de MgSO₄ a 50 mM, 0,5 μ L de *Platinum Pfx* DNA Polimerase, 5 μ L de tampão 10x em um total de 50 μ L de reação. As misturas foram incubadas em uma reação de PCR de 35 ciclos de 94°C por 30 s; 57°C por 30 s; 68°C por 50 s e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. As reações foram purificadas utilizando o *Illustra GFX PCR DNA*

and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Reino Unido) adicionando-se 500 µL do tampão 1 (contendo acetato e agente caotrópico) para desnaturar as proteínas envolvidas na reação, agitando-se, transferindo-se para uma coluna GFX com matriz de fibra de vidro e centrifugando-se a 12000 x g por 1 min. O líquido coletado foi descartado e adicionado 500 µL de tampão de lavagem (10 mM de tris-HCl pH 8,0; 1 mM de EDTA; 100 mL de etanol 100%) e centrifugado a 12000 x g por 1 min. O eluato foi descartado e se adicionou 50 µL de tampão de eluição (água estéril livre de nuclease) pré aquecido a 37°C no topo da matriz da coluna. A coluna foi mantida à temperatura ambiente por 1 min, centrifugada a 12000 x g por 1 min e o DNA coletado em tubo estéril.

4.1.5.8 Ligação das cadeias ao *linker*

O *linker* é uma sequência de DNA que codifica um peptídeo flexível com repetição tripla de quatro resíduos de glicina e um resíduo de serina (Gly₄Ser)₃. Este peptídeo tem a finalidade de unir a CL à CP. Para a amplificação do *linker* foi necessária a utilização deste oligonucleotídeo previamente sintetizado (L2F) com a função de iniciador. Pelo fato da CL ter uma região complementar ao *linker*, este foi amplificado e unido simultaneamente com a utilização dos devidos iniciadores por PCR (Figura 2). Para a reação foram utilizados 1 µL de CL, 2 µL de iniciador *reverse* de CL a 10µM, 3 µL de iniciador L2F, 1,5 µL de dNTPs a 10 mM, 1,5 µL de MgSO₄ a 50 mM, 0,5 µL de *Platinum Pfx* DNA Polimerase, 5 µL de tampão 10x em um total de 50 µL de reação. As misturas foram incubadas em uma reação de PCR de 35 ciclos de 94°C por 40 s; 45°C por 30 s; 68°C por 1 min e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%. Após a amplificação da CL com o *linker*, a CP foi unida a esta cadeia amplificada (Figura 2), para a formação do scFv. Foram utilizados 1 µL de CL-*linker*, 1 µL de CP, 1 µL de iniciador *reverse* de CL a 10µM, 1 µL de iniciador *forward* de CP, 1,5 µL de dNTPs a 10 mM, 1,5 µL de MgSO₄ a 50 mM, 0,5 µL de *Platinum Pfx* DNA Polimerase, 5 µL de tampão 10x em um total de 50 µL de reação. As misturas foram incubadas em uma reação de PCR de 35 ciclos de 94°C por 40 s; 45°C por 30 s; 68°C por 1 min e analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

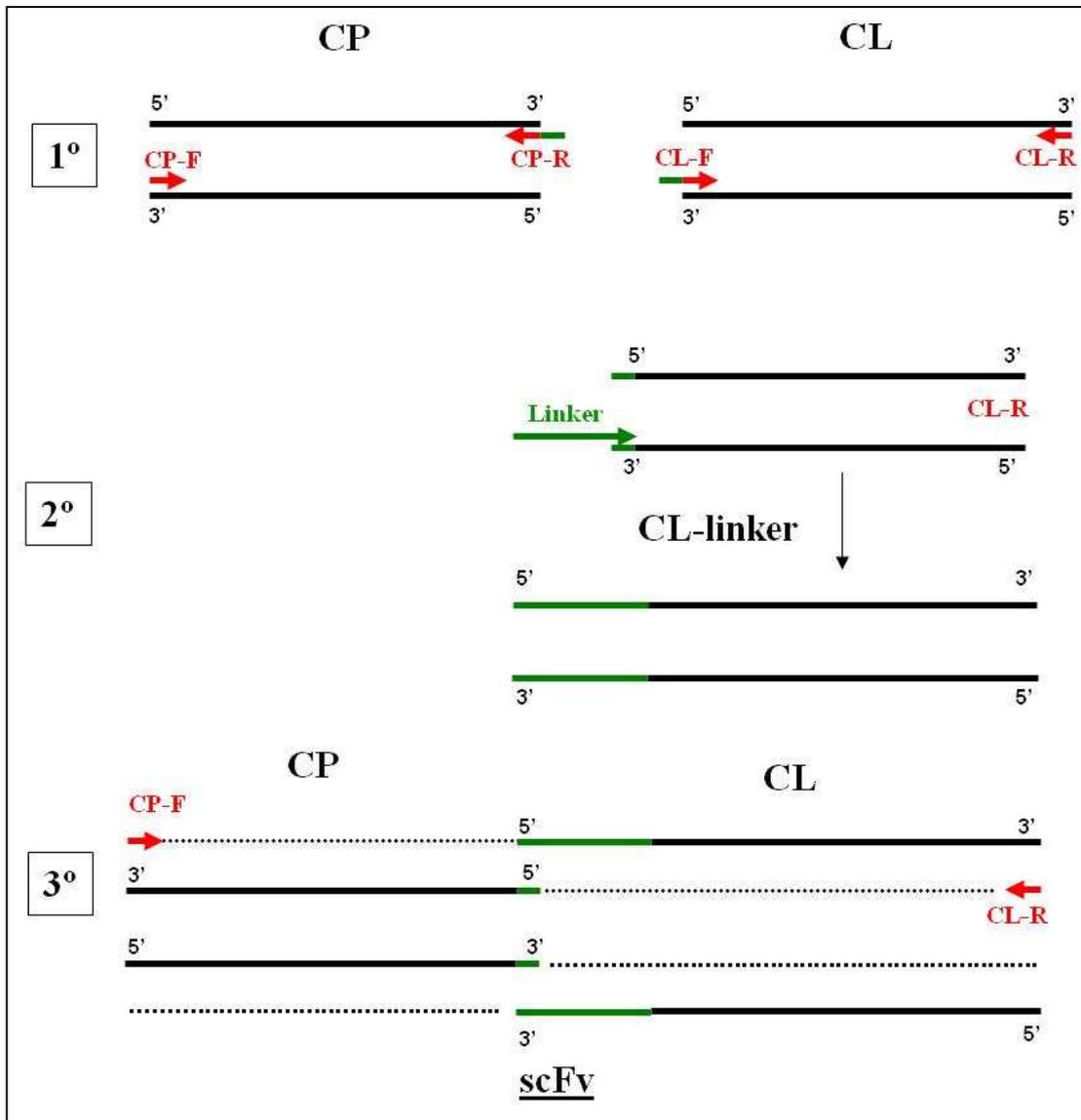


Figura 2: Esquema das reações de PCR: na 1ª etapa a amplificação de CL e CP utilizando iniciadores contendo uma região complementar ao *linker*. Na 2ª etapa a ligação da CL ao *linker*. Na 3ª etapa a ligação da CP a CL-*linker* e amplificação da cadeia única para a formação do scFv. Para as reações de PCR foi utilizada a enzima *Platinum Pfx* DNA Polimerase (Invitrogen, EUA)

Com a finalidade de ligar o inserto scFv em vetor de clonagem *pGEM-T Easy*, foi realizado o preenchimento da região 3' terminal da cadeia de scFv com dATP. Trinta microlitros de DNA foram utilizados com adição de 1 mM de dATP, 1 µL de MgCl₂, 1 µL de *Taq* Polimerase (Invitrogen, EUA), 4 µL de tampão 10x para 40 µL de reação. A mistura foi incubada a 72°C por 20 min e purificada utilizando o *kit Illustra GFX PCR*

DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Reino Unido), segundo recomendações do fabricante.

4.1.5.9 Ligação de scFv ao vetor de clonagem *pGEM-T Easy*

O produto de PCR do scFv preenchido com adenina ancorada na região 3' terminal foi submetido a ligação em vetor *pGEM-T Easy* utilizando 7,5 µL de tampão 2x (60mM de Tris-HCl pH 7,8, 20mM de MgCl₂, 20mM de DTT, 2mM de ATP, 10% de PEG 8000), 1 µL de *pGEM-T Easy* (50 ng), 5,5 µL do inserto, 1 µL de T4 DNA ligase para um total de 15 µL e incubada a 25°C por 1 h. O plasmídeo contendo o inserto foi transformado em células competentes de *E. coli* JM109 por choque térmico. Foram utilizados 5 µL de plasmídeo para 50 µL de células competentes. A mistura foi incubada em gelo por 20 min, a 42°C por 2 min e finalmente em gelo por 5 min. A reação foi adicionada a 450 µL de meio SOC (2 % de triptona, 0,5 % de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 0,25 M de KCl, 20 mM de Mg²⁺, 20 mM de glicose) por 1 h a 37°C sem agitação. Quatro placas de ágar LB contendo 100 µg/mL de ampicilina foram suplementadas com 1 mM de IPTG e 50 µg/mL de X-Gal. Após esse período, 50 µL, 100 µL, 200 µL de cultura e 200 µL de controle (*E. coli* JM109 não transformadas) foram plaqueadas e incubadas a 37°C por 18 h. As colônias brancas isoladas que cresceram no meio foram coletadas para crescimento em caldo LB contendo 100 µg/mL de ampicilina.

Para confirmar a ligação do inserto ao vetor, 1 mL de cultura foi centrifugado a 12000 x g e 100 µL de água destilada estéril foram adicionados ao sedimento. Cinco microlitros desta suspensão foram utilizados para a reação de "PCR de suspensão celular", adicionando-se 5 µL de tampão 10x, 1,5 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs, 1,5 µL de iniciador de cadeia pesada *forward*, 1,5 µL de iniciador de cadeia leve *reverse*, 0,5 µL de *Taq* Polimerase (Invitrogen, EUA), para uma reação de 50 µL. A mistura foi submetida a 96°C por 5 min e, em seguida, 30 ciclos de 96°C por 1 min; 50°C por 30 s; 72°C por 15 s e analisada por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os clones positivos foram submetidos a novo cultivo e ao ensaio de extração de plasmídeo

utilizando o *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen, EUA), como descrito previamente.

Os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão para nova confirmação de ligação do inserto. Para a digestão foram tomados 25,5 µL do plasmídeo, 3 µL de enzima de restrição *Bam*HI a 10 U/µL, 3 µL de enzima restrição *Hind*III a 10 U/µL, 3,5 µL de tampão NEB 2 (New England Biolabs, EUA) em uma reação de 35 µL. A mistura foi incubada a 37°C por 90 min e submetida à eletroforese em gel de agarose.

Os plasmídeos contendo o inserto foram sequenciados no Centro de Biotecnologia do Instituto Butantan para a confirmação da correta construção do scFv, utilizando-se iniciadores M13 *forward* (CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC) e *reverse* (TCACACAGGAAACAGCTATGAC), conforme descrito no item 4.1.5.5.

4.1.5.10 Ligação de scFv ao vetor de expressão pAE

Os clones contendo a correta construção do scFv foram cultivados e submetidos a extração do plasmídeo utilizando o *PureLink Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen, EUA), como descrito previamente. O *pGEM-T Easy* foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III para a liberação do inserto. Paralelamente, *E. coli* DH5α competentes foram transformadas por choque térmico com o vetor de clonagem pAE (Ramos *et al.*, 2004), cultivada a 37°C e submetida à extração por miniprep. O vetor pAE foi submetido a digestão com enzimas *Bam*HI e *Hind*III para a linearização. Para a digestão foram tomados 30 µL do plasmídeo, 3 µL de enzima de restrição *Bam* HI a 10 U/µL, 3 µL de enzima de restrição *Hind* III a 10 U/µL, 4 µL de tampão NEB 2 (New England Biolabs, EUA), em uma reação de 40 µL. A mistura foi incubada a 37°C por 90 min e submetida à eletroforese em gel de agarose a 1%. A banda referente ao vetor pAE foi cortada do gel e purificada utilizando o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Reino Unido), como descrito previamente. O pAE digerido foi ligado ao scFv digerido. A 7,5 µL de pAE foram adicionados 7,5 µL do inserto, 4 µL de tampão T4 5x, 1 µL de T4 DNA ligase (Invitrogen, EUA) para um volume total de 20 µL de reação. A mistura foi incubada a 16°C por 18 h.

4.1.6 Expressão de scFv

E. coli BL21(DE3) competente foi transformada com o produto de ligação do scFv em pAE por choque térmico, como descrito previamente. As colônias crescidas na placa foram cultivadas em 5 mL de caldo 2YT (1,7% de triptona, 1% de extrato de leveduras, 0,5% de NaCl, água destilada q.s.p.) contendo 100 µg/mL de ampicilina, como um pré-inóculo, por 18 h a 37°C. Uma alíquota deste pré-inóculo foi adicionada a 400 mL de caldo 2YT e cultivada sob agitação de 250 rpm a 37°C até a DO de 0,6. a essa cultura foi adicionado 1 mM de IPTG e cultivado por mais 5 h sob as mesmas condições. Após o período de cultivo, uma alíquota de pós-indução foi tomada e a cultura restante foi centrifugada a 4500 x g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 30 mL de PBS pH 7,4. As células da suspensão bacteriana foram rompidas por *French Press* (Thermo Scientific) a 2000 psi e centrifugadas a 12000 x g por 30 min a 4°C. Uma alíquota do sobrenadante foi tomada para fração solúvel e uma alíquota do sedimento foi tratada com 8 M de ureia para solubilizar as proteínas contidas em corpúsculos de inclusão na fração insolúvel. O extrato total de *E. coli* BL21 competente foi utilizado como controle de pré-indução. As frações foram submetidas a eletroforese em 2 géis SDS/PAGE a 12%, um corado por *Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution* (Bio Rad, EUA) e outro transferido para membrana de nitrocelulose pelo ensaio de *Western Blot* conforme descrito no item 4.1.4.5. O ensaio de *immunoblotting* foi realizado com a utilização de um anticorpo murino anti-His (GE Healthcare, Reino Unido) em uma diluição de 1:3000 e um anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Zymed-Invitrogen, EUA) em uma diluição de 1:5000. A membrana foi revelada com 3,3 diaminobenzidina (DAB) na presença de peróxido de hidrogênio. Foram testadas também as linhagens BL21(DE3) pLys e C43 (DE3) de *E. coli* e comparada a eficiência de expressão de cada uma. No cultivo de *E. coli* BL21 (DE3) pLys foi adicionado 20 µg/mL de cloranfenicol, além da ampicilina.

4.1.7 Purificação de scFv

A linhagem de *E. coli* BL21 (DE3) pLys transformada com pAE/scFv anti-intimina foi submetida à expressão protéica, como descrito previamente. A fração insolúvel, obtida após o rompimento das células bacterianas, foi solubilizada com tampão de solubilização contendo 50 mM de Tris-HCl (pH 8), 200 mM de NaCl, 5 mM de imidazol e 8 M de ureia e incubada a 4°C e agitação por 18 h. A solução foi centrifugada por 30 min a 12000 x g e a proteína solubilizada foi adicionada a 3 mL de resina de Níquel-Sepharose (GE Healthcare, Reino Unido) previamente equilibrada com o mesmo tampão de solubilização e submetida à agitação em banho de gelo por 2 h. A resina foi depositada em uma coluna e lavada com o tampão de solubilização para a retirada de proteínas inespecíficas. A lavagem foi monitorada pelo método Bradford até esgotamento de proteínas inespecíficas. Após lavagem a amostra foi eluída com tampão de eluição (50 mM de Tris-HCl pH 8; 200 mM de NaCl; 500 mM de imidazol e 8 M ureia) para a obtenção de scFv puro, porém de forma desnaturada. A proteína purificada foi submetida à análise por eletroforese em gel SDS/PAGE (item 4.1.4.5).

4.1.8 Refolding de scFv desnaturada

O processo de *refolding* de scFv foi realizado pelo método de diálise com concentrações decrescentes de ureia. A proteína em solução de ureia a 8 M foi depositada em uma membrana de diálise de 8000 Da em tampão solubilização descrito previamente, contendo 5 M de uréia. Após 12 h à temperatura ambiente, o tampão foi trocado por outro contendo 3 M de uréia e a diálise efetuada da mesma forma. O processo foi repetido para as concentrações de 2 M, 1 M, 0,5 M de uréia, sendo a última diálise realizada apenas com o tampão de solubilização. Ao tampão de concentração de ureia a 1 M foi adicionado 375 µM de glutathiona oxidada (GSSG) para o auxílio da reestruturação das pontes dissulfeto. A proteína solubilizada foi concentrada em PEG 6000 e quantificada pelo método de Warburg-Christian (1942).

4.1.9 Ensaio funcional de scFv anti-intimina

4.1.9.1 ELISA de captura

Para testar a funcionalidade do scFv foi realizado ensaio de ELISA de captura. Uma placa de poliestireno MaxiSorp (Nunc, Dinamarca) foi sensibilizada com uma diluição seriada de scFv a partir de 1:200 (1 µg) até 1:1600 (125 ng) por poço em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6 por 18 h a 4°C. A placa foi bloqueada com Molico a 5% diluído em PBS e incubada com 20 µg/mL de intimina purificada (Int₃₈₈₋₆₆₇) por 30 min a 37°C. Em seguida foi adicionada a fração enriquecida em IgG policlonal de coelho anti-intimina em uma diluição seriada de 1:200 (7,5 µg) até 1:3200 (470 ng) por 30 min a 37°C. O ensaio foi detectado com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Zymed-Invitrogen, EUA) diluído 1:5000 e revelado com O-fenilenodiamina (OPD). A absorbância foi medida a 492 nm. O branco da reação foi realizado sem a adição da intimina purificada.

4.1.9.2 Imunofluorescência

O isolado de EPEC E2348/69 foi cultivado em caldo LB a 37°C por 18 h sob agitação de 250 rpm. Um mililitro de cultivo foi centrifugado a 12000 x g por 10 min e lavado três vezes com tampão PBS. O sedimento foi submetido à permeabilização utilizando Triton X-100 a 4% com agitação por 10 min e lavado duas vezes com PBS, seguido da incubação com formaldeído a 1% por 20 min e duas lavagens subsequentes com PBS. A reação de imunofluorescência foi realizada utilizando-se 44 µg/mL do scFv anti-intimina obtido neste estudo, seguida da incubação com anticorpo anti-histidina diluído 1:2000. Em seguida, foi adicionado o anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, EUA) em uma diluição de 1:100. Todas as incubações foram realizadas por 1 h à temperatura ambiente. Uma gota da suspensão bacteriana foi colocada a uma lâmina de vidro e observada em microscópio de fluorescência (Axioskop – Zeiss, Alemanha) em aumento de 1000 x. Paralelamente, o anticorpo monoclonal anti-intimina foi utilizado na concentração de 193 µg/mL para teste de comparação com o scFv. Como controle negativo o ensaio foi realizado utilizando-se *E. coli* K-12 (linhagem JM109).

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Purificação da intimina recombinante

A intimina conservada recombinante, que compreende a região entre os aminoácidos 388 e 667 da intimina, contendo uma cauda de histidina, foi purificada em coluna de Níquel-Sepharose (GE Healthcare, Reino Unido) apresentando uma massa molecular de aproximadamente 33,6 kDa (Figura 3) e um rendimento estimado em 3 mg/mL determinado pelo método Christian & Warburg (1942). A proteína purificada foi utilizada em todos os ensaios de caracterização dos hibridomas anti-intimina, anticorpos monoclonais purificados e do anticorpo recombinante scFv.

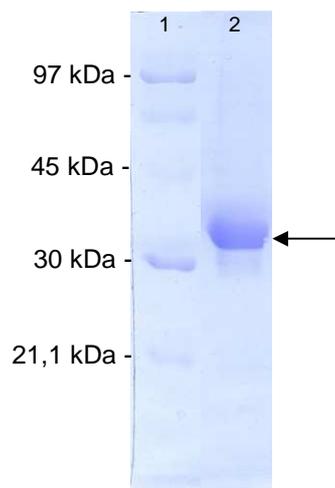


Figura 3: Perfil eletroforético da intimina purificada (Int₃₈₈₋₆₆₇) após purificação em coluna de Níquel-Sepharose. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS/PAGE) a 12%, corado por *Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution* (Bio-Rad, EUA) **1.** Marcador de massa molecular (LMW 97 – 14,4 kDa) **2.** Intimina purificada de aproximadamente 33,6 kDa indicado pela seta.

4.2.2 Caracterização dos anticorpos monoclonais anti-intimina

Os hibridomas anti-intimina foram obtidos a partir da fusão de células de mieloma (SP2O) com linfonodos poplíteos de camundongos imunizados com a intimina purificada (Int₃₈₈₋₆₆₇) (Koga, 2003). Os sobrenadantes das culturas dos hibridomas anti-intimina foram sub-clonados cinco vezes (K5); Esses hibridomas foram caracterizados

quanto aos seus isotipos e definidos como IgG2a e IgG2b. Ensaio de ELISA mostraram que esses hibridomas secretam anticorpos anti-intimina com absorvância a 492 nm próximas a 1 (Figura 4).

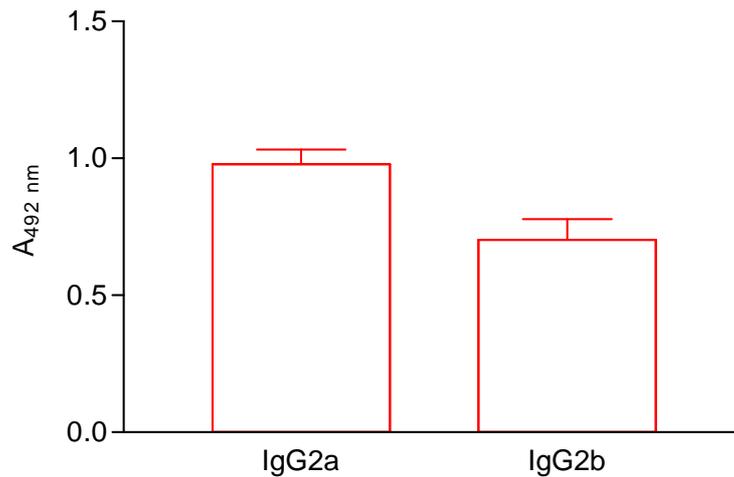


Figura 4: Reatividade dos sobrenadantes das culturas dos hibridomas anti-intimina por ELISA. Placas de poliestireno sensibilizadas com 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de intimina purificada ($\text{Int}_{388-667}$), incubadas com os sobrenadantes dos hibridomas anti-intimina, seguido da reação com soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase e revelação com OPD e H_2O_2 .

Após definição dos isotipos esses hibridomas foram purificados em colunas de Proteína A-Sepharose. Os anticorpos anti-intimina purificados foram submetidos ao ensaio de ELISA para o cálculo da constante de afinidade pelo método Friguet *et al.* (1985). O resultado da primeira etapa mostrou que a concentração de anticorpo de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambos anticorpos era a concentração ideal antes da saturação da reação (Figura 5). Esta concentração foi utilizada na segunda etapa de interação antígeno/anticorpo.

Na segunda etapa do ensaio do cálculo da constante de afinidade, os anticorpos foram incubados na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ (diluição 1:256) com uma diluição seriada de intimina a partir de 200 $\mu\text{g/mL}$.

Na terceira etapa a mistura antígeno/anticorpo foi incubada em placa de poliestireno sensibilizada com 15 $\mu\text{g/mL}$ de intimina purificada. Os anticorpos remanescentes da interação antígeno/anticorpo na segunda etapa reagiram com o antígeno sensibilizado na placa da terceira etapa (Figura 6). A concentração obtida foi de 1,56 $\mu\text{g/mL}$ de anticorpo monoclonal a uma absorbância de 0,26 para IgG2a e 0,197 para IgG2b.

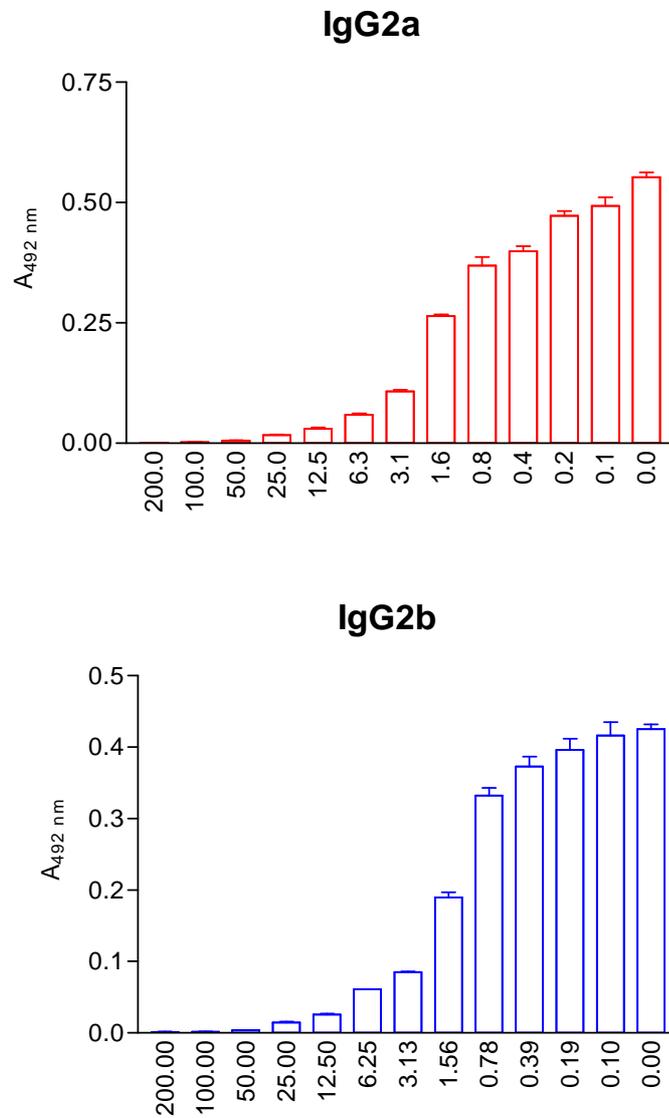


Figura 6: Gráficos apresentando o resultado da terceira etapa do ensaio de ELISA usado para a obtenção do valor da constante de afinidade. Uma placa de poliestireno foi sensibilizada com 15 µg/mL de intimina purificada e incubada com os anticorpos remanescentes da interação antígeno/anticorpo da incubação da segunda etapa e com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo conjugados à peroxidase (1:10000) e revelado por OPD e H₂O₂. A concentração obtida foi de 1,56 µg/mL de anticorpo monoclonal a uma absorbância de 0,26 para IgG2a e 0,197 para IgG2b.

A partir dos dados obtidos, as constantes de afinidade foram definidas como $1,5 \times 10^{-8}$ M para IgG2a e $1,3 \times 10^{-8}$ M para IgG2b.

Os anticorpos purificados anti-intimina IgG2a e IgG2b também foram utilizados para testar a reatividade frente ao extrato da tEPEC E2348/69 (O127:H6) por *immunoblotting*. Foram utilizados 3 $\mu\text{g/mL}$ de IgG2a e 4,2 $\mu\text{g/mL}$ de IgG2b. Como o anticorpo IgG2a apresentou reatividade com uma banda inespecífica (Figura 7, linha 1), todos os experimentos subseqüentes foram realizados utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-intimina caracterizado como IgG2b.

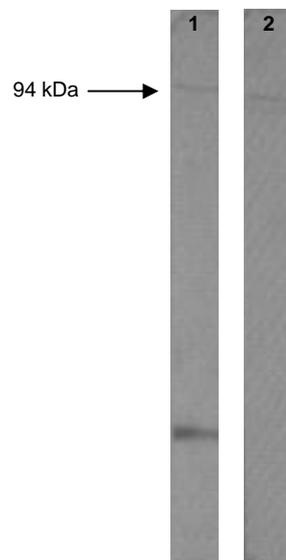


Figura 7: Membrana de nitrocelulose contendo extrato protéico do isolado de EPEC típica E2348/69. A membrana foi incubada com os anticorpos IgG2a (1) e IgG2b (2) anti-intimina, seguidos da incubação com soro de cabra anti-IgG de camundongo e revelados com DAB e H_2O_2 .

Com o objetivo de avaliar o limite de detecção do anticorpo monoclonal IgG2b frente à intimina purificada, realizou-se um ELISA que definiu que um micrograma desse anticorpo reconhece 0,6 μg de intimina, considerando-se uma absorbância de 0,175 (Figura 8).

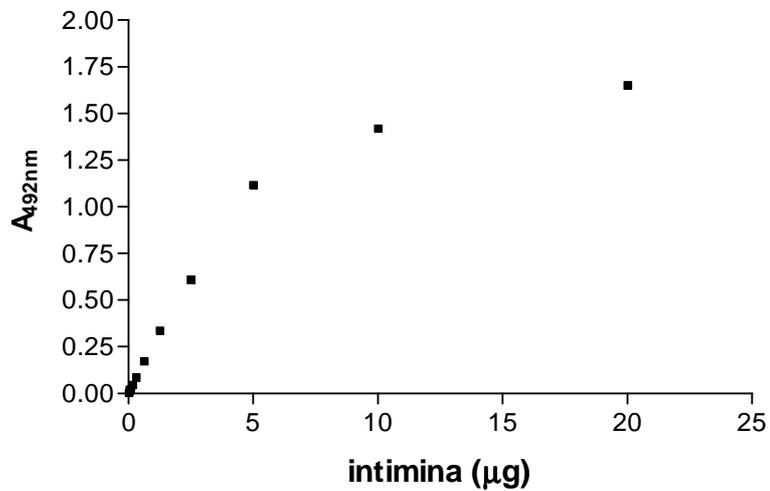


Figura 8: Limite de detecção do anticorpo monoclonal IgG2b anti-intimina. Placa de poliestireno sensibilizada com diferentes concentrações de intimina purificada a partir de 200 µg/mL em uma diluição seriada e incubada com 10 µg/mL de anticorpo monoclonal e soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:10.000), revelado com OPD e H₂O₂.

Sabendo-se a constante de afinidade e o limite de detecção desse anticorpo, avaliou-se a reatividade do anticorpo anti-intimina IgG2b por *immunoblotting*, utilizando membranas de nitrocelulose contendo frações protéicas de isolados de EPEC e EHEC que expressam diferentes tipos de intimina, outras categorias de *E. coli* diarreioagênica e *E. coli eae* negativos de outros patótipos diarreioagênicos. A figura 9 é representativa dos ensaios de *immunoblotting* realizados. Por esse ensaio observou-se que o anticorpo monoclonal apresentava uma especificidade de 100%, não reagindo com os isolados das outras categorias de *E. coli* diarreioagênicas e de *E. coli eae* negativos. No entanto, também não reconheceu alguns dos subtipos de intimina, apresentando assim uma positividade de 69,5% (Tabela 2).

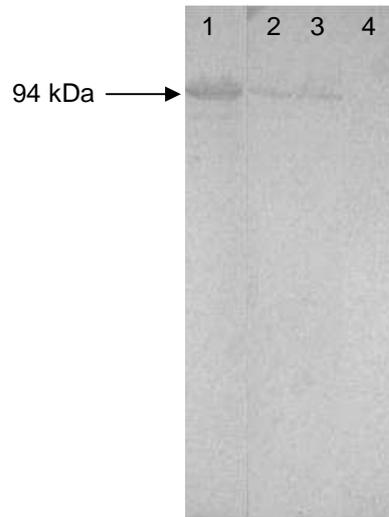


Figura 9: Membrana de nitrocelulose contendo frações protéicas de extratos bacterianos de **1.** E2348/69 (intimina α); **2.** O1:H16 (intimina β); **3.** O20:H⁻ (intimina μ); **4.** DH5 α (controle negativo). A membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-intimina IgG2b (8.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) seguido de soro de cabra anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (1:2000), e revelado com DAB e H₂O₂.

Tabela 2: Reatividade por *immunoblotting* do anticorpo monoclonal contra isolados eae positivos que apresentam diferentes tipos de intimina.

Patotipos	Tipos de intimina	Número de isolados
	(número de isolados)	reconhecidos pelo anticorpo monoclonal
tEPEC	Alfa (3)	3
	Beta (3)	3
	Gama (2)	1
	Delta (3)	2
	Teta (1)	0
	Total 12	9 (75%)
aEPEC	Alfa (2)	1
	Beta (19)	17
	Gama (6)	1
	Épsilon (20)	14
	Eta (1)	1
	Teta (8)	8
	Iota (4)	1
	Kappa (4)	3
	Lambda (4)	2
	Um (2)	2
	Pi (2)	2
	Total 72	52 (72,2%)
EHEC	Beta (2)	2
	Delta (1)	0
	Gama (3)	0
	Épsilon (2)	2
	Teta (3)	1
Total (11)	5 (45,4%)	
	Total 95	66 (69,5%)

4.2.3 Construção do Fragmento Variável de Cadeia Única (scFv) anti-Intimina recombinante, utilizando iniciadores desenhados com base em sequências conservadas das cadeias leve e pesada

Na construção do fragmento variável de cadeia única, foram utilizados hibridomas do anticorpo monoclonal IgG2b anti-intimina. As células foram cultivadas e 5×10^7 unidades viáveis foram coletadas para a extração de RNA mensageiro. O mRNA foi extraído e analisado por eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando padrões desejáveis de qualidade e quantidade (Figura 10).

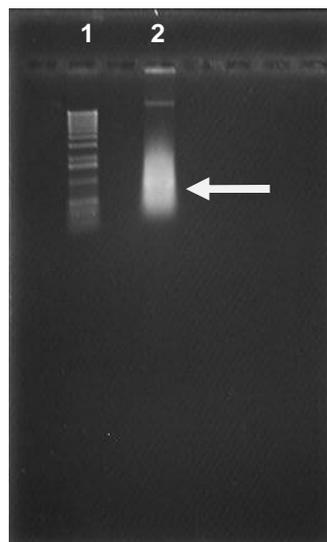


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose (1%) do mRNA extraído de hibridoma anti-intimina. **1.** Marcador 1 kb DNA Ladder. **2.** mRNA do hibridoma anti-intimina indicado pela seta branca.

A partir do mRNA foi realizada a síntese de cDNA em duas reações, uma para a cadeia leve (CL) e outra para a cadeia pesada (CP) da fração variável do anticorpo. Cada reação foi então amplificada com iniciadores baseados em sequências aleatórias das CL e CP, e analisadas em gel de agarose a 1% e purificadas. Os fragmentos

gênicos das porções variáveis das cadeias leve e pesada são representados por uma banda de aproximadamente 325 pb (CL) e 340 pb (CP), segundo o manual do fabricante do *kit* (GE Healthcare). A quantificação de cada cadeia, baseada no marcador *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen, EUA), foi estimada em 60 ng/ μ L (Figura 11).

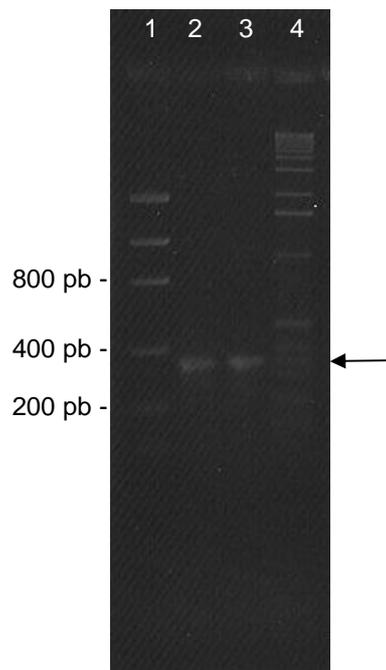


Figura 11: Reação de PCR dos fragmentos gênicos que codificam as cadeias leve e pesada da fração variável do anticorpo anti-intimina. Eletroforese em gel de agarose a 1 % apresentando amplificação do fragmento gênico da fração variável da cadeia leve (**2**) e da cadeia pesada (**3**) do anticorpo anti-intimina. As bandas apresentam um *amplicom* de aproximadamente 325 pb e 340 pb respectivamente, indicados pela seta. (**1 e 4**) Marcador Low Mass DNA Ladder (Invitrogen, EUA).

Os insertos referentes a CL e CP foram clonados em vetor *pGEM-T Easy* e submetidos à digestão com a enzima *EcoRI* para a quantificação, que foi estimada respectivamente em 150 ng/ μ L e 200 ng/ μ L (Figura 12).

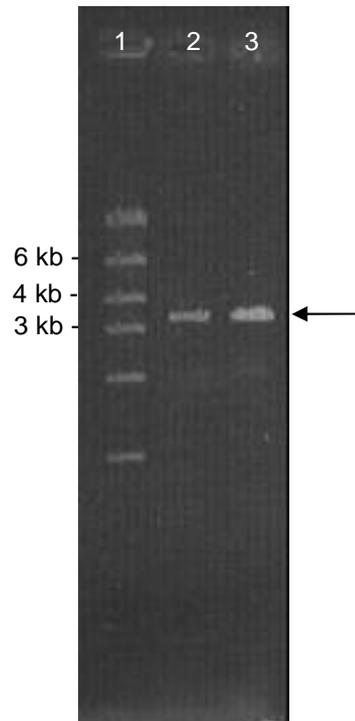


Figura 12: Quantificação de CL e CP clonadas em *pGEM-T Easy*. Eletroforese em gel de agarose de vetores digeridos com *EcoRI*. (2) CL. (3) CP, indicados pela seta. (1) Marcador High Mass DNA Ladder (Invitrogen, EUA).

Os plasmídeos quantificados com os devidos insertos foram submetidos ao sequenciamento com a utilização de oligonucleotídeos iniciadores M13 (*forward e reverse*).

Os cDNAs das cadeias leve e pesada também foram sequenciados e analisados, não sendo detectados códons de terminação (Tabela 3). As sequências previstas de aminoácidos da CL e CP (Tabela 4) foram analisadas no banco de dados do NCBI (blast.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando a ferramenta BLAST, e foi verificado homologia acima de 90% com dados publicados da região variável de anticorpos de camundongos espécie *Mus musculus*. Regiões conservadas do início das cadeias pesada e leve foram utilizadas para o desenho dos novos iniciadores contendo sítios de restrição apropriados para subsequente clonagem em vetor de expressão.

Tabela 3: Sequência de nucleotídeos referente à CP, *linker* e CL da fração variável anti-intimina.

CADEIAS	SEQUÊNCIAS
CP	GTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGGTGGTGAAGCCTGGGACTTCAGTGAAGATAT CCTGTAAGGCTTCTGGATACACGGTCACTGACTACTACATGAACTGGGTGAAGCAGAGC CATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCTTGACAATCGTGATTGTAGTTAT AACCAGAAGTTCCAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCGTCCAGCACAGTCTA CATGGAGATCCGACGCTGACTTCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGTCAACT GGTCACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
Linker	GGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG
CL	GACATTGTGCTGACCCAGTCTCCAGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGGCCACC ATCTCATACAGGGCCAGCAAAAGTGTGAGTACATCTGGCTATAGTTATATGCACTGGAAC CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCGTCTATCTTGTATCCAACCTAGAATCT GGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCA TCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTGTGAGCACATTAGGGAGCTTACAC GTTCCGAGGGGGCACCAAGCTGGAATCAAAC

Tabela 4: Sequência predita de aminoácidos referente à CP, *linker* e CL da fração variável anti-intimina sem a presença de códons de terminação.

CADEIAS	SEQUÊNCIAS
CP	VQLQESGPEVVKPGTSVKISCKASGYVTDYIMNWWKQSHGKSLEWIGDINLDRDCSYN QKFQDKATLTVDKSSSTVYMEIRSLTSEDSAVYYCASQLGHWGQGTTVTVS
Linker	GGGSGGGSGGGGS
CL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISYRASKSVSTSGYSYMHWNQKPGQPPRLLVYLVSNLESGV PARFSGSGSDFTLNHPVEEEDAATYYCQHIRELTRSEGAPSWKSN

Em todas as reações de PCR realizadas para a geração do scFv anti-intimina (amplificação das cadeias pesada e leve, da cadeia leve fusionada à sequência *linker* e do scFv) (Figura 2) foram utilizadas a polimerase de alta fidelidade para reduzir o risco de introdução de mutações e a alteração da leitura de fase.

Utilizando os iniciadores sintetizados, as cadeias CL e CP foram amplificadas por PCR a partir de plasmídeos *pGEM-T Easy* contendo as CL e CP. Bandas de aproximadamente 300 pb foram visualizadas no gel de agarose, referentes às regiões variáveis das CL e CP (Figura 13).

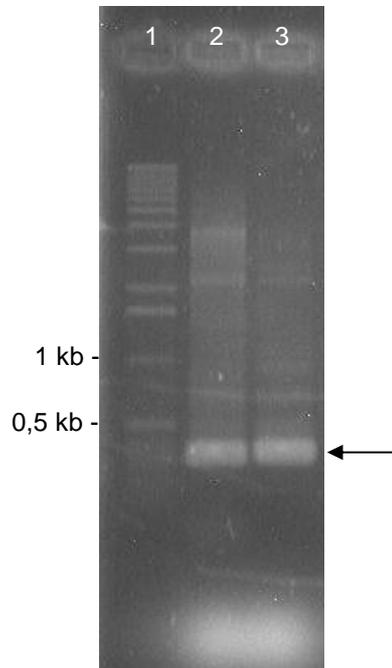


Figura 13: Reação de PCR da amplificação da região variável das cadeias leve e pesada de scFv anti-intimina. Análise em gel de agarose 1% dos produtos de PCR, utilizando novos iniciadores, da CP (2) e da CL (3) de scFv anti-intimina, de aproximadamente 300 pb, indicados pela seta. Marcador 1 kb DNA Ladder (Invitrogen,EUA)(1)

Após a amplificação das CL e CP, a CL foi submetida a uma reação de PCR, utilizando como iniciador *forward* a sequência *linker*. Isso foi possível pelo fato do produto de PCR inicial da CL ter sido amplificado com um iniciador *forward* com complementariedade parcial à sequência *linker*. Esta amplificação gerou um fragmento *linker*-CL (Figura 2).

Uma reação de PCR foi realizada para unir as cadeias leve e pesada utilizando como molde os fragmentos de DNA da CP e da CL-*linker*, e o iniciador *forward* de CP e o iniciador *reverse* da CL, resultando em uma banda de aproximadamente 700 pb, referente ao scFv anti-intimina (Figura 2 e Figura 14).

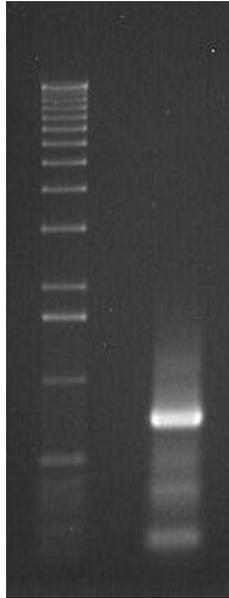


Figura 14: Amplificação por PCR do fragmento variável de cadeia única (scFv) anti-intimina. União de CL-*linker* e CP por PCR, resultando numa banda de aproximadamente 700 pb, referente ao scFv íntegro (2) indicado pela seta. (1) Marcador 1 kb DNA Ladder (Invitrogen, EUA).

O produto de PCR scFv anti-intimina com extremidades 3' não adeniladas foi purificado e submetido a reação de preenchimento da extremidade 3' terminal com dATP. Com a adenina ancorada, foi realizada a ligação do inserto em vetor de clonagem *pGEM-T Easy*. Células bacterianas competentes de *E. coli* JM109 foram transformadas com o plasmídeo *pGEM-T Easy/scFv*. Das colônias brancas resultantes, 5 foram submetidas à reação de PCR. A presença do inserto foi confirmada em todas as colônias selecionadas (Figura 15).

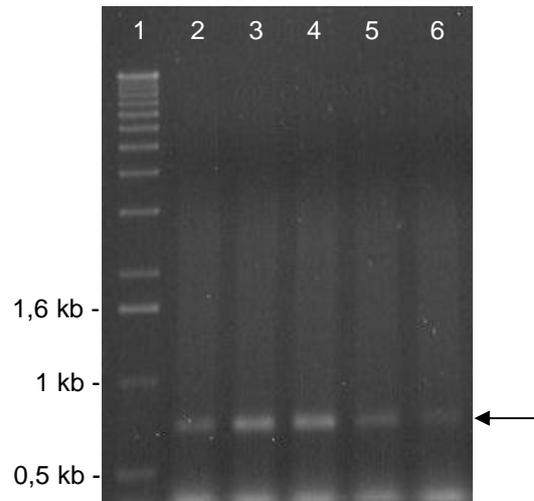


Figura 15: Análise de clones de *E. coli* recombinantes positivos para scFv por PCR de suspensão celular. Produtos de PCR de aproximadamente 700 pb (indicados pela seta), referente ao scFv, confirmando a presença do inserto em todos os cinco clones selecionados (2-6). Marcador 1 kb DNA Ladder (Invitrogen, EUA)(1)

Com o intuito de certificar a presença do inserto, 3 clones positivos foram selecionados para a reação de digestão. Os clones foram cultivados e submetidos à extração do plasmídeo. Enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III foram utilizadas para digerir os fragmentos scFv para posterior clonagem no vetor de expressão pAE. Em gel de agarose, todos os clones apresentaram uma banda de aproximadamente 700 pb, referente ao inserto, e uma banda de aproximadamente 3,2 kb referente ao *pGEM-T Easy*. Como controle foi utilizado um plasmídeo não digerido (Figura 16).

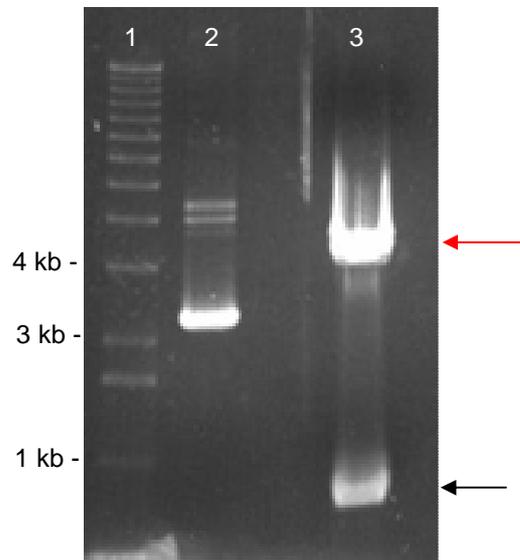


Figura 16: Reação de digestão do vetor *pGEMT-Easy/scFv* com enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, liberando um inserto de aproximadamente 700 pb, confirmando a presença de um fragmento com tamanho predito para scFv (3), indicado pela seta. Como controle foi utilizado um plasmídeo não digerido (2). Marcador 1 kb DNA Ladder (Invitrogen, EUA)(1). A seta vermelha indica o vetor digerido vazio.

4.2.4 Expressão e purificação do scFv anti-intimina

O inserto foi ligado ao vetor de expressão pAE e introduzido em *E. coli* BL21(DE3) competente. A bactéria transformada foi cultivada e submetida à indução da expressão protéica. Foram analisadas quatro frações por SDS/PAGE a 12%: pré indução; pós indução; solúvel e insolúvel (corpúsculos de inclusão). A proteína recombinante scFv anti-intimina, representada por uma massa molecular aparente de aproximadamente 26,5 kDa, foi observada na fração insolúvel do extrato bacteriano (Figura 17).

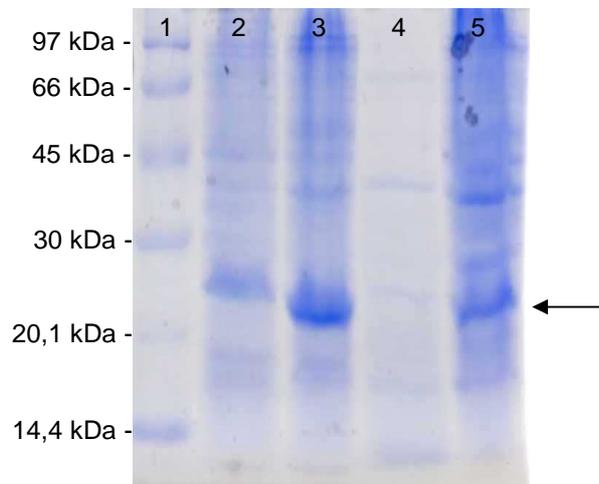


Figura 17: Perfil eletroforético da análise de expressão de scFv anti-intimina em extratos de *E. coli* BL21 (DE3) recombinantes. Frações de indução da expressão de scFv anti-intimina submetidas à eletroforese em gel SDS/PAGE a 12%. **1.** Marcador de massa molecular (LMW 97 – 14,4 kDa). **2.** Extrato total de BL21 competente como controle de pré-indução. **3.** Extrato total de células bacterianas após indução. **4.** Fração solúvel do extrato bacteriano. **5.** Fração insolúvel do extrato bacteriano (corpúsculo de inclusão) tratado com 8 M de ureia. Proteína de interesse indicada pela seta.

Para confirmar a presença da proteína recombinante fusionada a 6 resíduos de histidina no extrato de *E. coli* BL21 (DE3) recombinante, as frações foram analisadas por *immunoblotting*, utilizando um anticorpo murino anti-His (Figura 18). Além da *E. coli* BL21 (DE3), foram testadas também outras duas linhagens de *E. coli* para comparar a eficiência da expressão protéica. Com a linhagem *E. coli* C43 (DE3) obteve-se uma melhor expressão, mas observou-se outra banda de tamanho inferior, que poderia ser um produto de degradação de scFv, devido à ação de proteases endógenas da linhagem de expressão C43, bem como um produto de expressão truncado de scFv, devido a um possível *codon usage* raro na sequência de scFv (Figura 19, colunas 3 e 5). A linhagem *E. coli* BL21(DE3) pLys apresentou um melhor desempenho dentre as três linhagens testadas, por apresentar uma expressão superior a BL21 (DE3) e por não ter apresentado um padrão de degradação ou produção de scFv truncada. (Figura 18, colunas 5 a 7). Ambas as linhagens apresentaram um leve escape na expressão na fração de pré-indução.

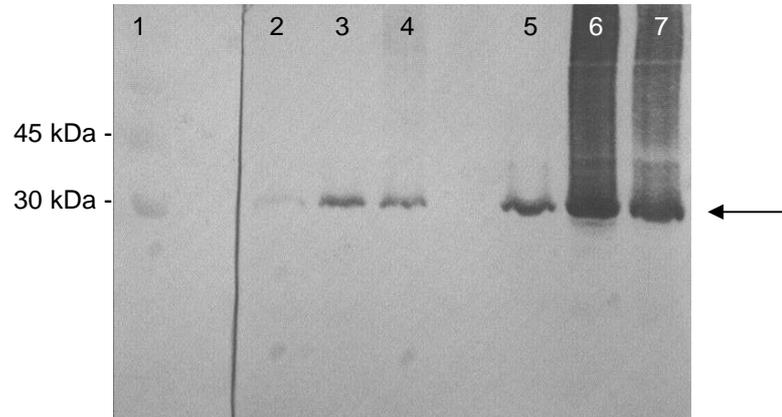


Figura 18: Análise de expressão de scFv anti-intimina em extratos de *E. coli* BL21 (DE3) (2, 3, 4) e *E. coli* BL21 (DE3) pLys (5, 6, 7). Frações de indução da expressão de scFv anti-intimina submetidas a eletroforese em gel SDS/PAGE a 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose para o ensaio de *immunoblotting*, utilizando o anticorpo anti-His. 1. Marcador de massa molecular (LMW 97 – 14,4 kDa). 2 e 5. Extrato total como controle de pré-indução. 3 e 6. Extrato total de células bacterianas após indução. 4 e 7. Fração insolúvel do extrato bacteriano (corpúsculo de inclusão) tratado com 8 M de ureia. Proteína de interesse, detectada pelo anticorpo anti-His, indicada pela seta.

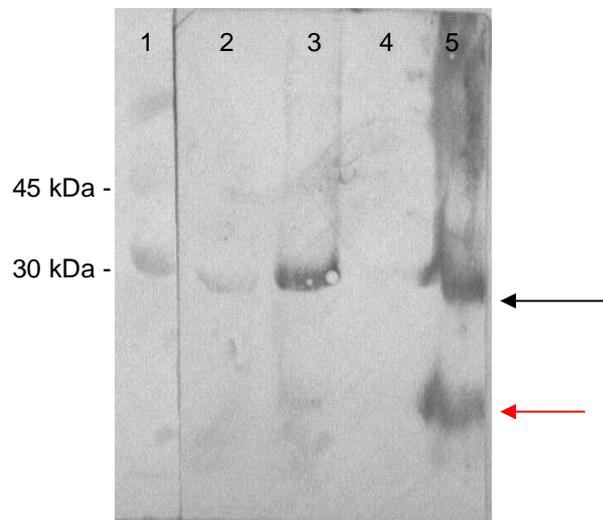


Figura 19: Análise de expressão de scFv anti-intimina em extratos de *E. coli* C43 (DE3). Extratos totais de C43 transformada submetidas à eletroforese em gel SDS/PAGE a 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose para o ensaio de *immunoblotting*, utilizando o anticorpo anti-His. 1. Marcador de massa molecular (LMW 97 – 14,4 kDa). 2. Extrato total como controle de pré-indução. 3. Extrato total de células bacterianas após indução. 4. Fração solúvel do extrato bacteriano. 5. Fração insolúvel do extrato bacteriano (corpúsculo de inclusão) tratado com 8 M de ureia. Proteína de interesse detectada pelo anticorpo anti-His indicada pela seta preta. Banda referente à proteína degradada ou truncada indicada pela seta vermelha.

Um clone BL21 (DE3) pLys recombinante para scFv anti-intimina foi cultivado em de caldo LB na presença de ampicilina e cloranfenicol e repicado para 400 mL de caldo 2YT na presença dos mesmos antibióticos até atingir a DO a 600 nm de 0,5. Com a adição de 1 mM de IPTG, as células bacterianas foram coletadas após 5 h de cultivo. A fração insolúvel foi incubada com tampão contendo 8 M de ureia e adicionada à coluna de Níquel-Sepharose. A proteína foi eluída com uma solução de 500 mM de imidazol e dialisada com concentrações decrescentes de ureia. A fração solubilizada foi quantificada e submetida à análise por eletroforese em gel SDS/PAGE a 12% (Figura 21), revelando uma banda inferior a 30 kDa, massa molecular próxima à predita para scFv anti-intimina recombinante, de 26,5 kDa. Pelo método Christian & Warburg de dosagem protéica, obteve-se um rendimento de aproximadamente 1 mg de proteína por 100 mL de cultura bacteriana.

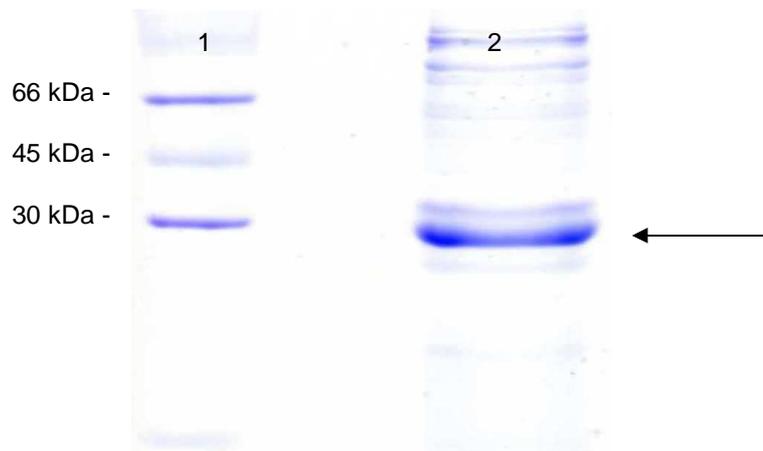


Figura 20: Perfil eletroforético da análise de purificação de scFv anti-intimina expressa em *E. coli* BL21 (DE3) pLys. Eluato de scFv anti-intimina submetidas a eletroforese em gel SDS/PAGE a 12%. **1.** Marcador de massa molecular (LMW 97 – 14,4 kDa). **2.** Fração purificada de scFv anti-intimina, referente a uma banda de aproximadamente 26,5 kDa indicada pela seta.

4.2.5 Ensaios de funcionalidade do scFv

O scFv purificado foi submetido a testes de funcionalidade. Pelo ensaio de ELISA de captura a placa foi sensibilizada com scFv, seguido da incubação de intimina purificada, fração enriquecida em IgG policlonal de coelho anti-intimina e anticorpo anti-

IgG de coelho conjugado à peroxidase. Apenas 275 ng de scFv reagiu com 2 μg de intimina purificada, utilizando 7,5 μg de fração enriquecida em IgG policlonal de coelho a uma absorbância de aproximadamente 0,75. O mesmo ensaio sem a utilização da intimina purificada foi utilizado como o branco da reação. Pelo resultado obtido, foi demonstrado que o scFv é funcional e reconhece a porção conservada da intimina (Figura 21).

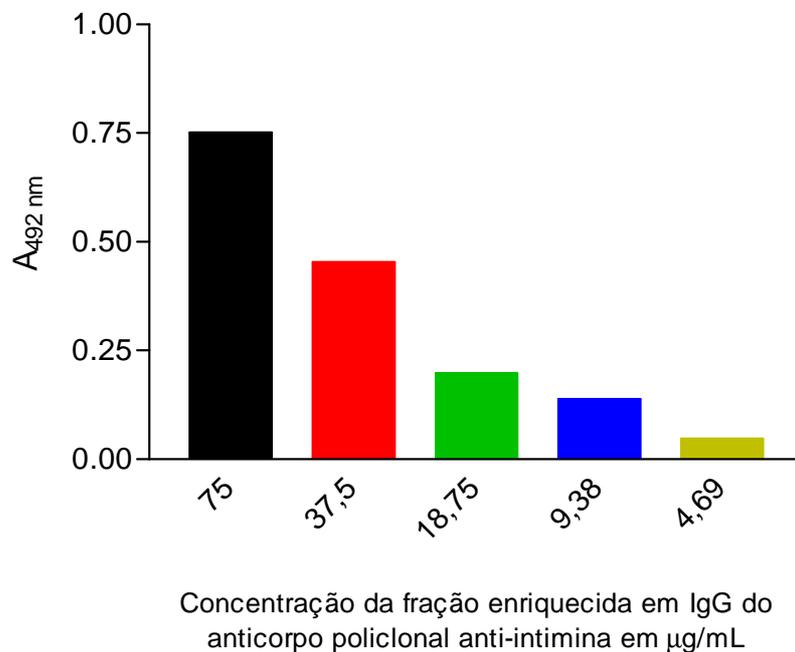


Figura 21: Reatividade do scFv anti-intimina à fração conservada da intimina. Ensaio de ELISA de captura com placa sensibilizada com 275 ng de scFv, seguido de incubação de 2 μg de intimina purificada e uma diluição seriada da fração enriquecida de IgG anti-intimina de coelho a partir de 7,5 μg , utilizando o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase e revelado por OPD e H_2O_2 .

Por imunofluorescência, o scFv mostrou uma forte reatividade (Figura 22A), reconhecendo amostras permeabilizadas de E2348/69 em relação à *E. coli* K-12 (Figura 22C) como controle negativo. Por outro lado, o anticorpo monoclonal teve uma menor reatividade se comparado ao scFv (Figura 22B).

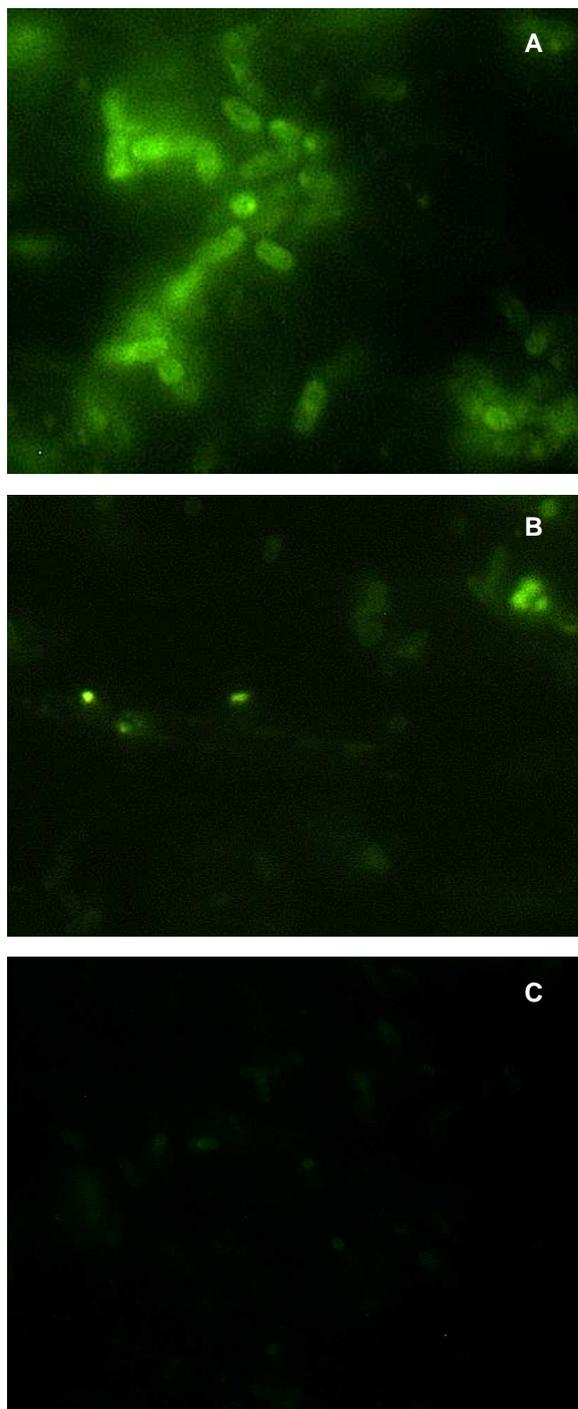


Figura 22: Reatividade do scFv e do anticorpo monoclonal anti-intimina por ensaio de imunofluorescência. Isolados de E2348/69 permeabilizados e incubados com scFv, anticorpo anti-His e anticorpo conjugado a FITC. **A:** E234869 - scFv. **B:** E234869 - anticorpo monoclonal. **C:** K12 - scFv

4.3 DISCUSSÃO

A associação de diarreia persistente e má nutrição como causa de mortalidade, tem reforçado a necessidade de desenvolvimento de programas de intervenção além do tratamento baseado em terapia de reidratação oral. Dentro destes programas de intervenção existe a detecção dos patógenos por ensaios diagnósticos, a fim de evitar possíveis surtos e escolher o melhor método de tratamento para minimizar os sintomas dos infectados (Qadri *et al.*, 2005). É importante ressaltar que muitas vezes no Brasil, quando a diarreia é detectada, erroneamente, antes mesmo de diagnosticar o agente causador, aplica-se antibioticoterapia, o que pode agravar o quadro clínico de pacientes. Isso reforça a idéia do diagnóstico como pré-requisito para o correto tratamento.

No entanto, na rotina de laboratórios clínicos, somente os ensaios de identificação do antígeno somático têm sido amplamente aplicados no diagnóstico de doenças gastrointestinais causadas por EPEC e EHEC, essa identificação não é conclusiva, pois não há correlação entre sorogrupo e as diferentes categorias de *E. coli* diarreiogênica. Além disso, no caso das EHEC, apenas o sorotipo O157:H7 é pesquisado, apesar de não ser o único representante deste patotipo (Trabulsi *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2004b).

Por outro lado, a identificação dos genes de virulência característicos seria uma escolha óbvia para a detecção dos patotipos das DEC. Ensaios de PCR simples ou multiplex para detectar genes de virulência tem sido empregados com sucesso para a detecção de EPEC e EHEC, assim como outros patotipos de DEC (Karch, Meyer, 1989; Pass *et al.*, 2000; Begum *et al.*, 1993; Franke *et al.*, 1994; Cocolin *et al.*, 2000; Feng, Monday, 2000; Rappelli *et al.*, 2001; Rich *et al.*, 2001; Paton, Paton, 1998, 2002; Osek, 2003; Toma *et al.*, 2003; Kimata *et al.*, 2005; Aranda *et al.*, 2004, 2007; Müller *et al.*, 2006; Persson *et al.*, 2007; Bueris *et al.*, 2007). No entanto, estes testes não são exequíveis na realidade de países em desenvolvimento. Além disso, a detecção do gene não garante a expressão do fator de virulência correspondente (Vilhena-Costa *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2009).

Dentre os métodos para detecção da expressão dos fatores de virulência, os ensaios imunossorológicos podem ser considerados como primeira alternativa por apresentarem alta sensibilidade e especificidade, utilizando anticorpos policlonal e monoclonal como ferramentas de detecção. Por esse motivo, em nosso laboratório foram produzidos anticorpos específicos para as toxinas LT e ST de ETEC (Menezes, 2002; Menezes *et al.*, 2003, 2006), para a toxina Pet de EAEC (Vilhena-Costa *et al.*, 2006) e para a toxina Stx de STEC (Mendes-Ledesma *et al.*, 2008).

Em comum, EPEC e EHEC compartilham um mesmo fator de virulência, a adesina intimina (Adu-Bobie *et al.*, 1998). A região conservada desta proteína (Int₃₈₈₋₆₆₇) foi utilizada como antígeno para o desenvolvimento de um potencial anticorpo universal anti-intimina (Batchelor *et al.*, 1999).

Em nosso laboratório, observou-se que a reatividade da fração enriquecida em IgG de soro de coelho anti-intimina contra tEPEC pertencente aos sorotipos que expressam intimina α , β , γ , δ e ϵ por *immunoblotting*. Esta reatividade foi confirmada por ensaio de *immuno-dot*, imunofluorescência, citometria de fluxo e imunomarcação por ouro coloidal sendo observada diferenças entre as cepas bacterianas (Koga *et al.*, 2003). Um ensaio de *colony-immunoblot* também foi desenvolvido, empregando a fração enriquecida em IgG de soro de coelho anti-intimina e utilizado para avaliar diferentes meios de cultivo e diferentes tampões de lise para a transferência protéica à membranas de nitrocelulose. Este ensaio detectou apenas os tipos de intimina α , β , γ , δ , ϵ e θ (Rocha, 2005).

Esses resultados nos levaram ao primeiro objetivo do presente trabalho, no qual paralelamente, um antissoro de rato e anticorpos monoclonais anti-intimina, foram produzidos a partir de intimina purificada (Int₃₈₈₋₆₆₇). Comparou-se a reatividade desse antissoro, da fração enriquecida e do anticorpo monoclonal anti-intimina por *immunoblotting*, utilizando extrato total de 72 isolados de aEPEC, 12 tEPEC, 11 EHEC e 16 isolados de *E. coli eae*-negativos. Apesar do baixo nível de reatividade cruzada observada na utilização do antissoro de rato, este reagente teve menor sensibilidade à intimina testada em relação à fração enriquecida em IgG de soro de coelho. Os resultados com a fração enriquecida de IgG de coelho apresentaram 100% de

especificidade e 97% de sensibilidade, sugerindo ser uma ferramenta apropriada para a detecção de isolados de EPEC e EHEC por *immunoblotting* (Menezes *et al.*, 2009).

Por outro lado, o anticorpo monoclonal anti-intimina IgG2b apresentou uma sensibilidade de 78%, mesmo apresentando uma constante de afinidade de $1,3 \times 10^{-8}$ M e um bom limite de detecção. A ausência da reatividade do anticorpo monoclonal parece ser relacionada ao sorotipo e não ao subtipo de intimina, principalmente considerando os isolados O157:H7. Nenhuma correlação pôde ser observada com outros sorotipos e subtipos de intimina. Este monoclonal, por exemplo, detectou apenas um de dois isolados do sorotipo O119:H6, ambos expressando intimina γ (Menezes *et al.*, 2009). Essa menor sensibilidade do anticorpo monoclonal levou-nos ao segundo objetivo desse trabalho que consistiu na manipulação do fragmento variável de cadeia única (scFv) do anticorpo monoclonal anti-intimina através de sua clonagem, expressão e análise de sua funcionalidade.

Duas abordagens foram utilizadas para a obtenção do scFv, em uma abordagem utilizou-se o vetor pCANTAB 5 E e outra utilizando-se o vetor pAE. Primeiramente, o sistema escolhido para a clonagem de scFv foi o *Recombinant Phage Antibody System* (RPAS - GE Healthcare, Reino Unido) que utiliza o vetor pCANTAB 5 E para a clonagem e expressão. Este sistema permite criar uma biblioteca de fagos em *E. coli* TG1 e expressar o scFv de forma solúvel em *E. coli* HB2151, sendo a purificação do scFv realizada por afinidade à cauda de E-tag, codificada na extremidade C-terminal do scFv.

O RPAS foi escolhido pelo fato de que era um sistema comercial disponível no início desse estudo que utilizava iniciadores aleatórios, não havendo necessidade de desenho de iniciadores específicos, além da grande quantidade de publicações de sucesso na literatura, esse sistema gerou scFvs para diversas finalidades, como diagnóstico, terapia, contraceptivos, marcadores de doenças auto-imune, marcadores tumorais e na formulação de vacinas contra vírus (Gao *et al.*, 1999; Norton *et al.*, 2001; Spats *et al.*, 2003; Bhaskaran *et al.*, 2005; Cardoso *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2000; He *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003). Essa tecnologia mostrou também a possibilidade da produção de anticorpos diméricos ou conjugados a enzimas, a partir da manipulação da

estrutura básica da sequência de nucleotídeos (Albrecht *et al.*, 2004; DeNardo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006).

Pelo fato dos hibridomas que originaram o anticorpo monoclonal anti-intimina terem sido submetidos a diversas etapas de diluição limitante, o anticorpo já apresentava alto grau de pureza e especificidade, não havendo a necessidade de gerar a biblioteca de fagos. O scFv foi então clonado diretamente em *E. coli* HB2151 para a expressão de proteína solúvel. Os resultados demonstraram que o *kit* não apresentou a eficiência esperada, pois não foi visualizada a expressão da proteína solúvel em *E. coli* HB2151. O sequenciamento do plasmídeo dos clones demonstrou que o scFv foi clonado de forma incorreta, em uma fase de leitura que apresentou códons de terminação prematuros, codificando um peptídeo de aproximadamente 1 kDa. Além disso, a fabricação e a comercialização do sistema de purificação RPAS foi descontinuada, impossibilitando a chance de se obter a proteína purificada.

Apesar de ser definido como um sistema prático e eficaz, diversos autores descreveram algumas restrições ao sistema RPAS. Tanaka *et al.* (1995) produziram cistatina de galinha (proteína inibidora de proteinases) de forma solúvel utilizando o vetor pCANTAB em *E. coli* HB2151, mas com rendimento baixo. Alvi *et al.* (2002) desenvolveram scFv contra VEE (vírus da encefalite equina venezuelana) em vetor pCANTAB, mas foi expresso com baixa afinidade devido a mutações no inserto. Cheng *et al.* (2005) produziram scFv solúvel contra sulfoglicolípido mamífero em pCANTAB, mas a afinidade e a capacidade de ligação foram bem menores do que as do anticorpo nativo.

Além do baixo rendimento, o sistema RPAS também apresenta outras limitações, como a forma de purificação exclusiva e de alto custo. Para contornar esses problemas alguns autores substituíram o pCANTAB por outros vetores de expressão. Yi *et al.* (1999) modificaram o vetor pRSET, adicionando sítios de restrição *Sfi* I e *Not* I para utilizar o scFv anti-CEA (antígeno embriocarcinogênico) do vetor pCANTAB, por apresentar um rendimento muito baixo. Em pRSET *Sfi* I *Not* I o rendimento foi maior (5 mg/litro de cultura) mas foi expresso em corpúsculos de inclusão. Guo *et al.* (2003) produziram scFv anti-AIF (isoferritina ácida) em pCANTAB. O inserto foi sequenciado a

partir do pCANTAB, amplificado com a utilização de iniciadores desenhados com base no sequenciamento e clonado em pET28a para produzir scFv. O vetor pCANTAB foi substituído por pET28a por apresentar um rendimento baixo e alto custo na purificação por E-tag. O sistema pET28a expressou o scFv em corpúsculos de inclusão, mas com rendimento de 60 mg por litro de cultura. O anticorpo se apresentou funcional e específico para AIF.

Kramer *et al.* (2002) retiraram o scFv do vetor pCANTAB e o transferiram para pASK85 e compararam os dois vetores. Concluíram que o pCANTAB tem diversas desvantagens, como a necessidade de reagentes caros (IPTG, anti-Etag) para a produção em larga escala. O promotor de pASK85 é induzido por tetraciclina anidra, mais barato que IPTG. O vetor pCANTAB também foi utilizado para uso de fagos em biblioteca, mas para expressão de LDTI (leech-derived tryptase inhibitor) como inibidor de serina proteinase para neutrófilo elastase e plasmina utilizou-se o vetor pVT102U/K em células leveduriformes para uma maior expressão protéica (Tanaka *et al.*, 1999 Campos *et al.*, 2004a).

Em uma segunda abordagem para a expressão de scFv o vetor pAE foi utilizado (Ramos *et al.*, 2004), este vetor une as características de pET3-His e pRSET. O vetor pET3-His tem a vantagem de conter 6 resíduos de histidina na porção N-terminal e múltiplos sítios de clonagem a apenas 9 aminoácidos a partir da metionina, mas a sua origem de replicação (pBR322) não possui alto número de cópias. Por outro lado, o vetor pRSET tem a vantagem de conter uma origem de replicação de alto número de cópias (pUC19), mas não contém múltiplos sítios de clonagem como no sistema pET. O vetor pAE foi construído com a base do vetor pRSET contendo a origem de replicação de alto número de cópias, com o sítio múltiplo de clonagem contendo 6 resíduos de histidina a partir do vetor pET3-His. Além disso, o vetor pAE tem um tamanho reduzido (2,8 kb) se comparado ao pET3-His (4,6 kb) e o pRSET (2,9 kb). Utilizando este vetor, Ramos *et al.* (2004) clonaram o fragmento C de toxina tetânica (Fc) e expressaram em *E. coli* BL21 (DE3). A fração Fc foi expressa de forma insolúvel, mas com um bom rendimento. Por essas vantagens, o vetor pAE foi escolhido no presente trabalho para a expressão de scFv anti-intimina.

A cadeia leve (CL) e a cadeia pesada (CP) da fração variável do anticorpo anti-intimina foram amplificadas utilizando os iniciadores específicos desenhados com base no sequenciamento do cDNA realizado. Aos iniciadores foram inseridos os sítios de restrição *Bam*HI e *Hind*III e regiões complementares a um fragmento de DNA, denominado *linker*. As cadeias foram ligadas em uma estratégia de amplificação em que foi utilizado o *linker* como *template* e iniciador. Em uma primeira etapa as cadeias foram amplificadas separadamente com seus respectivos iniciadores. Na segunda etapa a CL foi amplificada juntamente com o *linker* formando o complexo CL-linker. Na terceira etapa a CP foi amplificada com CL-linker, formando o scFv. Na última etapa o scFv foi amplificado utilizando os iniciadores CP-forward e CL-reverse com os respectivos sítios de restrição. Esta estratégia se mostrou eficiente, pois foi amplificado um fragmento do tamanho esperado. Além disso, o sequenciamento do scFv construído demonstrou a sequência esperada de nucleotídeos. O scFv com os sítios *Bam*HI e *Hind*III foi ligado ao vetor pAE e inserido em *E. coli* para a expressão protéica.

Para a expressão de proteína em *E. coli*, as linhagens usualmente utilizadas são as que apresentam deficiência em protease (B834, BL21, BLR, Origami B, Rosetta e Turner), as que têm o nível de expressão protéica ajustável (Origami B e Rosetta), as que aumentam a expressão de proteínas solúveis e formação de ponte dissulfeto (AD494, BL21, Origami, Origami B e Rosetta-gami) e as que apresentam suplementação de códons raros (Rosetta) (Manual pET, Novagen, EUA). Inicialmente foi utilizada a linhagem BL21 (DE3) de *E. coli*, a qual apresentou certa dificuldade de crescimento. Uma das maneiras de se conhecer a causa do crescimento lento é a realização de um teste de toxicidade da proteína, que consistiu no plaqueamento do transformante em condições indutoras, ou seja, na presença ou ausência de IPTG. Na placa que não continha o IPTG houve crescimento de colônias, o que não ocorreu na placa com o reagente. Este resultado demonstrou que a proteína expressa apresentava certa toxicidade para a bactéria hospedeira. A demora do crescimento bacteriano pode ser justificado pelo escape de expressão protéica nesta linhagem, isto é, a proteína foi expressa mesmo sem a adição do indutor.

Com o intuito de melhorar a eficiência da expressão protéica, outras linhagens de *E. coli* foram utilizadas, como as linhagens BL21 (DE3) pLys e C43 (DE3). Estas

linhagens impedem o escape de expressão e contribuem para uma super-expressão protéica, após a adição do IPTG. Através da análise de expressão na linhagem C43 (DE3) verificou-se a presença de uma proteína de massa molecular predita, além de uma outra de tamanho inferior. Isso pode ter ocorrido por ação de uma protease que poderia estar presente nesta linhagem. Outra hipótese seria a presença de códons raros nesta linhagem para a construção da proteína. A linhagem teria tRNA para esses códons, mas seria menos frequente, sendo produzida tanto proteína integral, quanto truncada. Os resultados demonstraram que a *E. coli* BL21 (DE3) pLys apresentou melhor expressão, não sendo observada nenhuma banda além da predita. Por esse motivo esta foi a linhagem escolhida para a expressão de scFv anti-intimina.

O scFv anti-intimina foi expresso de forma insolúvel. Portanto, foi necessário realizar um tratamento de solubilização. Com esse tratamento a proteína foi desnaturada, o que pode comprometer sua capacidade funcional. Esta desnaturação foi revertida pelo ensaio de *refolding*, possibilitando assim o retorno à estrutura conformacional original.

Três protocolos para *refolding* foram utilizados, dentre eles um ensaio de solubilização utilizando um tampão de Tris-HCl contendo 6 M de cloridrato de guanidina, seguida de diálise em concentrações decrescentes de guanidina (3 M, 2 M, 1 M, 0,5 M e 0 M) e subsequente purificação (Tsumoto *et al.*, 1998). Uma grande parte da proteína foi precipitada durante a diálise. Porém, a fração solubilizada foi recuperada e purificada, mas o rendimento foi relativamente baixo. Em outra tentativa, com a proteína solubilizada em tampão de Tris-HCl contendo 8 M de ureia, a proteína solubilizada foi gotejada lentamente em 2 L de tampão de Tris-HCl sem ureia, mas novamente houve precipitação protéica. Apesar disso a solução precipitada foi submetida à purificação, apresentando um alto grau de proteínas inespecíficas observadas em gel SDS/PAGE.

O método que se mostrou mais eficaz na recuperação da proteína insolúvel foi o protocolo em que se solubilizou a proteína em tampão Tris-HCl contendo 8 M de ureia, seguido de purificação, sendo o *refolding* realizado após essa, com diálises de concentrações decrescentes de ureia. A proteína expressa contém quatro resíduos de

cisteína, apresentando duas pontes dissulfeto, que foram quebradas com o tratamento de solubilização. Com o intuito de reconstituir essas pontes, foi utilizado glutationa oxidada como agente oxidante em uma das etapas do *refolding*. Uma pequena quantidade da proteína precipitou, no entanto, recuperou-se grande quantidade (cerca de 4 mg/mL) da fração solubilizada. Essa fração foi utilizada nos ensaios de funcionalidade.

O scFv anti-intimina foi expresso com seis resíduos de histidina na porção C-terminal, com a finalidade de purificação por afinidade metálica. Além da purificação, a cauda de histidina tem a função de marcador para detecção por um anticorpo específico. Para demonstrar a funcionalidade do scFv por ELISA, a intimina purificada (Int₃₈₈₋₆₆₇) é a melhor forma de detecção. Mas pelo simples fato da intimina purificada também conter essa cauda de histidina, a clara detecção do scFv é dificultada. O anticorpo anti-His pode também reagir com a intimina purificada, ocorrendo um falso positivo.

A estratégia utilizada foi o ensaio de ELISA de captura, utilizando a fração enriquecida em IgG de coelho ou o anticorpo monoclonal anti-intimina. Este protocolo consistiu na sensibilização da placa de poliestireno com scFv, seguido da incubação da intimina purificada e o anticorpo anti-intimina, sem a necessidade da utilização do anti-His. Resultados mostraram que o anticorpo policlonal não compete com o scFv pelo mesmo epítipo, como também que, o scFv anti-intimina é funcional. Com a utilização do anticorpo monoclonal neste ensaio, demonstrou-se que este anticorpo compete com o scFv pelo mesmo epítipo da intimina, demonstrando a grande fidelidade na clonagem do anticorpo recombinante.

Além disso, verificou-se a funcionalidade do scFv anti-intimina por imunofluorescência. Esse anticorpo reconheceu o isolado E2348/69, mas não *E. coli* K-12 após permeabilização da membrana externa, reforçando os dados de Koga *et al.* (2003) sobre a importância da permeabilização bacteriana para a observação de reatividade de anticorpos anti-intimina. Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que o anticorpo recombinante anti-intimina foi capaz de reconhecer a região conservada de intimina (Int₃₈₈₋₆₆₇) na forma purificada e a intimina α no isolado

de EPEC típica. Ensaios posteriores mostrarão a reatividade desse anticorpo com os diferentes tipos de intimina expressos por EPEC e EHEC. Essa questão é extremamente importante, uma vez que os dados de Kühne *et al.* (2004) mostraram que o scFv anti-intimina produzido a partir de células do baço de coelhos imunizados com a porção C-terminal de intimina de O157:H7 reconheceu apenas intimina γ . No entanto, vale a pena ressaltar que, se, o anticorpo recombinante apresentou maior reatividade com o isolado de EPEC típica por imunofluorescência do que o anticorpo monoclonal original, esses dados nos permitem inferir que esse anticorpo recombinante poderá tornar-se a ferramenta para o diagnóstico de EPEC e EHEC através da detecção de intimina.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- A fração enriquecida em IgG do soro de coelho anti-intimina apresentou 100% de especificidade e 97% de sensibilidade, sugerindo ser uma ferramenta apropriada para a detecção de isolados de EPEC e EHEC por *immunoblotting*;
- O anticorpo recombinante anti-intimina obtido a partir da clonagem e expressão do fragmento variável de cadeia única (scFv) foi capaz de reconhecer a região conservada de intimina (Int₃₈₈₋₆₆₇) na forma purificada e a intimina α no isolado de EPEC típica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE CM; TRABULSI LR; BLANCO J; BLANCO M; DAHBI G; BLANCO JE; MORA A; FRANZOLIN MR; TADDEI CR; MARTINEZ MB; PIAZZA RM ELIAS WP (2009) Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64: 357–365.
- ADU-BOBIE J, TRABULSI LR, CARNEIRO-SAMPAIO MMS, DOUGAN G, FRANKEL G (1998) Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin α and intimin β from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 66: 5643-5649.
- AFSET JE, BERGH K, BEVANGERS L (2003) High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 52: 1015–1019.
- AGBODAZE D (1999) Verotoxins (Shiga-like toxins) produced by *Escherichia coli*: a minireview of their classification, clinical presentations and management of a heterogeneous family of cytotoxins. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 22: 221.
- AGIN TS, WOLF MK (1997) Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine. *Infect. Immun.* 65: 320-326.
- AIDAR-UGRINOVICH L, BLANCO J, BLANCO M, BLANCO JE, LEOMIL L, DAHBI G, MORA A, ONUMA DL, SILVEIRA WD, PESTANA DE CASTRO AF (2007) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 297-306.
- ALBRECHT H, BURKE PA, NATARAJAN A, XIONG CY, KALICINSKY M, DENARDO GL, DENARDO SJ (2004) Production of soluble ScFvs with C-terminal-free thiol for site-specific conjugation or stable dimeric ScFvs on demand. *Bioconjug. Chem.* 15: 16-26.

- AL-GALLAS N, BAHRI O, BOURATBEEN A, BEN HAASEN A, BEN AISSA R (2007) Etiology of acute diarrhea in children and adults in Tunis, Tunisia, with emphasis on diarrheagenic *Escherichia coli*: prevalence, phenotyping, and molecular epidemiology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77: 571-582.
- ALVI AZ, FULTON RE, CHAU D, SURESH MR, NAGATA LP (2002) Development of a second generation monoclonal single chain variable fragment antibody against Venezuelan equine encephalitis virus: expression and functional analysis. *Hybrid Hybridomics.* 21: 169-178.
- ANVIKAR AR, DOLLA C, DUTTA S, RAO VG, GADGE VS, SHUKLA GP, RAO S, KARFORMA C (2008) Role of *Escherichia coli* in acute diarrhoea in tribal preschool children of central India. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* 22: 40-46.
- ARANDA KR, FABBRICOTTI SH, FAGUNDES-NETO U, SCALETISKY IC (2007) Single multiplex assay to identify simultaneously enteropathogenic, enteroaggregative, enterotoxigenic, enteroinvasive and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in Brazilian children. *FEMS Microbiol. Lett.* 267: 145-150.
- ARANDA KR, FAGUNDES-NETO U, SCALETISKY IC (2004) Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 42: 5849-5853.
- BARBAS CF, KANG AS, LERNER RA, BENKOVIC SJ (1991) Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7978-7982.
- BATCHELOR M, KNUTTON S, CAPRIOLI A, HUTER V, ZANIAL M, DOUGAN G, FRANKEL G (1999) Development of a universal intimin antiserum and PCR primers. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3822-3827.
- BEGUM D, STROCKBINE NA, SOWERS EG, JACKSON MP (1993) Evaluation of a technique for identification of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled probes. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3153-3156.

- BEUTIN L (2006) Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.* 53: 299-305.
- BEUTIN L, KRAUSE G, ZIMMERMANN S, KAULFUSS S, GLEIER K (2004) Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1099-1108.
- BHASKARAN S, JAY CM, BERGHMAN LR, WAGNER GG, WAGHELA SD (2005) A single-chain fragment variable recombinant antibody against F5 fimbria of enterotoxigenic *Escherichia coli* inhibits agglutination of horse red blood cells induced by F5 protein. *Vet. Res. Commun.* 29: 463-476.
- BLANCO JE, BLANCO M, ALONSO MP, MORA A, DAHBI G, COIRA MA, BLANCO J (2004) Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J. Clin. Microbiol.* 42: 311-319.
- BLANCO M, BLANCO JE, DAHBI G, ALONSO MP, MORA A, COIRA MA, MADRID C, JUÁREZ A, BERNÁRDEZ MI, GONZÁLEZ EA, BLANCO J (2006) Identification of two new intimin types in atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int. Microbiol.* 9: 103-110.
- BRADFORD MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dyebinding. *Anal. Biochem. Baltimore.* 72: 248-254.
- BRAY J (1945) Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. Coli neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. *J. Pathol. Bacteriol.* 57: 239-247.
- BUERIS V, SIRCILI MP, TADDEI CR, SANTOS MF, FRANZOLIN MR, MARTINEZ MB, FERRER SR, BARRETO ML, TRABULSI LR (2007) Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador in Salvador – Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 6: 839-844.

- CAMPOS IT, SILVA MM, AZZOLINI SS, SOUZA AF, SAMPAIO CA, FRITZ H, TANAKA AS (2004) Evaluation of phage display system and leech-derived trypsin inhibitor as a tool for understanding the serine proteinase specificities. *Arch. Biochem. Biophys.* 425: 87-94. A
- CAMPOS LC, FRANZOLIN MR, TRABULSI LR (2004) Diarrheagenic *Escherichia coli* among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups – A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99: 545-552. B
- CAPRIOLI A, MORABITO S, BRUGÈRE H, OSWALD E (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 36: 289-311.
- CARDOSO DF, NATO F, ENGLAND P, FERREIRA ML, VAUGHAN TJ, MOTA I, MAZIE JC, CHOUMET V, LAFAYE P (2000) Neutralizing human anti crotoxin scFv isolated from a nonimmunized phage library. *Scand. J. Immunol.* 51: 337-344.
- CASEY JL, COLEY AM, TILLEY LM, FOLEY M (2000) Green fluorescent antibodies: novel in vitro tools. *Protein Eng.* 13: 445-452.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (CVE) Manual de doenças transmitidas por alimentos (2000) Informe-net DTA, Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Ecolinet.htm>. Acesso em: 02 set. 2007.
- CERGOLE-NOVELLA MC, NISHIMURA LS, IRINO K, VAZ TM, DE CASTRO AF, LEOMIL L, GUTH BE (2006) Stx genotypes and antimicrobial resistance profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human infections, cattle and foods in Brazil. *FEMS Microbiol. Lett.* 259: 234–239.
- CERQUEIRA AMF, GUTH BE, JOAQUIM RM, ANDRADE JR (1999) High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle at Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet. Microbiol.* 70: 111-121.
- CHEN HD, FRANKEL G (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 83-98.

- CHENG X, ZHANG Y, KOTANI N, WATANABE T, LEE S, WANG X, KAWASHIMA I, TAI T, TANIGUCHI N, HONKE K (2005) Production of a recombinant single-chain variable-fragment (scFv) antibody against sulfoglycolipid. *J. Biochem.* 137: 415-421.
- CHINA B, JACQUEMIN E, DEVRIN AC, PIRSON V, MAINIL J (1999) Heterogeneity of the eae genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. *Res. Microbiol.* 150: 323-332.
- CHOI GH, LEE DH, MIN WK, CHO YJ, KWEON DH, SON DH, PARK K, SEO JH (2004) Cloning, expression, and characterization of single-chain variable fragment antibody against mycotoxin deoxynivalenol in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 35: 84-92.
- CHUNG WY, SACK M, CARTER R, SPIEGEL H, FISCHER R, HIRST TR, WILLIAMS NA, JAMES RF (2008) Phage-display derived single-chain fragment variable (scFv) antibodies recognizing conformational epitopes of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B-subunit. *J. Immunol. Methods.* 339: 115-123.
- CLACKSON T, HOOGENBOOM HR, GRIFFITHS AD, WINTER G (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature.* 352: 624-628.
- CLARK SC, HAIGH RD, FREESTONE PPE, WILLIAMS PH (2003) Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 365-378.
- COCOLIN L, MANZANO M, CANTONI C, COMI G (2000) A multiplex-PCR method to detect enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in artificially contaminated foods. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 203: 159-164.
- CROWTHER J, R (2001) The ELISA guidebook: In: Methods in molecular biology. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 149: 421.
- DeNARDO DG, XIONG CY, SHI XB, DENARDO GL, DENARDO SJ (2001) Anti-HLA-DR/anti-DOTA diabody construction in a modular gene design platform: bispecific antibodies for pretargeted radioimmunotherapy. *Cancer Biother. Radiopharm.* 16: 525-535.

- ELLIOTT SJ, NATARO JP (1995) Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Vet. Med. Microbiol.* 6: 196-206.
- ENGVALL E, PERLMANN P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin. *Immunochem.* 8: 871.
- ESTRADA-GARCIA T, LOPEZ-SAUCEDO C, THOMPSON-BONILLA R, ABONCE M, LOPEZ-HERNANDEZ D, SANTOS JI, ROSADO JL, DUPONT HL, LONG KZ (2009) Association of diarrheagenic *Escherichia coli* Pathotypes with infection and diarrhea among Mexican children and association of atypical Enteropathogenic *E. coli* with acute diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 47: 93-98.
- FARAH SM, DE SOUZA EM, PEDROSA FO, IRINO K, DA SILVA LR, RIGO LU, STEFFENS MB, PIGATTO CP, FADEL-PICHETH CM (2007) Phenotypic and genotypic traits of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from beef cattle from Parana State, southern Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 607-612.
- FENG P, MONDAY SR (2000) Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Mol. Cell. Probes.* 14: 333-337.
- FILPULA D (2007) Antibody engineering and modification technologies. *Biomol. Eng.* 24: 201-215
- FRANKE J, FRANKE S, SCHMIDT H, SCHWARZKOPF A, WIELER LH, BALJER G, BEUTIN L, KARCH H (1994) Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2460-2463.
- FRANKEL G, CANDY DC, EVEREST P, DOUGAN G (1994) Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect. Immun.* 62: 1835-1842.
- FRANZOLIN MR, ALVES RCB, KELLER R, GOMES TAT, BEUTIN L, BARRETO ML, MILROY C, STRINA A, RIBEIRO H, TRABULSI LR (2005) Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100: 359-363.

- FRIGUET B, CHAFFOTTE AF, DJAVADI-OHANIAN L, GOLDBERG ME (1985) Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods.* 2: 305-319
- GAO X, HUANG Y, ZHU S (1999) Construction of murine phage antibody library and selection of ricin-specific single-chain antibodies. *IUBMB Life.* 48: 513-517.
- GARMENDIA J, FRANKEL G, CREPIN VF (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.* 73: 2573–2585.
- GIRÓN JA, HO ASY, SCHOOLNIK GK (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 254: 710-713.
- GOLCHIN M, AITKEN R (2008) Isolation by phage display of recombinant antibodies able to block adherence of *Escherichia coli* mediated by the K99 colonisation factor. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121: 321-331.
- GOMES TAT, RASSI V, MACDONALD KL, RAMOS SR, TRABULSI LR, VIEIRA MA, GUTH BEC, CANDEIAS JA, IVEY C, TOLEDO MR (1991) Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. *J. Infect. Dis.* 164: 331-337.
- GONÇALVES AG, CAMPOS LC, GOMES TA, RODRIGUES J, SPERANDIO V, WHITTAM TS, TRABULSI LR (1997) Virulence properties and clonal structures of strains of *Escherichia coli* O119 serotypes. *Infect. Immun.* 65: 2034–2040.
- GRIEP RA, VAN TWISK C, KERSCHBAUMER RJ, HARPER K, TORRANCE L, HIMMLER G, VAN DER WOLF JM, SCHOTS A (1999) pSKAP/S: An expression vector for the production of single-chain Fv alkaline phosphatase fusion proteins. *Protein Expr. Purif.* 16: 63-69.
- GRIFFITHS AD, MALMQVIST M, MARKS JD, BYE JM, EMBLETON MJ, MCCAFFERTY J, BAIER M, HOLLIGER KP, GORICK BD, JONES NC, HOOGENBOOM HR, WITER G (1993) Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J.* 12: 725-734.

- GUO JQ, YOU SY, LI L, ZHANG YZ, HUANG JN, ZHANG CY (2003) Construction and high-level expression of a single-chain Fv antibody fragment specific for acidic isoform of ferritin in *Escherichia coli*. *J. Biotechnol.* 102: 177-189.
- GUTH BEC, SOUZA RL, VAZ TIM, IRINO K (2002) First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from a patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 535-536.
- GYLES CL (2007) Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 85: 45-62.
- HAJRA TK, BAG PK, DAS SC, MUKHERJEE S, KHAN A, RAMAMURTHY T (2007) Development of a simple latex agglutination assay for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) by using polyclonal antibody against STEC. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 600-604.
- HAMILTON S, ODILI J, PACIFICO MD, WILSON GD, KUPSCH JM (2003) Effect of imidazole on the solubility of a his-tagged antibody fragment. *Hybrid Hybridomics.* 22: 347-355.
- HE J, ZHOU G, LIU KD, QIN XY (2002) Construction and preliminary screening of a human phage single-chain antibody library associated with gastric cancer. *J. Surg. Res.* 102: 150-155.
- HEDBERG C, SAVARINO S, BESSER J, PAULUS C, THELEN V, MYERS L, CAMERON DN, BARRET TJ, KAPER JB, OSTERHOLM MT (1997) An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 176: 1625-1628.
- HERNANDES RT, ELIAS WP, VIEIRA MA, GOMES TA (2009) An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 297: 137-149.
- HIEN BT, SCHEUTZ F, CAM PD, SERICHANTALERGS O, HUONG TT, THU TM, DALSGAARD A (2008) Diarrheogenic *Escherichia coli* and Shigella strains isolated from children in a hospital case-control study in Hanoi, Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 46: 996-1004.

- HOLLIGER P, HUDSON PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23: 1126-1136
- IRINO K, KATO MA, VAZ TM, RAMOS II, SOUZA MA, CRUZ AS, GOMES TA, VIEIRA MA, GUTH BE (2005) Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. *Vet. Microbiol.* 5: 29-36.
- IRINO K, VAZ TM, KATO MA, NAVES ZV, LARA RR, MARCO ME, ROCHA MM, MOREIRA TP, GOMES TA, GUTH BE (2002) O157:H7 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 446-447.
- JAFARI F, GARCIA-GIL LJ, SALMANZADEH-AHRABI S, SHOKRZADEH L, ASLANI MM, POURHOSEINGHOLI MA, DERAKHSHAN F, ZALI MR (2009) Diagnosis and prevalence of enteropathogenic bacteria in children less than 5 years of age with acute diarrhea in Tehran children's hospitals. *J. Infect.* 58: 21-27.
- JARVIS KG, GIRON JA, JERSE AE, MCDANIEL TK, DONNENBERG MS, KAPER JB (1995) Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7996–8000.
- JERSE AE, KAPER JB (1991) 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.
- JERSE AE, YU J, TALL BD, KAPER JB (1990) 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.
- JOHNSON KE, THORPE CM, SEARS CL (2006) The emerging clinical importance of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.* 43: 1587-1595.
- KAPER JB (1996) Defining enteropathogenic *Escherichia coli*. *Rev. Microbiol.* 27: 130-133.

- KAPER JB, NATARO JP, MOBLEY HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews*. 2: 123–140.
- KAPER JB, O'BRIEN AD (1998) *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains. Washington: ASM Press. 465.
- KARCH H, MEYER T (1989) Evaluation of oligonucleotide probes for identification of shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1180-1186.
- KENNY B, WARAWA J (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. *Infect. Immun.* 69: 1444-1453.
- KIMATA K, SHIMA T, SHIMIZU M, TANAKA D, ISOBE J, GYOBU Y, WATAHIKI M, NAGAI Y (2005) Rapid categorization of pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Microbiol. Immunol.* 49: 485-492.
- KNUTTON S, SHAW RK, ANANTHA RP, DONNENBERG MS, ZORGANI AA (1999) The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol. Microbiol.* 33: 499-509.
- KOGA PCM (2003) Identificação fenotípica de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) utilizando anticorpos anti-intimina. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- KOGA PCM, MENEZES CA, LIMA FA, NARA JM, MAGALHÃES CA, CIANCIARULLO AM, FERREIRA-JÚNIOR JMC, TRABULSI LR, MENDES-LEDESMA MRB, PIAZZA RMF (2003) Polyclonal anti-intimin antibody: immunological characterization and its use in EPEC diagnosis, *Braz. J. Microbiol.* 34: 5-7.
- KRAMER K, FIEDLER M, SKERRA A, HOCK B (2002) A generic strategy for subcloning antibody variable regions from the scFv phage display vector pCANTAB 5 E into pASK85 permits the economical production of F(ab) fragments and leads to improved recombinant immunoglobulin stability. *Biosens. Bioelectron.* 17: 305-313.

- KÜHNE SA, HAWES WS, LA RAGIONE RM, WOODWARD MJ, WHITELAM GC, GOUGH KC (2004) Isolation of recombinant antibodies against EspA and intimin of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2966-2976.
- LAMBERSKI JA, THOMPSON NE, BURGESS RR (2006) Expression and purification of a single-chain variable fragment antibody derived from a polyol-responsive monoclonal antibody. *Protein. Expr. Purif.* 47:82-92.
- LAEMMLI UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- LEOMIL L, AIDAR-UGRINOVICH L, GUTH BE, IRINO K, VETTORATO MP, ONUMA DL, DE CASTRO AF (2003) Frequency of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolates among diarrheic and non-diarrheic calves in Brazil. *Vet. Microbiol.* 97: 103-109.
- LEUNG DT, YAM NW, CHUI YL, WONG KC, LIM PL (2000) A human and a mouse anti-idiotypic antibody specific for human T14(+) anti-DNA antibodies reconstructed by phage display. *Gene.* 255: 373-380.
- LEVINE MM (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155: 377-390.
- LEVINE MM, NATARO JP, KARCH H, BALDINI MM, KAPER JB, BLACK RE, CLEMENTS ML, O'BRIEN AD (1985) The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J. Infect. Dis.* 152: 550-559.
- MA Y, MAO X, LI J, LI H, FENG Y, CHEN H, LUO P, GU J, YU S, ZENG H, GUO G, YANG K, ZOU Q (2008) Engineering an anti-Stx2 antibody to control severe infections of EHEC O157:H7. *Immunol. Lett.* 121: 110-115.
- MAIRENA EC, NEVES BC, TRABULSI LR, ELIAS WP (2004) Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Curr. Microbiol.* 48:412-418.

- MARKS JD, HOOGENBOOM HR, BONNERT TP, MCCAFFERTY J, GRIFFITHS AD, WINTER G (1991) By-passing immunization. Human antibodies from v-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597.
- MARKS JD, HOOGENBOOM HR, MCCAFFERTY J, GRIFFITHS AD, WINTER G (1992) Molecular evolution of proteins on filamentous phage. Mimicking the strategy of the immune system. *J. Biol. Chem.* 267: 16007-16010.
- MARTIN CD, ROJAS G, MITCHELL JN, VINCENT KJ, WU J, MCCAFFERTY J, SCHOFIELD DJ (2006) A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies. *BMC Biotechnol.* 6: 46-70.
- MCCAFFERTY J, GRIFFITHS AD, WINTER G, CHISWELL DJ (1990) Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* 348: 552-554.
- MCDANIEL TK, JARVIS KG, DONNENBERG MS, KAPER JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 1664–1668.
- MENDES-LEDESMA MR, ROCHA LB, BUERIS V, KRAUSE G, BEUTIN L, FRANZOLIN MR, TRABULSI LR, ELIAS WP, PIAZZA RM (2008) Production and characterization of rabbit polyclonal sera against Shiga toxins Stx1 and Stx2 for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.* 52: 484-491.
- MENEZES, CA (2002) Anticorpos monoclonais para detecção de amostras de *Escherichia coli* produtoras de ST-I e LT-I. Dissertação (Mestrado) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- MENEZES CA, GONÇALVES DS, AMIANTI J, FERNANDES I, TADDEI CR, KOGA PCM, TRABULSI LR, MARTINEZ MB, PIAZZA RMF (2003) Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. *Braz. J. Microbiol.* 34: 11-13.

- MENEZES CA, IMAMURA SY, TRABULSI LR, FERNANDES-FILHO A, MARTINEZ MB, GUTH BE, GIRÃO DM, PIAZZA RM (2006) Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101: 875-880.
- MENEZES MA, ROCHA LB, KOGA PC, FERNANDES I, NARA JM, MAGALHÃES CA, ABE CM, AYALA CO, BURGOS YK, ELIAS WP, CASTRO AF, PIAZZA RM (2009) Identification of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin. *J. Appl. Microbiol.* doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04484.
- MOON HW, WHIPP SC, ARGENZIO RA, LEVINE MM, GIANNELLA RA (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 41: 1340-1351.
- MOREIRA CN, PEREIRA MA, BROD CS, RODRIGUES DP, CARVALHAL JB, ALEIXO JA (2003) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Vet. Microbiol.* 93: 179-183.
- MORENO ACR, FERNANDES-FILHO A, GOMES TAT, RAMOS STS, MONTEMOR LPG, TAVARES VC, SANTOS-FILHO L, IRINO K, MARTINEZ MB (2008) Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.017.
- MOYO SJ, MASELLE SY, MATEE MI, LANGELAND N, MYLVAGANAM H (2007) Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from infants and children in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Infect. Dis.* 7: 92.
- MÜLLER D, HAGEDORN P, BRAST S, HEUSIPP G, BIELASZEWSKA M, FRIEDRICH AW, KARCH H, SCHMIDT MA (2006) Rapid identification and differentiation of clinical isolates of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), atypical EPEC, and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by a one-step multiplex PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 44: 2626-2629.
- NATARO J, KAPER JB (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol.* 11: 142–210.

- NATARO JP, KAPER JB, ROBINS-BROWNE R, PRADO V, VIAL P, LEVINE MM (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 6: 829-831.
- NGUYEN RN, TAYLOR LS, TAUSCHEK M, ROBINS-BROWNE RM (2006) Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 597-603.
- NORTON EJ, DIEKMAN AB, WESTBROOK VA, FLICKINGER CJ, HERR JC (2001) RASA, a recombinant single-chain variable fragment (scFv) antibody directed against the human sperm surface: implications for novel contraceptives. *Hum. Reprod.* 16: 1854-1860.
- O' BRIEN AD, MARQUES LR, KERRY CF, NEWLAND JW, HOLMES RK (1989) Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain 933. *Microb. Pathog.* 6: 381-390.
- O'BRIEN AD, HOLMES RK (1987) Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51: 206-220.
- OCHOA TJ, BARLETTA F, CONTRERAS C, MERCADO E (2008) New insights into the epidemiology of *Escherichia coli* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102: 852-856.
- OCHOA TJ, RUIZ J, MOLINA M, DEL VALLE LJ, VARGAS M, GIL AI, ECKER L, BARLETTA F, HALL E, CLEARY TG, LANATA CF (2009) High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81: 296-301.
- ORLANDI PP, MAGALHÃES GF, MATOS NB, SILVA T, PENATTI M, NOGUEIRA PA, SILVA LH (2006) Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil) *Braz. J. Med. Biol. Res.* 4: 507-517.
- OSEK J (2003) Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *J. Appl. Microbiol.* 95: 1217-1225.

- OSWALD E, SCHMIDT H, MORABITO S, KARCH H, MARCHES O, CAPRIOLI A (2000) Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* 68: 64-71.
- PASS MA, ODEDRA R, BATT RM (2000) Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2001-2004.
- PATON JC, PATON AW (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 450-479.
- PERSSON S, OLSEN KE, SCHEUTZ F, KROGFELT KA, GERNER-SMIDT P (2007) A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 13: 516-524.
- QADRI F, SVENNERHOLM AM, FARUQUE AS, SACK RB (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.* 18: 465-483.
- RAMACHANDRAN V, BRETT K, HORNITZKY MA, DOWTON M, BETTELHEIM KA, WALKER MJ, DJORDJEVIC SP (2003) Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5022-5032.
- RAMOS CR, ABREU PA, NASCIMENTO AL, HO PL (2004) A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 1103-1109.
- RAPPELLI P, MADDAU G, MANNU F, COLOMBO MM, FIORI PL, CAPPUCINELLI P (2001) Development of a set of multiplex PCR assays for the simultaneous identification of enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohemorrhagic and enteroinvasive *Escherichia coli*. *New Microbiol.* 24: 77-83.
- REID SD, BETTING DJ, WHITTAM TS (1999) Molecular detection and identification of intimin alleles in pathogenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2719-2722.

- RICH C, ALFIDJA A, SIROT J, JOLY B, FORESTIER C (2001) Identification of human enterovirulent *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J. Clin. Lab. Anal.* 15: 100-103.
- RILEY LW, REMIS RS, HELGERSON SD, MCGEE HB, WELLS JG, DAVIS BR, HEBERT RJ, OLCOTT ES, JOHNSON LM, HARGRETT NT, BLAKE PA, COHEN ML (1983) Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681-685.
- ROBINS-BROWNE RM, BORDUN AM, TAUSCHEK M, BENNETT-WOOD VR, RUSSEL J, OPPEDISANO F, LISTER NA, BETTELHEIM KA, FAIRLEY CK, SINCLAIR MI, HELLARD ME (2004) *Escherichia coli* and Community-Acquired Gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 10: 1797-1805.
- ROCHA LB (2005) Detecção de intimina em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) Centro Universitário Fundação Santo André, Santo André, SP, 2005.
- ROSA AC, MARIANO AT, PEREIRA AM, TIBANA A, GOMES TAT, ANDRADE JR (1998) Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Microbiol.* 47:781-790.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SAPATS SI, HEINE HG, TRINIDAD L, GOULD GJ, FOORD AJ, DOOLAN SG, PROWSE S, IGNJATOVIC J (2003) Generation of chicken single chain antibody variable fragments (scFv) that differentiate and neutralize infectious bursal disease virus (IBDV). *Arch. Virol.* 148: 497-515.
- SCALETSKY IC, FABBRICOTTI SH, SILVA SO, MORAIS MB, FAGUNDES-NETO U (2002) HEp-2-adherent *Escherichia coli* strains associated with acute infantile diarrhea, São Paulo, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 855-858.

- SCALETSKY ICA, PEDROSO MZ, OLIVA CAG, CARVALHO RLB, MORAIS MB, FAGUNDES-NETO U (1999) A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 67: 3410-3415.
- SCHEUTZ F, BEUTIN L, PIERARD D, SMITH H. Nomenclature of verotoxins. In: DUFFY G, GARVEY P, MCDOWELL DA *Verocytotoxigenic E. coli*. Trumbull: Food and Nutrition Press, 2001. 447-452.
- SCHMIDT H, GEITZ C, TARR PI, FROSCH M, KARCH H (1999) Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. *J. Infect. Dis.* 179: 115-123.
- SCOTLAND SM, SMITH HR, CHEASTY T, SAID B, WILLSHAW GA, STOKES N, ROWE B (1996) Use of gene probes and adhesion tests to characterize *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. *J. Med. Microbiol.* 44:438-443.
- SEARS CL, KAPER JB (1996) Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* 60: 167-215.
- SHAO C, ZHANG J (2008) The expression and characterization of a bifunctional protein in *E. coli* for autologous erythrocyte agglutination test. *Cell. Mol. Immunol.* 5: 299-306.
- SKERRA A, PLÜCKTHUN A (1991) Secretion and in vivo folding of the Fab fragment of the antibody McPC603 in *Escherichia coli*: influence of disulphides and cis-prolines. *Protein. Eng.* 4: 971-979.
- SMITH H, SCOTLAND S, CHEASTY T, WILLSHAW G, ROWE B (1996) Enteropathogenic *Escherichia coli* infections in the United Kingdom. *Rev. Microbiol.* 27: 45-49.
- SPANIO LC, SADOVSKY AD, SEGUI PN, SAICK KW, KITAGAWA SM, PEREIRA FE, FAGUNDES-NETO U, SCALETSKY IC (2008) Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 57: 359-363.

- STUDIER FW (1973) Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J. Mol. Biol.* 79: 237-248.
- SVENNERHOLM AM, WIKSTRÖM M, LINDBALD M, HOLMGREN J (1986) Monoclonal antibodies against *Escherichia coli* heat-stabile toxin (STa) and their use in a diagnostic ST ganglioside GM1-Enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 24: 585-590.
- TANAKA AS, SAMPAIO CA, FRITZ H, AUERSWALD EA (1995) Functional display and expression of chicken cystatin using a phagemid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214: 389-395.
- TANAKA AS, SILVA MM, TORQUATO RJ, NOGUTI MA, SAMPAIO CA, FRITZ H, AUERSWALD EA (1999) Functional phage display of leech-derived tryptase inhibitor (LDTI): construction of a library and selection of thrombin inhibitors. *FEBS Lett.* 458: 11-16.
- TIMM CD, IRINO K, GOMES TA, VIEIRA MM, GUTH BE, VAZ TM, MOREIRA CN, ALEIXO JA (2007) Virulence markers and serotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, isolated from cattle in Rio Grande do Sul, Brazil. *Let. Appl. Microbiol.* 44: 419-425.
- TOMA C, LU Y, HIGA N, NAKASONE N, CHINEN I, BASCHKIER A, RIVAS M, IWANAGA M (2003) Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2669-2671.
- TOWBIM H, STAEHELIN T, GORDON J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 4350-4354.
- TRABUSI LR, KELLER R, GOMES TAT (2002) Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 508-513.

- TSUMOTO K, SHINOKI K, KONDO H, UCHIKAWA M, JUJI T, KUMAGAI I (1998) Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent--application to a human single-chain Fv fragment. *J. Immunol. Methods.* 219: 119-129.
- VALLANCE BA, FINLAY BB (2000) Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 8799-8806.
- VANDEKERCHOVE DG, KERR PG, CALLEBAUT AP, BALL HJ, STAKENBORG T, MARIËN J, PEETERS JE (2002) Development of a capture ELISA for the detection of antibodies to enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in rabbit flocks using intimin-specific monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 88: 351-366.
- VAZ TM, IRINO K, KATO MA, DIAS AM, GOMES TA, MEDEIROS MI, ROCHA MM, GUTH BE (2004) Virulence properties and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Sao Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. *J. Clin. Microbiol.* 42: 903-905.
- VILCHEZ S, REYES D, PANIAGUA M, BUCARDO F, MÖLLBY R, WEINTRAUB A (2009) Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. *J. Med. Microbiol.* 58: 630-637.
- VILHENA-COSTA AB, PIAZZA RM, NARA JM, TRABULSI LR, MARTINEZ MB (2006) Slot blot immunoassay as a tool for plasmid-encoded toxin detection in enteroaggregative *Escherichia coli* culture supernatants. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 55: 101-106.
- VILJANEN M, PELTOLA T, JUNNILA S, OLKKONEN L, JARVINEN H, KUISTILA M, HUOVINEN P (1990) Outbreak of diarrhoea due *Escherichia coli* O11:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. *The Lancet.* 336: 381-384.

- WANG SH, ZHANG JB, ZHANG ZP, ZHOU YF, YANG RF, CHEN J, GUO YC, YOU F, ZHANG XE (2006) Construction of single chain variable fragment (ScFv) and BiscFv-alkaline phosphatase fusion protein for detection of *Bacillus anthracis*. *Anal. Chem.* 78: 997-1004.
- WARBURG O. CHRISTIAN W (1942) Isolierung und kristallisation des garungsferments enolase. *Biochem. Z.* 310: 384-421.
- WELINDER-OLSSON C, BADENFORS M, CHEASTY T, KJELLIN E, KAIJER B (2002) Genetic profiling of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains in relation to clonality and clinical signs of infection. *J. Clin. Microbiol.* 40: 659-964.
- YE T, LIN Z, LEI H (2008) High-level expression and characterization of an anti-VEGF165 single-chain variable fragment (scFv) by small ubiquitin-related modifier fusion in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 311-317.
- YI K, CHUNG J, KIM H, KIM I, JUNG H, KIM J, CHOI I, SUH P, CHUNG H (1999) Expression and characterization of anti-NCA-95 scFv (CEA 79 scFv) in a prokaryotic expression vector modified to contain a *Sfi* I and *Not* I site. *Hybridoma.* 18: 243-249.
- ZHANG XX, DENG Q, ZHANG SY, LIU J, CAI Q, LU ZM, WANG Y (2003) Broadly cross-reactive mimotope of hypervariable region 1 of hepatitis C virus derived from DNA shuffling and screened by phage display library. *J. Med. Virol.* 71: 511-517.

7 ANEXOS

TRABALHOS EM COLABORAÇÃO

Publicações:

NAKANO V, PIAZZA RMF, CIANCIARULLO AM, BUERIS V, SANTOS MF, **MENEZES MA**, MENDES-LEDESMA MRB, SZULCZEWSKI V, ELIAS WP, PUMBWE L, WEXLER H, AVILA-CAMPOS MJ (2008) Adherence and invasion of Bacteroidales isolated from the human intestinal tract. *Clin Microbiol Infect*, 14: 955–963

ROCHA SPD, ELIAS WP, CIANCIARULLO AM, **MENEZES MA**, NARA JM, PIAZZA RMF, SILVA MRL, MOREIRA CG, PELAYO JS (2007) Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51:319–326

Trabalho aceito:

NARA JM, CIANCIARULLO AM, CULLER HF, BUERIS V, HORTON DSPQ, **MENEZES MA**, FRANZOLIN MR, ELIAS WP, PIAZZA RMF (2009) Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. *J Appl Microbiol* (aceito)

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas**

Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA/FCF nº 60/2008

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Expressão e caracterização da fração variável (FV) dos hibridomas obtidos contra intimina e BFP para a sua utilização na detecção de ‘Escherichia coli’ enteropatogênica” (Protocolo CEEA nº199), de responsabilidade do pesquisador Márcio Anunciação Menezes sob a orientação da Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 13/10/2008.

São Paulo, 10 de novembro de 2008.

*Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/USP*

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 5508627/1 - Márcio Anunciação Menezes

Email: menezes@usp.br

Data de Nascimento: 12/09/1979

Cédula de Identidade: RG - 6.220.650-0 - PR

Local de Nascimento: Estado do Paraná

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Farmacêutico - Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Paraná - Brasil - 2001

Curso: Doutorado Direto

Programa: Farmácia (Análises Clínicas)

Área: Análises Clínicas

Data de Matrícula: 05/07/2005

Início da Contagem de Prazo: 05/07/2005

Data Limite: 02/11/2009

Orientador: Prof(a). Dr(a). Marina Baquerizo Martinez - 05/07/2005 a 16/08/2005 E.Mail: mbmartin@usp.br

Orientador: Prof(a). Dr(a). Roxane Maria Fontes Piazza - 17/08/2005 até o presente. E.Mail: roxane@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 05/07/2005

Prorrogação: 120 dias
 Período de 05/07/2009 a 02/11/2009

Prazo Máximo para Aprovação no Exame de 02/05/2009 (verifique em sua CPG se ela possui um prazo anterior)

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/12/2008

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Histórico de Ocorrências:

Ingressou no Doutorado Direto em 05/07/2005

Prorrogação em 09/06/2009

Situação Atual: Prorrogação em 09/06/2009

Impresso em: 26/10/09 21:56:59

Janus

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 5508627/1 - Márcio Anuniação Menezes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMM5798-1/2	Características Fenotípicas e Moleculares de Bacilos Gram-negativos	01/08/2005	04/09/2005	150	10	100.0	A	N	Concluída
FBC5793-7/7	Seminários em Análises Clínicas	03/08/2005	30/11/2005	30	2	87.0	A	N	Concluída
BMM5808-2/1	Imunologia para Estudantes de Microbiologia:	03/10/2005	02/12/2005	120	8	100.0	A	N	Concluída

	Uma Visão Básica sobre os Principais Mecanismos Envolvidos no Controle das Doenças Microbianas Infecção Hospitalar: Recursos Laboratoriais								
FBC5707- 4/3	Tradicional e Avançados na Investigação, Epidemiologia, Profilaxia e Controle Mecanismos de	03/10/2005	24/10/2005	75	0	0.0	-	N	Matrícula cancelada
BMM5789- 3/4	Ação de Agentes Antimicrobianos Trabalhos	08/05/2006	07/06/2006	60	4	100.0	A	N	Concluída
FBC5748- 1/3	Científicos: da Elaboração à Publicação	01/03/2007	10/05/2007	60	4	100.0	A	N	Concluída

Disciplinas:	25	25	28
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	28

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Situação Atual: Prorrogação em 09/06/2009