

Novembro, 2006 Volume 3 Número 35

■ **Aplicação de Anticorpos Monoclonais na Detecção de Enteropatógenos em Amostras de Origem Clínica, Alimentar e Ambiental para a Produção de Kits para Imunodiagnóstico**
Monoclonal Antibodies in the Detection of Enteropatogens in Clinical, Food and Environmental Samples for the production of diagnostic kits

Elizabeth N. De Gaspari¹, Christiane A Ristori², Ruth E G Rowlands², Kinue Irino³, Domingas D Torres⁴ e Mark Tamplin⁵

Seção de Imunologia¹, Seção de Microbiologia Alimentar², Seção de Bacteriologia³, Seção de Parasitologia⁴, Instituto Adolfo Lutz, Departamento da Agricultura, Pennsylvania, USA⁵, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – IAL/CCD/SES-SP

Resumo

A detecção de microrganismos patogênicos em amostras clínicas, de alimento e de água é uma etapa extremamente importante para reduzir e/ou evitar a ocorrência de doenças veiculadas por alimentos. Os métodos tradicionais de cultura para a detecção de bactérias patogênicas normalmente são demorados, havendo, portanto, a necessidade de implantar métodos rápidos, sensíveis, específicos, simples e de baixo custo. Métodos rápidos, como a aglutinação de látex, podem ser extremamente úteis aos serviços de saúde para investigar, diagnosticar e evitar surtos de doenças veiculadas pelos alimentos. Anticorpos monoclonais utilizados em sistemas de testes rápidos, como, por exemplo, aglutinação de latex, ELISA, imunofluorescência e separação magnética, podem se constituir em importantes ferramentas a serem utilizadas nos serviços de saúde pública, reduzindo o impacto das enfermidades veiculadas pelos alimentos.

Palavras-chave: enteropatógenos; anticorpos monoclonais; aglutinação de latex; ELISA; ELISA de captura; imunofluorescência; anticorpos monoclonais e partículas magnéticas

Abstract

The ability to detect the presence of pathogenic organisms in clinical specimens, food and water is extremely important to reduce and/or prevent case of foodborne illness. Culture methods for bacterial detection are often lengthy, therefore rapid, sensitive, specific and simple methods of detection are needed. Rapid testing can provide processors with better quality assurance programs, which in turn reduces the risk to consumers. If the co-agglutination technique can be optimized, it could be very useful to public health agencies to investigate, diagnose, and prevent foodborne illness outbreaks. Monoclonal antibody reagents formatted into rapid test systems (e.g. latex agglutination, ELISA, immunofluorescence, and immunomagnetic separation), can provide public health agencies with necessary diagnostic tools to reduce the impact of food and water borne diseases.

Key words: enteropathogens; monoclonal antibodies; latex agglutination; ELISA; capture ELISA; immunofluorescence; monoclonal antibody and immunomagnetic beads

Introdução

O Brasil, país de dimensão continental, convive tanto com as doenças do mundo desenvolvido (câncer, hipertensão arterial e diabetes) quanto com as doenças infecciosas e parasitárias características do subdesenvolvimento¹. O laboratório é um componente central da vigilância da cólera. É essencial para confirmar a presença do *V.cholerae* em uma determinada área, para monitorar a sua contínua presença ou documentar o seu desaparecimento, para determinar a sensibilidade aos agentes antimicrobianos e identificar a sua presença nos alimentos e no meio ambiente.

Uma importante característica da cólera como doença transmissível é o seu comportamento epidemiológico, com tendência a ocorrer de forma explosiva e causar pandemias extensas. Sob o ponto de vista de saúde pública, duas importantes características devem ser determinadas no *Vibrio cholerae* após a sua caracterização bioquímica: a identificação dos antígenos O1 e O139, marcas do seu potencial epidêmico/pandêmico e a sua capacidade de produzir a enterotoxina CT, responsável pela severa doença em epidemias e nas formas esporádicas.

A cólera pode ser transmitida oralmente pela água contaminada, porém, mais comumente por alimentos contaminados com água e fezes. Os vibrios, sobrevivendo à passagem através do estômago, podem colonizar o intestino delgado e estabelecer a infecção e a doença. Os vibrios se ligam aos enterócitos da mucosa do intestino delgado e proliferam alcançando concentrações de 10^7 a 10^8 vibrios/grama de intestino delgado². Estas altas concentrações possibilitam a detecção do *V.cholerae* por ensaios de coaglutinação.

Atualmente, os ecologistas microbianos consideram seriamente a possibilidade de um nicho ecológico para o *V. cholerae* O1 no ambiente aquático, cuja existência poderia explicar a sobrevivência desses microrganismos nos intervalos epidêmicos. Entretanto, permanece a questão de qual ambiente particular, micro ou macro ou nicho no ecossistema aquático, seria o reservatório desses microrganismos.

Diferentes tipos de organismos aquáticos, tais como mariscos, zooplâncton, ostras etc., têm sido considerados como habitats potenciais do *V.cholerae* O1 no meio aquático, e esta interação parece estar associada à capacidade desses vibrios produzirem quitinase e usarem a quitina da carapaça desses organismos como fonte de nutrientes^{3,4}. A flora aquática, tanto as macrófitas como as micrófitas, tem sido indicada como reservatório de vibrio nas áreas endêmicas. Os trabalhos nessa área demonstram claramente uma associação entre o *V. cholerae* O1 e o fitoplâncton, principalmente a *Anabaena* sp.^{5,6}. Tem sido observado que o pico de incidência de cólera em áreas endêmicas de Bangladesh ocorre junto com as florações de algas verdes azuladas no ambiente aquático.

A ecologia do *V.cholerae* O1 tem sido investigada há muitos anos, mas ainda não foi elucidada conclusivamente. É possível que uma série de organismos e fatores desempenhe um papel na manutenção inter-epidêmica desses microrganismos. Os protozoários e zooplânctons são alimentos para certas espécies de peixes e moluscos bivalves, podendo, portanto, contaminar esses animais. Em adição, as formas dormentes de *V.cholerae* O1 (formas viáveis, mas não cultiváveis) podem aderir à superfície desses organismos e reverter a organismo cultivável com a disponibilidade de nutrientes. A associação do plâncton com *V.cholerae* O1 tem sido extensivamente estudada, entretanto são necessários, ainda, estudos controlados do papel dos peixes ou moluscos bivalves na transmissão da cólera, e a interação de diferentes microhabitats desses macro e micro animais deve ser melhor estudada. Considerando que no ambiente, muitas vezes, esses microrganismos estão presentes na forma viável, mas não cultivável, a técnica de imunofluorescência tem sido o método mais apropriado para essas investigações, sendo imprescindível a utilização de anticorpos altamente específicos.

Entre as espécies do gênero *Vibrio*, a patogenicidade do *V.cholerae* tem sido a mais estudada, sendo o *V. cholerae* o microrganismo protótipo para o estudo das doenças ocasionadas por bactérias enterotoxigênicas. A cólera é manifestada por uma severa diarreia aquosa, que, se não tratada, pode levar a uma desidratação fatal e ao desequilíbrio eletrolítico. Uma pronta reposição de fluidos e eletrólitos junto com a terapia antimicrobiana pode reduzir enormemente a mortalidade e a morbidade pela cólera. Em termos mundiais, a taxa de mortalidade varia de menos de 1% a 25%, dependendo da disponibilidade de cuidados médicos.

O *V.cholerae* é uma espécie heterogênea em relação a sua patogenicidade. Dentro desta espécie, a sua classificação em sorogrupos, a capacidade de produzir a enterotoxina CT e o potencial de disseminação constituem as principais distinções. Sob o ponto de vista de saúde pública, somente os *V.cholerae* dos sorogrupos O1 e O139 estão associados com a cólera epidêmica, sendo as cepas de outros sorogrupos consideradas como não-patogênicas ou patógenos ocasionais.

Refletindo a sua heterogeneidade, encontramos cepas de *V.cholerae* dos sorogrupos O1 e O139 que não produzem a toxina CT, não causam a cólera e não possuem nenhum potencial epidêmico. Por outro lado, ocorrem cepas distintas dos sorogrupos O1 e O139 que são claramente patogênicas, pela produção da toxina CT ou outros fatores de virulência. Entretanto, nenhuma delas é causadora de epidemia, não tendo as mesmas implicações epidemiológicas na saúde pública como o *V.cholerae* dos sorogrupos O1 e O139, produtores da toxina CT.

A virulência do *V.cholerae* O1 e O139 tem sido atribuída, principalmente, aos efeitos da toxina CT, composta de duas subunidades, A e B. A subunidade A (CT-A) está presente como uma única subunidade e possui a atividade tóxica que resulta na ativação do adenilato ciclase ligada à membrana, causando uma cascata intracelular. A subunidade B é composta de cinco subunidades que são os receptores para o gangliosídeo epitelial GM1 e levam a toxina total para a proximidade da superfície da célula epitelial.

Estes eventos resultam na aparência clássica de “água de arroz” das fezes de pacientes com cólera. Outras toxinas possivelmente envolvidas nos sintomas da cólera incluem a toxina zot (*zona occludens toxin*) e fatores ainda desconhecidos envolvidos no processo diarréico.

Recentemente, no Instituto Adolfo Lutz padronizamos a técnica de aglutinação para a detecção de *Vibrio cholerae* O1 em ostras, utilizando partículas de látex e anticorpos monoclonais. O *V. cholerae* sorogrupo O1 é o agente etiológico da cólera pandêmica, sendo considerado o mais importante dentre os vibrios patogênicos ao homem. Os sintomas das infecções por esta bactéria variam de diarréia branda a doença grave, podendo até levar a óbito.

Dentre os alimentos marinhos, as ostras representam uma das principais vias de transmissão de cólera. Os métodos convencionais para detecção do *V. cholerae* O1 são laboriosos e demorados, havendo, portando, a necessidade de implantar métodos rápidos, sensíveis, específicos, simples e de baixo custo.

O objetivo deste estudo foi avaliar a técnica de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpo monoclonal (AcMo) na detecção de *V. cholerae* O1 em ostras, contaminadas no laboratório. A técnica de aglutinação com látex sensibilizado detectou 1.2×10^2 UFC da bactéria (diluição 1/32). As amostras de ostras utilizadas para contaminação originalmente não continham *V. cholerae*, mas outras bactérias foram detectadas, tais como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp. e outros vibrios (que não o *V. cholerae*).

O presente estudo demonstrou que o tempo da pesquisa de *V. cholerae* em alimentos pode ser de 18 horas; na metodologia convencional a análise é finalizada, em média, em sete dias. O AcMo monoclonal produzido apresentou uma sensibilidade e especificidade de 100% para *V. Cholerae*^{7,8,9}.

Resultados e discussão

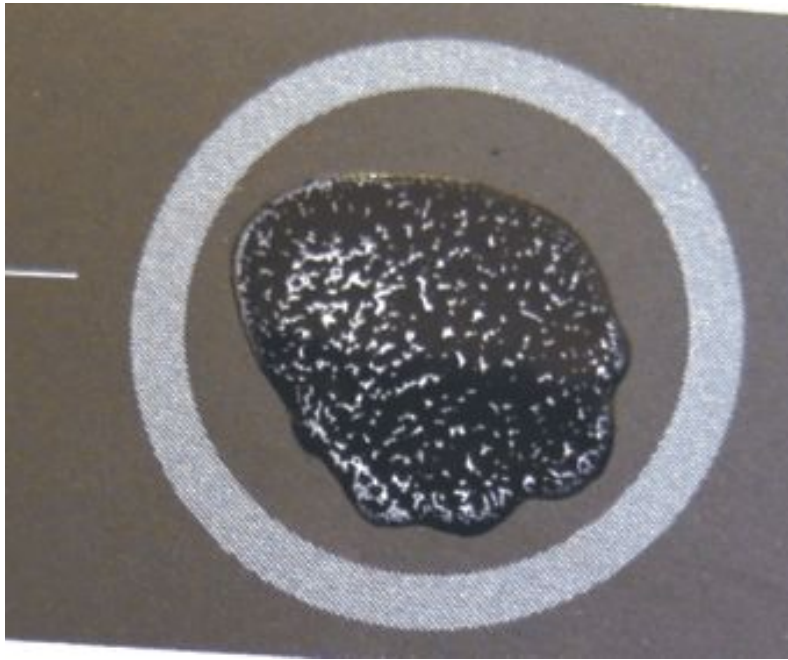


Figura 1. Padrão apresentado pelo teste de aglutinação em lâminas utilizando partículas de látex ligadas com anticorpo monoclonal, para a detecção de *V.cholerae* em amostras de ostras infectadas artificialmente no laboratório.

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

Ainda em nosso estudo, outro patógeno de interesse em saúde pública é a *Escherichia coli*, produtora de Shiga (STEC) que são microrganismos causadores de doenças entéricas e compreendem um importante grupo de patógenos emergentes associados a um largo espectro de doenças humanas, incluindo diarreias, colite hemorrágica (CH) e síndrome hemolítica urêmica (SHU)¹⁰. Este patógeno foi isolado na década de 1980 em pacientes com CH e foi associado com a ingestão de carne de hambúrguer contaminada e denominado *E.coli* O:157:H7 devido a seus antígenos somáticos e flagelar^{11,12}.

Entretanto, em 1997, pesquisadores descreveram um irreversível efeito citotóxico em células Vero. Esta citotoxina foi, inicialmente, denominada verotoxina e identificada posteriormente por Karmali *et al.* em pacientes com SHU¹³. A SHU é a principal complicação das infecções causadas por STEC, principalmente em crianças¹⁴, desenvolvendo-se em torno de 2% a 7% dos casos¹⁵. Esta síndrome caracteriza-se por anemia hemolítica microangiopática, insuficiência renal aguda e trombocitopenia, podendo se estender a outros órgãos, incluindo o sistema nervoso central¹⁶. A púrpura trombocitopenica é uma freqüente complicação em adultos¹⁴.

Hoje sabemos que as STEC possuem diversos fatores de virulência, dentre eles a produção de uma ou mais verotoxinas denominadas, atualmente, toxinas de Shiga (Stx1 e Stx2), produtos dos genes Stx1 e Stx2¹⁷ codificados por bacteriófagos lisogênicos. A estrutura e função destas toxinas são similares à toxina de Shiga produzida pela *Shigella dysenteriae* tipo 1, e pertencem ao grupo das toxinas do tipo A/B, apresentando cinco subunidades do tipo B, com 7,5 kDa e uma subunidade A, com 35 kDa¹⁷. As subunidades B são responsáveis pela ligação da toxina ao receptor globotriacilceramida (Gb3) presente nas células hospedeiras. A subunidade A cliva o rRNA eucariótico e afeta a função ribossomal, inibindo a síntese protéica na célula hospedeira. Tanto Stx1 quanto Stx2 são citotóxicas para células Vero e HeLa, enterotóxicas para coelhos e letais para camundongos, coelhos e outros animais¹⁸.

Rotineiramente o diagnóstico de STEC é realizado utilizando-se métodos microbiológicos, como cultura de fezes, provas bioquímicas e moleculares. A *E. coli* O:157:H7 possui a característica de não fermentar o sorbitol. A cultura em ágar MacConkey-Sorbitol permite a identificação deste patógeno¹⁰. Entretanto, a emergência de variantes fenotípicas do sorogrupo O:157:H7, capazes de fermentar o sorbitol, e as demais STEC, que são fenotipicamente similares às *E. coli* comensais não patogênicas, requer a utilização de outras metodologias para a sua caracterização¹⁹.

A caracterização de STEC baseada apenas nos métodos microbiológicos tradicionais seria praticamente inviável, devido ao grande número de sorotipos e ao fato da caracterização do sorogrupo não indicar se o organismo produz ou não uma ou ambas citotoxinas Stx1 e Stx2²⁰.

Os problemas associados com as técnicas fenotípicas estimularam o desenvolvimento de métodos moleculares de diagnóstico e, atualmente, muitas técnicas de diagnóstico baseadas na análise de DNA são utilizadas tanto nos laboratórios clínicos quanto nos laboratórios de referência²⁰. Porém, seu emprego na rotina de laboratórios clínicos de países em desenvolvimento é inviável, devido ao seu alto custo.

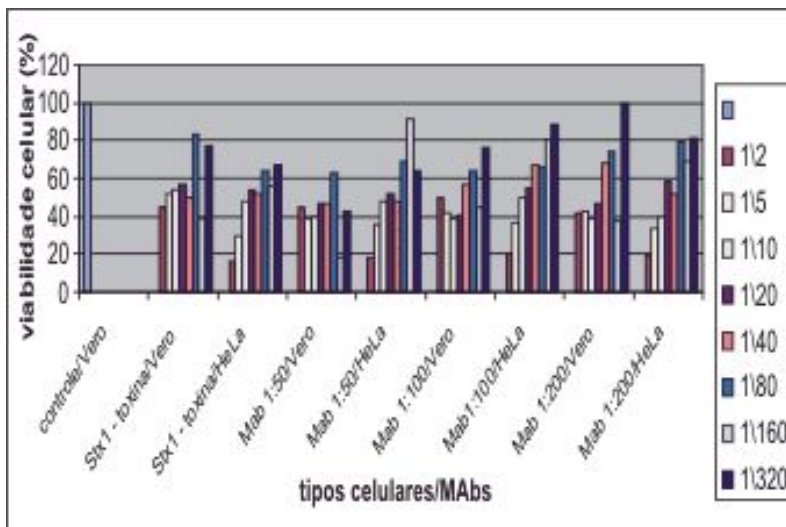
Atualmente, está disponível no mercado o VTEC-Screen "SEIKEN", método que se baseia na aglutinação de verotoxinas em partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti Stx específicos. Chart *et al.*²¹ compararam este teste com o ensaio em células Vero e observaram que ele corresponde a um método simples e rápido de detecção de Stx em sobrenadante de cultura bacteriana de fezes de pacientes infectados com STEC. O *colony immunoblot* (SIFIN GmbH, Berlin, Germany) é uma técnica recém disponível comercialmente para a detecção de colônias de STEC em placas²² e foi desenvolvida para facilitar a identificação positiva e quantificação de *E. coli* O:157:H7²³.

Como estes testes estão disponíveis comercialmente e não requerem materiais específicos, têm sido utilizados com frequência na rotina laboratorial em diferentes países²³. Isso, entretanto, não acontece em países em desenvolvimento, pois esses *kits* são extremamente caros²⁴.

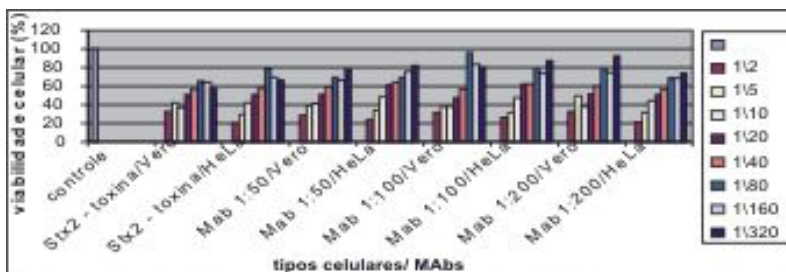
Nosso laboratório produziu e atualmente analisa anticorpos monoclonais e estão sendo utilizados na padronização de *kits* para imunodiagnóstico como: aglutinação utilizando partículas de látex, ELISA de captura, ELISA ensaio de inibição da atividade citotóxica destas toxinas por meio de anticorpos monoclonais em células Vero e HeLa pelo método de captura de Vermelho Neutro de amostras de origem clínica, na tentativa de suprir as nossas necessidades^{25,26,27}.



Figura 2. Ensaio de inibição da citotoxicidade por captura de Vermelho Neutro, utilizando anticorpos monoclonais para as toxinas Stx1 e Stx2 em placas de cultura de células de 96 orifícios. As toxinas foram diluídas de 1:2 a 1:320.

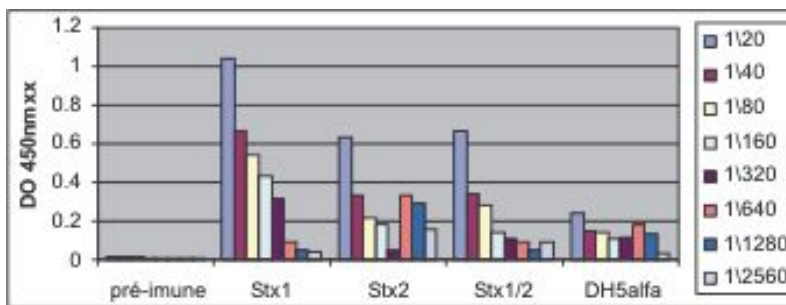


Comparação do potencial de inibição anti Stx1 (Mabs) em células Vero e HeLa



Comparação do potencial de inibição anti Stx2 (MABs) em células HeLa e Vero

Por meio de ELISA de captura utilizando anticorpos monoclonais anti Stx1 e Stx2 produzidos em nosso laboratório e soro policlonal de coelho para estas toxinas pudemos detectar no sobrenadante de cultura de bactérias as toxinas secretadas em amostras de origem clínica. No ensaio padronizado observamos 98% de sensibilidade e 99,8% de especificidade. Utilizamos como controle sobrenadantes de cultura de bactérias *E.coli* DH5 alfa.



ELISA de captura utilizando anticorpos monoclonais produzidos no laboratório para as toxinas Stx1 e Stx2 de amostras de origem clínica.

Quando utilizamos técnicas para imunodiagnóstico, existe a necessidade de utilizarmos mais de um ensaio no laboratório. Em nossos estudos a técnica de ELISA foi capaz de detectar as toxinas Stx1 e Stx2 em algumas amostras; entretanto, pudemos observar uma diferença quando avaliamos as mesmas amostras pelo ensaio de inibição de citotoxicidade em células HeLa ou Vero. Podemos atribuir esta diferença ao fato de a quantidade de toxina produzida ser insuficiente para detecção por este método, uma vez que são necessárias nanogramas no ensaio de ELISA por mililitro de toxina para a realização da análise, enquanto a quantidade de toxina produzida pode ser adequada para o ensaio citotóxico em células, pois picogramas por mililitro podem ser detectados em

ensaios de citotoxicidade em células Vero ou HeLa. Os ensaios realizados em células com as toxinas Stx1 e Stx2 revelaram que as mesmas geram alterações morfológicas celulares irreversíveis até a concentração de $1 \times 10^7 \mu\text{g}$.

O teste de citotoxicidade por meio de captura de Vermelho Neutro, utilizando células HeLa ou Vero, num estudo comparativo frente a diferentes períodos de exposição destas células a diferentes diluições de Shiga toxina produzida por *E.coli* avaliando o potencial de inibição frente a anticorpos monoclonais ou policlonais, apresentou uma boa reprodutibilidade. Entretanto, mais estudos são necessários para a validação do método.

Atualmente, os métodos de detecção para este patógeno são:

a) **Coprocultura** – Fezes de pacientes com diarreia sanguinolenta devem ser cultivadas em placas contendo agar MacConkey com sorbitol (SMAC). Após um período de incubação de 18-24 horas, colônias não fermentadoras (ou fermentadoras tardias) de sorbitol devem ser repicadas em meios de diagnóstico presuntivo (IAL, Kligler, TSI) e incubadas por 18-24 horas a 37°C.

Caracterização bioquímica e sorológica – Colônias que apresentarem reações bioquímicas compatíveis com *E.coli* deverão ser submetidas ao teste de aglutinação em lâmina utilizando o anti-soro específico O157. Todas as cepas que apresentarem uma aglutinação franca e rápida deverão ser confirmadas pelo teste de aglutinação em tubo. Cepas confirmadas como *E.coli* O157 deverão, a seguir, ser repicadas no meio semi-sólido para ativação da motilidade e posterior caracterização dos antígenos flagelares.

Caracterização de cepas O157 – Todas as cepas identificadas como O157:H- e O157:H7 deverão ser submetidas a: (1) teste de hibridização com as sondas Stx1 e Stx2; (2) verificação da produção da verotoxina em cultivo celular; (3) teste de neutralização.

b) **Detecção pelo teste de aglutinação com partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti O157** – As colônias sorbitol negativas deverão ser cultivadas em meio de diagnóstico presuntivo e cultivadas em meio líquido (TSB) e submetidas ao teste de látex. Colônias que apresentarem reação positiva deverão ser caracterizadas conforme descrito acima.

Técnicas de imunodiagnóstico estão também sendo avaliadas em nosso laboratório, utilizando os protozoários *Gardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum*. De distribuição geográfica muito ampla, com predomínio nas regiões de clima quente e temperado, a giardíase tem se mostrado mais freqüente, apresentando altas taxas de prevalência nos países em desenvolvimento, onde as condições de higiene, habitação e saneamento básico são, na maioria das vezes, bastante precárias. Esta protozoose vem adquirindo, através dos anos, grande importância do ponto de vista de saúde pública, por atingir populações de todas as raças, de ambos os sexos e de todas as faixas etárias, independente da classe socioeconômica a que pertencem, sendo, porém, mais freqüente em pré-escolares e escolares.

A veiculação hídrica da doença é apontada como a principal fonte de infecção. Em trabalhos recentes, a giardíase foi reconhecida como uma infecção sexualmente transmitida, alcançando índices elevados de prevalência em certos grupos de homossexuais masculinos. Atualmente, outra importante via de transmissão da giardíase que tem sido relatada é a de pessoa a pessoa, ocorrendo principalmente em comunidades fechadas, como creches e orfanatos, com elevados índices de prevalência.

No Brasil, em especial no Estado de São Paulo, a giardíase vem se constituindo um importante problema de saúde pública em razão de sua alta prevalência, principalmente em crianças até 12 anos^{28,29,30}.

Recentemente, com a produção de anticorpos monoclonais, analisamos 16 amostras de crianças com idades entre 4 e 24 meses de um surto ocorrido, em 2005, numa creche em Avaré (SP). Do total de amostras, oito mostraram-se negativas para enteroparasitas e oito positivas exclusivamente para *G. lamblia*. O diagnóstico foi feito na Seção de Enteroparasitoses do Instituto Adolfo Lutz, pelos métodos de rotina (Sedimentação Espontânea, formol-éter modificado, Rugai e col. e coloração específica para coccídeos intestinais). As

amostras, em conjunto com um material purificado positivo para *G. lamblia*, foram utilizadas para a realização da técnica de Dot-ELISA, usando anticorpo monoclonal anti *G. lamblia* proveniente de fusões de células de mieloma Sp2/0 com células de linfonodos de camundongos imunizados com parasito purificado.

A eficiência da técnica de imunofluorescência, tão bem como a técnica de Dot-ELISA, foi avaliada usando-se diferentes concentrações de oocistos aplicados (2µl) em membrana de nitrocelulose de 0,22µc de diâmetro. O método foi sensível, permitindo detectar com alta sensibilidade e especificidade na quantidade de 5X10³ cistos em (2µl) com o anticorpo monoclonal diluído a 1:1000. Em conclusão, nosso estudo mostrou que o método de Dot-ELISA é claramente um método viável e rápido para a detecção de *G. lamblia* em amostras fecais de origem clínica. Ainda com o uso deste anticorpo monoclonal padronizamos a técnica de imunofluorescência³¹⁻³⁶.

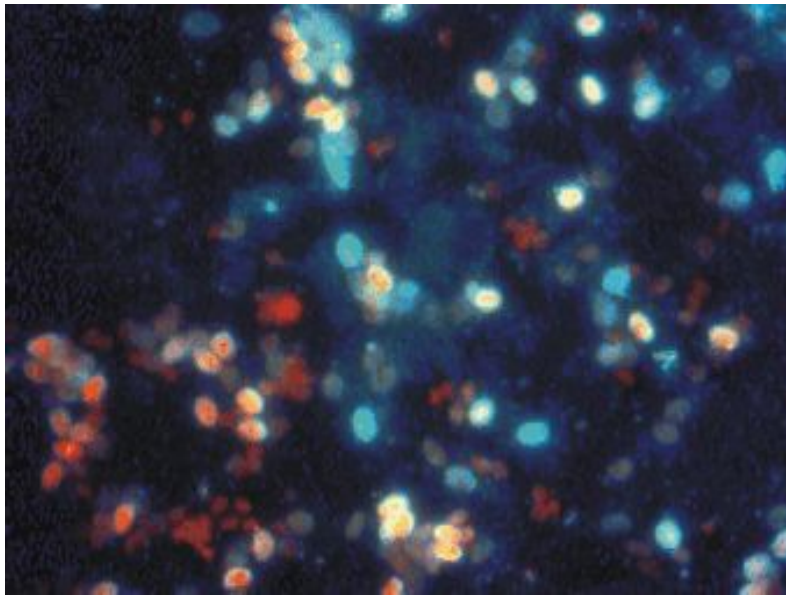


Figura 3. Padrão apresentado pela Reação de Imunofluorescência utilizando amostras de *G. lamblia* de um surto ocorrido em 2005 numa creche em Avaré e anticorpo monoclonal

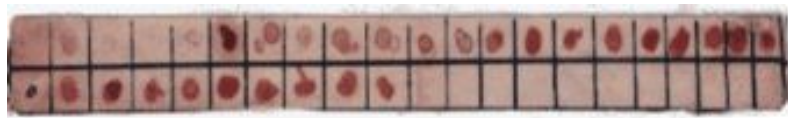


Figura 4. Técnica de Dot-ELISA empregando diferentes amostras clínicas de *G.lamblia*

Reação positiva com as amostras (coloração marrom) utilizando anticorpo monoclonal para a detecção.

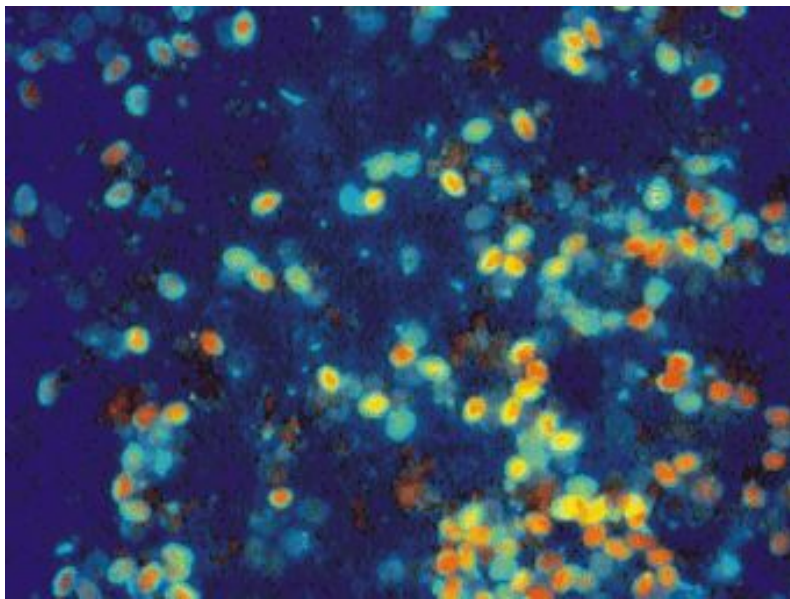


Figura 5. Reação de Imunofluorescência indireta
Padrão apresentado pela reação negativa com *G.lamblia* em amostra de origem clínica

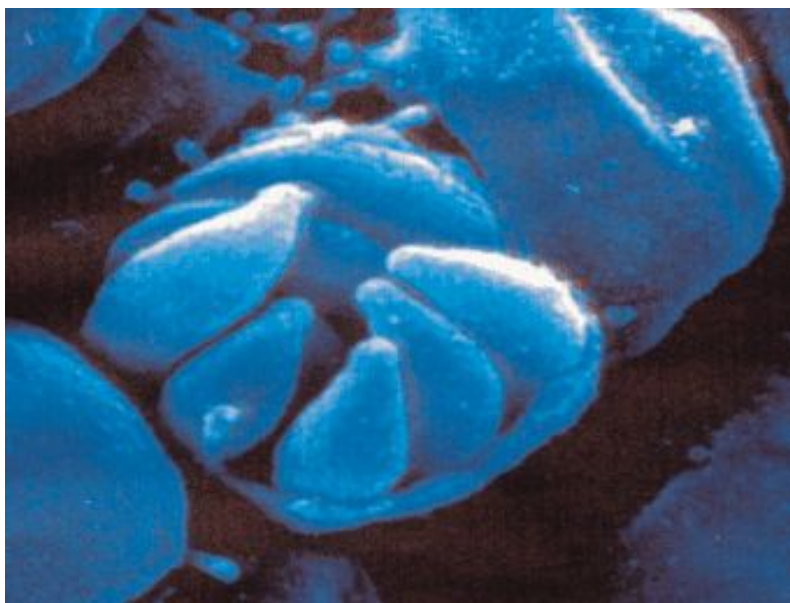
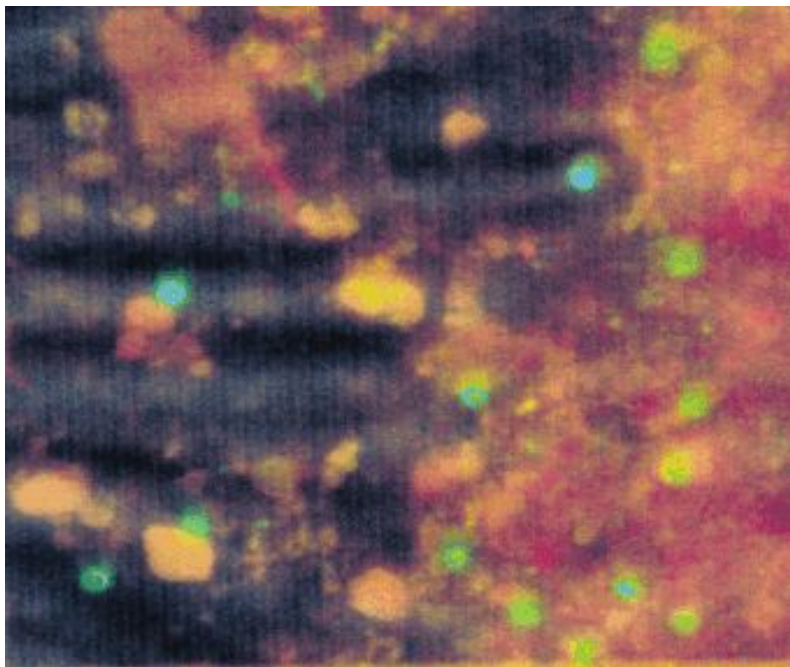
Os protozoários do gênero *Cryptosporidium* são parasitos que completam seu ciclo biológico na superfície de células epiteliais dos tratos gastrintestinal, respiratório e urinário de mamíferos, aves, répteis e peixes. Após sua primeira descrição em 1907, por Tyzzer, a criptosporidiose foi considerada, até recentemente, uma enfermidade rara e oportunista, sendo poucos os relatos de casos associados à presença de sinais clínicos.

Anderson *et al*⁷ ressaltaram a importância da criptosporidiose em termos de saúde pública, descrevendo o caso de uma estudante de Medicina Veterinária que entrou em contato com bezerros portadores da criptosporidiose intestinal. Os sintomas surgiram cinco dias após o contato inicial, consistindo de náusea, diarreia e febre, evoluindo para dor abdominal, calafrios e sudorese. Os exames de fezes realizados aos 9, 10 e 11 dias foram positivos para *Cryptosporidium* sp., tornando-se negativos aos 13 dias.

Os resultados dos inquéritos epidemiológicos de criptosporidiose em bovinos são muito variáveis. No entanto, é sabido que esta enfermidade determina alta morbidade. Kirkpatrick³⁸, revisando dezenas de trabalhos sobre o assunto, encontrou taxas de morbidade em bezerros variando entre 10% a 85%, com uma média de 25%. Em outro trabalho, Garber *et al*⁹, examinando amostras fecais de 7.369 bezerros provenientes de 1.103 fazendas, encontrou oocistos de *Cryptosporidium* sp. em 652 (59,1%) propriedades e em 1.642 (22,4%) animais estudados. Quase a metade dos bezerros com idade variando entre 7 e 21 dias apresentou oocistos de *Cryptosporidium* sp. em suas fezes. A maior prevalência foi observada na época de verão. Maldonado-Camargo *et al*⁴⁰, estudando 31 fazendas leiteiras em três estados do México, observaram que a idade dos bezerros foi fortemente associada ao grau de infecção por oocistos de *C. parvum*, já que os animais com 15 dias de idade possuíam as maiores taxas de infecção.

A contaminação do ambiente é geralmente alta, pois, segundo Angus⁴¹, um bezerro chega a eliminar até dez milhões de oocistos por grama de fezes. Nos últimos anos, houve uma maior preocupação com relação ao risco potencial de contaminação dos reservatórios de água de consumo por *C. parvum*.

Com a produção de anticorpos monoclonais para *C.parvum* na Seção de Imunologia do IAL estamos avaliando, por meio de imunofluorescência, ELISA, Dot-ELISA, amostras de origem clínica.



C.parvum

A pesquisa de novos métodos mais sensíveis para acelerar e simplificar os procedimentos na detecção de microrganismos enteropatogênicos veiculados pela água e alimentos tem se constituído em grande preocupação, não só no campo da microbiologia como também da parasitologia. Tradicionalmente, a detecção da maioria dos patógenos em amostras de material biológico, água, esgoto e alimentos envolve o uso de uma variedade de meios de enriquecimento e meios seletivos, testes bioquímicos e sorológicos. As técnicas de cultivo convencional consomem muito tempo, requerem quantidades significativas de meios de cultura e, em alguns casos, necessitam de técnicos altamente qualificados⁴².

O desenvolvimento e a aplicação de métodos rápidos têm sido de grande importância para os órgãos de saúde, especialmente quando necessárias medidas para controlar a disseminação de doenças epidêmicas. Dentro desse propósito, na última década foram desenvolvidos métodos imunológicos e de biologia molecular para complementar os métodos convencionais disponíveis.

Entre os métodos imunológicos, os testes de coagulação, ELISA e imunofluorescência têm sido aplicados como métodos rápidos para a detecção de patógenos, tais como *V.cholerae*, *Salmonella* e *Shigella* em fezes e alimentos^{43,44,45,42,46}. Esses ensaios são comumente realizados diretamente dos caldos de enriquecimento, sendo possível obter resultados em um curto prazo de tempo (máximo de 20 horas).

Com a tecnologia dos anticorpos monoclonais, essas metodologias foram implementadas tornando-se mais sensíveis e específicas. Entretanto, atualmente, nos deparamos com um grande problema que é a disponibilidade desses reagentes. O Brasil não dispõe de autonomia para a produção desses anticorpos para fins diagnósticos na rotina, sendo necessário importar o reagente, muitas vezes por um preço que não condiz com a nossa realidade de mercado.

Problema semelhante tem sido enfrentado no campo da parasitologia para diagnóstico de *Giardia* e *Cryptosporidium*, parasitas que na última década têm sido associados aos principais agentes etiológicos de doenças de veiculação hídrica, devido, principalmente, à alta resistência dos mesmos aos processos de desinfecção⁴⁷. A técnica de imunofluorescência empregando anticorpos monoclonais é a que tem fornecido melhores resultados para detecção desses parasitas, por ser mais sensível do que os métodos tradicionais; estes, por sua vez, não conseguem detectar a fonte de infecção quando um número reduzido de parasitas está presente, tanto na água como em material biológico. Em sendo um método alternativo e de maior sensibilidade, contribuirá para eliminar os resultados falso-negativos obtidos pelos métodos utilizados rotineiramente no laboratório, além de economizar tempo e diminuir custos. Porém, encontramos no mercado, em nível internacional, poucos fornecedores desses anticorpos, o que encareceria a utilização desta técnica na rotina do laboratório.

Para minimizar este problema, a solução é a utilização da técnica de produção de anticorpos monoclonais de nosso domínio para adquirirmos auto-suficiência e podermos produzir nossos próprios reagentes, sem precisarmos depender de importação desses produtos, o que aumentaria muito a relação custo-benefício.

A detecção de cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* em amostras ambientais é a chave para se identificar uma epidemia de veiculação hídrica, determinar a densidade desses parasitas nas fontes de água e avaliar a eficácia do sistema de tratamento de água. Portanto, é vital que métodos específicos, rápidos e de alta sensibilidade estejam disponíveis para os profissionais da área de saúde pública e saneamento ambiental.

O desenvolvimento de reagentes mais específicos para esses parasitas e a disponibilidade desses reagentes no mercado nacional, a um preço mais acessível, são imprescindíveis para dominarmos essas técnicas e conduzirmos estudos ambientais sobre a presença de enteroprotzoários em nossos corpos hídricos e avaliar o risco dessas águas na veiculação destes agentes, além de sua utilização em amostras biológicas de pacientes com suspeita clínica destas protozooses.

O *V. cholerae* e a *E.coli* O157:H7 são microrganismos importantes do ponto de vista da saúde pública e de higiene dos alimentos. A determinação do *V.cholerae* e da *E.coli* O157:H7 em alimentos, tais como verduras a serem consumidas cruas, moluscos bivalves e carnes bovinas, permitirá avaliar a presença (prevalência, ocorrência) destes patógenos como alerta epidemiológico e para a adoção das medidas sanitárias pertinentes. A análise de moluscos bivalves e de verduras é fundamental, pois estes dois produtos indicam tanto a disseminação do agente no meio ambiente como a possibilidade de ocorrência de doenças (avaliação de risco microbiológico por estes agentes). No aspecto analítico, o uso de anticorpos monoclonais, comparado com os métodos de referência de isolamento das bactérias, terá como finalidade verificar a eficiência e eficácia dos mesmos.

Dentro do programa da monitorização da cólera, a Seção de Microbiologia de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz participa da vigilância de pescados e moluscos bivalves desde 1991, analisando amostras correspondentes às coletas semanais de pescados da região litorânea, em especial São Vicente e Cananéia. Entre as 6.000 amostras analisadas, desde a implantação desse programa, já foram isoladas algumas cepa de *Vibrio cholerae* O1. Por outro lado, a vigilância de portos e aeroportos, realizada através da análise de amostras coletadas das aeronaves (alimentos, dejetos), permitiu o isolamento do *V.cholerae* O1 toxigênico.

Embora no Brasil ainda não haja notificação do isolamento de *E.coli* O157:H7 de alimentos, estudos realizados pela Organização Pan-americana da Saúde (Opas) sobre alimentos comercializados em vias públicas relatam o isolamento de *E.coli* O157:H7 verotoxigênica na Nicarágua, mostrando a importância da monitoração destes produtos. Por outro lado, na Argentina, em 1996, foi relatado o isolamento de três cepas de *E.coli* O157:H7 dentre 740 amostras de carne bovina. A contínua vigilância da presença deste microrganismo, sobretudo na carne bovina, é extremamente importante, considerando o intenso intercâmbio comercial entre a Argentina e o Brasil. E em 1998, o isolamento de uma cepa de *E.coli* O157:H7 em água de poço localizado na periferia da cidade de São Paulo.

Os graves sintomas da infecção por *E.coli* O157:H7 têm efeitos na saúde das crianças e de idosos. Por consequência, as organizações de saúde pública necessitam de métodos rápidos e de baixo custo para um diagnóstico precoce e detecção de *E.coli* O157:H7 em amostras clínicas, de alimento e de água. Esta necessidade pode ser suprida pela produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno específico (LPS) de *E.coli* O157:H7 e para as suas toxinas.

O objetivo deste projeto é alcançar a auto-suficiência na produção de anticorpos monoclonais a serem utilizados no diagnóstico de algumas infecções entéricas de importância em saúde pública. 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.

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 (Pesquisador Científico VI), da Seção de Imunologia do IAL.

Agradecimentos

Há quatro anos o presente trabalho vem sendo desenvolvido e tem como importância a iniciativa, dedicação e integração de vários Laboratórios do Instituto Adolfo Lutz. A seriedade e os avanços dos conhecimentos proporcionados pelo nosso grupo despertaram o interesse e a colaboração do USA na área de saúde pública para diferentes patógenos neste projeto. Contamos ainda com a colaboração de pesquisadores como: Dra Mioko Jakabi, Dra Dilma S Gelli da Seção de Microbiologia Alimentar, Dr Pedro L S Pinto da Seção de Parasitologia, Dra Áurea Cruz da Seção de Coleção de Cultura de Células do Departamento de Virologia, as Assistentes de apoio Técnico à Pesquisa, Ligia Maria Bozzoli, Seção de Imunologia, e Monica C G Scola da Seção de Coleção de Bactérias, Divisão de Biologia Médica. Atualmente contamos com a participação do Dr. Rodrigo Martins Soares do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Universidade de São Paulo. Na Seção de Imunologia contamos com a participação em nosso grupo de outros integrantes dando apoio neste projeto além dos seus projetos em diferentes áreas do conhecimento os alunos de Doutorado Túlio Nakazato Cunha e Luciana Botelho Chaves os alunos de mestrado Tatiane Ferreira, Marta de Almeida, Maria Verônica dos Santos, Mariana Teixeira, Claudia F Tunes do Programa de Pós Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Aline Seneme Ferraz e Andréia M dos Santos Carmo alunas do Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública) e recentemente contamos com a colaboração da aluna da Bolsista Daniela de Lima Franco do Programa de Aprimoramento Profissional (PAP) em Imunologia, do Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças, da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo – PAP/IAL/CCD/SES-SP e futura aluna de Mestrado (março de 2007) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, área de Análises Clínicas da Universidade de São Paulo. O projeto também proporcionou recursos para o treinamento dos alunos de iniciação Científica como André Yoshio Ito, Simone Néri, Dimitri Marimoto e Matheus Diniz Gonçalves Coelho. Todos os alunos são orientados pela Dra Elizabeth N De Gaspari em diferentes programas de pós graduação. Gostaríamos de agradecer todo o corpo técnico do Hospital Emilio Ribas SP/SP pelo apoio e colaboração.

Referências bibliográficas

1. Brasil. Fundação Nacional da Saúde (Funasa). Ministério da Saúde. Manual Integrado de Prevenção e Controle da Cólera, 1994.
2. Kaper JB, Morris JG e Levine MM. Cholera. **Clin. Microbiol. Rev.**, 1995; 8:48-86.
3. Kaper JB; Lockman H, Colwell RR e Joseph SW. Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1979; 37:91-103.
4. DePaola A, Copers GM e Motes MT. Isolation of Latin American epidemic strain of *Vibrio cholerae* O1 from US gulf coast. **Lancet**, 1992; 339:624.
5. Tamplin ML, Gauzens AL, Huq A, Sack DA e Colwell RR. Attachment of *Vibrio cholerae* serogroup O1 to zooplankton and phytoplankton of Bangladesh waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1990; 56:1977-1980.
6. Islam ML, Drasar BS e Sack RB. Ecology of *Vibrio cholerae*: role of aquatic fauna and flora. In: Cholera and the Ecology of *Vibrio cholerae*. Ed. Drasar BS & Forrest BD. Chapman & Hall. London 1996; p. 187-227.
7. Ristori, CA, Rowlands REG, Jakabi M, Gelli DS, De Gaspari EN. Anticorpo Monoclonal: Detecção de *Vibrio cholerae* O1 em Ostras. In: VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz "Saúde Pública, Pesquisa e Responsabilidade Social", 2005. São Paulo (São Paulo). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2005; v. 64. p. 67-67 (a).
8. Ristori CA, Rowlands REG, Jakabi M, Gelli DS e De Gaspari EN. Use of Monoclonal Antibody Against *Vibrio Cholerae* Serovar O1. In: 6th Annual Meeting (Federation of Clinical Immunology Societies), 2006. San Francisco (California). **Clin. Immunol.**, 2006; v. 119. p. 153-153 (b).
9. Ristori CA, Rowlands REG, Jakabi M, Gelli DS, Scolla M CG e De Gaspari EN. Detecção de *Vibrio cholerae* O1 em ostras utilizando anticorpo monoclonal em ensaio de aglutinação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2006; v. 65(1) in press.
10. Paton JC e Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Clin. Microbiol. Rev.**, 1998; 11:450-479.
11. Knight P. Haemorrhagic *E.coli*. The Danger Increases. **ASM News**, 1993; 59:247-250.
12. OMS. Organização Mundial da Saúde. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting, 1998.
13. Karmali MA, Steele BT, Petri M e Lim C. Sporadic cases of haemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Lancet**, 1983; 1:619-620.
14. Martin D, MacDonald KL, White JL, Soler JT e Osterholm MT. The epidemiology and clinical aspects of the hemolytic uremic syndrome in minnesota. **N. Engl. J. Med.**, 1990; 323:1161-1167.
15. OMS. Organização Mundial da Saúde. Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. 1997.
16. Kaplan BS e Proesmans W. The hemolytic uremic syndrome of childhood and its variants. **Semin. Hematol.**, 1987; 24:1460-1480.
17. Schmitt CK, Mckee ML e O'Brien AD. Two copies of Shiga-like toxin II- related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H- strain E32511. **Infect. Immun.**, 1991; 59:1065-73.
18. O'Brien AD e Holmes RK. Shiga and Shiga-like toxins. **Microbiol. Rev.**, 1987; 51:206-220.
19. Feng P. *Escherichia coli* serotype O157:H7: novel vehicles of infection and emergence of phenotypic variants. **Emerg. Infect. Dis.**, 1995; 1:47-52.
20. Arbeit rd. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC e Tenover RH. Manual of Clinical Microbiology, 1999. 7ª. ed. ASM Press. P 116-137.
21. Chart H, Willshaw GA e Cheasty T. Evaluation of a reverse passive latex agglutination test for the detection of verocytotoxin (VT) expressed by strains of VT producing *Escherichia coli*. **Let. Appl. Microbiol**, 2001; 32:370-374.
22. Ruger HJ, Karch H, Timm M, Richter H, Musielski H, Ruger K, Pollex G, Mohr J. Development and evaluation of a colony immunoblot assay for isolation of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. DGHM Congress, Aachen. Intern. **Jour. Med. Microbiol**, 2001; 291:5-8.
23. Bettelheim KA, Beutin L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). **J. Appl. Microbiol.**, 2003; 95:205-220.
24. Strockbine NA, Wells JG, Bopp CA e Barrett TJ. Overview of detection and subtyping methods. In:

- Escherichia coli* O:157:H7 and other Shiga toxin producing *E.coli* strains. Kaper JB e O'Brien AD (editores). Washington: American Society for Microbiology, 1998; pp.331-356.
25. Ferreira T, Scolla MCG, Cruz AS e De Gaspari EN. Teste de citotoxicidade por captura do Vermelho Neutro avaliando potencial de inibição por anticorpos monoclonais e policlonais em células HELA expostas a Shiga Toxinas. *In: VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz Saúde Pública, Pesquisa e Responsabilidade Social*, 2005. São Paulo (São Paulo). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2005; v. 64. p. 147-147 (a).
 26. Ferreira T, Scolla MCG, Cruz AS e De Gaspari EN. Produção de Anticorpos Monoclonais para as Toxinas STx1 e STx2 (STEC): Ensaio de Inibição da Citotoxicidade em Células HELA. *In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 2005. Santos (São Paulo), 2005; p. 947-1 (b).
 27. Ferreira T, Scolla MCG, Cruz AS e De Gaspari EN. Cytotoxin Neutralization and Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for *Escherichia coli* toxins. *In: 6th Annual Meeting (Federation of Clinical Immunology Societies)*, 2006. San Francisco (California). **Clin. Immunol.**, 2006; v. 119. p. 178-179.
 28. Chieffi PP, Waldman EA, Waldman CCS, Sakata EE, Gerbi LJ, Rocha AB e Aguiar PR. Aspectos epidemiológicos das enteroparasitoses no Estado de São Paulo. **Rev. Paul. Med.**, 1982; 99:34-6.
 29. Monteiro CA, Chieffi PP, Benicio MHA, Dias RMD, Torres DMAGV e Mangini ACS. Estudo das condições de saúde das crianças do Município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. VII Parasitoses intestinais. **Rev. Saúde Públ.**, 1988; 22:8-15.
 30. Torres DMAGV, Chieffi PP, Costa WA e Kudzielies E. Giardíase em creches mantidas pela Prefeitura do Município de São Paulo, 1982/1983. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 1991; 33(2):137-42.
 31. Bozzoli LM, Araújo AJUS e De Gaspari EN. Evaluation of a rapid screening assay for *Cryptosporidium* identification (Dot-ELISA) using monoclonal antibodies. *In: Proceedings of the IXth International Coccidiosis Conference*, 2005. Foz do Iguaçu (Paraná) 2005. P. 181-182 (a).
 32. Bozzoli LM, Pinto PLS e De Gaspari EN. Avaliação de um método rápido para a identificação de *Cryptosporidium parvum* por meio de (Dot-ELISA) com anticorpos monoclonais em fezes de bezerro. *In: VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz Saúde Pública, Pesquisa e Responsabilidade Social*, 2005. São Paulo (São Paulo). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2005; v. 64. P. 146-146 (b).
 33. Bozzoli LM, Pinto PLS e De Gaspari EN. ELISA de captura para *Cryptosporidium parvum* em amostras de fezes de bezerro com anticorpos monoclonais. *In: VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz Saúde Pública, Pesquisa e Responsabilidade Social*, 2005. São Paulo (São Paulo). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2005. v. 64. P. 146-146 (c).
 34. Bozzoli LM, Quadros CS, Torres D, Pinto PLS e De Gaspari EN. Avaliação de um ensaio rápido para a identificação de cistos de *Giardia lamblia* em amostras de crianças com anticorpos monoclonais. *In: VI Encontro do Instituto Adolfo Lutz Saúde Pública, Pesquisa e Responsabilidade Social*, 2005. São Paulo (São Paulo). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2005; v. 64. P. 147-147 (d).
 35. Bozzoli LM, Torres D, Pinto PLS e De Gaspari EN. Development and Application of Enzyme-linked Immunosorbent and Dot-ELISA for detection *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* Oocysts in human fecal Specimens. *In: 6th Annual Meeting (Federation of Clinical Immunology Societies)*, 2006. San Francisco (California). **Clin. Immunol.**, 2006; v. 119. P. 191-191(a).
 36. Bozzoli LM, Soares RM, Pinto PLS, Torres D e De Gaspari EN. Development and Application of Enzyme-linked Immunosorbent and dot-ELISA for detection *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. *In: XXXI Meeting of the Brazilian Society for Immunology -Signaling in Immune System*, 2006. Búzios (Rio de Janeiro). P. 111-111, 2006 (b).
 37. Anderson BC *et al.* Cryptosporidiosis in a veterinary student. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 1982; v.180, p.408-409.
 38. Kirkpatrick CE. *Cryptosporidium* infection as cause of calf diarrhea. *Vet Clin North Am: Food Anim. Pract.*, 1985; v.1, nº 3, p.515-528.
 39. Garber LP *et al.* Potential risk factor for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 1994; v.205, n.1, p.86-91.
 40. Maldonado-Camargo S *et al.* Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Friesian dairy calves in central Mexico. **Prev. Vet. Med.**, 1998; v.36, nº 2, p.95-107.
 41. Angus KW. Cryptosporidiosis in domestic animals and humans. *In: Practice*, London, 1987; v.9, p.47-49.
 42. Rohner P, Dharan S e Auckenthaler R. Evaluation of the Wellcolex Colour *Salmonella* Test for detection of *Salmonella* spp. in enrichment broths. **J. Clin. Microbiol.**, 1992; 30:3274-3276.

43. Holbrook R, Anderson JM, Baird-Parker AC, Dodds LM, Sawhney D, Stuchbury SH e Swaine D. Rapid detection of salmonella in foods – A convenient two-day procedure. **Lett. Appl. Microbiol.**, 1989; 8:139-142.
44. Metzler J e Nachamkin I. Evaluation of a latex agglutination test for the detection of *Salmonella* and *Shigella* spp. by using broth enrichment. **J. Clin. Microbiol.**, 1988; 26:2501-2504.
45. Nishikawa Y, Hase A, Ishii E e Kishi T. Screening of aquatic samples for *Vibrio cholerae* serotype O1 by a dot-blot method and a latex agglutination test. **Appl. Environ. Microbiol.**, 1990; 56:1547-1550.
46. Shaffer N, Santos ES, Andreason P e Farmer III JJ. Rapid laboratory diagnosis of cholera in the field. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, 1989; 83:119-120.
47. Zu SX, Fang GD, Fayer R e Guerrant RL. Cryptosporidiosis: Pathogenesis. **Parasitol. Today**, 1992; 8:24-7.

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:



Bepa
Av. Dr. Arnaldo, 351 - 1º andar, s. 135
São Paulo - SP - tels.: (11) 3066-8823 / 3066-8825
e-mail: bepa@saude.sp.gov.br

Fale conosco

