

Produção e Aplicação de Novos Anticorpos Monoclonais na Padronização de Técnicas Imunológicas para a Detecção das Bactérias *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio cholerae* O1 e Toxinas Stx1, Stx2 em Alimentos.

Production and Application of New Monoclonal Antibodies in the Padronization of Immunological Methods for the Detection of the Bacteria *Escherichia coli* O157:H7 *Vibrio cholerae* O1 and Stx1, Stx2 toxins in food.

Ruth E G Rowlands¹, Christiane A Ristori¹, Tatiane Ferreira², André Yoshio Yto², Daniela de Lima Franco², Monica C G Scola³, Mioko Jakabi¹, Dilma S Gelli¹, Mark Tamplin⁴, Tulio N. Cunha² e Elizabeth N. De Gaspari²

¹Seção de Microbiologia Alimentar, ²Seção de Imunologia, ³Seção de Coleção de Bactérias, Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – IAL/CCD/SES-SP

⁴Departamento da Agricultura, Pennsylvania-USA

Resumo

O presente trabalho descreve a produção e utilização de novos anticorpos monoclonais para a detecção das bactérias *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O157:H7 assim como para as toxinas Stx1 e Stx2 em amostras de alimentos. Testes imunológicos como Dot-ELISA, ELISA de captura e aglutinação utilizando partículas de látex ligadas aos anticorpos monoclonais produzidos estão em fase de avaliação. Os limites e padrões microbiológicos que devem ser adotados para garantir uma correta interpretação sobre os resultados das análises microbiológicas, os fatores que contribuem para a ocorrência de surtos de enfermidades de origem alimentar demandam a implantação de sistemas de detecção de alta sensibilidade e especificidade, características estas das técnicas imunológicas. Os dados indicam que os ensaios de Dot-ELISA, ELISA de captura e aglutinação utilizando partículas de látex são apropriados dependendo da amostra de alimento analisada.

Palavras-chave: anticorpo monoclonal, Dot-ELISA, ELISA de captura, aglutinação utilizando partículas de látex, amostras de alimentos.

Abstract

This paper describes the production and the use of new monoclonal antibodies for the detection of the bacteria *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O157:H7 as well as for the toxins Stx1 e Stx2 in food samples. Immunological tests like Dot-ELISA - Capture and agglutination ELISA, employing latex particles linked to the monoclonal antibodies produced are under evaluation. Limits and microbiological patterns that must be adopted to warrant correct interpretation of the results of microbiological results, factors contributing to the occurrence of foodborne diseases outbreaks demand the implantation of detection systems of high specificity and sensibility, which are characteristic of these immunological techniques. Data indicate that Dot-ELISA, Capture ELISA Agglutination essays and latex particles are appropriate, depending on the food sample under analysis.

Key words: monoclonal antibodies, Dot-ELISA, capture ELISA, agglutination with latex particles, food samples.

Introdução

As *Escherichia coli* são bactérias presentes normalmente no intestino do homem e de animais. A maioria delas não é patogênica, entretanto algumas cepas são causas de graves doenças. A *E.coli* O157:H7 é uma cepa particular que causa uma severa diarreia e em alguns casos complicações sérias que podem levar ao óbito. A doença causada por estas cepas é clinicamente distinta de outras doenças causadas por outros patógenos entéricos.

A bactéria foi identificada pela primeira vez em surtos de colite hemorrágica nos estados de Oregon e Michigan/ EUA, associada ao consumo de hambúrguer mal cozido em restaurantes de uma cadeia de *fast food*¹. De 1982 a 2002, foram reportados 350 surtos, 8.598 casos esporádicos, 1.493 hospitalizações, 354 casos de colite hemorrágica e 40 óbitos por *E. coli* O157 em 49 estados dos EUA, sendo os produtos cárneos moídos de origem bovina os veículos identificados em 75 surtos e os hambúrgueres bovinos em 27 surtos. Nesse período, entre os surtos associados a hambúrgueres contaminados, cinco ocorreram em restaurantes do tipo *fast food*, sendo dois em 1982, um em 1992 a 1993, um em 1995, e um em 1999. Seis surtos similares envolvendo hambúrgueres contaminados por esta bactéria, nos EUA, também foram notificados em 2003 (três casos) e 2004 (três casos)^{2,3}.

A *E.coli* O157:H7 tem uma característica que a diferencia da maioria das cepas de *E.coli*. Elas podem sobreviver às baixas temperaturas e resistem à dessecação e ambientes com pH ácido. Estas características permitem a sua persistência em ambientes distintos de outras cepas de *E.coli*. Elas podem sobreviver em ambientes ácidos por até 56 dias. Conseguem sobreviver em ambientes dessecados e em salsichas dessecadas e estocadas a baixas temperaturas. Outra característica destas cepas é a sua baixa dose infectante. A dose infectante suficiente para causar a doença está entre 10 a 100 células, correspondente a 1/10.000 da dose de outras cepas de *E.coli*. Consequentemente, os ambientes que permitem a sua sobrevivência podem representar sérios riscos à saúde humana⁴.

Embora possa ser isolada de uma variedade de animais, o gado tem sido considerado o principal reservatório de *E. coli* O157:H7. Habitante do trato gastrointestinal de animais normais sadios, sua prevalência varia de 1.8 a 16% em rebanhos dos Estados Unidos. Tais estimativas podem variar consideravelmente dependendo da linhagem do gado, da localização geográfica e de outros fatores, incluindo a composição da dieta, o tamanho do rebanho e a idade dos animais. A presença do patógeno no animal individual dentro dos rebanhos parece ser transitória.

Tem sido relatado que a eliminação de *E.coli* O157:H7 nas fezes varia de acordo com a idade do animal, com os regimes alimentares e com as condições de stress. No gado leiteiro são eliminadas *E.coli* O157:H7. Estes animais podem excretar de 10³ a 10⁵ CFU de *E.coli* O157:H7 por grama de fezes.

Acredita-se que as *E.coli* O157:H7 sejam inofensivas para o animal hospedeiro, o que complica o controle da sua disseminação através dos ambientes da fazenda. A maneira pela qual ela infecta o animal, o tempo de sua persistência, os efeitos na saúde animal e o papel desses ambientes permanecem desconhecidos. A sua disseminação mundial possivelmente indica que este microrganismo estabeleceu um nicho ecológico onde suas toxinas podem aumentar a sobrevivência.

A *E.coli* O157:H7 também foi encontrada em outros animais tais como: o carneiro, suínos, cabras e aves. Animais selvagens e domésticos que vivem próximos à fazenda de gado podem também albergar esta espécie. Portanto, além do gado, outros animais também podem ser veículos de *E.coli* O157:H7³.

No Brasil, têm sido realizados estudos visando evidenciar a presença de *E. coli* O157:H7 em hambúrgueres, frigoríficos e indústrias nas regiões Sul e Sudeste. A bactéria não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas, atestando senão a ausência, pelo menos uma baixa frequência desse patógeno em produtos cárneos brasileiros^{3,4}.

As enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs) são definidas como qualquer doença resultante da ingestão de

alimentos contaminados. Podem ser causadas pelo consumo de produtos contendo células vegetativas viáveis de um agente infeccioso específico ou toxinas pré-formadas resultantes da proliferação de patógenos toxigênicos^{3,5}.

Essas enfermidades são consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos problemas de saúde pública mais difundidos no mundo contemporâneo e afetam até 30% da população do mundo industrializado⁶. As conseqüências que essas doenças podem causar à saúde humana são bastante variáveis, dependendo de sua natureza, estágio de tratamento, idade, susceptibilidade individual, patogenicidade do agente e número de organismos ingeridos^{3,7,8}.

A doença começa com uma severa diarreia e câimbras abdominais levando à uma diarreia sanguinolenta. Os sintomas ocorrem usualmente 3-4 dias após a exposição. Algumas pessoas têm somente uma diarreia moderada ou nenhum sintoma, o que pode ser de grande relevância na disseminação subsequente. Vômitos e/ou febre baixa também podem ocorrer. As complicações incluem a síndrome hemolítica urêmica (HUS), a mais séria delas, o que pode resultar em destruição dos glóbulos vermelhos (anemia hemolítica), trombocitopenia e colapso renal. A HUS pode também afetar o sistema nervoso e levar eventualmente ao coma. Elevados números de glóbulos brancos, febre, anemia e insuficiência renal são sinais de desenvolvimento da HUS. Embora a maioria das pessoas se recupere da HUS, aproximadamente, 2 a 7% dos pacientes vão a óbito; em alguns surtos, entre os idosos, a taxa de mortalidade pode chegar a 50%.

Os microrganismos que contaminam os produtos cárneos são amplamente distribuídos na natureza e podem ser encontrados na água, no ar, no solo, no trato intestinal do homem e de animais, na pele, nas mãos e no trato respiratório dos manipuladores de alimentos, na pele e nas carcaças de bovinos e nos utensílios e equipamentos de abatedores e de cozinhas⁹.

A microbiota normal de produtos à base de carne bovina moída sob condições higiênicas é composta, predominantemente, por bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* e do gênero *Pseudomonas* e por Gram-positivas dos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus*². As bactérias patogênicas ou potencialmente mais comuns nestes alimentos são *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *S. aureus* e *Salmonella*, e, ocasionalmente, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*^{3,10}.

Na carne moída ou na carne de hambúrguer bovina são evidenciadas, predominantemente, as bactérias deteriorantes aeróbias Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella* e *Aeromonas*, que crescem na superfície desses alimentos e, ocasionalmente, as anaeróbias Gram-positivas como *Lactobacillus*, que se desenvolvem no seu interior^{11,12}. As *Pseudomonas* e *Acinetobacter-Moraxella* spp são geralmente responsáveis pela deterioração primária, com algumas outras atuando em menor escala, no processo¹¹.

Normalmente, os episódios agudos são brandos, autolimitados e de curta duração. Destacam-se como sintomas mais comuns: diarreia, cólica, dor abdominal, náusea e, raramente, vômito e febre¹².

Crianças, idosos, gestantes e indivíduos imunodebilitados são considerados grupos de risco, uma vez que apresentam o sistema imunológico incompleto ou deficiente e, nesses casos, a ingestão de pequeno número de patógenos pode ser suficiente para causar doença. Deve-se considerar ainda que essas patologias podem manifestar-se de forma mais acentuada, causando sérias complicações ou até mesmo a morte³.

Nas últimas décadas, foram identificadas novas espécies de patógenos ou verificado o reaparecimento de agentes já conhecidos e também foram desenvolvidos métodos mais eficazes de isolamento e detecção¹³. Mudanças demográficas e alterações nos hábitos alimentares têm provocado modificações tecnológicas na indústria com relação à formulação, ao processamento e à distribuição dos alimentos. Essas modificações, associadas à habilidade dos microrganismos de se desenvolverem rapidamente e se adaptarem ao ambiente, têm acarretado novos desafios ao sistema alimentar¹⁴.

A variedade de alimentos associados a surtos de doenças por eles veiculadas inclui os produtos de origem animal,

como carnes vermelhas, de frango, peixes e frutos do mar, ovos, leite e seus derivados e os de origem vegetal, como as frutas e hortaliças . A carne bovina e seus derivados têm sido apontados como os principais veículos em vários surtos notificados em diferentes países .

A multiplicação de patógenos nos produtos cárneos pode ocorrer em qualquer etapa da produção e do consumo e depende de fatores intrínsecos como atividade da água, pH, potencial de oxidação-redução, composição química, fatores antimicrobianos naturais, interações entre os microrganismos e de fatores extrínsecos relacionados com o ambiente como a umidade e a temperatura .

Durante a produção do hambúrguer, tanto em estabelecimentos industriais e varejistas quanto na fabricação caseira, pode ocorrer contaminação resultante da adoção de práticas inadequadas de higiene ou após adição de condimentos ou outros ingredientes contaminados . A remoção ou a diminuição do número de bactérias coliformes pode ser evidenciada após o tratamento da carne utilizada na fabricação de hambúrgueres por pasteurização com água a 85°C por 45 ou 60 segundos^{3,15} .

O armazenamento e o resfriamento inadequados da carne também são fatores que contribuem para a ocorrência de ETAs ¹⁶. Os hambúrgueres devem ser acondicionados corretamente em sacos plásticos estéreis, estocados e conservados congelados sob temperaturas $\leq 0^{\circ}\text{C}$, preferencialmente a -18°C com tolerância de até -12°C até o momento do uso. Sob refrigeração, os produtos cárneos de origem bovina devem ser armazenados a 4°C por até 72 horas^{3,17}.

O hambúrguer mal cozido tem sido apontado como um dos principais fatores de risco de infecções esporádicas e surtos causados por *E. coli* O157:H7¹⁸ .

Em muitos países, erros durante o processamento e o cozimento de hambúrgueres têm resultado em vários surtos, especialmente causados por *Escherichia coli* O157:H7. Isso demonstra que a contaminação cruzada e o tratamento térmico insuficiente são fatores diretamente relacionados com surtos causados por produtos cárneos^{3,19,20}.

Nos EUA, são estimados, aproximadamente, 250 mil casos de toxinoses alimentares por *C. perfringens* e sete óbitos por ano²¹. Entre 1993 e 2004, foram identificados no país alguns surtos causados por essa bactéria, associados ao consumo de carne moída cozida. Na Inglaterra e País de Gales, de 1996 a 2000, foram relatados 168.436 casos de toxinoses por *C. perfringens*, o que ocasionou 709 hospitalizações e 177 óbitos, sendo as carnes de origem bovina e aviária os alimentos mais envolvidos²². Surtos similares causados por este patógeno, tendo a carne e o hambúrguer de origem bovina como veículos, também foram identificados na Austrália, entre 1995 e 2000, e no Brasil, entre 1998 e 2001^{3,23}.

É bem reconhecido, atualmente, que cada país deve ter o seu próprio banco de dados sobre composição de alimentos, especialmente em relação aos componentes que afetam a saúde humana, positiva ou negativamente. A análise de alimentos, no entanto, é dispendiosa e complicada, e os métodos variam largamente em custo, exatidão, precisão e complexidade. São imprescindíveis a validação e revalidação de métodos e são também requeridos, especialmente em países em desenvolvimento, vários métodos para cada analito, todos capazes de fornecer dados confiáveis, e passíveis de serem utilizados por laboratórios com recursos humanos e materiais diferentes.

Assim, o presente trabalho teve por objetivo comparar métodos sorológicos de alta sensibilidade e especificidade na análise da bactéria *E.coli* O157:H7 e *V.cholerae* como anticorpos monoclonais para as toxinas Stx1 e Stx2 produzidos na seção de Imunologia utilizando como alimentos carnes e hortaliças.

Objetivos

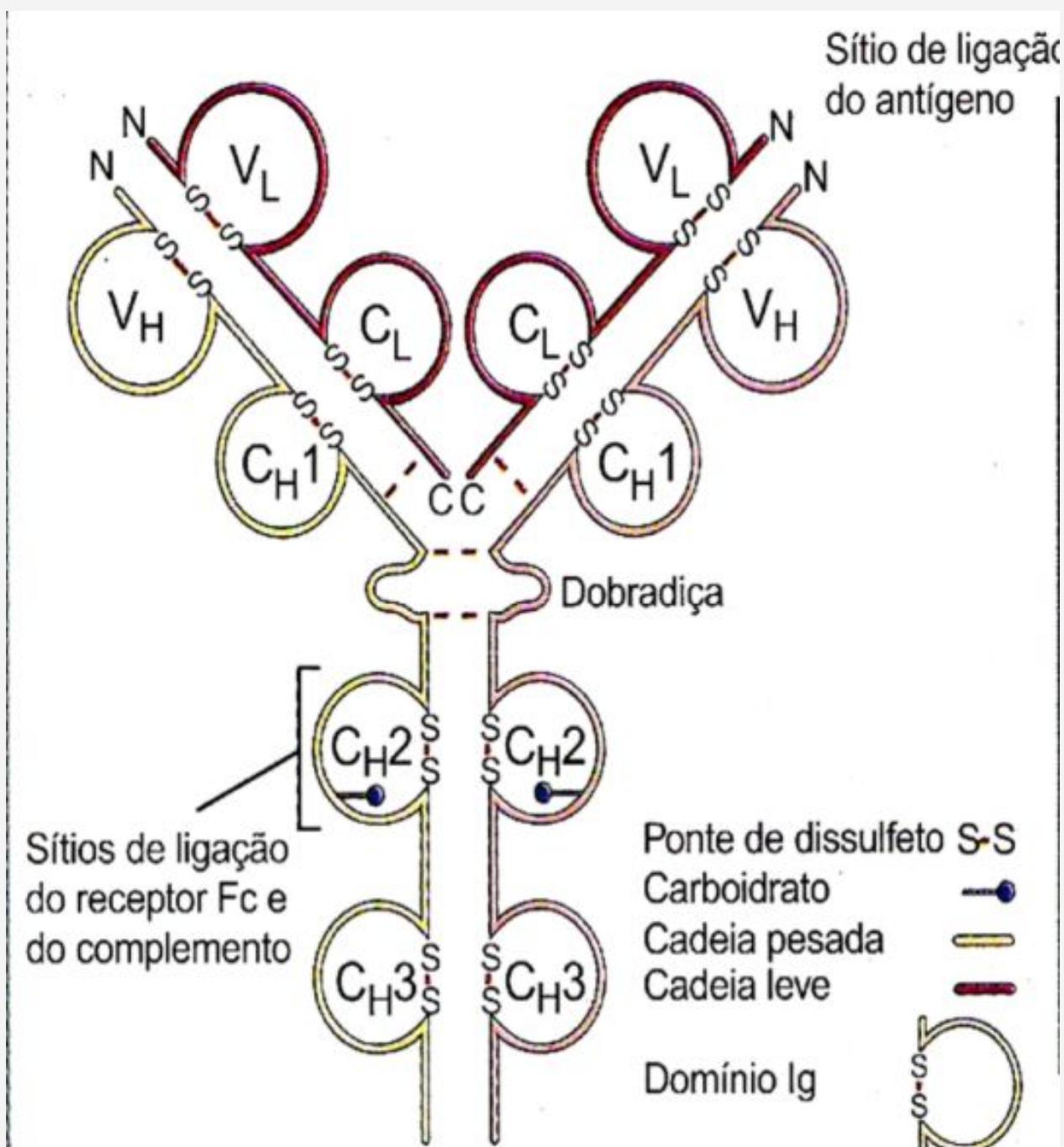
Alcançar a auto-suficiência na produção de anticorpos monoclonais a serem utilizados no diagnóstico de algumas infecções entéricas de importância em saúde pública. A produção de reagentes de baixo custo, utilizando anticorpos monoclonais e que possibilitem a sua aplicação em métodos de diagnóstico rápido de alta especificidade e

sensibilidade, permitindo uma ação mais eficaz na prevenção e controle dessas infecções.

Material e métodos

Anticorpos

- São um tipo de molécula glicoprotéica, também chamada de imunoglobulina, Ig.
- São produzidos por tecidos linfóides em resposta à presença de antígenos.
- Atuam neutralizando e eliminando os antígenos que induziram sua formação.
- São capazes de distinguir dois polipeptídeos que se diferenciam pela presença de um aminoácido.
- Apresentam grande especificidade.





Fonte: Abbas *et al*, 1993

Molécula de Imunoglobulina

Todo anticorpo é formado por duas cadeias leves e duas pesadas.

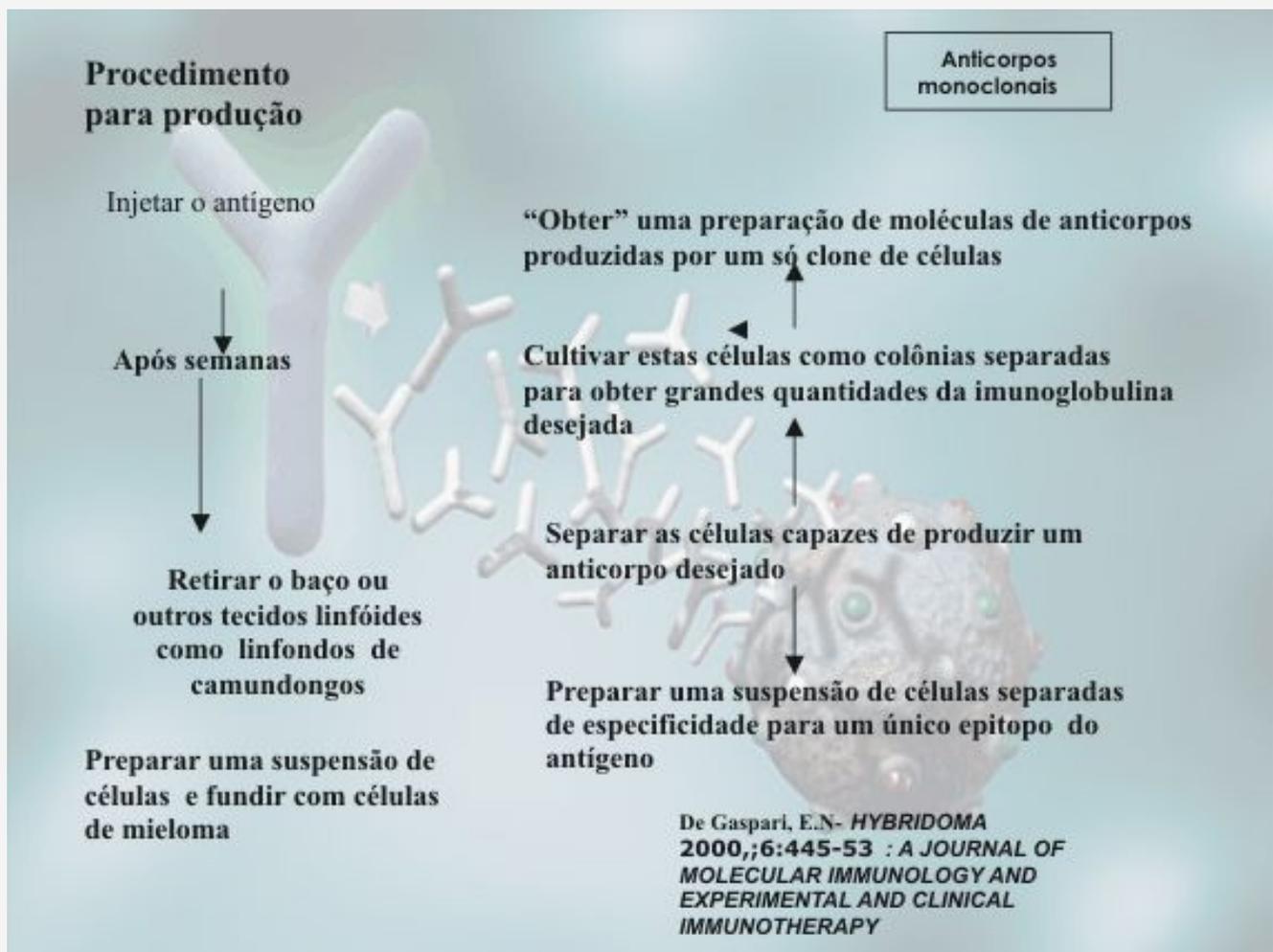
Os dois tipos de cadeias apresentam regiões variáveis (V; N-terminal) e regiões constantes (C; carboxi-terminais)

Anticorpos policlonais

- **Um clone de células B produz anticorpos com sítios idênticos para combinar com antígenos, isto é, anticorpos com as mesmas regiões variáveis.**
- **A heterogenidade dos anticorpos produzidos quando se injeta um único antígeno purificado em um animal se deve à ativação de muitos linfócitos B diferentes para diferentes partes do antígeno.**

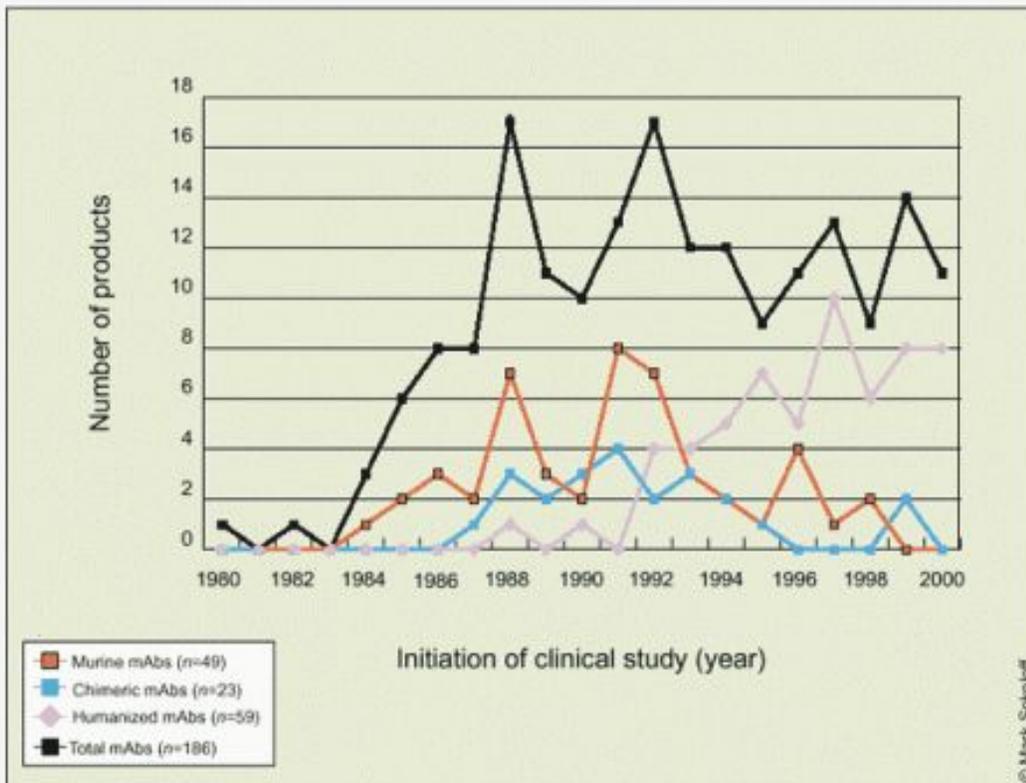
Anticorpos monoclonais

- **Essa técnica foi descrita por Cesar Milstein e George Kohler em 1975.**
- **Baseada no fato de que cada linfócito B produz anticorpo de uma única especificidade.**
- **São necessárias manipulações adicionais para obter anticorpos monoclonais, pois os linfócitos B que sintetizam os anticorpos não crescem e nem se dividem em cultivo.**
- **Solução: Combinaram dois tipos de células, o linfócito normal e o mieloma, fusionando as duas e formando células híbridas – HIBRIDOMA, que crescem e proliferam produzindo grande quantidade do anticorpo desejado.**
- **Em 1980 dois anticorpos monoclonais foram submetidos a experimentos clínicos mas esse número aumentou consideravelmente nos últimos 20 anos ^{24,25,26,27}.**
- **Atualmente, aproximadamente 200 anticorpos e seus derivados estão em experimentação clínica para o tratamento de doenças.**



Fonte: Cesar Milstein e George Kohler em 1975.

Figura 1 – Procedimento técnico utilizado no laboratório para a produção de anticorpos monoclonais em camundongos

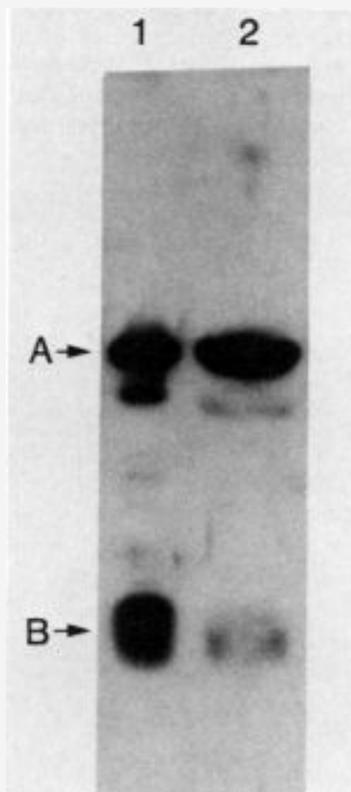


Fonte: Relher, JM *et al* 2001

Figura 2 – Número de AcMs que incorporaram estudos clínicos por ano.

Imunodiagnóstico

- Nos últimos anos os anticorpos monoclonais se tornaram uma classe cada vez mais importante de terapêuticos humanos^{24,25,26,27}.
- Diversos resultados clínicos bem sucedidos realizados recentemente aumentaram o interesse em pesquisas voltadas à expressão de várias formas de anticorpos monoclonais³¹
- O diagnóstico de muitas doenças infecciosas baseia-se na detecção de antígenos e /ou anticorpos particulares na circulação ou nos tecidos, usando-se anticorpos monoclonais.



Fonte: De Gaspari, EN *et al* 2006

Figura 3 – Caracterização por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das toxinas **(1)** Stx1 e **(2)** Stx2 utilizadas na imunização de camundongos para a produção de anticorpos monoclonais. Método de coloração pela prata.

Camundongos da linhagem BALB/C foram imunizados pela via subplantar com 1×10^2 células inteiras de *E.coli* O157:H7, inativadas com formalina 0,5% no volume de 10 μ l, ou com as toxinas STx1 e ou STx2 previamente emulsificadas na mesma proporção em adjuvante completo de Freund (Sigma). Após 20 dias, os animais receberam uma dose reforço pela mesma via e a mesma quantidade de antígeno, embora a emulsão tenha sido feita em adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os camundongos foram sangrados pelo plexo oftálmico para análise, por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), da quantidade dos anticorpos produzidos antes da fusão. Utilizamos o protocolo técnico baseado em estudos para obtenção de AcMo em nosso laboratório, com algumas modificações. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz **CTC/BM 44/99**

Obtenção de células de linfonodos poplíteos

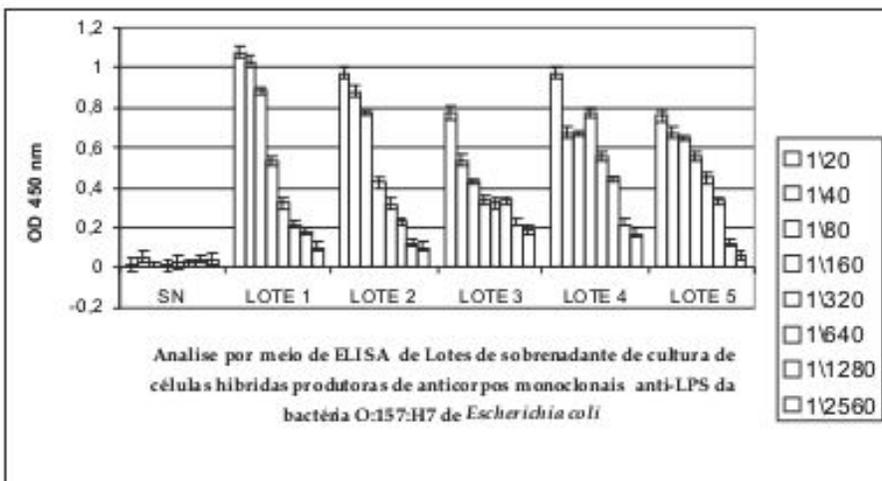
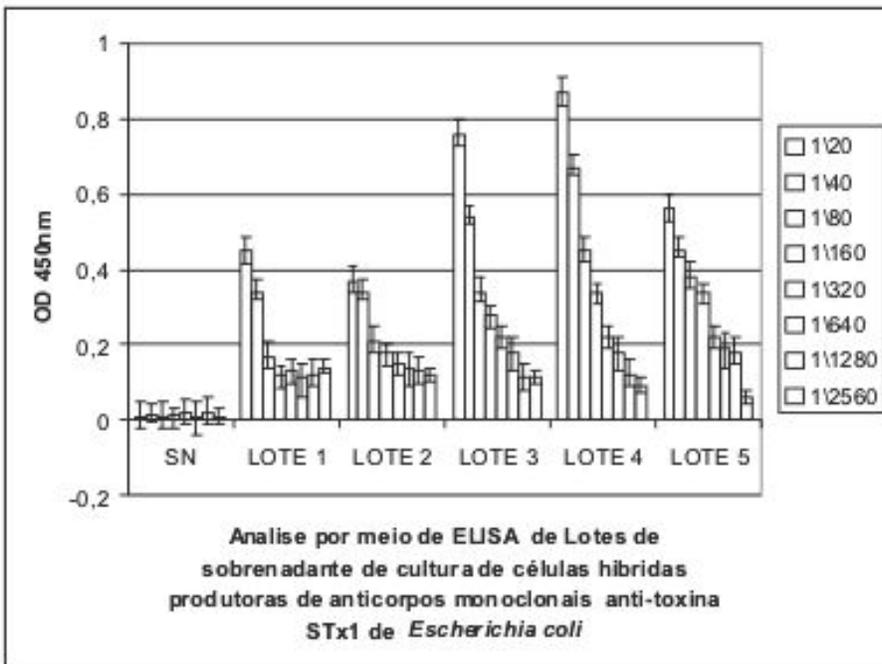
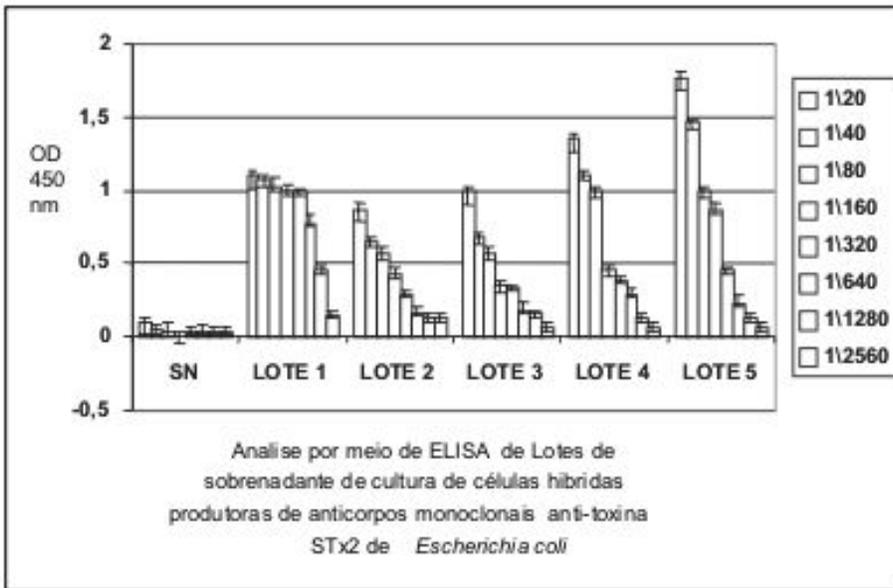
Foi utilizado um camundongo para a fusão celular. Três dias antes da fusão celular, que corresponde dois dias após ter sido realizada a última coleta da amostra de sangue, foi dado reforço contendo 1×10^2 células íntegras de *E.coli* ou toxinas STx em solução salina. Os linfonodos poplíteos do camundongo imunizado foram retirados assepticamente e macerados com lâminas de microscopia com um dos lados do vidro esmerilhada em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), suplementado com glutamina (Gibco) a 1%, piruvato de sódio (Gibco) a 2%, meio não essencial MEM a 1%, gentamicina (Gibco) a 0,1% e HEPES (Gibco) a 1,5%. As células assim obtidas foram reservadas para a técnica de fusão celular. O cultivo das células de mieloma P3X63-Ag8.653 foi realizado até atingirem a fase logarítmica de crescimento um dia antes da fusão (acertando a concentração para 5×10^4 células/mL). Um dia antes da fusão foi obtido o *feeder layer* de macrófagos, injetando 5 mL de RPMI com SFB (soro fetal bovino) no peritônio de camundongos. O lavado peritoneal foi diluído em 45 mL de meio e distribuído em placa de cultura de 96 orifícios. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%.²⁸

Obtenção dos hibridomas (Fusão celular)

Os linfócitos e as células mielomatosas foram lavados separadamente utilizando o meio RPMI e centrifugados durante 5 minutos a 800xg. Os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 10 mL do meio, tanto no *pellet* de linfócitos como naquele das células de mieloma. Foi realizada contagem das células diluídas a 1:2 em *trypan blue* (Gibco) a 0,1%. As células foram misturadas na proporção 1:1 (células de infonodo/mieloma) e após centrifugação, foi realizada a fusão celular com o sedimento utilizando uma solução, previamente autoclavada, de 0,5 g de polietilenglicol 3500 (MERCK) diluída em 0,7 mL de PBS (pH 7,4), contendo 50 µL de dimetilsulfóxido (Sigma), gota a gota, por 1 min. a 37°C. Na seqüência, as células foram mantidas em repouso por 1,5 min a 37°C, foi adicionado 1 mL de RPMI com SFB, gota a gota por 1 min. a 37°C, e mais 20 mL de RPMI, gota a gota por 4 min. a 37°C. As células foram mantidas em repouso por 4 min. a 37°C. Em seguida, foram centrifugadas em meio RPMI com SFB, contendo HAT a 3% (Gibco) na proporção de 1×10^6 células por mL de meio. Após duas horas de incubação por orifício em placas contendo *feeder layers* de macrófagos e mantidas a 37°C com 5% de CO₂. A primeira troca de meio foi realizada após 3 dias, as subseqüentes a cada 2 dias, e após uma semana o HAT foi substituído por hipoxantina e timidina (HT) (Gibco) a 2% e mantido por mais duas semanas, quando se passou a utilizar RPMI-SFB. A seleção dos clones por ELISA foi iniciada 10 dias após a fusão celular, quando os hibridomas já se apresentavam com bom crescimento (ocupando 1/3 do poço). O ELISA para a seleção dos clones foi feito com células íntegras de *E.coli* ou as toxinas. Para a seleção foi utilizado conjugado anti-IgG solução PBS-Tween 0,05% e bloqueadas por 1h com 200µL de leite 5%. Repetidas as lavagens, foram incubadas com 100 µL de sobrenadante de cultura de células. Após 1h a 37°C foram feitas novas lavagens e adicionados 100 µL do conjugado de anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição 1:2000 em leite desnatado (Glória-Brasil) 1%. Após a incubação de mais uma hora 37°C, novas lavagens foram feitas, e a reação foi revelada com o substrato preparado com 10µL de água oxigenada e 9 mL de uma solução de tampão (citrato-fosfato) contendo cromógeno (TMB). A leitura foi feita após 15 minutos a 450 nm. A determinação do índice de avides dos anticorpos produzidos foi realizada basicamente com o mesmo procedimento utilizado para técnica de ELISA, sendo que os monoclonais foram incubados na ausência e na presença de tiocianato de potássio (KSCN) 1.5M em PBS (Sigma). O índice de avides foi expresso como a razão entre as médias das absorbâncias na presença de KSCN e na ausência de KSCN (com PBS). A especificidade dos AcMs utilizados em nossos estudos foi avaliada por *immunoblot*. O Protocolo utilizado para a sensibilização partículas de Látex está de acordo com as instruções do fabricante (Polyscience – USA)²⁸.

No amplo quadro da investigação científica na área da saúde observam-se inúmeras aplicações para os AcMos, pois estes anticorpos possuem especificidade única, como também observado em estudos realizados em nosso laboratório há mais de 10 anos em diferentes áreas do conhecimento. Em nosso laboratório estes monoclonais são utilizados na sorotipagem de *Neisseria meningitidis*, caracterização de novos antígenos importantes em novas preparações vacinais para este microrganismo, também como em estudos de Imunologia Básica e Aplicada.

Resultados



Fonte: De Gaspari, E.N – imunologia IAL/CCD/SES-SP

Figura 4 – Análise de sobrenadante de cultura de células híbridas dos lotes (1 a 5) de anticorpos monoclonais do isótipo IgG selecionados por meio de ELISA utilizando células íntegras de *E. coli* O157:H7 e as toxinas STx1 , STx2. Os resultados mostram a média de três ensaios independentes.

O sobrenadante de cultura de células foi diluído de 1/20 a 1/2560.

Discussão

O *V.cholerae* O1 e O139 são normalmente detectados, por dois métodos, em amostras clínicas, alimentos e água. Em amostras onde se espera encontrar uma concentração alta do *V.cholerae*, como em fezes diarreicas aquosas, estas poderão ser semeadas diretamente em placas contendo, por exemplo, o agar TCBS (tiosulfato- citrato- sais biliares- sacarose). Se a concentração for baixa ou desconhecida, a amostra é normalmente inoculada em água peptonada alcalina, para enriquecimento, antes de ser semeada em meio seletivo (TCBS).

Seguindo os processos de cultivo, a identificação envolve normalmente uma série de testes bioquímicos e sorológicos, que podem levar 3 a 5 dias para a obtenção de um resultado confirmatório. A sorologia pode ser dificultada quando são isoladas cepas rugosas que são auto-aglutinantes. O anti-soro para identificar o *V.cholerae* O139 era difícil de se obter; sendo que até Junho de 1993, nos Estados Unidos da América, menos de 1 mL deste anti-soro era a quantidade disponível para pesquisa em saúde pública .

O uso de anticorpo monoclonal dirigido contra o epitopo específico do *V.cholerae* O1 e O139 pode produzir um teste muito mais rápido para o diagnóstico da cólera. O anticorpo monoclonal pode ser padronizado para ELISA para a identificação de colônias, eliminando os testes bioquímicos. Poderá também ser conjugado ao isotiocianato de fluoresceína para um ensaio rápido de imunofluorescência. O método mais eficiente seria a aglutinação de latex (sensibilizado com anticorpos monoclonais), que poderia ser utilizada diretamente para detectar o *V.cholerae* nas fezes, nas culturas em meio líquido e nas colônias isoladas²⁸ .

As toxinas Stx1 e STx2 podem ser detectadas por uma série de testes, dependendo da capacidade de cada laboratório. O teste mais avançado envolve PCR ou hibridização de colônias, cuja aplicabilidade nos laboratórios é dificultada pela necessidade de equipamentos, reagentes e custos para manutenção.

A produção das toxinas Stx1 e Stx2 pode ser verificada em ensaios com culturas de células. As toxinas Stx1 e Stx2 são detectadas pela mudança morfológica na linhagem celular, usualmente de uma forma fibroblástica para forma circular, ou o oposto, dependendo da linhagem celular. Algumas vezes, a interpretação é dificultada se a cultura bacteriana contém citolisinas que destroem a linhagem celular. Este é especialmente o problema se o nível da citotoxina é mais alta que o nível da toxina CT. Outra dificuldade que deve ser mencionada refere-se ao alto custo devido à necessidade de equipamentos tais como capelas de fluxo laminar, microscópio e meios de cultura para culturas celulares.

Por essas razões, os sistemas de detecção baseados em anticorpos oferecem uma abordagem mais simples e de baixo custo para a detecção da toxina CT. Atualmente encontramos disponíveis, no comércio, kits para ensaios de inibição competitiva e para aglutinação de latex para detecção da toxina CT; entretanto, o alto custo torna-os praticamente inacessíveis para a maioria dos laboratórios²⁹.

Em nossos estudos utilizamos:

Amostras

As amostras de carne moída crua (200 g) e alface (um pé) que foram adquiridas em estabelecimentos comerciais do Município de São Paulo. As amostras foram contaminadas artificialmente.

Cepas

Foram utilizadas cepas de *E. coli* O157:H7 IAL 1848 e *V. cholerae* O1 não toxigênico IAL 1965 provenientes da Seção de Coleção de Culturas do IAL. As cepas, mantidas em gelose conservação, foram repicadas em caldo TSB (caldo tripticase de soja) e incubadas a 35°C por 18 h. Após este período foram realizadas diluições seriadas em

água peptonada a 1% (APT), de 10^{-1} a 10^{-6} (para *V. cholerae*) e 10^{-1} a 10^{-9} (para *E. coli* O157:H7).

Toxinas



De Gaspari, EN et al 2006

Fonte: De Gaspari, E.N – imunologia IAL/CCD/SES-SP

Figura 5 – As toxinas Stx1 e Stx2 foram obtidas do sobrenadante de cultura de *Escherichia coli*. A concentração das toxinas presentes no sobrenadante da cultura de bactérias foi feita por meio da análise utilizando o método de Bradford.

Preparo das amostras

Alface

A amostra de alface foi dividida em três porções de 50 g e uma de 25 g. Cada porção de 50 g foi imersa em 100 mL de água potável declorada contaminada com alíquotas da cepa de *V. cholerae* O1 conforme descrito abaixo:

Amostra A – 1 mL da cepa na concentração de 10^{-1}

Amostra B – 1 mL da cepa na concentração de 10^{-3}

Amostra C – 1 mL da cepa na concentração de 10^{-6}

As porções foram mantidas na água por 2 minutos sob agitação manual. De cada amostra foram colhidos 25 g em 225 mL de água peptonada alcalina, seguido de homogeneização por 2 minutos. Antes dos testes de aglutinação em látex foram semeados 0,1 mL de cada frasco em ágar TCBS (Tiosulfato citrato de sais biliares) para enumeração da bactéria. As amostras foram incubadas a 35°C por 18 h para enriquecimento.

Carne

A amostra de carne foi alíquotada em três porções de 50 g e uma de 25 g. Cada porção de 50 g foi contaminada com alíquotas da cepa de *E. coli* O157:H7 e homogenizadas manualmente por 2 minutos como descrito a seguir:

Amostra A1 – 2,5 mL da cepa na concentração de 10^{-5}

Amostra B1 – 2,5 mL da cepa na concentração de 10^{-7}

Amostra C1 – 2,5 mL da cepa na concentração de 10^{-9}

De cada amostra foram colhidos 25 g em 225 mL de APT, seguido de homogeneização por 2 minutos. Antes dos testes de aglutinação em látex, foram semeados 0,1 mL de cada frasco em ágar MacConkey Sorbitol (MCS) para contagem. As amostras foram incubadas a 35°C por 18 h para enriquecimento.

As amostras foram contaminadas artificialmente com as toxinas Stx1 ou Stx2 diluídas a 1/10 (figura 5).

As porções de 25 g de cada uma das amostras (sem contaminação), alface e carne, foram analisadas microbiologicamente para verificar a presença dos patógenos estudados e de outras bactérias.



Figura – Rowlands, REG e Ristori C.A

Fonte: De Gaspari, E.N – imunologia IAL/CCD/SES-SP

Figura 6 – Procedimento técnico utilizado para a contaminação artificial de amostras de carne e alface com as bactérias *E.coli* O157:H7, *V.colerae* e as toxinas Stx1 e STx2 para a padronização de ensaios imunológicos.

A Figura 6 apresenta amostras de alface com as diferentes concentrações da bactéria *V.cholerae*.

Aglutinação utilizando partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais

A técnica foi realizada imediatamente (sem etapa de enriquecimento) e após o enriquecimento como descrito anteriormente^{28,29}.

Análise microbiológica das amostras não contaminadas

Alface

Coliformes totais: $4,6 \times 10^2$ NMP/g

Coliformes termotolerantes: < 3,0 NMP/g

Presença de *Alcaligenes* spp., *Citrobacter* spp. e *Enterobacter* spp.

Ausência de *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *V.cholerae*

Carne

Coliformes totais: $4,6 \times 10^2$ NMP/g

Coliformes termotolerantes: $< 3,0$ NMP/g

Presença de *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Alcaligenes* spp.

Ausência de *Salmonella* spp., *Aeromonas* spp. e *E. coli* O157:H7

Contagem após contaminação (sem enriquecimento)

Alface (contagem de *V. cholerae*)

A: $< 10^2$ UFC/g

B: $< 10^2$ UFC/g

C: $< 10^2$ UFC/g

Carne (contagem de *E. coli* O157:H7)

A1: $6,3 \times 10^3$ UFC/g

B1: $9,1 \times 10^3$ UFC/g

C1: $1,1 \times 10^4$ UFC/g

Contagem após contaminação (com enriquecimento)

Alface (contagem de *V. cholerae*)

A: $> 2,5 \times 10^4$ UFC/g

B: $> 2,5 \times 10^4$ UFC/g

C: $> 2,5 \times 10^4$ UFC/g

Carne (contagem de *E. coli* O157:H7)

A1: $> 2,5 \times 10^4$ UFC/g

B1: $> 2,5 \times 10^4$ UFC/g

C1: > 2,5 x 10⁴ UFC/g

Conclusão

Utilizamos em nossos estudos as técnicas como previamente demonstrado em nossos trabalhos Dot-ELISA, Aglutinação com anticorpos monoclonais adsorvidos em partículas de látex e ELISA de captura utilizando anticorpos monoclonais^{28,29}.

Este projeto propõe a produção de anticorpos monoclonais de baixo custo para a detecção de enteropatógenos que poderão ser utilizados nos testes de ELISA assim como em ensaios de inibição competitiva, e posteriormente serem repassados à rede de laboratórios de saúde pública. Estudos estão em andamento em nosso laboratório utilizando um número maior de amostras para a validação dos métodos^{28,29}.

A importância da vigilância epidemiológica para o monitoramento de doenças de notificação compulsória tem sido enfatizada em várias situações de desastre. Uma vigilância efetiva, simples e representativa no país pode fornecer sinais prévios para impedir surtos epidêmicos. Essa vigilância envolve análises de material clínico, alimentos e amostras ambientais, as quais devem ser realizadas através de técnicas simples e de resultado rápido. Entre essas técnicas os ensaios imunológicos têm sido os mais amplamente empregados, sendo premente o desenvolvimento e produção de anticorpos monoclonais, sejam eles para a detecção desses microrganismos ou de seus fatores de virulência.

Este projeto é financiado pela Fapesp – Projeto Temático (Processo 00/05834-7) e Instituto Adolfo Lutz, envolvendo vários laboratórios, sob a Coordenação da doutora Elizabeth N. De Gaspari, PhD em Imunologia pelo Departamento de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, (Pesquisador Científico VI), da Seção de Imunologia do IAL. Email: egaspari@ial.sp.gov.br

Referências Bibliográficas

1. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Heberts RJ, Olcott HM, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N Engl J Med** 308: 681-685, 1983.
2. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. **Emerg Infect Dis** 11: 603-609, 2005
3. Tavares, MT, Serafini, AB. Carnes de Hambúrgueres prontas para consumo: Aspectos legais e riscos bacterianos. **Rev.Pathol.Trop** 35:1-21, 2006
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Foodborne outbreak response and surveillance unit. U.S. Foodborne disease outbreaks. June, 2004. Disponível em: http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb.htm. Acesso em: 6 de janeiro de 2007.
5. Silveira NFA, Silva N, Contreras C, Miyagusku L, Baccin MDF, Kono E, Beraquet NJ. Occurrence of *Escherichia coli*:H7 in hamburgers produced in Brazil. **J Food Prot** 62: 1333-1335, 1999.
6. Silva N, Silveira NFA, Contreras C, Beraquet NJ. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. **Ciênc Tecnol Aliment** 21: 223-227, 2001.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária–ANVISA. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União. Brasília**, 10 jan. 2001.
8. World Health Organization (WHO). **WHO Media Centre**. Fact Sheet No 237. *Food safety and foodborne*

illness. January 2002. Disponível em:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>. Acesso em: 06 de janeiro de 2007.

9. Buzby JC. Older adults at risk of complications from microbial foodborne illness. *Food Review* 25: 30-35, 2002.
10. Unnevehr L, Roberts T, Custer C. New pathogen testing technologies and the market for food safety information. *AgBioForum* 7: 212-218, 2004.
11. Jay JM. *Microbiologia de Alimentos*. 6. ed., Porto Alegre: **Artmed**, 2005.
12. Forsythe SJ. A flora microbiana dos alimentos. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. 1. ed., Porto Alegre: **Artmed**, 2002.
13. Taeye A. The Cleveland Clinic. Disease Management Project. Medicine Index. Infectious Diseases. *Food-borne disease*. February 2004. Disponível em: <http://www.clevelandclinicmeded.com/diseasemanagement/infectiousdisease/foodborne/foodborne.htm>. Acesso em: 6 janeiro 2007
14. Sobel J, Mixter CG, Kolhe P, Gupta A, Guarner J, Zaki S, Hoffman NA, Songer JG, Fremont-Smith M, Fischer M, Killgore G, Britz PH, MacDonald C. Necrotizing enterocolitis associated with *Clostridium perfringens* type A in previously healthy north american adults. *J Am Coll Surg* 201: 48-56, 2005
15. Adak GK, Meakins SM, Yip H, Lopman BA, O'Brien SJ. Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. *Emerg Infect Dis* 11: 365-372, 2005.
16. Picchi V. *Higienização em estabelecimentos de abate de bovinos*. **Revista Nacional da Carne**, v. 332, Outubro de 2004. Disponível em: http://www.dipemar.com.br/carne/332/materia_especial_carne.htm. Acesso em: 21 janeiro de 2007.
17. Gill CO, Bryant J, Badoni M. Effects of hot water pasteurizing treatments on the microbiological condition of manufacturing beef used for hamburger patty manufacture. *Int J Food Microbiol* 63: 243-256, 2001
18. Silva CRB, Barros JJC, Miranda FA, Rossi DA. Efeito do congelamento e resfriamento na preservação de *Escherichia coli* (ATCC25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC9801), inoculadas em carne moída bovina estocada para investigação de surtos de toxinfecção alimentar. *Rev Hig Alimentar* 19: 95-98, 2005
19. Fattori FFA, Souza LC, Braoios A, Ramos APD, Tashima NT, Neves TRM, Barbosa RL. Aspectos sanitários em "trailers" de lanche no município de Presidente Prudente, SP. *Rev Hig Alimentar* 19: 54-62, 2005
20. Macdonald C, Drew J, Carlson R, Dzogan S, Tataryn S, Macdonald A, Ali A, Amhed R, Easy R, Clark C, Rodgers F. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 leading to the recall of retail ground beef – **Winnipeg, Manitoba**, May1999. *CDCR* 26-13, 2000
21. Kassenborg HD, Hedberg CW, Hoekstra M, Evans MC, Chin AE, Marcus R, Vugia DJ, Smith K, Ahuja SD, Slutsker L, Griffin PM. Farms visits and undercooked hamburgers as major risk factors for sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: data from a case-control study in 5 FoodNet sites. *Clin Infect Dis* 38: S271-278, 2004.
22. Wen Q, McClane BA. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in american retail foods. *Appl Environ Microbiol* 70: 2685-2691, 2004.
23. Câmara SAV. *Surtos de toxinfecções alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, 1998-2001*. Campo Grande [Monografia de Especialização em Saúde Pública – Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser/

MS, 2002.

24. Reichert JM. Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. **Nat Rev Drug Discov.** 2:695-702, 2003.
25. Reichert JM. Therapeutic monoclonal antibodies: trends in development and approval in the US. **Curr Opin Mol Ther.** 4:110-8, 2002.
26. Reichert JM. Monoclonal antibodies in the clinic. **Nat Biotechnol.** 19:819-22, 2001.
27. Humphreys DP, Glover DJ. Therapeutic antibody production technologies: molecules, applications, expression and purification. **Curr Opin Drug Discov Devel.** 4:172-85, 2001.
28. Ristori, C. A, Rowlands, R. E G, Jakabi, Miyoko, Gelli D, Scolla, M CG, De Gaspari, E.N. Detecção de *Vibrio cholerae* 01 em ostras utilizando anticorpo monoclonal em ensaio de aglutinação. **Rev. Inst. Adolfo. Lutz,** 65:127-132, 2006
29. De Gaspari E.N, Ristori, C A, Rowlands, R E G, Irino, K, Torres, D, D, Tamplin, M. Aplicação de Anticorpos Monoclonais na Detecção de Enteropatógenos em Amostras de Origem Clínica, Alimentar e Ambiental para a Produção de Kits para Imunodiagnóstico. **Bepa**, ed. novembro, 2006, Volume 3, Número 35 <http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa> 5)

Correspondência/Correspondence to:

Elizabeth N. De Gaspari

Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar

CEP: 01246-902 – São Paulo (SP)

Tel.: (11) 3068-2898

E-mail: degaspari.elizabeth@gmail.com



Bepa

Av. Dr. Arnaldo, 351 - 1º andar, s. 135 – CEP: 01246-000

São Paulo - SP - tels.: (11) 3066-8823 / 3066-8825

e-mail: bepa@saude.sp.gov.br

Fale conosco

