



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E
APLICADA**

JENIFFER CLORIVES LOPES BATISTA

**Novas ferramentas e imunoensaios para detecção de *Escherichia coli*
diarreogênicas e *Shigella flexneri***

**MANAUS-AM
2024**

JENIFFER CLORIVES LOPES BATISTA

Novas ferramentas e imunoensaios para detecção de *Escherichia coli* diarreogênicas e *Shigella flexneri*

Tese apresentada à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção de título de Doutora.

Orientador: Dr. Luís André Moraes Mariúba

Coorientadora: Dra. Juliane Corrêa Glória

**MANAUS-AM
2024**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B333n	<p>Batista, Jeniffer Clorives Lopes Novas ferramentas e imunoensaios para detecção de Escherichia coli diarréogênicas e Shigella flexneri / Jeniffer Clorives Lopes Batista . 2024 146 f.: il. color; 31 cm.</p> <p>Orientador: Luis André Morais Mariúba Coorientador: Juliane Corrêa Glória Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.</p> <p>1. Doenças diarreicas. 2. Enterobactérias. 3. Imunoensaio. 4. Esferas magnéticas. 5. Quantum dots. I. Mariúba, Luis André Morais. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>
-------	--

*Vanderléa e Moacy,
meus pais,
Juliane e André,
meus orientadores,*

Dedico

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”.

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela vida!!! Èpa Babà!!! Entre todos os momentos de alegria, dor, conquista, perda, acertos, erros, de breu e luz, Tu estavas comigo. E com isto, à minha espiritualidade ancestral em especial: Odoyà!! Ogunhê!! Laroyê!! Aos caboclos que acompanharam meu orì até a chegada deste dia: Okê caboclo!!! Salve o povo da mata!! Salve o povo d'Água!! Salve o povo da rua!! Salve as crianças!! Salve vovô e vovó!!!

Aos meus queridos pais, Vanderléa e Moacy, por todo o amor, incentivo e apoio na busca de uma qualidade de vida melhor, através dos estudos.

Aos avós, Dona Clorives e ao Sr. Joaquim, Dona Maria e Sr. Manoel, pelo afago e valiosos conselhos e afetos. Encontrei em vocês conhecimentos e entendimentos que só se encontram na biblioteca da vida.

Aos irmãos, o mais velho: Jonathan, com o qual eu aprendi a ler e entender o sentido de lealdade; aos mais novos: Vandercy e Miléa, com os quais comprehendi os primorosos cuidados de nossos pais para conosco. Às irmãs do meio: Angleicirene e Luana, com as quais aprendi que há irmãos mais chegados que amigos.

Aos queridos amigos, Débora Martins, Ademir Bernardes, Késsia Caroline, Lorrane e Diego, Aryana, Andréa, Maria Antônia, Maria Solange, Luiz Fernando, pela lealdade e apoio nessa caminhada. Vocês são a prova de que sorrisos devem ser compartilhados e pesos não precisam ser carregados sozinhos.

Aos meus queridíssimos orientadores, Dr. André Mariúba e Dra. Juliane Glória, os melhores que a vida me propôs! O voto de confiança e a oportunidade de realizar um trabalho como o nosso trouxeram-me o entendimento de que ciência não se faz só, apesar de ser uma caminhada solitária. Além da excelência e competência científico-acadêmica que oferecem, toda compreensão, paciência, humildade e humanidade foram essenciais para a realização deste trabalho. Conseguí graças a vocês!!!

Aos caríssimos colegas de trabalho: Yury Chaves, Ivanildes Bastos, Edilene Martins, Caio Coutinho, João Verçosa, Fernanda Batalha, Daniele Mota, Alice Alencar, Aline Rubens, Gabriela Vasconcelos, Yuri Sam, Joy, Eliza Raquel, Darleide, André Corado e Mavi Corado. As personalidades gentis e de grande carisma são inspiradoras e garantiram um percurso recompensador.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane, da Fundação Oswaldo Cruz (ILMD-FIOCRUZ) e toda sua equipe, em especial: Dona Jura, Michele, Marinete, Marizete, Lúcio, Darlison, Joabe,

Aryadina, Ícaro, Raimundo, Sebastião e Wasley. Graças a todos vocês, tivemos o privilégio de um suporte sólido para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colaboradores, Dra. Paula Taquita e Dr. Diogo Castro e toda a equipe *EZscience eirele*: a primeira Startup de biotecnologia fruto do grupo de pesquisa DCDIA (Laboratório de Controle e Diagnóstico de Doenças Infecciosas na Amazônia); grupo liderado na época pelos professores doutores Patrícia Puccinelli e Paulo Nogueira, do Instituto Leônidas e Maria Deane, da Fundação Oswaldo Cruz (ILMD-FIOCRUZ).

Ao colaborador, professor Dr. Ricardo Andrez e toda sua equipe da Universidade do Extremo Sul Catarinense, por todo suporte e apoio através da síntese de peptídeos sintéticos ao longo desses seis anos, desde o mestrado.

À Universidade Federal do Amazonas, que através do Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA), impulsiona os jovens a aprofundarem conhecimento em Ciência e Pesquisa.

Ao PPGIBA por todo suporte administrativo, em especial à Dra. Jeruza Quintão, Dr. Antônio Boechat e nossos excepcionais secretários Edson Brazão e Ana Araújo, pelo empenho em auxiliar os discentes em todas as etapas inerentes à vida acadêmica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro concedido ao longo do desenvolvimento deste projeto.

RESUMO

As síndromes diarreicas são um problema de saúde pública, sendo a *Escherichia coli* ETEC e *Shigella flexneri* importantes patógenos causadores desta doença no mundo. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos rápidos, eficazes e precisos são essenciais para as medidas de controle. Dentre as abordagens existentes para o diagnóstico, existem os imunoensaios, os quais necessitam de moléculas capazes de interagir especificamente com marcadores de infecções. Neste cenário, a tecnologia dos anticorpos IgY tornou-se uma alternativa para a produção de anticorpos, dado os benefícios existentes em sua produção, vantagens éticas e econômicas. Este estudo buscou desenvolver e avaliar anticorpos IgY direcionados contra os抗ígenos FimH de *Shigella* sp./*E. coli* e ETpA de *E. coli* ETEC, avaliando-os por diferentes imunoensaios. O Capítulo I desta tese apresenta uma revisão que destaca os últimos estudos que relatam a utilização de esferas magnéticas em sistemas de detecção de bactérias diarreogênicas. O Capítulo II apresenta uma patente depositada no INPI que descreve um método para a produção e obtenção de anticorpos de gema de ovo (IgY) utilizando peptídeos sintéticos direcionados a抗ígenos de *Shigella* sp. e *E. coli*. No Capítulo III, apresentamos um artigo original a ser submetido, que aborda o desenvolvimento de anticorpos IgY anti-ETpA e anti-FimH aplicados a um imunoensaio utilizando esferas magnéticas e “quantum dots”, sendo a avaliação do ensaio realizada por citometria de fluxo. Trabalhos futuros buscarão aplicar as ferramentas e métodos aqui desenvolvidos em ensaios para a detecção de patógenos em amostras de pacientes, potabilidade de água para consumo e para análise de alimentos.

Palavras-chave: doenças diarreicas; enterobactérias; imunoensaio; esferas magnéticas; “quantum dots”.

ABSTRACT

Diarrheal syndromes represent a public health issue, with *Escherichia coli* ETEC and *Shigella flexneri* being significant pathogens worldwide. Therefore, the development of rapid, effective, and accurate methods is crucial for control measures. Among the existing diagnostic approaches are immunoassays, which require molecules capable of specifically interacting with infection markers. In this context, IgY antibody technology has emerged as an alternative for antibody production, given its production and economic benefits, and ethical advantages. This study aimed to develop and evaluate IgY antibodies targeted against *Shigella* sp./*E. coli* FimH and ETEC *E. coli* ETpA antigens, assessing them through various immunoassays. Chapter I of this thesis provides a review highlighting recent studies on the use of magnetic beads in diarrheagenic bacteria detection systems. Chapter II presents a patent filed with INPI describing a method for producing and obtaining egg yolk antibodies (IgY) using synthetic peptides targeting *Shigella* sp. and *E. coli* antigens. In Chapter III, we presented an original article, addressing the development of IgY antibodies against ETpA and FimH applied to an immunoassay using magnetic beads and quantum dots, with assay evaluation performed by flow cytometry. Future work will aim to apply the tools and methods developed here in assays for pathogen detection in patient samples, water potability for consumption, and food analysis.

Keywords: diarrheal diseases; enterobacteria; immunoassay; magnetic beads; quantum dots.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mortalidade por diarreia em 2016. Taxa de mortalidade em indivíduos de todas as idades (A), crianças menores de cinco anos (B) e adultos maiores de 70 anos (C)	17
Figura 2 – Frações (percentual) de patógenos específicos atribuíveis à diarreia hospitalizada em crianças menores de 5 anos entre 2017 e 2018 em Locais de Vigilância Global de Diarreia Pediátrica em 28 países de baixa e média renda.....	19
Figura 3 – Variação temporal na prevalência de diarreia causada por <i>Shigella</i> e outros enteropatógenos. De agosto de 2007 a dezembro de 2008, 1.346 crianças na faixa de 0 a 10 anos de idade foram internadas com diarreia e procuraram tratamento em três hospitais em Manaus, na região central da Amazônia brasileira. Foram coletadas amostras de fezes nas quais <i>Shigella</i> e outros enteropatógenos foram identificados por métodos clássicos. A distribuição das chuvas ao longo do período de estudo é classificada em dois níveis. Os retângulos cinza escuro representam a maior taxa de precipitação (entre 300 e 600 mm), e o cinza claro indica precipitação abaixo de 200 mm.	24
Figura 4 – Imunidade protetora da mucosa contra diarreia por ETEC. ETEC são bactérias não invasivas que aderem ao epitélio intestinal através de um ou mais de 30 FCs diferentes. A ETEC produz toxina LT e/ou toxina ST, que se liga a receptores nas células epiteliais e causa aumento de AMP cíclico (AMPc) e GMP cíclico (GMPc), respectivamente, resultando em diarreia aquosa. As vacinas orais, que são baseadas em FCs expressas na superfície das bactérias, e/ou um toxoide LT ou LT não tóxico, por exemplo, ETVAX (nome da vacina ETEC) e ACE527, são consideradas indutoras de proteção contra ETEC através da produção de IgA secretória (SIgA) contra FCs e/ou LT da vacina por células plasmáticas localizadas na lâmina própria intestinal. No lúmen, os anticorpos SIgA podem ligar-se e neutralizar CFs e LT. Os anticorpos dirigidos contra FCs bacterianas reduzem a colonização bacteriana e podem proteger também contra ETEC produtoras de ST que expressam FC. Anticorpos que se ligam a抗ígenos ETEC O e抗ígenos não canônicos, como EatA (adesina recombinante) ou EtpA (protease degradadora de mucina recombinante), também podem contribuir para a proteção.....	28
Figura 5 – Patogênese celular de <i>Shigella</i> spp.	29

Figura 6 – Imagens representativas de microscopia eletrônica de derivados da cepa M90T de *S. flexneri* contendo pACYC184 (vetor) ou pSH2 (contendo o operon Fim) (painéis A e B, respectivamente). Barra de escala, 1 µm. Painel C: Resultados de ensaios de hemaglutinação realizados na ausência ou na presença de manose 0,2 mM com a cepa de *S. flexneri* M90T contendo pSH2 ou pACYC184 33

Figura 7 – A) ETEC fazendo a ancoragem nas células hospedeiras através das pontas dos flagelos. B e C) EtpA se concentra nas pontas dos flagelos interagindo com regiões altamente conservadas de flagelina..... 35

Figura 8 – Comparação entre IgY de aves e IgG de mamíferos. As duas moléculas possuem duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, que consistem em um domínio variável (VH e VL) e domínios constantes: CH1, CH2, CH3 e CH4 no caso do IgY e CH1, CH2 e CH3 no caso do IgG. A região de dobradiça do IgG é mais longa, tornando a molécula mais flexível..... 38

Figura 9 – Resumo das semelhanças e diferenças entre os sistemas imunológicos humano e de galinha. *Presente em ambas as espécies, com menor contribuição em galinhas. † Presente em ambas as espécies, com menor contribuição em humanos 40

Figura 10 – Perfis de excitação e emissão de QDs com emissão simétrica e picos estreitos com ampla excitação em comprimento de onda entre 400 nm a 550 nm. Pico de intensidade baseado na absorbância e no tempo (ns) em relação às amostras biológicas 45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA SÍNDROME DIARREICA	16
2.2 EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL	20
2.3 ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA DE <i>Shigella</i> sp.	23
2.4 <i>Escherichia coli</i> DIARREIOGÊNICA	25
2.4.1 <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	26
2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA BACTERIANA	30
2.5.1 FimH.....	32
2.5.2 EtpA.....	33
2.6 DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS DIARREICAS	35
2.7 TECNOLOGIA IgY	38
2.7.1 Resposta imune humoral em galinhas.....	39
2.7.2 Uso de IgY em testes de diagnóstico de doenças bacterianas	41
2.8 NANOPARTÍCULAS	43
2.8.1 Pontos quânticos (Quantum dots).....	44
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
CAPÍTULO I.....	48
CAPÍTULO II.....	65
CAPÍTULO III.....	98
DISCUSSÃO GERAL.....	117
CONCLUSÕES.....	121
REFERÊNCIAS.....	123
APÊNDICES.....	138
ANEXOS.....	142

1 INTRODUÇÃO

A síndrome diarreica é um problema de saúde pública pertinente em decorrência dos elevados índices de morbidade e mortalidade no mundo (Stockmann *et al.*, 2017). Alguns entraves estão relacionados à etiologia da doença, como a dificuldade em identificar de forma eficaz e rápida os patógenos envolvidos em cada caso (Cohen *et al.*, 2022).

Até os dias de hoje, o método padrão-ouro de diagnóstico de síndromes diarreicas consiste no isolamento do microrganismo em cultura e testes bioquímicos para a identificação dos patógenos. Este, além de laborioso, requer infraestrutura sofisticada, um tempo longo e mão de obra altamente qualificada para execução. Como alternativa, encontram-se disponíveis no mercado imunoensaios, os quais, de modo geral, utilizam anticorpos como ferramentas para a captura de alvos de detecção. Contudo, as metodologias de imunodiagnóstico atualmente disponíveis apresentam limitações referentes à praticidade, sensibilidade, especificidade e tempo de entrega do resultado, a depender do método utilizado. Logo, diferentes estudos têm buscado desenvolver imunoensaios alternativos para a detecção desses patógenos (Newell; La Ragione, 2018).

O desenvolvimento de insumos para imunoensaios apresenta alguns desafios. Os anticorpos policlonais mais utilizados, por exemplo, são provenientes de mamíferos, o que aumenta a intercorrência de reatividade cruzada com fatores presentes em amostras humanas. Os anticorpos monoclonais são significativamente mais difíceis de produzir e, consequentemente, mais onerosos (Samaranayake *et al.*, 2009; Stills, 2012). Nesse contexto, uma nova classe de anticorpos também tem sido apresentada como alternativa aos anticorpos de mamíferos devido à baixa reatividade cruzada comumente relatada na literatura. Dentre estas, as imunoglobulinas do tipo Y (IgY) têm sido consideradas uma alternativa aos convencionais IgG por não apresentarem em sua estrutura química domínios de reconhecimento que ocasionam reatividades cruzadas indesejadas. Além disso, dentre outras vantagens da tecnologia, destaca-se o potencial de escalabilidade, pois esta molécula pode ser isolada a partir da gema de ovos de galinhas poedeiras (Pereira *et al.*, 2019).

Diversas abordagens têm sido exploradas em imunodiagnóstico visando a melhoria no desempenho de imunoensaios de modo geral, seja a partir do desenvolvimento de testes e equipamentos mais robustos, porém pouco acessíveis, ou através do desenvolvimento de imunossensores mais simples baseados apenas em conjugados de anticorpos e nanopartículas. Nesse contexto, as nanopartículas magnéticas e os pontos quânticos são exemplos de nanomateriais explorados nos últimos anos para amplificação do sinal de detecção (Hu *et al.*, 2021; Zhu; Sikora; Ozcan, 2012).

Uma vez que um dos principais desafios para identificação de patógenos em baixa concentração consiste no isolamento dos analitos em soluções complexas, as *beads* magnéticas surgem como uma alternativa, podendo ser acopladas a anticorpos específicos a抗ígenos-alvo (Khamlamoon; Nawattanapaiboon; Srikririn, 2023; Safarik; Safarikova, 2004; Xia *et al.*, 2021). Os “quantum dots” podem ser utilizados para o aumento da sensibilidade de imunoensaios, por serem nanopartículas com propriedades químicas e ópticas interessantes para alguns métodos de diagnóstico, pois permitem uma fotoestabilidade aumentada e emissão de fluorescência superior às convencionais (Abdellatif *et al.*, 2022; Cotta, 2020; Zhu; Sikora; Ozcan, 2012).

Em trabalhos anteriores realizados por nossa equipe, Astolpho e colaboradores (2017) desenvolveram um imunoensaio para identificação da proteína EtpA para detecção de *E. coli* diarreogênica do tipo enterotoxigênica (ETEC). Este estudo utilizou anticorpos contra uma proteína quimérica recombinante EtpA produzidos em camundongos para detecção de cepas por meio de citometria de fluxo, tendo sido capaz de identificar especificamente cepas de *E. coli* ETEC, com uma reatividade basal com outros subtipos de *E. coli*.

Logo, como continuidade deste estudo, o presente trabalho buscou o desenvolvimento de uma metodologia para produção de anticorpos IgY em ovos de galinhas baseada na imunização com peptídeos sintéticos. Além de anticorpos para detecção de *E. coli* ETEC a partir de peptídeos baseados no antígeno ETpA, produzimos e avaliamos anticorpos IgY contra FimH, antígeno compartilhado entre *Shigella* sp. e *E. coli*. Com estes anticorpos, novos imunoensaios foram criados em associação a pontos quânticos e esferas magnéticas, e a capacidade de reconhecimento destes foi confirmada por citometria de fluxo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA SÍNDROME DIARREICA

A diarreia consiste na passagem de fezes aquosas e moles por pelo menos três vezes ao dia em 24 horas. Embora as definições possam variar dependendo do estudo e suas populações distintas, é uma condição comum que pode não exigir atenção médica em casos leves (Dupont, 2014; Pakbin; Brück; Brück, 2023; Riddle; Dupont; Connor, 2016; Shane *et al.*, 2017).

São sugeridas as seguintes definições de diarreia de acordo com a duração dos sintomas: diarreia aguda (14 dias ou menos), diarreia persistente (mais de 14 dias e menos de 30 dias), diarreia crônica (mais de 30 dias) (Beaugerie; Sokol, 2013) e recorrente (diarreia que reaparece após 7 dias sem diarreia) (Hiyoshi *et al.*, 2018).

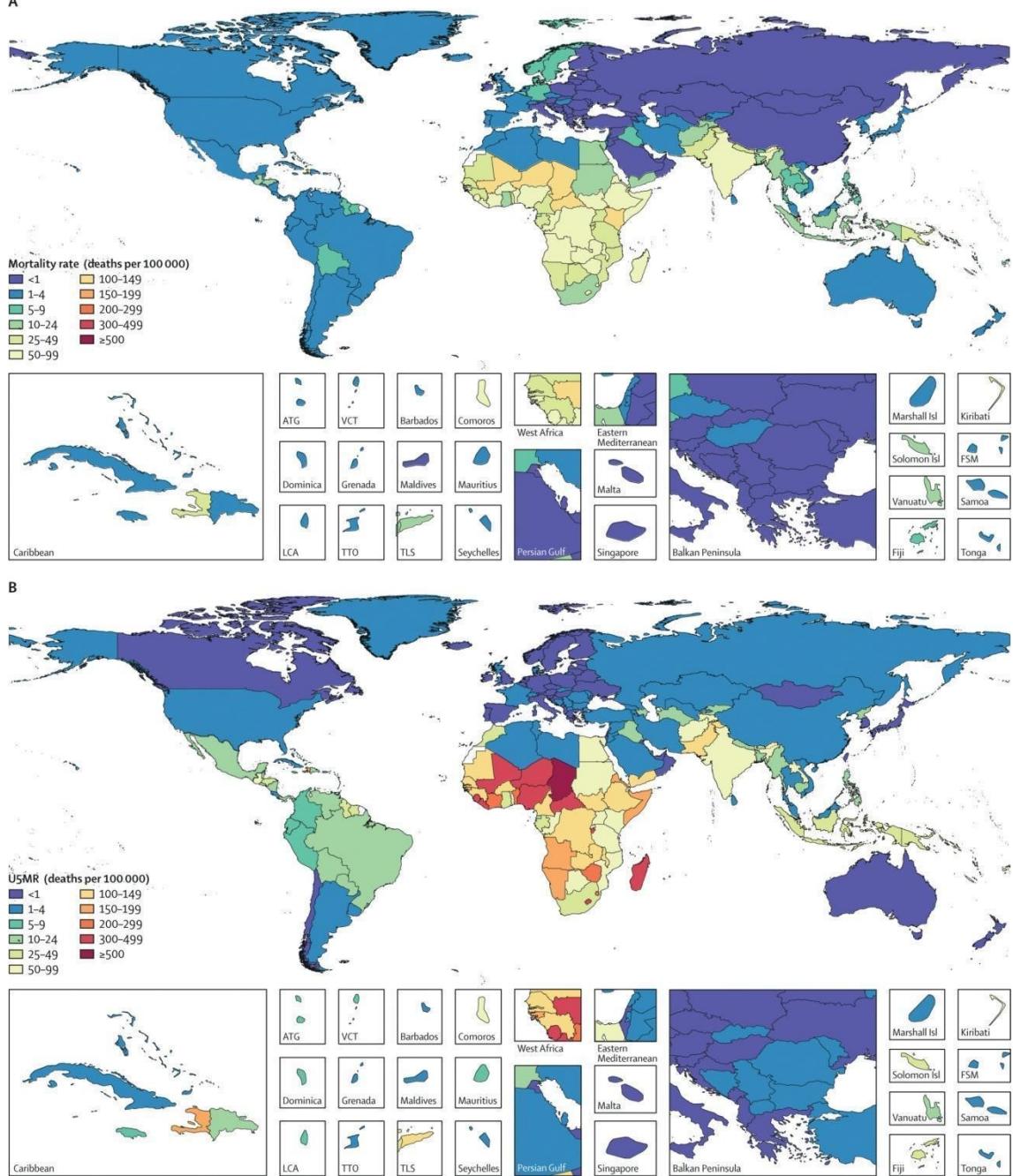
Em contraste com a diarreia aquosa, a diarreia invasiva ou disenteria é definida como diarreia com sangue ou muco visível, frequentemente associada a febre e dor abdominal (Beaugerie; Sokol, 2013). Embora a maior parcela de diarreia aguda seja de etiologia infecciosa viral, a diarreia aguda bacteriana pode levar à forma mais grave (Beaugerie; Sokol, 2013), sendo a disenteria a diarreia associada ao sangue, com mais ou menos muco, e que representa uma infecção mais invasiva.

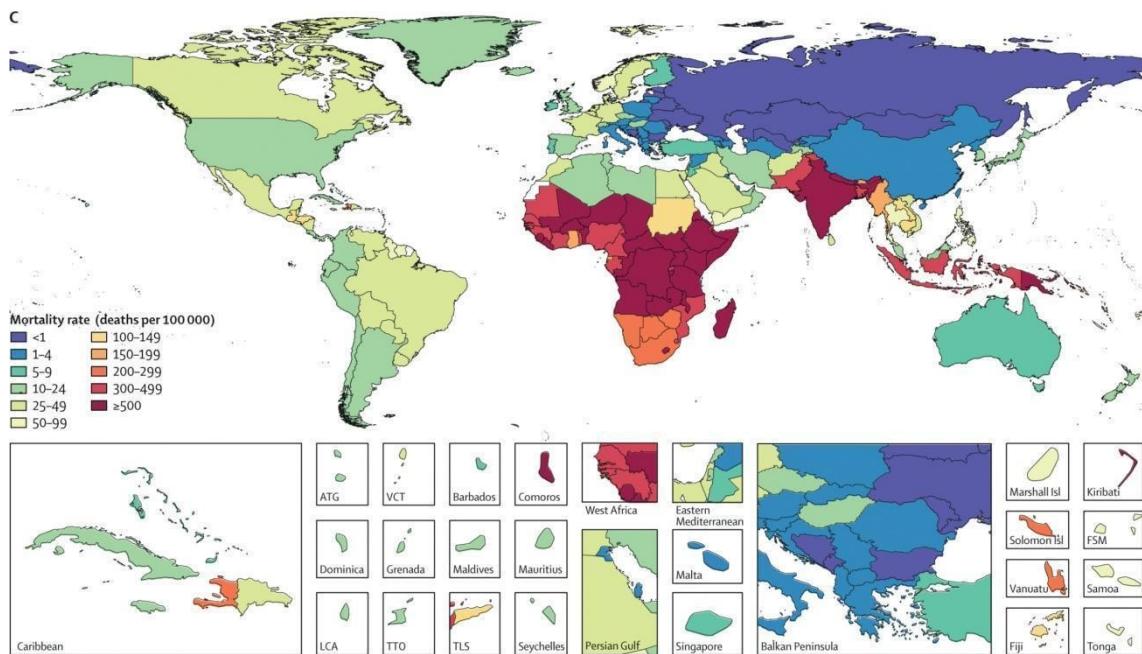
A síndrome diarreica é um problema de saúde pública devido aos elevados índices de morbidade e mortalidade associados, principalmente à elevada prevalência em crianças menores de 5 anos de idade (Guandalini *et al.*, 2011; Stockmann *et al.*, 2017). *Global Burden of Diseases Study* (GBD) é um estudo sistemático abrangente e realizado para quantificar o impacto de mais de 200 doenças e seus fatores de risco, o qual apresenta estimativas atualizadas sobre morbidade e mortalidade (Troeger *et al.*, 2018).

No GBD 2016, a diarreia foi descrita como a oitava principal causa de óbitos entre indivíduos de diferentes faixas etárias, com um total de 1.665.944 óbitos registrados (Troeger *et al.*, 2018). Além disso, foi também considerada a quinta principal causa de mortalidade infantil no mundo, com um total de 446.000 óbitos de crianças menores de 5 anos de idade; de forma predominante nas regiões da África Subsaariana, Sul e Sudeste da Ásia (Figura 1) (Troeger *et al.*, 2018).

O GBD 2016 evidenciou ainda uma redução substancial na carga global da diarreia e, apesar da redução apresentar diferentes proporções entre os locais de incidência, o estudo revelou que há uma sobrecarga substancial entre adultos maiores de 70 anos que requer devida atenção (Figura 1) (Troeger *et al.*, 2018).

Figura 1 – Mortalidade por diarreia em 2016. Taxa de mortalidade em indivíduos de todas as idades (A), crianças menores de 5 anos (B) e adultos maiores de 70 anos (C)





Fonte: Troeger *et al.* (2018).

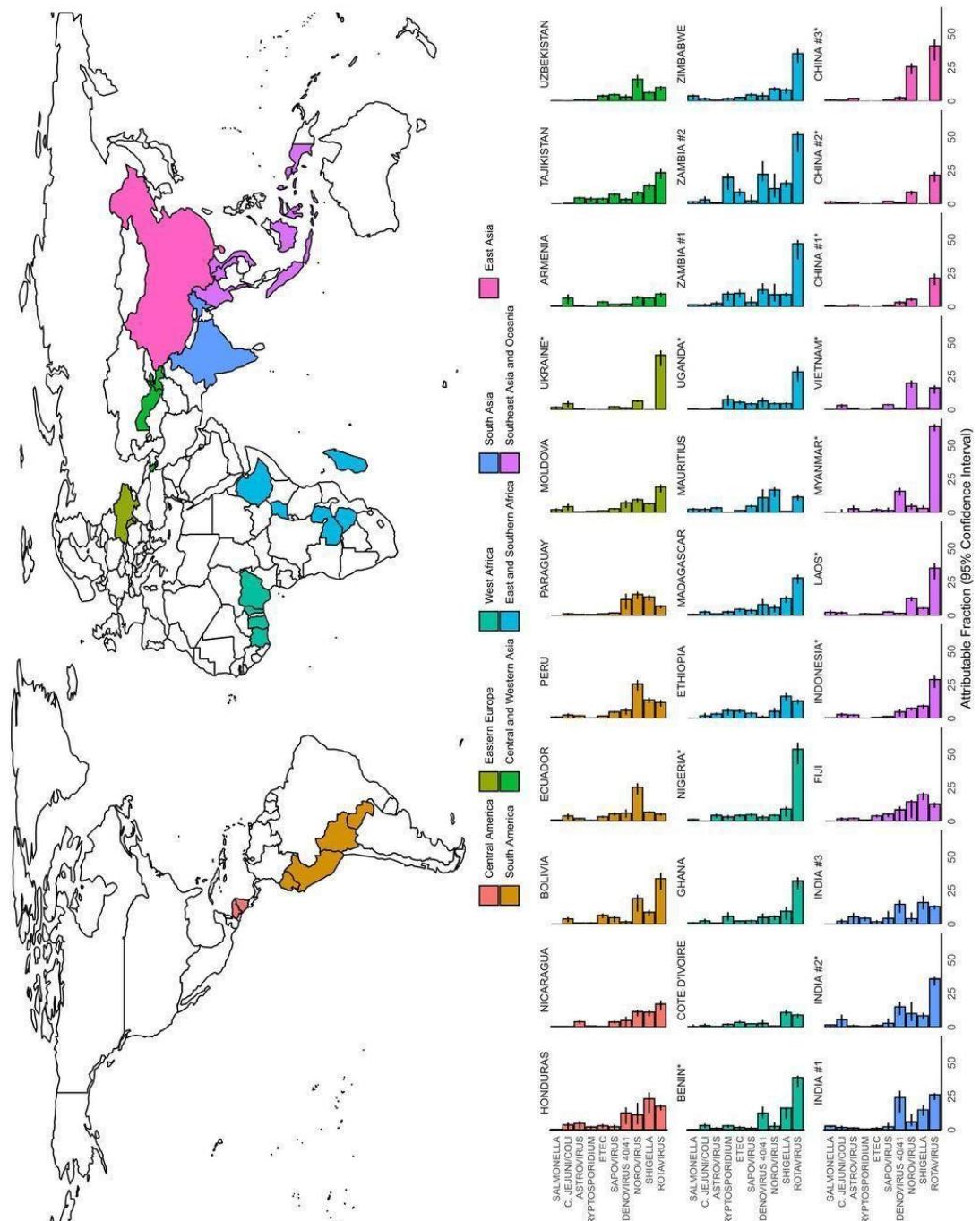
A infecção causada por *Shigella* foi a segunda principal causa de mortalidade por diarreia em 2016 entre todas as idades, sendo responsável por 212.438 mortes (95% UI 136.979–326.913) e cerca de 13,2% (9,2–17,4) de todas as mortes por diarreia. Esta foi responsável por 63.713 mortes (41.191–93.611) entre crianças menores de 5 anos e foi frequentemente associada à diarreia em todas as faixas etárias adultas, aumentando em pessoas idosas, com ampla distribuição geográfica. A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) foi a oitava principal causa de mortalidade por diarreia em 2016 entre todos os grupos etários, sendo responsável por 51.186 mortes (26.757–83.064) e cerca de 3,2% (1,8–4,7) das mortes por diarreia. Entre crianças menores de 5 anos, a ETEC foi responsável por cerca de 4,2% (2,2–6,8) das mortes por diarreia (Khalil *et al.*, 2018).

Em estudos mais atuais, Cohen e colaboradores (2022) estabeleceram a *Global Pediatric Diarrheal Surveillance* (GPDS) a partir de estimativas do GBD em nível de país, no qual foi realizada uma análise sistemática com base em registros de internações por diarreia entre os anos de 2017 e 2018, em 28 países de baixa e média renda.

Assim, a GPDS evidenciou que o rotavírus foi a principal causa de diarreia que requer hospitalização (33,3%), seguido por *Shigella* (9,7%), norovírus (6,5%) e adenovírus (5,5%). Na região da América Central e América do Sul, as principais causas foram *Shigella* (19,2%) e norovírus (22,2%), respectivamente (Figura 2). Em populações de países de alta renda, estima-se que o norovírus seja a principal causa de diarreia pediátrica que requer hospitalização e que há uma carga residual de diarreia por rotavírus. Ademais, *Shigella*, norovírus e adenovírus são

patógenos adicionais de importância global. Foram estimados 208.009 óbitos por ano atribuíveis ao rotavírus, 62.853 à *Shigella*, 36.922 ao adenovírus e 35.914 ao norovírus. Observou-se também que a taxa de hospitalizações atribuídas ao rotavírus foi 50% menor em locais onde a vacina foi introduzida (Cohen *et al.*, 2022).

Figura 2 – Frações (percentual) de patógenos específicos atribuíveis à diarreia hospitalizada em crianças menores de 5 anos entre 2017 e 2018 em Locais de Vigilância Global de Diarreia Pediátrica em 28 países de baixa e média renda



Fonte: Cohen *et al.* (2022). Nota: Os gráficos de barras coloridas são correspondentes à localização de países e seus grupos geográficos. *A vacina não foi introduzida até 2017. ETEC = *E. coli* enterotoxigênica.

A partir do exposto, é evidente que intervenções contra *Shigella* podem contribuir ainda mais para a redução de morbidade e mortalidade por diarreia. Diversos fatores contribuem para a variação da carga global da doença, e a compreensão sobre como esses fatores podem afetar as estimativas de mortalidade é crucial na tomada de decisões para a saúde pública. Historicamente, o *Institute of Health Metrics and Evaluation* (IHME) e o *Maternal and Child Epidemiology Estimation* (MCEE) utilizaram diferentes conjuntos de estudos sobre *Shigella* e ETEC para determinar estimativas de mortalidade associada à diarreia. Para o ano de 2013, o MCEE estimou que ocorreram 42.000 (20.000 - 76.000) óbitos por ETEC em menores de 5 anos e 28.000 (12.000 - 53.000) óbitos por *Shigella*. Neste mesmo ano, o IHME foi consistente com o MCEE, com uma estimativa de 33.400 (24.900 - 43.500) óbitos por *Shigella* e 23.100 (17.000 - 30.400) óbitos associados à ETEC. Para o ano de 2016, pelo IHME, as modelagens começaram a apresentar divergências daquelas do MCEE, com uma estimativa de 18.669 (9.800 - 30.659) óbitos associados à ETEC e 63.713 (41.191 - 93.611) óbitos associados à *Shigella* (Butkeviciute *et al.*, 2021).

Em um estudo de modelagem estimativa sobre a carga da doença sobre a mortalidade por diarreia associada à ETEC e *Shigella* e associação ao atraso no crescimento de crianças menores de 5 anos, 79 países de baixa e média renda foram avaliados. Segundo os dados obtidos com este estudo, foram registrados 44.400 óbitos relacionados à diarreia por ETEC e atraso de crescimento em crianças. No caso de diarreia por *Shigella*, registraram-se cerca de 63.100 mortes por atraso de crescimento. A prevalência mais elevada de infecções por ETEC e *Shigella* foi registrada na região africana, na qual a mortalidade estimada foi superior a 25.000 para cada agente patogênico (Anderson *et al.*, 2019).

Como a maioria dos estudos sobre a carga global da diarreia não apresentaram, até o momento, dados sobre a ocorrência da doença no Brasil, descreveremos separadamente nos tópicos a seguir uma recapitulação da epidemiologia da diarreia no Brasil, no intuito de apresentar também a ocorrência de casos da doença associados à *Shigella* e ETEC ao longo dos anos.

2.2 EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL

Kuiava, Perin e Chielli (2019) relataram em seu estudo a evolução das taxas de hospitalização e as taxas de mortalidade por diarreia no Brasil durante os anos de 2000 a 2015. Os autores evidenciaram a ocorrência de cerca de 3,4 milhões de casos de hospitalizações por diarreia no período. Dentre esses casos, 72 mil óbitos por diarreia foram registrados, com uma

taxa média de hospitalização de 112 casos a cada 100 mil habitantes, e uma taxa de mortalidade de 2,3 casos a cada 100 mil habitantes. Rondônia apresentou a maior taxa de hospitalização, com 297,09 hospitalizações a cada 100 mil habitantes. Em nível regional, o Nordeste foi a região que apresentou as maiores taxas de hospitalizações por diarreia, e o estado do Acre apresentou as menores taxas (Kuiava; Perin; Chielli, 2019).

Em relação à incidência por idade, observou-se que as taxas de hospitalização foram mais elevadas para as faixas de 0 a 4 anos e em adultos maiores de 80 anos, com uma taxa de 385 e 562 casos a cada 100 mil habitantes, respectivamente. Ao analisar as taxas de hospitalização por diarreia ao longo dos anos, verificou-se um aumento de 64% no estado do Rio Grande do Norte, 44% no Maranhão e 27% em Roraima, incluindo hospitalizações entre crianças da faixa de 0 a 4 anos de idade. Uma queda expressiva dessas taxas foi observada no Rio de Janeiro (82%) e Pernambuco (83%). A taxa de mortalidade foi de 10 casos a cada 100 mil habitantes para a faixa de 0 a 4 anos de idade, e de 49 a cada 100 mil habitantes entre adultos maiores de 80 anos. Na região Nordeste, o estado de Alagoas foi o que apresentou os maiores índices de mortalidade por diarreia, com uma taxa de 6,07 mortes a cada 100 mil habitantes. Na região Sul, foram observados os menores índices, com cerca de 1,3 óbitos a cada 100 mil habitantes (Kuiava; Perin; Chielli, 2019).

Para a faixa de 0 a 4 anos de idade, as taxas de mortalidade entre os estados apresentaram quedas expressivas, principalmente entre as regiões Norte e Nordeste, com destaque para o estado da Paraíba, com uma redução de 20 para 0,3 óbitos a cada 100 mil habitantes. No entanto, para a faixa de indivíduos maiores de 80 anos, houve um aumento de 60% na taxa de mortalidade para a região Nordeste, salientando a necessidade de uma atenção especial a essa população acometida pela doença (Kuiava, Perin; Chielli, 2019).

Essa análise retrospectiva apresenta o impacto da doença na população brasileira. No entanto, apontar os patógenos envolvidos e em que proporções se fazem presentes nos casos registrados é de igual valor. Nesse sentido, Orlandi e colaboradores (2001) observaram em Rondônia, estado de Porto Velho, uma incidência acentuada na faixa etária de crianças de 0 a 2 anos de idade dentre os 130 casos de diarreia infantil. Dentre esses, os lactentes menores de 1 ano de idade foram particularmente afetados, apresentando 62 casos (47,7%), dos quais 28 casos (21,4%) foram menores de 6 meses de idade. O estudo também relatou que dentre os 130 casos de diarreia, 16 lactentes testaram negativo para os exames laboratoriais de enterobactérias e rotavírus. Dentre os patógenos encontrados em fezes de 53 lactentes com diarreia (40,7%), o rotavírus foi o patógeno mais frequente (19,2%), sendo *Shigella* encontrada em 10 casos

(7,7%), com uma frequência de *Shigella flexneri* de 8/10 em relação à *Shigella sonnei* de 2/10 (Orlandi *et al.*, 2001).

Salmonella foi encontrada em 9 casos (6,9%) e ETEC em 4 casos de diarreia, no qual todos continham as enterotoxinas LT e ST. EPEC foi encontrada em 3 casos de diarreia (2 *E. coli* O:111 e 1 *E. coli* O:125); 1 caso de EIEC e *Y. enterocolitica* foram identificados. *Campylobacter* foi encontrada em casos de diarreia e controles. Os exames parasitológicos evidenciaram 8 casos de diarreia com cistos de *E. histolytica*, 19 casos de diarreia por cistos de *G. lamblia* e em 4 controles. As infecções mistas foram frequentes e foram identificados 2 casos de *Shigella* e rotavírus, 3 casos de *Salmonella* e *G. lamblia*, e 2 casos de EPEC e *E. histolytica*. Outros patógenos estavam distribuídos por todas as faixas etárias, no entanto, sua frequência não foi determinada devido ao baixo número de casos observados em crianças maiores de 2 anos de idade (Orlandi *et al.*, 2001).

Ainda no estudo de Orlandi e colaboradores (2001), observou-se que, embora os patógenos bacterianos tenham sido encontrados durante todo o período do estudo, o número de casos de diarreia por rotavírus (70%) foi maior no período de outubro a fevereiro, correspondente a uma estação local chuvosa, em comparação ao período de maio a setembro, que corresponde a uma estação mais seca.

Taborda e colaboradores (2018), em uma pesquisa mais recente, realizaram um estudo de caracterização de *E. coli* enteroaggregativa (EPEC) em crianças com diarreia na Amazônia ocidental brasileira. As amostras foram provenientes de crianças hospitalizadas com gastroenterite aguda (Hospital Infantil Cosme e Damião na cidade de Porto Velho-RO), na faixa de 6 anos de idade, entre 2010 e 2012. No estudo, os isolados sugestivos de *E. coli* foram submetidos à reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação dos fatores de virulência e ensaios de adesão bacteriana *in vitro* em células HEp-2, testes de detecção de biofilme e testes de susceptibilidade antimicrobiana. A partir desses métodos, *E. coli* diarréogênica foi encontrada em 27,4% das crianças hospitalizadas, sendo EAEC (*E. coli* enteroaggregativa) a *E. coli* diarréogênica associada com maior frequência dos casos de diarreia (52,4%). Foi observado que 69% das EAEC eram produtoras de biofilme, e a maioria era resistente à ampicilina (70,6%), sulfametoxazol (60%), tetraciclina (44,7%) e cefotaxima (22,4%). A partir deste primeiro estudo que investigou os fatores de virulência bacteriana de EAEC em crianças, Taborda *et al.* (2018) evidenciaram que há outras cepas de *E. coli* diarréogênicas circulantes no Brasil e que estas diferem dos dados epidemiológicos globais.

Na região Norte, em Manaus, Amazonas, foi realizado um estudo etiológico no qual 1.339 crianças apresentaram diarreia durante o período de agosto de 2007 a julho de 2008. As

espécies de *Shigella* foram a quinta causa mais comum de diarreia (2,2%), liderada por *Escherichia coli* enteropatogênica em 837 casos (62,1%), seguida por 207 crianças com rotavírus (15,4%), 192 com espécies de *Salmonella* (14,3%) e 34 casos de espécies de *Yersinia* (2,5%). A infecção por protozoários foi observada em 46 casos: *Entamoeba histolytica* foi encontrada em 16 casos, 14 para *Giardia lamblia*, 13 para *Entamoeba coli* e 3 para *Balantidium coli*. Vinte e quatro crianças tiveram diarreia associada a vermes, 9 por *Enterobius vermicularis*, 9 por *Ascaris lumbricoides*, 4 por espécies de *Ancylostoma* e 2 por *Trichiura trichuris*. Ainda assim, a etiologia da diarreia em 199 crianças era desconhecida. Foram encontradas monoinfecções entre os principais grupos de enteropatógenos, bactérias ($N = 867$), rotavírus ($N = 39$) e parasitas intestinais ($N = 8$). Também foram encontradas diversas coinfecções; 13 crianças foram infectadas por bactérias enteropatogênicas, rotavírus e parasitas intestinais. Foram encontradas bactérias enteropatogênicas coinfetadas com rotavírus em 178 casos ou com parasitas intestinais em 45 crianças (Cruz *et al.*, 2014).

Atualmente, ao considerar as estimativas globais direcionadas à *Shigella* e ETEC, como descrito por Butkeviciute *et al.* (2021) nos últimos anos, a próxima seção descreve resumidamente a epidemiologia sobre ambas as bactérias diarréiogênicas e sua ocorrência no Brasil.

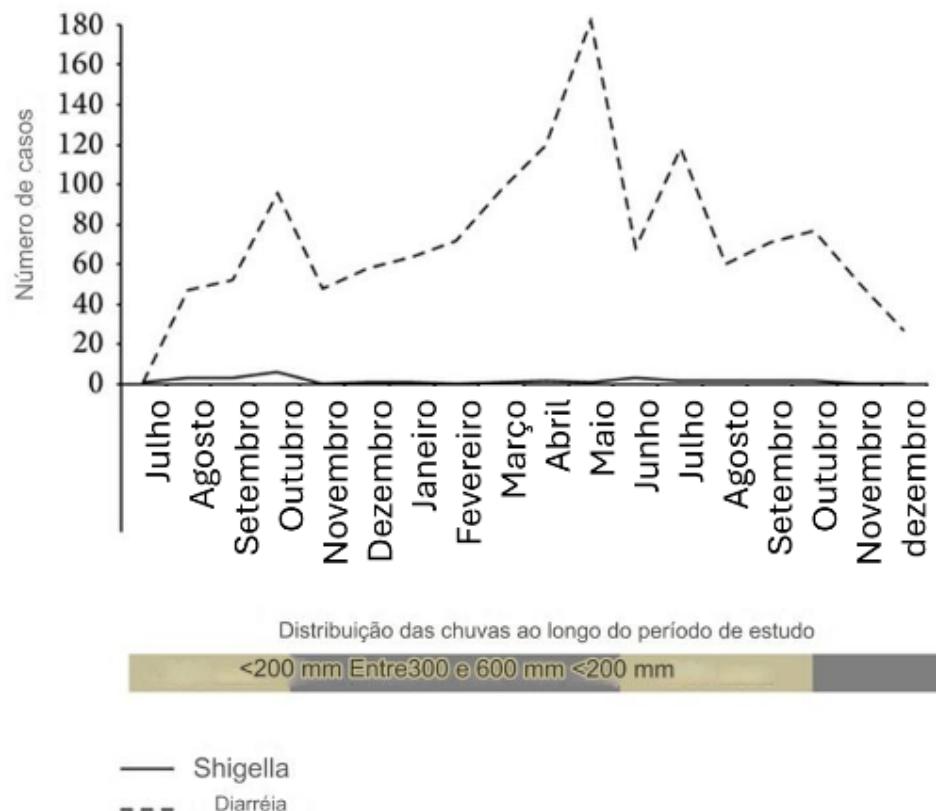
2.3 ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA DE *Shigella* sp.

Nos últimos 30 anos, a mortalidade por *Shigella* caiu consideravelmente, e isso se deve principalmente às contribuições da redução da desnutrição global. Apesar disso, a shigelose foi classificada pelo *Global Burden of Disease Consortium* como a segunda principal causa de mortes diarréicas em 2015 (Kotloff *et al.*, 2017, 2018), além de ser a segunda principal causa de hospitalizações e óbitos por diarreia na população pediátrica durante os anos de 2017 e 2018 (Cohen *et al.*, 2022).

Em consonância com as estimativas globais, no Brasil, as infecções causadas por *S. sonnei* também estão associadas a regiões geográficas de alta renda, como o Sudeste, enquanto infecções causadas por *S. flexneri* estão associadas a regiões de baixa renda, como o Norte e Nordeste do país (Sousa *et al.*, 2010). Em Minas Gerais, durante o outono e verão, cerca de 90% das infecções foram causadas por *S. sonnei*, e no Piauí, frequentemente em crianças com idade inferior a 24 meses, 80% das infecções foram causadas por *S. flexneri* (Nunes *et al.*, 2012).

No estudo de Cruz *et al.* (2014), 30 isolados de *Shigella* foram identificados em um estudo etiológico no qual foram incluídas 1.339 crianças de 0 a 10 anos de idade. *S. flexneri* foi a espécie mais frequente encontrada em 60,0% dos isolados, seguido de 22,2% para *S. sonnei* e 6,6% para *S. dysenteriae* e *S. boydii*. Embora as chuvas na região sejam sazonais, a variação temporal dos casos de diarreia por *Shigella* não oscilou durante as duas estações chuvosas, ao contrário dos casos de diarreia por outros enteropatógenos, que aumentaram ao longo da estação chuvosa (Figura 3).

Figura 3 – Variação temporal na prevalência de diarreia causada por *Shigella* e outros enteropatógenos. De agosto de 2007 a dezembro de 2008, 1.346 crianças na faixa de 0 a 10 anos de idade foram internadas com diarreia e procuraram tratamento em três hospitais em Manaus, na região central da Amazônia brasileira. Foram coletadas amostras de fezes nas quais *Shigella* e outros enteropatógenos foram identificados por métodos clássicos. A distribuição das chuvas ao longo do período de estudo é classificada em dois níveis. Os retângulos cinza escuro representam a maior taxa de precipitação (entre 300 e 600 mm), e o cinza claro indica precipitação abaixo de 200 mm



Com base no exposto, verificou-se a ocorrência da doença diarreica no Brasil e que esta está associada à vulnerabilidade de populações de regiões de baixa renda, as quais apresentam dificuldade de acesso à água potável e residem em locais onde há ausência de coleta e

tratamento de esgoto. Dentre os casos de doença diarréica infecciosa no Brasil, há indícios da disseminação de cepas de *E. coli* diarréiogênicas resistentes a antibióticos, dentre elas ETEC (Cruz *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2012).

2.4 *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete e membro da família *Enterobacteriaceae*, isolada de fezes infantis pela primeira vez em 1885 por Theodor Escherich. Há uma relação de mútuo benefício entre o ser humano e as cepas de *E. coli*, mas ainda assim a *E. coli* comensal pode ocasionar doenças em indivíduos com a barreira gastrointestinal lesionada ou em hospedeiros imunocomprometidos (Tenaillon *et al.*, 2010).

Certas cepas de *E. coli* medeiam inúmeras doenças em humanos e animais, ocasionando doenças diarréiogênicas e extraintestinais. Existem seis categorias patogênicas de *E. coli* que causam infecção intestinal em homens e animais, sendo denominadas de *E. coli* diarréiogênicas, que são diferenciadas pela presença de fatores de virulência, como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas, e classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroaggregativa (EAEC), *E. coli* aderente difusa (DAEC) e o novo patótipo *E. coli* invasiva aderente (AIEC), como causadoras de diarréia e distúrbios intestinais (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2016).

Várias síndromes clínicas distintas acompanham a infecção por categorias de *E. coli* diarréiogênicas, incluindo diarréia do viajante (causada por ETEC), colite hemorrágica e síndrome hemolítica-urêmica (EHEC), diarréia persistente (DAEC) e diarréia aquosa de bebês (EPEC) (Gomes *et al.*, 2016).

Cada patótipo de *E. coli* possui mecanismo de patogenicidade característico e perfil de fatores de virulência específicos codificados por grupamentos de genes associados à atividade de adesão, invasão, fixação, aquisição de ferro, motilidade e atividade de toxinas (Mainil, 2013). O patótipo *E. coli* ETEC libera enterotoxinas no intestino delgado humano e é a principal causa de diarréia em viajantes e crianças em países de baixa e média renda, com maiores taxas de infecção e mortalidade por ETEC em crianças menores de 2 anos de idade (Buuck *et al.*, 2020).

2.4.1 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

A cepa ETEC (*Escherichia coli* enterotoxigênica) é um dos agentes causadores de diarreia infantil e do viajante, a qual, em décadas passadas, chegou a ocasionar cerca de 400 mil óbitos por ano em crianças menores de 5 anos e está relacionada com o desenvolvimento de desnutrição infantil (Dubreuil, 2014; Von Mentzer *et al.*, 2014).

A ETEC ocasiona uma diarreia abrupta cuja apresentação é de fezes com consistência aquosa, na qual não é observado muco, sangue ou pus, e uma minoria dos casos está associada aos sinais clínicos de febre e vômito (Dubreuil, 2014). Nas estatísticas globais, essa bactéria já foi responsável por mais de 20% dos casos graves de diarreia e, em anos anteriores, foi estimado que mais de 10 milhões de turistas sofreram de diarreia provocada pelo patógeno (Dubreuil, 2014; Qadri *et al.*, 2005).

Orlandi e colaboradores (2006) realizaram um estudo na região Norte do país, na cidade de Porto Velho, estado de Rondônia, com cerca de 500 crianças menores de 6 anos de idade. Dentre as crianças com perfil de diarreia aguda, 21 casos (4,2%) foram atribuíveis ao patógeno bacteriano *E. coli* ETEC.

Moreno *et al.* (2010), em um estudo conduzido na região Nordeste do país com 290 crianças com diarreia, constataram que dentre 2.344 isolados bacterianos de *E. coli*, 10% corresponderam ao patógeno ETEC. Em um outro estudo também conduzido no Nordeste, na cidade de Teresina, estado do Piauí, foi constatado que dentre os isolados de 250 crianças menores de 5 anos de idade com diarreia, cerca de 9,5% corresponderam ao patógeno ETEC (Nunes *et al.*, 2011).

As bactérias ETEC iniciam a infecção ao aderir o epitélio intestinal do hospedeiro e colonizar o intestino delgado, mecanismo mediado por adesinas fimbriais e não fimbriais chamadas fatores de colonização (CFA) ou抗ígenos de superfície coli (CS) (Gaastra; Graaf, 1982; Knutton; Lloyd; Mcneish, 1987; Von Mentzer; Svennerholm, 2023).

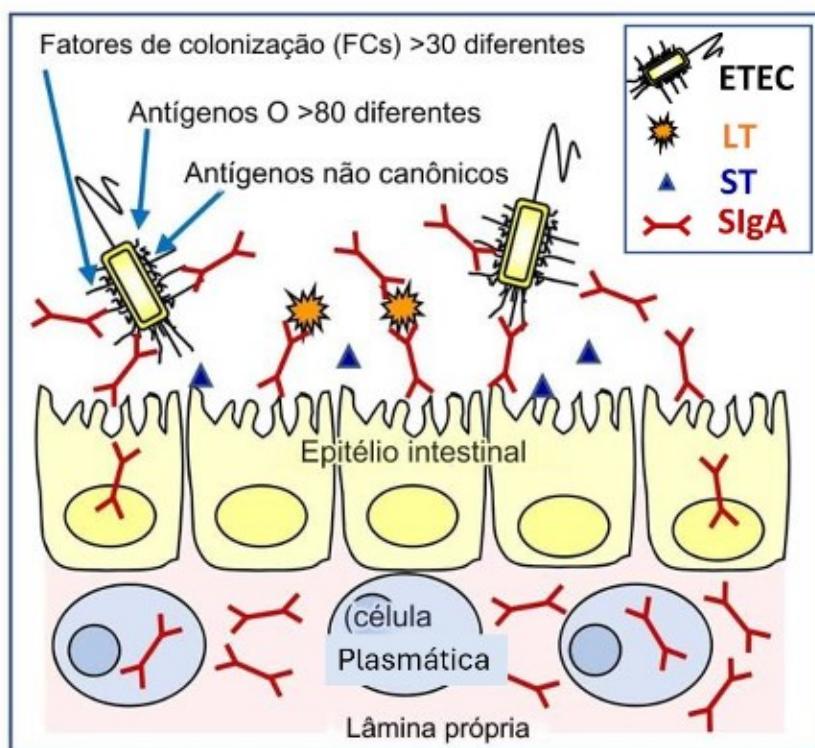
Uma vez fixada a bactéria, ocorre o estímulo à expressão de uma toxina lábil ao calor (LT) e/ou toxina estável ao calor (ST). A LT estimula a adenilato ciclase, levando a um aumento do monofosfato de adenosina cíclico intracelular (cAMP) e subsequente secreção de cloreto pelas células da cripta intestinal. Esse mecanismo inibe a absorção de cloreto de sódio das vilosidades intestinais, resultando na secreção livre de água no lúmen intestinal, caracterizado como diarreia aquosa. A ST estimula a guanilato ciclase e o aumento de monofosfato de guanosina cíclico intracelular (cGMP) e posterior secreção de cloreto com inibição da absorção

de cloreto de sódio, a qual também induz a uma diarreia aquosa (Fleckenstein *et al.*, 2010; Nataro, 1987; Wang *et al.*, 2019).

Em humanos infectados por ETEC, pode ocorrer o aumento da secreção de IgA na mucosa do intestino e simultânea secreção de IgA no soro. A produção de IgA na mucosa ocorre principalmente como resultado da resposta das células B à infecção, após ativação por células dendríticas que apresentam抗ígenos do agente infeccioso. As células B ativadas passam por expansão clonal, hipermutação e seleção no tecido linfoide associado ao intestino (GALT), principalmente nas placas de Peyer. Os plasmoblastos migram para a corrente sanguínea por meio do sistema linfático e, expressando marcadores de localização em sua superfície, dirigem-se aos locais efetores da mucosa ao longo do trato gastrointestinal. Os plasmablastos se diferenciam em células plasmáticas da mucosa, que iniciam a produção e secreção de IgA específica para os抗ígenos que estimularam inicialmente as células B. Essas imunoglobulinas sãoativamente secretadas através da parede intestinal e na mucosa intestinal, onde se conectam e imobilizam o patógeno alvo ou seus fatores de virulência (Figura 4) (Riaz; Seinsland; Hanevik, 2020).

O entendimento sobre a resposta imune em infecções por *E. coli* ETEC também tem sido obtido através de estudos que utilizam outros mamíferos como modelo animal (Dhamer *et al.*, 2023). Nesse sentido, o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interleucina-6 (IL-6) são citocinas pró-inflamatórias relatadas como marcadores de infecção patogênica em suínos que sofreram desmame (Zhang *et al.*, 2010). A superestimulação dessas citocinas, principalmente o TNF-alfa, pode resultar em efeitos patológicos que levam à inflamação e a quantificação dessas proteínas pode ser utilizada como indicativo de resposta à infecção por ETEC (Dhamer *et al.*, 2023). Em humanos, observou-se o aumento das concentrações de mieloperoxidase (MPO) nas fezes, associada a uma maior colonização intestinal por ETEC, um aumento da proteína de ligação a ácidos graxos intestinais no soro, e aumento das citocinas IL-17 e IFN-γ após infecção por ETEC (Brubaker *et al.*, 2021).

Figura 4 – Imunidade protetora da mucosa contra diarreia por ETEC. ETEC são bactérias não invasivas que aderem ao epitélio intestinal através de um ou mais de 30 FCs diferentes. A ETEC produz toxina LT e/ou toxina ST, que se liga a receptores nas células epiteliais e causa aumento de AMP cíclico (AMPc) e GMP cíclico (GMPc), respectivamente, resultando em diarreia aquosa. As vacinas orais, que são baseadas em FCs expressas na superfície das bactérias, e/ou um toxoide LT ou LT não tóxico, por exemplo, ETVAX (nome da vacina ETEC) e ACE527, são consideradas indutoras de proteção contra ETEC através da produção de IgA secretória (SIgA) contra FCs e LT da vacina por células plasmáticas localizadas na lámina própria intestinal. No lúmen, os anticorpos SIgA podem se ligar e neutralizar CFs e LT. Os anticorpos dirigidos contra FCs bacterianas reduzem a colonização bacteriana e podem proteger também contra ETEC produtoras de ST que expressam FC. Anticorpos que se ligam a antígenos ETEC O e antígenos não canônicos, como EatA (adesina recombinante) ou EtpA (protease degradadora de mucina recombinante), também podem contribuir para a proteção



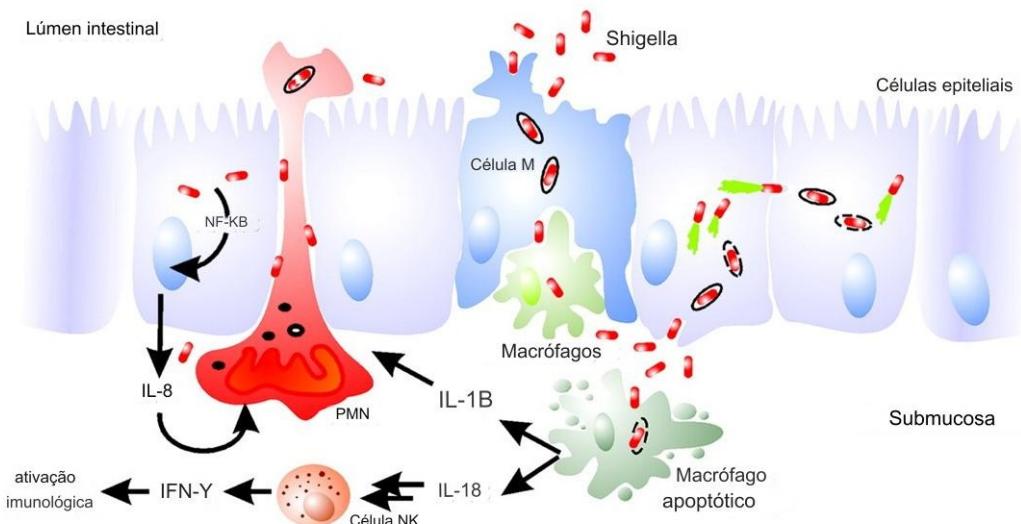
Fonte: Adaptado de Svennerholm e Lundgren (2023).

Shigella é um bacilo Gram-negativo, imóvel (Matanza; Clement, 2023), causador da disenteria bacilar, classificada nos patótipos *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii* e *Shigella sonnei* (Farzam *et al.*, 2017; Franke-Fayard *et al.*, 2010), restritos a primatas, o que a diferencia dos demais membros da família *Enterobactereaceae* (Mattock; Blocker, 2017; Trikha; Rishi; Tewari, 2017).

Com estimativa de 149,2 milhões de crianças com atraso no crescimento, desde a década de 1970, há evidências dos impactos negativos das doenças diarréicas no crescimento em menores de 5 anos de idade, sendo a diarréia atribuída à *Shigella* associada pela primeira vez a esse aspecto por Black e colaboradores em 1984 (Bagamian *et al.*, 2023).

A patogenicidade de *Shigella* spp. tem sido tradicionalmente estudada utilizando *Shigella flexneri* como modelo primário (Matanza; Clement, 2023). As bactérias induzem uma morte celular em macrófagos semelhante à apoptose, que é acompanhada por sinalização pró-inflamatória. As bactérias livres invadem as células M pelo lado basolateral, movem-se para o citoplasma por polimerização vetorial da actina e se espalham para as células adjacentes (Figura 5). A sinalização pró-inflamatória por macrófagos e células M ativa ainda mais a resposta imune inata envolvendo células NK (*natural killer*) e atrai células polimorfonucleares (PMN). O influxo de PMN desintegra o revestimento de células M, o que inicialmente agrava a infecção e a destruição do tecido, facilitando a invasão de mais bactérias. Em última análise, os PMN fagocitam *Shigella*, contribuindo para a resolução da infecção (Gopal *et al.*, 2017; Koestler *et al.*, 2019; Schroeder; Hilbi, 2008).

Figura 5 – Patogênese celular de *Shigella* spp.



Fonte: Adaptado de Schroeder e Hilbi (2008).

Na presença de células epiteliais, *Shigella* induz a uma reorganização do citoesqueleto e ocasiona a formação de um vacúolo pinocítico, entrada nas células e crescimento intracelular após rápida lise do vacúolo endocítico. O patógeno evade para o citoplasma e migra para células adjacentes através de uma cauda de actina (Sansonetti, 1991).

Em estudos mais atuais, em crianças com diarreia por *Shigella*, ocorre a secreção de citocinas pró-inflamatórias em níveis elevados de interferon gama, fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), TNF-beta, interleucina IL-1alfa, IL-1beta, fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), IL-6, IL-8, IL-12, IL-17 e fator de crescimento endotelial (VEGF), comparado a crianças sem diarreia. Em relação à gravidade da doença, em crianças

com disenteria infectadas por *Shigella*, as citocinas pró-inflamatórias exibem níveis significativamente mais baixos de TNF-beta, IL-1beta e IL-17 e níveis elevados de GM-CSF em comparação a crianças sem disenteria. Níveis aumentados de MPO, CP e LF foram encontrados nas fezes de crianças infectadas por *Shigella*. Em relação à resposta de citocinas TH1 e TH2, crianças infectadas por *Shigella* apresentam níveis mais elevados de IL-2, IL-15, IL-4, IL-13 e IL-10, bem como um nível cinco vezes maior de IgA e IgG total nas fezes comparado a crianças sem diarreia. A presença de citocinas pró-inflamatórias é um indicativo da ativação de células imunes inatas e reflete provavelmente um quadro de infecção recente ou aguda, enquanto as citocinas de células T sugerem um quadro de infecção recorrente ao organismo hospedeiro (Buskirk *et al.*, 2022).

Em estudos recentes sobre a patogenicidade de *Shigella* em modelo animal murino, tem-se descrito que essas bactérias invasoras entregam accidentalmente flagelina e T3SS (sistema de secreção tipo 3) no citosol de células epiteliais do intestino (IECs), onde são detectadas pelo inflamassoma NAPL/NLR4, que ativa caspases a jusante e impulsiona a secreção de citocinas pró-inflamatórias, extrusão de IECs infectadas e a programação lítica (pyroptose e necroptose) e não lítica (apoptose) e morte celular. O sistema imunológico da mucosa do hospedeiro utiliza sensores intracelulares como o inflamassoma NALP/NLR4, descrito em estudos com camundongos, sendo utilizado para neutralizar possíveis ameaças particularmente contra agentes infecciosos (Gül *et al.*, 2023).

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA BACTERIANA

Fatores de virulência são moléculas específicas, principalmente proteínas produzidas e liberadas por bactérias, fungos, protozoários e vírus que estão codificados por genes específicos localizados no cromossomo ou elementos genéticos móveis, como os plasmídeos e transposons, em patógenos bacterianos (Wu; Wang; Jennings, 2008).

Os principais fatores de virulência descritos em patógenos bacterianos estão distribuídos em seis principais classes, que incluem as proteínas de membrana, proteínas de membrana externa, constituintes de biofilme, captadores de ferro, constituintes da cápsula e as proteínas secretoras (Peterson; Baron, 1996). Na classe de proteínas de membrana estão incluídos os fatores de adesão, invasão, colonização e virulência de superfície, enquanto a classe de proteínas secretoras engloba os inibidores de resposta imune, toxinas e transportadores (Johnson, 2017).

Muitas bactérias apresentam em sua superfície estruturas de tamanho e aparência diferentes chamadas pili e fímbrias e, nesse contexto, eles já foram usados indistintamente (Hobot, 2015). O pili conjugativo é mais longo que a fímbria, sendo composto principalmente pela proteína pilina, organizada em estrutura tubular que permite a passagem de material genético durante o processo de conjugação (Tang *et al.*, 2014). A fímbria possui uma estrutura similar, mas o fato de estar envolvida no processo de adesão celular e a presença de subunidades proteicas específicas da cepa confere uma variedade de propriedades de aglutinação (Hobot, 2015).

As estruturas fímbriais do tipo 1 foram observadas pela primeira vez em investigações de microscopia eletrônica como apêndices filamentosos não flagelares de bactérias (Duguid *et al.*, 1955). Foram designados pela primeira vez como “fímbrias” por Duguid e colaboradores (1955) e denominados “pillus” pela primeira vez por Brinton e colaboradores (1965). Atualmente, as fímbrias do tipo I são descritas como estruturas superficiais filamentosas produzidas por vários membros da família *Enterobacteriaceae* (Klemm; Schembri, 2000), sendo codificadas pelo operon *fim/AICDFGH* contendo genes necessários para montagem e estrutura (Capitani *et al.*, 2006). FimA é a principal subunidade da estrutura de fímbrias, FimI é necessária para biossíntese das fímbrias, mas seu papel não é totalmente elucidado, FimC é o componente periplasmático para subunidades de fímbrias, FimD é a plataforma de montagem da membrana externa, FimF e FimG são proteínas adaptadoras (Zeiner; Dwyer; Clegg, 2012) e FimH é a adesina localizada na ponta da fímbria mediando adesão a moléculas de manose na superfície da mucosa do hospedeiro (Jones *et al.*, 1995).

As interações que as bactérias patogênicas estabelecem com seu hospedeiro têm tido bastante atenção quanto à identificação de seus determinantes específicos de virulência, adquiridos geralmente por transferência horizontal entre as bactérias (Bravo *et al.*, 2015). Ao longo dos anos, essas estruturas foram investigadas em profundidade, e em estudos sobre adesão bacteriana, há relatos de que aproximadamente 80% de todas as cepas de *E. coli* de origem fecal são capazes de produzir fímbrias do tipo 1, que são codificadas pelo operon “fim” cromossômico (Kaczmarek; Budzyńska; Gospodarek, 2012). Alguns estudos com *Shigella flexneri*, *Shigella sonei* e EIEC (*E. coli* enteroinvadadora) de isolados clínicos de pacientes chilenos com diarreia entre 2004 e 2006 sugerem que essas bactérias podem ainda apresentar estado fimbriado e não fimbriado como resposta patoadaptativa ao ambiente (Bravo *et al.*, 2015; Snellings; Tall; Venkatesan, 1997).

A importância das investigações sobre os fatores de virulência se dá pelo fato de que os genes codificadores associados fornecem informações sobre a interação patógeno-hospedeiro a

nível molecular, com indicativos sobre como o patógeno leva ao desenvolvimento da doença (Kaper; Nataro; Mobley, 2004). Alguns genes de fatores de virulência de patótipos entéricos de *E. coli* que estão associados à colonização, adesão, toxinas e proteínas efetoras já foram descritos (Pakbin; Brück; Rossen, 2021). Dentre os vários fatores de virulência presentes na estrutura bacteriana distinta de *Shigella* e ETEC, encontram-se os抗ígenos Fim-H e EtpA, respectivamente.

2.5.1 FimH

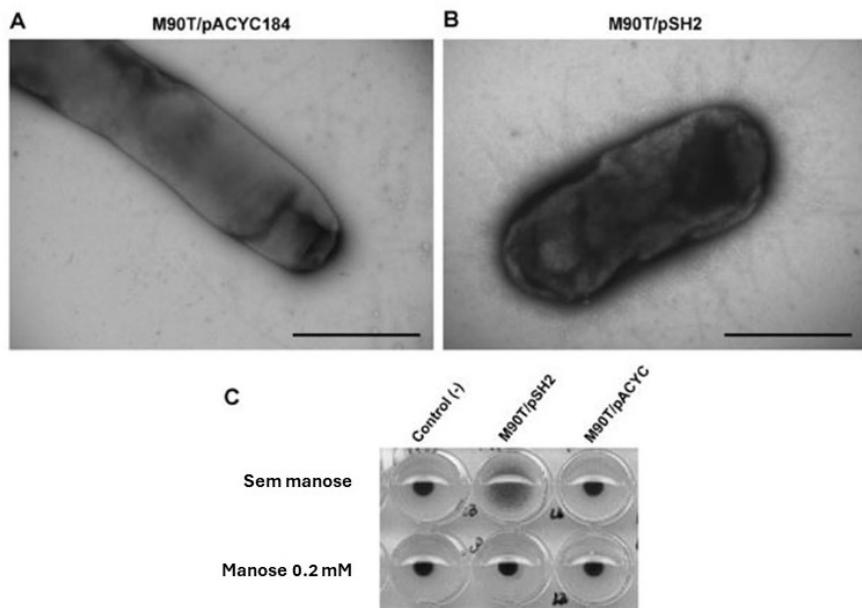
A proteína presente na membrana externa de um subconjunto de bactérias Gram-negativas, denominada Fim-H, tem sido alvo de pesquisas para o desenvolvimento de vacinas contra bactérias diarreogênicas, devido ao potencial em imunogenicidade (Karam; Habibi; Bouzari, 2016; Pardo, 2016; Singaravelu; Selvan; Anishetty, 2014; Souza, 2018).

Alguns estudos descrevem que a estrutura da superfície bacteriana contendo o pili tipo 1 é composto por filamentos proteicos de 0,1 a 2 mm de comprimento, importante para a adesão bacteriana no organismo do hospedeiro (Hahn *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 1995). A proteína FimH é uma das subunidades que compõem esse pili, localizada na ponta distal, funcionando como uma adesina fimbrial (Waksman; Hultgren, 2009).

Essa proteína possui em sua estrutura dois domínios: um domínio de lectina N-terminal (Fim-H) e um domínio de pilina C-terminal (Fim-HP), e possui uma dobra semelhante à imunoglobulina incompleta. A proteína é completada pela inserção de uma fita doadora N-terminal da Fim-G, que é uma subunidade subsequente na montagem do pilus (Waksman; Hultgren, 2009).

Fim-H reconhece as manoses nas glicoproteínas epiteliais do hospedeiro (Figura 6) (Bravo *et al.*, 2015), e por mediar a aderência das bactérias Gram-negativas nas membranas de mucosas, possui um papel importante no estabelecimento da infecção por *Shigella* (Sauer *et al.*, 2016). Em decorrência disso, já foi explorada em alguns estudos, em sua maioria voltados para o desenvolvimento de candidatos vacinais, como o desenvolvido por Pardo e colaboradores (2016).

Figura 6 – Imagens representativas de microscopia eletrônica de derivados da cepa M90T de *S. flexneri* contendo pACYC184 (vetor) ou pSH2 (contendo o operon Fim) (painéis A e B, respectivamente). Barra de escala, 1 µm. Painel C: Resultados de ensaios de hemaglutinação realizados na ausência ou na presença de manose 0,2 mM com a cepa de *S. flexneri* M90T contendo pSH2 ou pACYC184



Fonte: Adaptado de Bravo *et al.* (2015).

A imunogenicidade do antígeno proteico Fim-H foi confirmada a partir da produção de anticorpos IgG policlonais em murinos, demonstrada através de reatividade positiva ao antissoro obtido (Pardo, 2016). Dentre as regiões peptídicas do antígeno proteico capazes de gerar uma resposta imune, definidas como epítópos, foi observada uma reatividade significativa do antissoro com o epítopo 9 da adesina fimbrial Fim-H, descrita no estudo realizado por Souza (2018). Além disso, foi demonstrada a imunogenicidade do antígeno a partir da produção de anticorpos policlonais IgG em murinos a fim de avaliar o potencial vacinal contra *Shigella* (Souza, 2018).

2.5.2 EtpA

A exoproteína EtpA (*Enteropathogenic E. coli Translocated Protein A*) é um fator de adesão extracelular grande, da família de proteínas *two-partner secretion* (TPS) (Roy *et al.*, 2008). Esta proteína é secretada pela bactéria e inserida na membrana celular do hospedeiro durante a infecção e um papel fundamental na adesão da *E. coli* ETEC às células epiteliais intestinais, o que é um passo crucial para a colonização e subsequente desenvolvimento da doença (Figura 7) (Luo *et al.*, 2015; Roy; Hamilton; Fleckenstein, 2012).

Estudos anteriores constataram que EtpA é altamente conservada entre as cepas circulantes e que estão presentes em mais de 50% dos isolados de ETEC encontrados no Chile e em Guiné Bissau (Del Canto *et al.*, 2011; Sahl *et al.*, 2011). Ademais, também foi observado que a colonização de bactérias com deleção do gene da EtpA nocauteado foi prejudicada. Dessa maneira, surgem cada vez mais estudos que têm esta proteína como foco para o desenvolvimento de vacinas (Fleckenstein; Sheikh, Qadri, 2014; Kulmann *et al.*, 2023; Roy *et al.*, 2008).

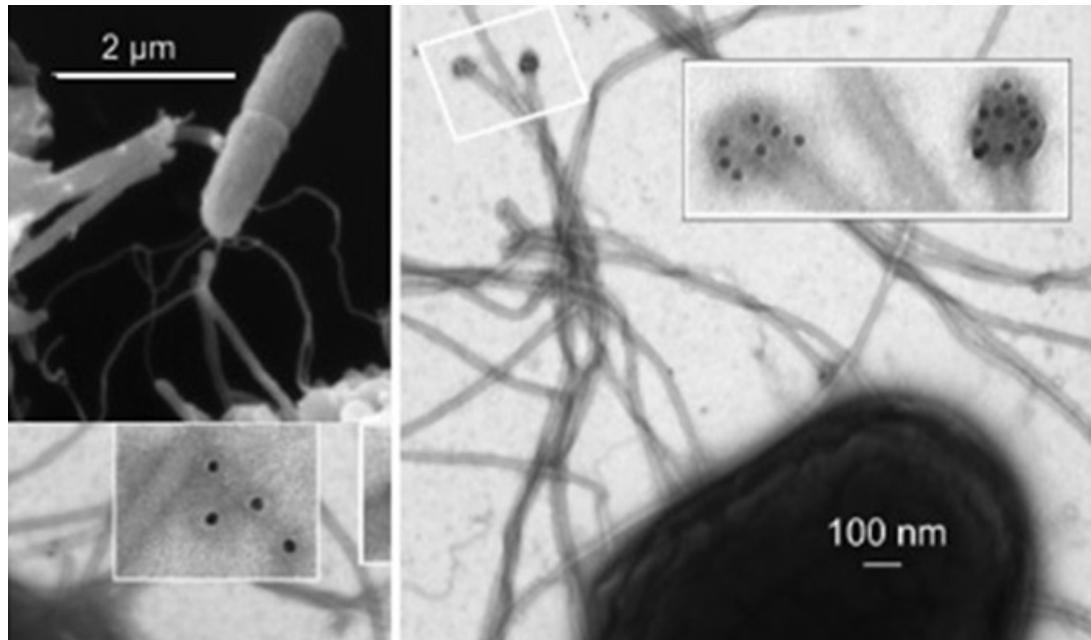
Em estudos para a verificação da conservação da proteína EtpA entre diferentes isolados de ETEC, utilizando o sequenciamento de nova geração completo do genoma, constatou-se uma alta identidade da sequência (93,6-100%) (Joffre *et al.*, 2015; Vidal *et al.*, 2019). A EtpA liga-se preferencialmente à N-acetylgalactosamina (NAG) expressa nos glicanos da mucosa intestinal do grupo sanguíneo A, aumentando a intercorrência de severidade nesse grupo (Kumar *et al.*, 2018; Qadri *et al.*, 2007).

Para atestar a conservação de funcionalidade de EtpA, Kuhlmann *et al.* (2019) clonaram os genes mais divergentes de EtpA, expressaram as proteínas correspondentes e examinaram a interação destas com glicanos do grupo sanguíneo A, os quais mostraram uma ligação preferencial aos carboidratos expressos na superfície dos enterócitos, confirmando a conservação funcional da EtpA, mesmo que em diferentes cepas de ETEC.

Uma vez atestada a ampla conservação da EtpA, o estudo de Astolpho (2017) buscou produzir uma ferramenta para detecção de *E. coli* ETEC usando a expressão, purificação e obtenção de anticorpos IgG de camundongos contra uma proteína quimérica de EtpA, obtendo, ao final, um imunoensaio de citometria de fluxo baseado em microesferas magnéticas capaz de detectar preferencialmente isolados de ETEC, entre outras cepas de *E. coli* diarréogênicas, apresentando apenas uma baixa reatividade com uma cepa de *E. coli* enteropatogênica (EPEC).

Para o mapeamento das regiões imunogênicas do antígeno EtpA construído por Astolpho (2017), foram obtidos peptídeos sintéticos, a partir do qual foi demonstrado que apenas um epítopo apresentou reatividade ao antissoro de murinos. Tais resultados demonstraram o potencial de utilização deste antígeno para o diagnóstico de *E. coli* ETEC.

Figura 7 – A) ETEC fazendo a ancoragem nas células hospedeiras através das pontas dos flagelos. **B e C)** EtpA se concentra nas pontas dos flagelos interagindo com regiões altamente conservadas de flagelina



Fonte: Astolpho (2017), adaptado de Roy *et al.* (2009).

2.6 DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS DIARREICAS

Os métodos de diagnóstico utilizados no *Global Enteric Multicenter Study* (GEMS) para avaliar as causas de diarreia moderada a grave incluíram cultura para bactérias, EIA para rotavírus, adenovírus e protozoários, e PCR multiplex de transcriptase reversa (RT-PCR) com eletroforese em gel (Liu *et al.*, 2016a).

Para a detecção, a otimização de métodos de detecção molecular, como a reação em cadeia da polimerase quantitativa, tem sido amplamente utilizada para a detecção de 32 enteropatógenos causadores de diarreia a partir de amostras de fezes armazenadas de 2007 a 2011 (Liu *et al.*, 2016b). Em relatos recentes, a detecção de patógenos entéricos em crianças com diarreia em Moshi, Tanzânia, tem sido realizada através do ácido nucleico extraído de amostra fecal utilizando a reação em cadeia da polimerase quantitativa com cartões TaqMan Array personalizados para *Shigella* spp. ou EIEC, adenovírus, rotavírus, *Cryptosporidium* spp. e *E. coli* produtora de enterotoxina estável ao calor (ST-ETEC), *Campylobacter jejuni* ou *C. coli*, sapovírus e *E. coli* enteropatogênica típica (tEPEC); Norovírus GII, *Helicobacter pylori*, astrovírus, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., *Cyclospora cayetanensis* e *Entamoeba histolytica*;

E. coli enteroaggregativa e *Aeromonas* spp., *E. coli* enteroaggregativa, *Aeromonas* spp. e *Cystoisospora belli*.

Em crianças de comunidades rurais e periurbanas na África do Sul com diarreia, a coinfecção com múltiplos enteropatógenos (2014-2016) através do painel gastrointestinal *BioFire FilmArray* foi utilizado para detectar simultaneamente 22 patógenos: *C. jejuni*, *C. coli*; *C. upsaliensis*, *Clostridium difficile* (toxina A/B), *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, *V. cholerae*, *Vibrio* spp. (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*), *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* enteroaggregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC [lt/st]), *E. coli* produtora de toxina semelhante à Shiga [STEC stx1 /stx2], *E. coli* O157, *Shigella*-EIEC, Adenovírus F40/41, Sapovírus [I; II; 4; V], Astrovírus [HAstV 1-8], Norovírus [GI; GII], Rotavírus *A. Cryptosporidium*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia* [*G. intestinalis*, *G. duodenalis*] (Potgieter *et al.*, 2023).

Os métodos laboratoriais para o diagnóstico da doença diarréica envolvem a coleta de amostras fecais após evacuação natural ou estimulação com supositório de glicerina. Uma parte das amostras é separada para a análise parasitológica e testes para rotavírus e a segunda parte para cultivo de acordo com procedimento bacteriológico padrão (Akhondi; Simonsen, 2019; Orlandi *et al.*, 2001).

Embora existam ensaios disponíveis para identificar todas as categorias de *Escherichia coli* diarréicas, em muitas situações, não é necessário atribuir um agente patogênico específico de *E. coli* a um paciente em particular. Por exemplo, pacientes com diarréia enterotoxigênica do viajante causada por *E. coli* (ETEC) frequentemente resolvem o quadro diarréico antes de buscar atendimento médico para realização de cultura de fezes. Embora a maioria dos isolados enteroinvasivos de *E. coli* (EIEC) possam ser perdidos no laboratório clínico, a diarréia geralmente cessa, e os pacientes respondem a antibióticos empíricos, como fluoroquinolonas, administrados para tratar outras formas de diarréias bacterianas. A cultura de fezes para a maioria das categorias de *E. coli* diarréicas deve ser conduzida em casos de diarréia persistente, especialmente em viajantes, crianças e imunocomprometidos, além de situações de surto. As amostras de fezes contendo *E. coli* podem ser enviadas a um laboratório de referência qualificado para identificação definitiva. As indicações para a cultura de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) diferem das demais categorias de *E. coli* diarréicas e são detalhadas na seção subsequente sobre EHEC (Nataro, 1987).

O procedimento padrão envolve a adição de suspensão fecal em meio seletivo de MacConkey, SS e Ágar verde brilhante, de 24 a 48 horas a 37 °C, para isolamento e identificação bacteriana de *Escherichia coli* (EPEC), *Escherichia coli* (EHEC), *Escherichia*

coli (EIEC), *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*; e em meio Skirrow por 48 horas a 42 °C para o isolamento e identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* (Orlandi *et al.*, 2001).

Os isolados bacterianos avaliados em testes bioquímicos, como o da catalase e oxidase, lactose e coloração de Gram são posteriormente testados com antissoros comerciais disponíveis para a determinação e diferenciação dos tipos bacterianos e grupos bacterianos (Orlandi *et al.*, 2001).

Com isso, os sorotipos EPEC, EHEC e EIEC são testados para a determinação da produção de enterotoxinas LT e ST pelo método convencional da PCR (Binnicker *et al.*, 2015; Orlandi *et al.*, 2001).

Estudo de revisão mais recente, realizado por Von Mentzer e Svennerholm (2023), descreveu que desde o início dos anos 2000, técnicas tradicionais como hemaglutinação, soroaglutinação e imunodifusão foram substituídas por métodos mais avançados, como sondas genéticas e ensaios de Dot-Blot. Esses ensaios demonstram reatividade com anticorpos monoclonais específicos anti-FC em folhas de nitrocelulose. Os métodos fenotípicos subsequentemente deram lugar aos métodos de PCR, incluindo PCR convencional ou multiplex, utilizando primers específicos que agora estão disponíveis para a maioria dos CFs de *Escherichia coli* enterotoxigênica humana e animal (ETEC) identificados. Os iniciadores de PCR normalmente têm como alvo as subunidades principais, que são os genes mais variáveis dentro dos agrupamentos de genes da FC. Nos últimos anos, estudos diagnósticos e epidemiológicos em larga escala sobre ETEC CFs incorporaram análises de PCR em tempo real (RT), TaqMan ou Luminex. Para fins de diagnóstico, uma abordagem de sequenciamento pode ser empregada para identificar os principais fatores de virulência e determinantes de resistência aos antibióticos. No entanto, é importante notar que a sequenciação continua indisponível em muitos países que enfrentam desafios de saúde relacionados com a ETEC.

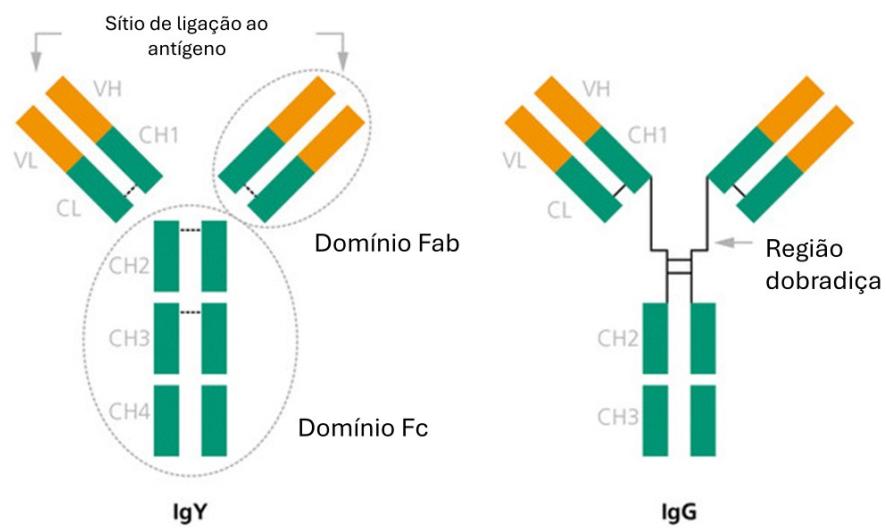
Como visto anteriormente, o diagnóstico da doença diarreica engloba uma gama de métodos para a identificação dos agentes infecciosos envolvidos em cada caso, o que requer mão de obra altamente qualificada e infraestrutura altamente sofisticada, geralmente restrita aos centros de referência e instituições de pesquisa. Com isso, há uma necessidade de desenvolver alternativas que proporcionem eficiência, praticidade e rapidez para o fechamento de um diagnóstico preciso.

2.7 TECNOLOGIA IgY

Um dos gargalos na produção de testes de imunodiagnóstico consiste no fato de que anticorpos secundários immobilizados ou marcados podem reagir de forma inespecífica e produzir resultados com alto ruído de fundo, ou falso positivos. Em muitos casos, isso ocorre devido à reação com fatores reumatóides das amostras sorológicas (Larsson; Campbell; Eriksson, 2022; Larsson; Karlsson-Parra; Sjoquist, 1991).

Em decorrência disso, nos últimos anos, anticorpos de gema de ovo (IgY) têm sido explorados devido às suas propriedades biológicas funcionais desejáveis. A imunoglobulina Y é um isotipo de anticorpo que possui funcionalidade biológica semelhante a IgG de mamíferos, sendo encontrada em aves, répteis e alguns peixes pulmonados (Khan *et al.*, 2017). Apesar de possuírem funções semelhantes, são observadas diferenças significativas na estrutura dos anticorpos IgY quando comparados aos anticorpos IgG de mamíferos (Figura 8).

Figura 8 – Comparação entre IgY de aves e IgG de mamíferos. As duas moléculas possuem duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, que consistem em um domínio variável (VH e VL) e domínios constantes: CH1, CH2, CH3 e CH4 no caso do IgY e CH1, CH2 e CH3 no caso do IgG. A região de dobradiça do IgG é mais longa, tornando a molécula mais flexível



Fonte: Adaptado de Müller *et al.* (2015).

Os anticorpos IgY possuem um domínio conservado a mais na sua cadeia pesada e, por esse motivo, possuem peso molecular mais alto que o IgG (180 kDa do IgY e 150 kDa do IgG). Além disso, são menos flexíveis por possuírem uma região de dobradiça mais curta (Warr; Magor; Higgens, 1995). Também foi observado que os IgY não apresentam reatividade com

fatores reumatóides de amostras humanas devido à ausência de receptores Fc correspondentes na estrutura de imunoglobulina (Hong *et al.*, 2018; Munhoz *et al.*, 2014).

Outros aspectos relacionados a esses anticorpos consistem no fato destas moléculas poderem ser obtidas de forma não invasiva, a partir da gema de ovos, sem a necessidade de sangria e/ou eutanásia do animal, o que se apresenta como uma característica desejável para diminuir as desvantagens éticas relacionadas à obtenção de anticorpos (Khan *et al.*, 2017).

O uso da tecnologia IgY também apresenta a vantagem de escalabilidade, uma vez que em uma gema de ovo de galinha imunizada são encontrados 50-200 mg de anticorpos IgY, dentre os quais 1-10% são anticorpos específicos ao antígeno de interesse (Schade *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2011). Em comparação aos mamíferos, a produção de uma galinha poedeira corresponde a quatro vezes a produção de um coelho no decorrer de um ano (Schade *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2011).

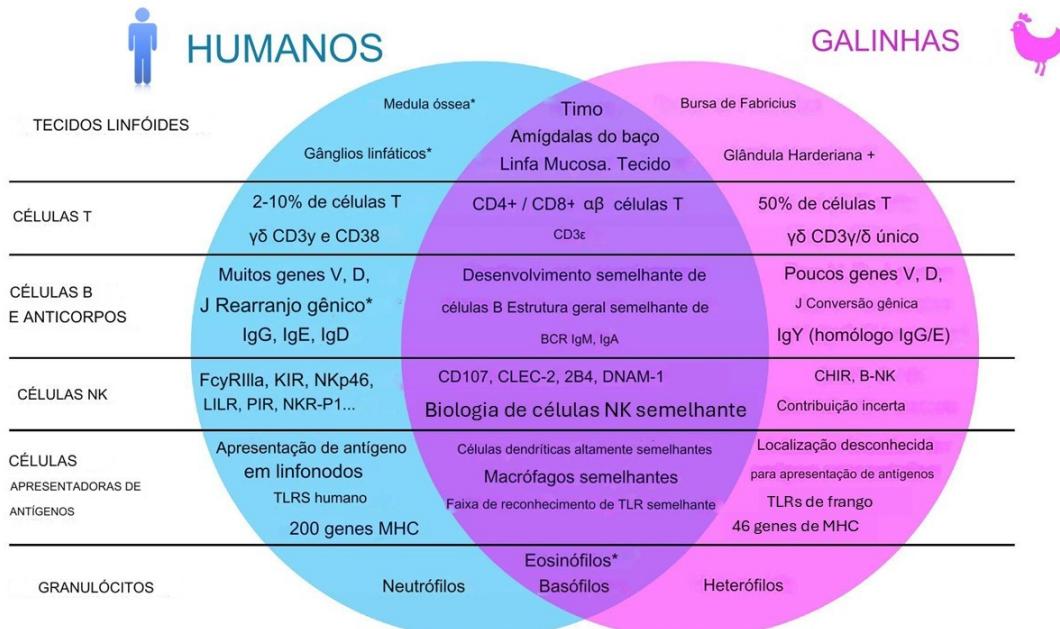
2.7.1 Resposta imune humoral em galinhas

Assim como o sistema imune de mamíferos, o sistema imune de aves é composto por células imunitárias, como as células T e B que estão localizadas em tecidos linfoides estrategicamente dispostos para melhor proteção do hospedeiro (Boehm; Hess; Swann, 2012; Rostami *et al.*, 2018).

Os tecidos linfoides são classificados em primários, como o timo e a bursa de Fabricius, e secundários, como o baço (Ifrah *et al.*, 2017; Madej; Stefaniak; Bednarczyk, 2015; Sun *et al.*, 2016). Os tecidos linfoides primários selecionam linfócitos como as células T (células dependentes do timo) e células B (células selecionadas na bursa de Fabricius), garantindo uma resposta imune apropriada e evitando a autoimunidade. Os precursores de células B e T são gerados pelas células linfoides embrionárias na medula óssea (Boehm; Hess; Swann, 2012).

Assim como nos mamíferos, a resposta imune das aves também é dividida em inata e adquirida, esta última sendo caracterizada por ser uma resposta mais lenta, por produzir anticorpos e também ser a memória imunológica (Jeurissen *et al.*, 2000; Kaiser, 2012). Um resumo das diferenças e similaridades entre a resposta imune de galinhas e humanos pode ser encontrado na Figura 9.

Figura 9 – Resumo das semelhanças e diferenças entre os sistemas imunológicos humano e de galinha. *Presente em ambas as espécies, com menor contribuição em galinhas. † Presente em ambas as espécies, com menor contribuição em humanos



Fonte: Adaptado de Garcia *et al.* (2021).

Em galinhas, são três os isotipos de imunoglobulinas produzidas: IgM, IgA e IgY, as quais são produzidas por plasmoblastos e plasmócitos. Nas aves, as células precursoras diferenciam-se e proliferam na bursa de Fabricius, de onde viajam para a periferia como linfócitos B maduros. Cada linfócito B carrega em sua superfície moléculas de IgM com uma determinada especificidade de antígeno. Todos os diferentes patógenos são reconhecidos porque existem muitos linfócitos B, cada um com sua própria especificidade antigênica (Hammer, 1974; Jeurissen *et al.*, 2000).

Quando os linfócitos B encontram patógenos ou antígenos pela primeira vez, eles se ligam a esses antígenos, ou a partes deles, por meio das moléculas de IgM em sua superfície (Hammer, 1974). No entanto, os linfócitos B necessitam de vários sinais coestimulatórios dos linfócitos T e de outras células para se tornarem plasmoblastos e iniciarem a produção de anticorpos específicos (Jeurissen *et al.*, 2000). Ao mesmo tempo, porém, ocorre a chamada formação de memória que, após contato renovado com o mesmo antígeno, levará a uma resposta imune mais rápida, mais elevada e mais específica e a uma mudança de moléculas IgM para IgY (Hammer, 1974; Jeurissen *et al.*, 2000).

Os mecanismos de transmissão de anticorpos da galinha para a gema e o uso de anticorpos pela prole em galinhas estão bem documentados (Hamal *et al.*, 2006; Kowalczyk *et al.*, 1985). Nas galinhas, assim como nos mamíferos, o IgY (análogo ao IgG em mamíferos) é

o isótipo de anticorpo predominante transferido da galinha para a prole através dos ovos (Brambell, 1966; Hamal *et al.*, 2006). A IgY de galinha é primeiro transportada do soro da galinha para a gema por um sistema de transporte seletivo de IgY nos folículos ovarianos aviários, o qual reconhece a porção Fc da IgY e exclui imunoglobulinas poliméricas (Kitaguchi *et al.*, 2008).

Foi relatado que a captação de IgY na gema é proporcional ao acúmulo de massa vitelina e, portanto, a concentração de IgY não varia entre soro e gema (Kowalczyk *et al.*, 1985). A IgY da gema também é absorvida pela circulação fetal durante a incubação. A IgY circulante em jovens é principalmente de origem endógena até 2 semanas (Grindstaff; Brodie; Ketterson, 2003) e a prole começa a sintetizar ativamente a partir de 5 dias após a eclosão (Brambell, 1966; Rose; Orlans, 1981).

2.7.2 Uso de IgY em testes de diagnóstico de doenças bacterianas

O ensaio imunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) tem sido amplamente utilizado para diagnosticar diversas doenças, exigindo anticorpos específicos para identificar os biomarcadores. A tecnologia IgY tem emergido como uma ferramenta eficaz nesse sentido, encontrando aplicações no diagnóstico de uma ampla gama de doenças infecciosas.

Tendo como foco o uso de IgY para detecção de doenças bacterianas, em um estudo conduzido por Bayat e colaboradores (2018), tais anticorpos foram empregados no desenvolvimento de um ensaio ELISA sanduíche para detectar as proteínas de membrana externa W (OmpW) e a citotoxina B (CtxB) do *Vibrio cholerae*. A cólera, uma infecção bacteriana com desafios epidemiológicos peculiares, apresenta instabilidade no número de casos ao longo do tempo e sintomas inespecíficos, dificultando seu rastreamento eficaz (Azman; Moore; Lessler, 2020). O ensaio imunoenzimático demonstrou um limite de detecção de 103 UFC/mL para a proteína OmpW e 33 pg/mL para a citotoxina B recombinante, proporcionando uma ferramenta sensível para identificar a presença do *V. cholerae*.

Outro estudo conduzido por Parma *et al.* (2012) desenvolveu um ensaio ELISA sanduíche para detectar toxina Shiga em cepas padrão de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC). Anticorpos IgY anti-Stx2B foram utilizados como anticorpos de captura, resultando na detecção de todas as 42 cepas de STEC testadas, com um limite de detecção de 115 ng/mL. Esse ensaio oferece uma ferramenta valiosa para identificar STEC, contribuindo para o controle de infecções alimentares. Também para detecção de *E. coli*, um estudo utilizou anticorpos IgY para detecção altamente específica da subunidade de enterotoxina B termolábil

de *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), apresentando um limite de detecção de 39 ng (Vansofla *et al.*, 2021).

Em relação ao botulismo, um estudo visou detectar a neurotoxina botulínica A (BoNT/A) usando anticorpos IgY contra um peptídeo linear. Dada a gravidade do botulismo, torna-se crucial detectar essas neurotoxinas em diversas amostras (Dressler, 2012; Li *et al.*, 2020; Pantano; Montecucco, 2014; Pirazzini *et al.*, 2017). O teste demonstrou um limite de detecção promissor, revelando potencial de aplicação em alimentos e amostras clínicas.

Para a tuberculose, Chen *et al.* (2013) desenvolveram uma abordagem inovadora utilizando microesferas de alginato contendo anticorpos IgY contra complexo de *Mycobacterium tuberculosis*. Essa técnica proporciona uma ferramenta sensível e específica para o diagnóstico de infecções bacterianas, com potencial para melhorar a detecção devido à ampla superfície de contato das microesferas.

Cortés-Sarabia e colaboradores (2021) investigaram a produção de anticorpos IgY contra um peptídeo referente à vaginolisina (VLY), que é um fator de virulência *Gardnerella vaginalis*. O estudo demonstrou a eficácia do mapeamento *in silico* de epítópos para que a especificidade dos anticorpos fosse alcançada, uma vez que os anticorpos desenvolvidos foram capazes de reconhecer sobrenadante de cultura bacteriana e a bactéria inteira (Cortés-Sarabia *et al.*, 2021)

Além disso, novos métodos estão sendo desenvolvidos para detectar抗ígenos de patógenos, como o estudo realizado por Kota *et al.* (2020), que utilizaram anticorpos IgY contra a proteína A de *Staphylococcus aureus* para desenvolver um ensaio de imunocaptura por PCR. Esse teste mostrou promessa na detecção de *S. aureus* em várias amostras, oferecendo uma opção econômica e específica para identificar esse patógeno.

Em resumo, os anticorpos IgY representam uma ferramenta valiosa para o diagnóstico de uma variedade de doenças infecciosas, demonstrando sensibilidade e especificidade em diversos ensaios imunoenzimáticos. Essas técnicas têm o potencial de melhorar o diagnóstico e o monitoramento de doenças, contribuindo para a saúde pública.

2.8 NANOPARTÍCULAS

Dentre as estratégias exploradas para o melhoramento da sensibilidade e especificidade dos imunoensaios e teste de diagnóstico rápidos, há a utilização de nanopartículas, seja para concentração de analitos de baixa concentração em amostras clínicas ou ambientais (Safarik; Safarikova, 2004; Xia *et al.*, 2021) ou para amplificação de sinal de detecção de testes utilizando nanopartículas fluorescentes (Hu *et al.*, 2021; Zhu; Sikora; Ozcan, 2012).

Nanopartículas (NPs) podem ser definidas como material com pelo menos uma de suas dimensões na faixa de 1-100 nanômetros (Shrestha; Wang; Dutta, 2020) ou definidas como estrutura que experimenta confinamento em todas as três dimensões (x,y,z). Por outro lado, quando uma estrutura está confinada a apenas duas dimensões, pode assumir a forma de um nanofio ou nanobastão (Hossain *et al.*, 2023).

As nanopartículas foram anteriormente categorizadas como nanopartículas de dimensão zero, unidimensional, bidimensional e tridimensional (El-Kalliny *et al.*, 2023; Naguib *et al.*, 2023 apud Hu; Shaw, 1999), mas quando se trata de análise de caracterização, as partículas são comumente tratadas como esferas ou bastonetes, apesar de sua estrutura cristalina muitas vezes levar a formas multifacetadas (Hossain *et al.*, 2023). Há dois grandes grupos distintos de nanopartículas: NPs orgânicas (sistema micelar, polímeros, nanotubos de carbono e fulerenos) e NPs inorgânicas (pontos quânticos, óxido de ferro e RAMAM), as quais podem ser projetadas para servir como vetores na entrega de fármacos (terapêutica), sondas de imagem (diagnóstico) ou ambas as aplicações (teranóstica) (Shrestha; Wang; Dutta, 2020).

Uma estratégia amplamente explorada na aplicação de anticorpos é sua utilização como sensor de reconhecimento molecular e biológico, que podem ser obtidos a partir da conjugação a nanopartículas diversas, como as nanopartículas de ouro coloidal (AuNPs), nanopartículas de prata (AgNPs), nanopartículas de látex e óxido de ferro, também descritas como *beads* magnéticas/superparamagnéticas e pontos quânticos (QDs) (Batistela, 2015; Higa, 2022; Mota *et al.*, 2023; Reis, 2023; Silva *et al.*, 2023).

Dentre essa gama de nanomateriais, as nanopartículas de óxido de ferro e os pontos quânticos têm sido amplamente utilizados nos últimos anos (Brasil Júnior, 2014; Cabral Filho, 2013; Carvalho, 2014; Feitosa, 2022; Lopes, 2012). Dessa forma, essas tecnologias têm sido apresentadas como alternativas para o desenvolvimento de testes de imunodiagnóstico mais simples, eficazes e acessíveis na exploração para o desenvolvimento de imunossensores como ferramentas de detecção.

2.8.1 Pontos quânticos (*quantum dots*)

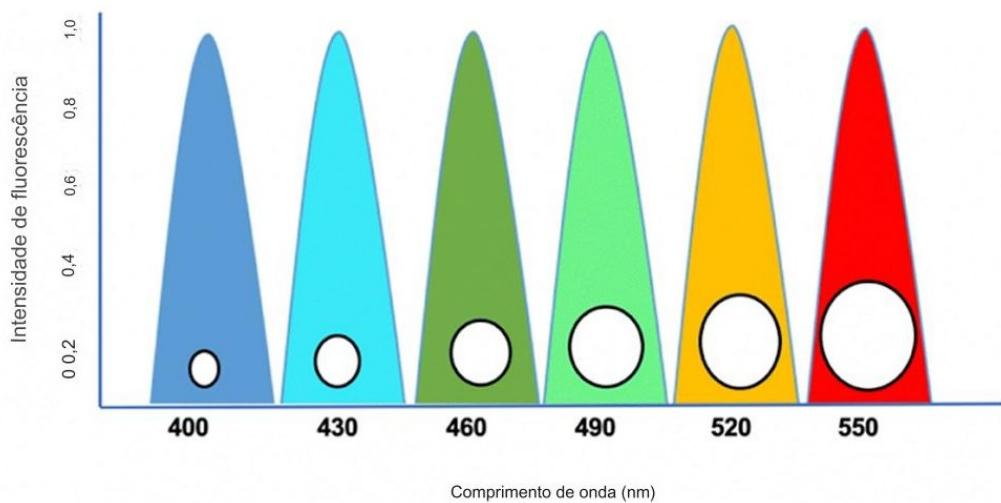
Os pontos quânticos, do inglês *quantum dots* (QDs), são um novo tipo de nanomaterial fluorescente que consiste em núcleos inorgânicos com moléculas orgânicas na escala nanométrica entre 1-10 nanômetros aplicados à superfície do núcleo (Jahangir *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020a; Rajendiran *et al.*, 2019). Estes podem ser sintetizados por diferentes materiais como o carbono, silício, seleneto de cádmio, sulfeto de cádmio ou arseneto de índio que, quando excitados por uma fonte de luz, emitem fluorescência. Essas propriedades químicas e ópticas conferem uma fotoestabilidade prolongada, fornecem brilho de sinal superior e emissão de fluorescência em várias cores (Figura 10) (Boopathy *et al.*, 2023). A intensidade de fluorescência é maior que a de corantes orgânicos ou proteínas fluorescentes e possui também maior resistência ao branqueamento (Smiley Smith *et al.*, 2008).

Essas nanopartículas são caracterizadas por uma energia (*band gap*) que depende da composição e tamanho da partícula. Isso requer uma energia mínima necessária para excitar um elétron a um nível de energia acima de seu estado fundamental, geralmente através da absorção de um fóton de energia maior. O relaxamento do elétron excitado pode ser acompanhado pela emissão fluorescente de um fóton (Smiley Smith *et al.*, 2008).

Com isso, suas propriedades ópticas e eletrônicas estão sendo exploradas como uma nova classe de sonda para células e moléculas (Stanisavljevic *et al.*, 2015) e, quando combinados a outras nanopartículas, podem ser excelentes ferramentas em bioensaios (Heli; Ajji, 2020). Dessa forma, podem ser aplicados em diversos campos como a química, microbiologia e bioquímica para aumentar a sensibilidade e velocidade de detecção do analito-alvo (Kong *et al.*, 2016).

Essas nanopartículas solúveis em água podem ser acopladas a biomoléculas como anticorpos e oligonucleotídeos utilizando protocolos de bioconjugação sem alteração da reatividade das biomoléculas (Díaz-González; Escosura-Muñiz, 2021). Nos últimos anos, os *quantum dots* de ZnCdSe/ZnS conjugados a proteínas têm sido explorados em testes de fluxo lateral fluorescente para detecção de anticorpos para o desenvolvimento de imunossensores. A intensidade de fluorescência, valores de pico de espectro de fluorescência e condições de acoplamento têm sido otimizados para determinar as melhores condições em proporções de agentes de conjugação, proteína e PBS, e faixa de pH a fim de evitar a sedimentação do material (Li *et al.*, 2022).

Figura 10 – Perfis de excitação e emissão de QDs com emissão simétrica e picos estreitos com ampla excitação em comprimento de onda entre 400 nm a 550 nm. Pico de intensidade baseado na absorbância e no tempo (ns) em relação às amostras biológicas



Fonte: Adaptado de Boopathy *et al.* (2023).

Outra estrutura que vem ganhando destaque nas últimas décadas quanto a sua aplicação em ensaios para diagnóstico são as esferas magnéticas, que podem apresentar tamanho micro ou nanométrico. O Capítulo I desta tese é dedicado a estas partículas, destacando sua estrutura e uso em imunoensaios para detecção de bactérias diarreogênicas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver novas ferramentas e métodos para detecção de *Escherichia coli* diarreogênicas e *Shigella flexineri*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar um levantamento bibliográfico sobre o estado da arte de novas tecnologias de diagnóstico de doenças diarreogênicas;
- Produzir e isolar anticorpos IgY contra fatores de virulência de bactérias diarreogênicas;
- Padronizar método de acoplamento dos anticorpos às *beads* magnéticas (BMs) e *quantum dots* (QDs);
- Padronizar imunoensaio utilizando BMs, QDs e IgY para detecção de ETEC e *Shigella flexneri*;
- Analisar a sensibilidade e especificidade do método desenvolvido.

CAPÍTULO I

Este capítulo apresenta um artigo de revisão que descreve os pontos quânticos e sua ampla utilização, mas com foco principal na utilização como sonda fluorescente no desenvolvimento de métodos para diagnóstico.

Informações sobre o artigo

Título do artigo: “MINI-REVIEW: USO DE BEADS MAGNÉTICAS EM IMUNOENSAIOS PARA DETECÇÃO RÁPIDA DE BACTÉRIAS DIARREIOGÊNICAS”.

Situação: A ser submetido.

Revista a ser submetido: Experimental Biology and Medicine

MINI-REVIEW:**USO DE ESFERAS MAGNÉTICAS EM IMUNOENSAIOS PARA DETECÇÃO
RÁPIDA DE BACTÉRIAS DIARREIOGÊNICAS**

Jeniffer Clorives Lopes Batista^{1, 3}, Juliane Corrêa Glória^{1, 4}, Luis André Morais Mariúba^{1, 2, 3, 4}

1- Instituto Leônidas e Maria Deane Fiocruz Amazonia, Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia;

2- Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia;

3- Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada;

4- Instituto Leônidas e Maria Deane Fiocruz Amazonia, Programa de Pós-Graduação em Biologia da Intereração patógeno-hospedeiro.

RESUMO

A diarreia é uma das principais causas de mortalidade infantil, especialmente em regiões como África Subsaariana, sul e sudeste da Ásia. O diagnóstico preciso do microrganismo causador da diarreia é essencial para um tratamento adequado. Os imunoensaios têm sido utilizados para a rápida e precisa detecção do patógeno causador da doença. Junto a estes ensaios, tem crescido o uso de esferas magnéticas para promover o isolamento do microrganismo e concentração deste. Este artigo aborda as diferentes aplicações destas esferas nos últimos anos para a detecção rápida de bactérias diarreogênicas.

Palavras-chave: diarreia; imunoensaios; “beads” magnéticas; diagnóstico

1. INTRODUÇÃO

A síndrome diarreica pode ser definida como uma doença do trato gastrointestinal caracterizada por frequentes evacuações ao longo do dia, cujas fezes apresentam alterações na consistência (KHAN et al., 2023). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença pode ser classificada em três categorias: diarreia aguda aquosa, diarreia aguda com sangue (disenteria) e diarreia persistente (WHO, 2007).

A doença pode ser causada por bactérias (*Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Shigella* e *Salmonella* spp.), vírus (Rotavírus, Norovírus e Adenovírus), protozoários e parasitas (*Cryptosporidium*), que podem ser transmitidos por água contaminada (MOSISA et al., 2021) ou alimentos contaminados, por via fecal-oral (DA CRUZ GOUVEIA; LINS; DA SILVA, 2020). Alguns sintomas como vômito, febre e dor abdominal estão frequentemente associados com a síndrome diarreica (GUERRANT et al., 2001; SHANE et al., 2017; WENZL et al., 1995).

Uma série de fatores que contribuem para a prevalência da doença em diferentes populações, como a desnutrição, acesso limitado à água potável, condições precárias de higiene e a suspensão de aleitamento materno (CHANG et al., 2021). Alguns estudos descrevem que a exposição a infecções na primeira infância pode prejudicar o desenvolvimento cognitivo, atrasar o crescimento e expor esses indivíduos a um risco maior de desenvolverem comorbidades na vida adulta, como a obesidade (GUERRANT et al., 1999).

O Global Burden of Diseases Study (GBD) de 2016 determinou que a diarreia foi a oitava principal causa de óbitos entre indivíduos de diferentes faixas etárias, com 1.665.944 óbitos, sendo considerada a quinta principal causa de mortalidade infantil, totalizando 446.000 óbitos entre crianças menores de cinco anos de idade, de forma predominante na África Subsaariana, Sul e Sudeste da Ásia. O estudo evidenciou ainda a redução substancial na carga global da diarreia e, apesar da redução entre os diferentes locais, revelou que a sobrecarga entre adultos com mais de 70 anos requer atenção (TROEGER et al., 2018).

Embora geralmente possamos reconhecer os sintomas das doenças diarreicas, identificar com precisão o microrganismo causador requer exames precisos. Os métodos diagnósticos tradicionais, como cultura de fezes ou microscopia, têm suas limitações em termos de precisão e tempo para entrega do resultado. Nesse sentido, diversos esforços têm sido realizados buscando o desenvolvimento de testes para detecção rápida e precisa do agente causador da diarreia, possibilitando assim tratamento e acompanhamento adequado ao paciente.

Vários sistemas de detecção foram desenvolvidos com a finalidade de atender a necessidades urgentes em diferentes ambientes clínicos, dentre eles os imunoensaios. Estes utilizam anticorpos como molécula base de reconhecimento biológico, onde ocorre a conversão

do evento de ligação antígeno-anticorpo em um sinal detectável e mensurável, os quais são ferramentas clínicas já estabelecida para a detecção de analitos até em baixa concentração (BANGE; HALSALL; HEINEMAN, 2005; KADMISSETTY et al., 2015).

Esta técnica proporciona uma ligação antígeno-anticorpo altamente específica e sensível, que permite detectar uma diversidade de biomoléculas, proteínas, ácidos nucleicos e outras pequenas moléculas que podem ser encontradas em vírus e em bactérias. Dentre os exemplos clássicos de imunoensaios há os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA), método amplamente utilizado desde a década de 70 (GIL ROSA et al., 2022). O ELISA, cuja sensibilidade é oferecida em picogramas por mililitro em detecção de proteínas, possui a capacidade de detectar analitos únicos, embora em alguns casos apresente baixa sensibilidade (LI et al., 2020).

Outro ensaio muito utilizado são os testes de fluxo lateral, surgidos a partir da década de 1980, sendo desenvolvidos para detecção de biomarcadores no ponto de atendimento, também conhecidos como testes POC, do inglês “Point of Care” (WANG et al., 2020). Estes oferecem detecção rápida, econômica, confiável, semiquantitativa, de biomarcadores individuais, de menor sensibilidade em comparação ao ELISA (em nanogramas por mililitro), mas que se tornaram um dos métodos mais promissores em triagem clínica primária de primeira linha (KOCZULA; GALLOTA, 2016).

Outros sistemas de imunodetecção comercial foram desenvolvidos para obter uma entrega de resultado mais rápida, econômica, confiável e altamente sensível, como o Quansys multiplexed ELISA (DUPONT et al., 2005). Além deste, ainda em ambiente laboratorial, novos ensaios têm sido propostos através do emprego de outras metodologias de análise, dentre eles a análise óptica, como o ressonância plasmônica de superfície (SPR), a espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS), a microscopia de fluorescência (IM), a detecção de luminescência, absorbância óptica e colorimetria magnética e elétrica, transistor de efeito de campo e sensores eletroquímicos (GAO et al., 2019; JIRAKOVA et al., 2019; KADMISSETTY et al., 2018; LIU et al., 2016; PHILLIPS et al., 2018).

Buscando aprimorar a sensibilidade destes e outros ensaios tradicionais e modernos, partículas magnéticas esféricas (“beads” magnéticas) têm sido empregadas de modo a permitir a concentração prévia do alvo na amostra para posterior análise qualitativa/quantitativa. Este artigo tem como objetivo apresentar um levantamento dos estudos disponíveis na literatura do uso deste método aplicado à detecção, separação e concentração bactérias diarreogênicas.

2. ESFERAS MAGNÉTICAS

A detecção bacteriana é importante em análises de risco biológico, diagnóstico clínico, microbiologia forense, estudos ambientais. Isto impulsiona o desenvolvimento nas áreas de nanotecnologia e nanomateriais de ferramentas funcionalizadas inovadoras como os promissores sensores seletivos bacterianos que utilizam ímãs (BOHARA; PAWAR., 2015; HU et al., 2021).

Tais sensores utilizando “beads” magnéticas, as quais são importantes classe de nanopartículas/micropartículas tipicamente fabricadas a partir de metais puros (Fe, Co, Ni) ou mistura de metais e polímeros, sendo a utilização aumentada em várias aplicações médicas como no tratamento de câncer, liberação de drogas, ressonância magnética e biosensores, cuja maior vantagem é a manipulação a partir de um campo magnético externo. A composição química, tamanho, forma, morfologia e comportamento magnético são critérios importantes na determinação de suas aplicações como ligantes de moléculas biológicas (JIN et al., 2018; TRAN; TRAN; NGUYEN, 2010). Para isso, devem apresentar características como alta estabilidade em soluções, boa química de superfície, para serem facilmente adaptáveis às moléculas de ligação e alta magnetização (KOH; JOSEPHSON, 2009). É recomendável o uso de “beads” magnéticas do tamanho inferior a 50 nm para aplicações como biosensores a fim de promover atividade de ligação a uma superfície celular e serem mais estáveis em ambientes fisiológicos, evitando a agregação espontânea que ocorre com “beads” magnéticas de maiores tamanhos (CHITHRANI; CHAN, 2007).

A separação usando “beads” magnéticas é amplamente conhecida e tem sido utilizada como ferramenta analítica há décadas devido a funcionalidade de superfície e separação magnética. Proteínas ou DNA conjugados podem ser utilizados para interação específica com moléculas alvo e separados por um ímã externo. Ao longo das últimas décadas tem sido desenvolvido nanoestruturas para diversas finalidades em diagnóstico. As imuno-beads magnéticas são introduzidas como reagentes de amplificação para aumentar o sinal de detecção comparado imunossensores regular, como estratégia de reduzir interferências desconhecidos em testes de imunoensaios (WEAGANT; BOUND., 2001).

Nas próximas sessões, serão apresentadas diferentes aplicações de “beads” magnéticas para detecção rápida de bactérias diarreogênicas. Estas metodologias exploram basicamente a capacidade destas partículas em permitirem a concentração e isolamento da bactéria/antígeno alvo, seguida de uma detecção que pode ser executada por diversos métodos.

3. MÉTODOS DE DETECÇÃO

Dentre as diferentes metodologias relatadas na literatura que permitem a detecção das bactérias capturadas pela metodologia de “beads” magnéticas, a utilização de reagentes químicos os quais utilizam a própria bioquímica das bactérias alvo, tem se mostrado um dos caminhos mais simples e práticos para determinar a positividade de um teste (figura 1).

Park et al (2020) relataram o desenvolvimento de uma separação imunomagnética automatizada combinada com um ensaio colorimétrico para a detecção rápida de *E. coli* O157:H7 em amostras de alimentos. Os ensaios foram realizados utilizando amostras de leite contaminado incubados com “beads” imunomagnéticas contendo anticorpos anti- O157:H7 em sua superfície. Após separação das “beads” pelo uso de um imã, a amostra foi colocada em contato com tampão de lise bacteriana seguido de uma reação enzimática utilizando β -galactopiranosídeo vermelho de clorofenol (CPRG) para reagir com a enzima β -galactosidase liberada de *E. coli* O157: H7. A detecção da reação pode ser feita a olho nu e por medição de absorbância, podendo detectar 3×10^2 UFC/mL de *E. coli* O157:H7 de uma amostra de leite em 3 horas.

Uma estratégia similar foi relatada por Hong et al (2023), os quais estabeleceram uma nova estratégia para detectar *E. coli* em amostras de água. O ensaio se baseou no uso de esferas magnéticas conjugadas com proteína de fibra de cauda (TFP), seguida de uma reação enzimática utilizando o substrato CPRG. Os autores relatam uma maior capacidade de separação se comparado a métodos que utilizam a interação antígeno-anticorpo, sendo descrita a detecção de uma concentração menor que 10^2 UFC/mL, sem pré-enriquecimento, com alteração colorimétrica podendo ser determinada a olho nu em até 4 horas.

Ainda utilizando métodos colorimétricos para determinar a positividade da separação de bactérias utilizando “beads” magnéticas, Wen et al. (2014) relataram o uso da oxidação de 3, 3 ', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB) na presença de peróxido de hidrogênio para identificação da presença da bactéria não diarreogênica *Shewanella oneidensis*, a qual possui uma peroxidase em sua membrana bacteriana. O método foi capaz de detectar valores entre $5,0 \times 10^3$ e $5,0 \times 10^6$ CFU/mL da bactéria estudada, podendo ser tomado como exemplo de abordagem a qual utiliza elementos da própria bioquímica da bactéria para revelação do resultado sem a necessidade de lise bacteriana.

Neste sentido, abordagem não colorimétricas também vem sendo alvo de estudo. Bu et al. (2019) relatou o uso de detector portátil de hidrogênio juntamente com esferas magnéticas para separação da estrutura sanduíche e nanocompósitos híbridos como catalisadores para catalisar a geração de hidrogênio a partir de amônia-borano. O hidrogênio gerado foi detectado

por um detector de hidrogênio usando um método eletroquímico, sendo capaz de detectar até $10 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ de *E. coli* O157:H7.

Com o avanço da nanotecnologia, novas esferas magnéticas têm sido criadas em tamanhos inferiores a 100 nm, permitindo a aplicação destas em técnicas como os ensaios de fluxo lateral. Wang et al (2020) descreveram o desenvolvimento de um teste imunocromatográfico utilizando nanopartículas de núcleo magnético dual quantum dot (QD)-shell (Fe_3O_4 DQDs) como rótulos fluorescentes multifuncionais. Os $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ DQDs foram usados para capturar e enriquecer bactérias de amostras biológicas (sangue total humano e escarro), seguido de sua aplicação em tiras de LFA para a detecção quantitativa de bactérias. Ensaios labororiais apresentaram uma detecção ultrassensível de *Streptococcus pneumoniae* com um limite baixo de detecção de 8 células por mL e uma ampla faixa linear dinâmica de 10 células por mL a 10^7 células por mL, sendo superior de 55 a 1000 vezes aos métodos tradicionais de detecção em tirar imunocromatográficas. Esta metodologia ainda não foi aplicada a detecção de bactérias diarréogênicas, sendo um campo promissor para seu uso.

Contudo, um método similar foi aplicado por Cho e Irudayaraj (2013) para a detecção da bactéria *Listeria monocytogenes*, a qual pode ser transmitida por alimentos contaminados, causando uma grave infecção com presença de distúrbios gastrointestinais. Neste estudo, um ensaio imunocromatográfico enzimático foi realizado primeiramente através da separação e concentração da bactéria alvo pelo uso de nanopartículas magnéticas contendo a enzima “horseradish peroxidase”, seguida da aplicação desta amostra diretamente ao sistema de fluxo latera. Foi observado um limite de detecção de 95 e $97 \pm 19,5$ UFC/mL em solução tampão e amostra de leite a 2%, respectivamente, com tempo total de 2h para todo o processo. O ensaio não apresentou reatividade cruzada com *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*, sendo, portanto, aplicável tanto na triagem rápida de patógenos quanto como medida preventiva para conter surtos de doenças.

Outro exemplo do avanço no uso de esferas magnéticas para diagnóstico rápido de patógenos microbianos se dá pelo uso de sensores eletroquímicos impressos. Um estudo proposto por Pandey et al. (2022) utilizou esferas magnéticas de microgel funcionalizadas com DNAzima de clivagem de RNA específico de *Escherichia coli* (*E. coli*), os quais estavam programadas para transdução por sinais eletroquímicos. Tal metodologia foi ultrassensível na detecção rápida de *E. coli* em amostras de urina não diluídas e nem processadas, provenientes de pacientes sintomáticos com suspeita de infecções do trato urinário (ITU). O uso de esferas magnéticas de microgel permitiu a conjugação eficiente das DNAzimas, e resultou em limites de detecção de 6 UFC/mL em tampão e 138 UFC/mL em urina não processada, demonstrando

ainda uma alta especificidade contra múltiplos patógenos urinários, em até uma hora de ensaio. Com isso, observa-se uma grande relevância deste teste, que pode vir a servir de base para outros ensaios que possam ser aplicados em rotina clínica.

Uma metodologia amplamente utilizada aumentar a sensibilidade de ensaios para diagnóstico laboratorial de doenças é através da amplificação do material genético específico do patógeno em estudo através de métodos moleculares. Contudo, um dos gargalos para o desenvolvimento e disseminação destes testes de detecção molecular consiste na necessidade da utilização de reagentes e equipamentos sofisticados, o que restringe sua implementação ao ambiente laboratorial (GIRONES et al., 2010; KURKELA; BROWN, 2009). Visto essa problemática, é crescente o uso da técnica de amplificação isotérmica, como na técnica LAMP (“Loop Mediated Isothermal Amplification”), que combina a alta sensibilidade da detecção molecular com a praticidade de testes *point of care*, por dispensar a amplificação por ciclos de temperatura (NOTOMI et al., 2000).

Neste cenário, o estudo proposto por Li et al. (2022) utilizou um método de detecção por LAMP e CRISPR/Cas12a, aprimorado por esferas magnéticas de imunocaptura (ICB) (ICB-LAMP-CRISPER/Cas12a), para detecção rápida e visual de *Campylobacter jejuni*, que é uma das causas mais importantes de doenças infecciosas de origem alimentar e representa desafios para a segurança alimentar e a saúde pública. Usando o método ICB-LAMP-CRISPR/Cas12a, *C. jejuni* foi capturado pelas ICB, e o DNA genômico bacteriano foi então liberado por aquecimento e usado na reação LAMP. Após a reação LAMP, os produtos LAMP foram misturados e detectados pela mistura de clivagem CRISPR/Cas12a. Como resultado, este método de ICB-LAMP-CRISPR/Cas12a foi capaz de detectar um mínimo de 8 UFC/mL de *C. jejuni* em 70 min. Além disso, apresentou a vantagem de dispensar a separação de pré-amplificação, a reação tendo sido realizada em um só tubo após a captura das bactérias pelas ICB, evitando assim, a poluição por aerossóis. O método ICB-LAMP-CRISPR/Cas12a foi posteriormente validado testando 31 amostras fecais positivas para *C. jejuni* de diferentes fazendas de aves poedeiras. Com isso, também se apresenta como um método sensível, específico e prático, que pode ser aplicado para detecção de vários outros patógenos.

Ainda através de metodologias moleculares, Jiang et al. (2023) estabeleceu um método baseado em esfera magnética livre de eluição, utilizando polietileno-polipropilenoglicol (PEPPG) F68 em tampão de lise e usando solução de NaOH em vez de álcoois como tampão de lavagem para extração rápida de ácido nucleico de vários tipos de amostras biológicas (esfregaços nasofaríngeos, soro, leite e carne de porco), seguido de amplificação direta após o tratamento da amostra com tempo total de extração de 7 minutos. A sensibilidade dos ensaios

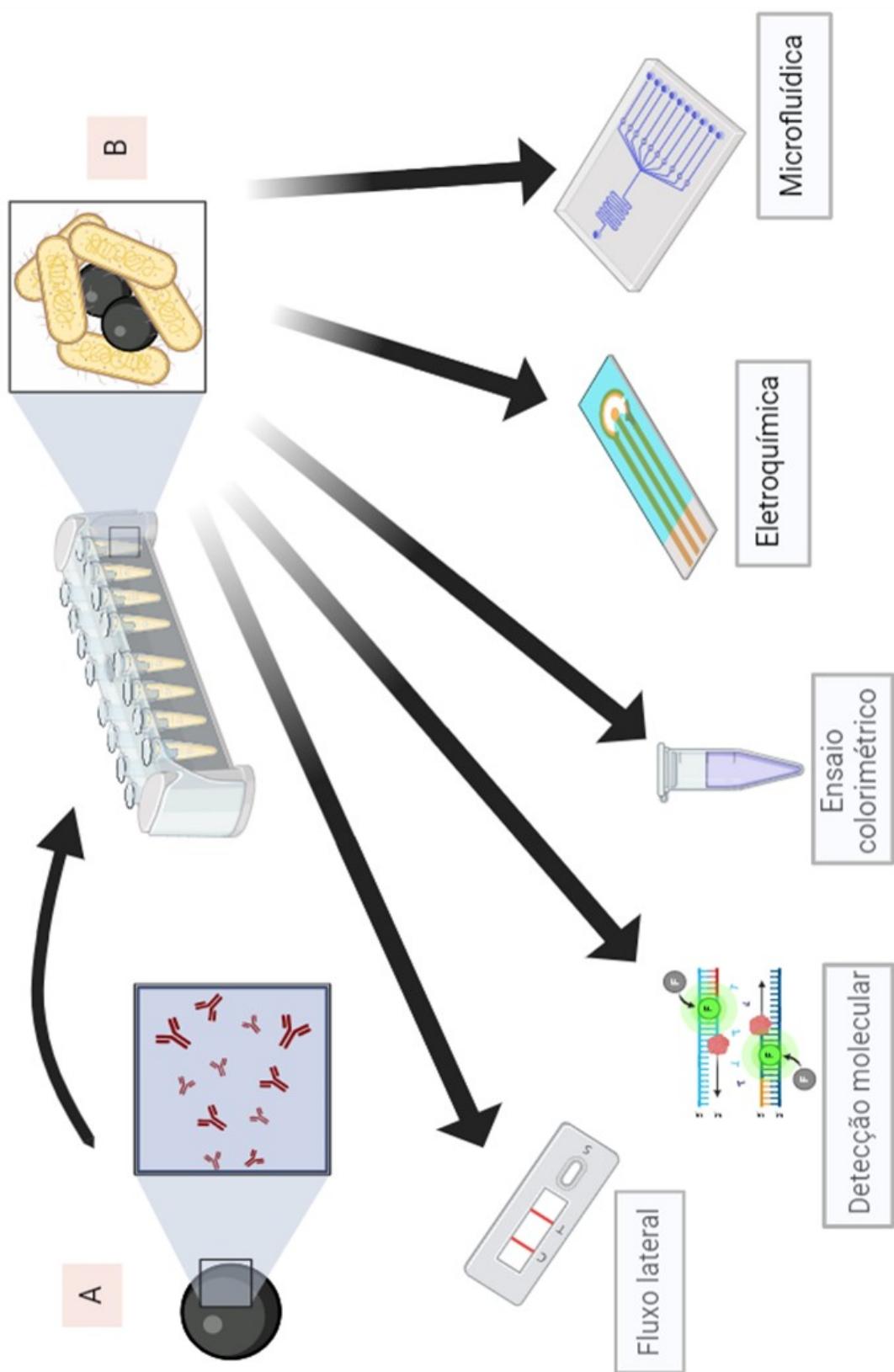
qLAMP às bactérias alvo nas amostras biológicas foi ainda maior do que os ensaios PCR em tempo real, apresentando limite de detecção de $1,0 \times 10^3$ cópias/mL, $1,0 \times 10^4$ UFC/mL, $1,0 \times 10^5$ UFC/mL e $1,0 \times 10^4$ UFC/mL para SARS-CoV-2, *S. aureus*, *E. coli* O157:H7 e *S. typhimurium*, respectivamente. Os resultados indicaram ainda que o método baseado em esferas magnéticas sem eluição foi mais eficaz para a extração de ácidos nucleicos de amostras utilizadas neste trabalho, as quais possuem alto teor de componentes orgânicos de interferência, do que quando comparado aos métodos tradicionais.

Também com o intuito de criar ferramentas para separação e concentração de analitos utilizando microesferas magnéticas, um estudo conduzido por Luciani et al. (2016) utilizou anticorpos monoclonais (MAbs) específicos para o lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O104:H4 em um método para detecção molecular desta cepa bacteriana em amostras de leite. A utilização das microesferas magnéticas funcionalizadas com os MAbs (separação imuno magnética - IMS) foi capaz de reduzir o tempo de execução do ensaio e aumentar a eficiência do isolamento em comparação com o procedimento de isolamento convencional baseado em cultura. Suspensões de leite contendo outras bactérias patogênicas com probabilidade de serem encontradas (*Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) também foram testadas para avaliar a especificidade das esferas revestidas com MAb. No entanto, estas mostraram boa capacidade de capturar *E. coli* O104:H4, mesmo em amostras de leite contaminadas com outras bactérias, com maior número de UFC de *E. coli* O104:H4 reisoladas em comparação com o método oficial. Com isso, o método de detecção demonstrou especificidade de 100%. Os autores utilizaram o método de PCR para confirmar a presença das bactérias analisadas, contudo fica clara a possibilidade da junção desta metodologia de detecção e isolamento das bactérias alvo com metodologias mais atuais de detecção molecular, como LAMP e RPA (“recombinase polymerase amplification”).

Estudos aplicando métodos altamente avançados para detecção de patógenos têm, da mesma forma que os demais escritos anteriormente, associado as características únicas das esferas magnéticas como base para realização de seus ensaios. Golberg et al. (2014) descreveu em seu estudo a plataforma ScanDrop para captura, detecção e identificação rápida e específica de bactérias em água potável. Esta integra microfluídica de baixos volumes, um sistema de imagem portátil. O método realiza o monitoramento em tempo real da qualidade da água através da detecção de um indicador de coliformes fecais, *Escherichia coli*, em água potável contaminada com fezes. Esta detecção é realizada utilizando esferas magnéticas conjugadas com anticorpos anti-*E. coli*, os quais realizam a captura seletiva e isolamento específico das bactérias nas amostras de água. As bactérias capturadas pelas esferas magnéticas são co-

encapsulado em gotículas de pico-litro com anti-*E. coli* marcado com fluorescência e fotografados com um sistema automatizado de microscopia de fluorescência personalizado, levando cerca de 8 horas para liberação online do resultado.

Figura 1 – Métodos de detecção rápida pós separação de bactérias utilizando beads magnéticas. **A** – Esferas magnéticas nano ou microestruturadas são preparadas de modo a conter em sua superfície moléculas (na maioria dos estudos são anticorpos) capazes de se ligar à bactérias diarréogênicas. Estas são adicionadas às amostras, incubadas e lavadas utilizando “racks” magnéticas as quais através de imãs possibilitam a separação rápida das esferas, sem a necessidade de centrifugações. **B** – Após o processamento das amostras, estas podem ser analisadas por uma diversidade de metodologias de rápida resposta como fluxo lateral, detecção molecular, ensaios colorimétricos, eletroquímica e microfluídica.



4. CONCLUSÃO

O constante avanço nas pesquisas na área de desenvolvimento de novos testes para diagnóstico de doenças tem caminhado a passos largos na última década. O uso de esferas magnéticas vem sendo uma constante na busca por métodos cada vez mais sensível, específicos, de rápida resposta, portáteis e menos onerosos. A facilidade na concentração e isolamento de moléculas alvo possibilitada pelo uso destas estruturas permitem de maneira única a análise de alvos em volumes maiores amostra, além de facilitar o carreamento destes em plataformas de detecção, como em sistemas microfluídicos. O uso de versões nanoestruturadas das esferas magnéticas parece estar em uma crescente expansão, abrindo, por exemplo, a possibilidade de aumento da sensibilidade de testes de fluxo lateral, sendo este a décadas um dos grandes problemas relatados para esta metodologia. A inserção no mercado de testes utilizando esta tecnologia poderá nos próximos anos trazer grandes benefícios para o tratamento de pacientes com síndromes diarreicas ou outras doenças, através de um encurtamento do tempo de entrega de resultados e aumento da acurácia de exames ainda não observada nos testes “point-of-care” atualmente disponíveis.

5. REFERÊNCIAS

- BANGE, A.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Microfluidic immunosensor systems. **Biosensors & bioelectronics**, v. 20, n. 12, p. 2488–2503, 15 jun. 2005.
- BOHARA, R. A.; PAWAR, S. H. Innovative Developments in Bacterial Detection with Magnetic Nanoparticles. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 176, n. 4, p. 1044–1058, 24 jun. 2015.
- BU, S. J. et al. Immunoassay for pathogenic bacteria using platinum nanoparticles and a hand-held hydrogen detector as transducer. Application to the detection of Escherichia coli O157:H7. **Mikrochimica acta**, v. 186, n. 5, 1 maio 2019.
- CHANG, H. et al. Aetiology of acute diarrhoea in children in Shanghai, 2015-2018. **PloS one**, v. 16, n. 4, 1 abr. 2021.
- CHITHRANI, B. D.; CHAN, W. C. W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. **Nano letters**, v. 7, n. 6, p. 1542–1550, jun. 2007.
- CHO, I. H.; IRUDAYARAJ, J. Lateral-flow enzyme immunoconcentration for rapid detection of Listeria monocytogenes. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 10, p. 3313–3319, abr. 2013.
- DA CRUZ GOUVEIA, M. A.; LINS, M. T. C.; DA SILVA, G. A. P. Acute diarrhea with blood: diagnosis and drug treatment. **Jornal de pediatria**, v. 96 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 20–28, 1 mar. 2020.
- DUPONT, N. C. et al. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. **Journal of reproductive immunology**, v. 66, n. 2, p. 175–191, ago. 2005.
- GAO, Y. et al. Multiplex measurement of twelve tumor markers using a GMR multi-biomarker immunoassay biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 123, p. 204–210, 1 jan. 2019.
- GIL ROSA, B. et al. Multiplexed immunosensors for point-of-care diagnostic applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 203, p. 114050, 1 maio 2022.
- GIRONES, R. et al. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. **Water research**, v. 44, n. 15, p. 4325–4339, 2010.
- GOLBERG, A. et al. Cloud-enabled microscopy and droplet microfluidic platform for specific detection of Escherichia coli in water. **PloS one**, v. 9, n. 1, 27 jan. 2014.
- GUERRANT, D. I. et al. Association of early childhood diarrhea and cryptosporidiosis with impaired physical fitness and cognitive function four-seven years later in a poor urban

community in northeast Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 61, n. 5, p. 707–713, 1999.

GUERRANT, R. L. et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 32, n. 3, p. 331–351, 2001.

HONG, B. et al. Separation and colorimetric detection of Escherichia coli by phage tail fiber protein combined with nano-magnetic beads. **Mikrochimica acta**, v. 190, n. 6, 1 jun. 2023.

HU, S. et al. Rapid Detection Method for Pathogenic Candida Captured by Magnetic Nanoparticles and Identified Using SERS via AgNPs. **International journal of nanomedicine**, v. 16, p. 941–950, 2021.

JIANG, Q. et al. Direct capture and amplification of nucleic acids using a universal, elution-free magnetic bead-based method for rapid pathogen detection in multiple types of biological samples. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 415, n. 3, p. 427–438, 1 jan. 2023.

JIN, K. et al. Biomimetic nanoparticles for inflammation targeting. **Acta pharmaceutica Sinica. B**, v. 8, n. 1, p. 23–33, 1 jan. 2018.

JIRAKOVA, L. et al. Multiplexed Immunosensing Platform Coupled to Hybridization Chain Reaction for Electrochemical Determination of MicroRNAs in Clinical Samples. **Electroanalysis**, v. 31, n. 2, p. 293–302, 1 fev. 2019.

KADIMISETTY, K. et al. Automated multiplexed ecl immunoarrays for cancer biomarker proteins. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 8, p. 4472–4478, 21 abr. 2015.

KADIMISETTY, K. et al. Automated 3D-Printed Microfluidic Array for Rapid Nanomaterial-Enhanced Detection of Multiple Proteins. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 12, p. 7569–7577, 19 jun. 2018.

KHAN, A. I. et al. Outbreak of diarrheal diseases causes mortality in different geographical locations of Bangladesh during the 2021 COVID-19 era. **Frontiers in Public Health**, v. 11, p. 1103518, 27 jan. 2023.

KOCZULA, K. M.; GALLOTTA, A. Lateral flow assays. **Essays in biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 111–120, 30 jun. 2016.

KOH, I.; JOSEPHSON, L. Magnetic nanoparticle sensors. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 10, p. 8130–8145, out. 2009.

KURKELA, S.; BROWN, D. W. G. Molecular diagnostic techniques. **Medicine**, v. 37, n. 10, p. 535–540, 1 out. 2009.

LI, C. et al. Immunocapture Magnetic Beads Enhanced the LAMP-CRISPR/Cas12a Method for the Sensitive, Specific, and Visual Detection of *Campylobacter jejuni*. **Biosensors**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2022.

- LI, Z. et al. Histo-ELISA technique for quantification and localization of tissue components. **Scientific Reports** 2020 **10:1**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 16 nov. 2020.
- LIU, X. et al. Surface plasmon resonance immunosensor for fast, highly sensitive, and in situ detection of the magnetic nanoparticles-enriched *Salmonella enteritidis*. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 230, p. 191–198, 1 jul. 2016.
- LUCIANI, M. et al. Rapid detection and isolation of *Escherichia coli* O104:H4 from milk using monoclonal antibody-coated magnetic beads. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, p. 191817, 15 jun. 2016.
- MOSISA, D. et al. Determinants of diarrheal diseases among under five children in Jimma Geneti District, Oromia region, Ethiopia, 2020: a case-control study. **BMC Pediatrics**, v. 21, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2021.
- NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 12, 2000.
- PANDEY, R. et al. DNAzyme-Immobilizing Microgel Magnetic Beads Enable Rapid, Specific, Culture-Free, and Wash-Free Electrochemical Quantification of Bacteria in Untreated Urine. **ACS Sensors**, v. 7, n. 4, p. 985–994, 22 abr. 2022.
- PARK, J. Y. et al. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Using Automated Immunomagnetic Separation and Enzyme-Based Colorimetric Assay. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 5, 1 mar. 2020.
- PHILLIPS, E. A. et al. Ampli: A Construction Set for Paperfluidic Systems. **Advanced healthcare materials**, v. 7, n. 14, 25 jul. 2018.
- SHANE, A. L. et al. 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Infectious Diarrhea. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 65, n. 12, p. e45–e80, 15 dez. 2017.
- TRAN, H. V.; TRAN, L. D.; NGUYEN, T. N. Preparation of chitosan/magnetite composite beads and their application for removal of Pb(II) and Ni(II) from aqueous solution. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 30, n. 2, p. 304–310, 30 jan. 2010.
- TROEGER, Christopher et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global

Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1211-1228, 2018.

WANG, C. et al. Layer-by-layer assembly of magnetic-core dual quantum dot-shell nanocomposites for fluorescence lateral flow detection of bacteria. **Nanoscale**, v. 12, n. 2, p. 795–807, 2 jan. 2020.

WEAGANT, S. D.; BOUND, A. J. Evaluation of techniques for enrichment and isolation of Escherichia coli O157:H7 from artificially contaminated sprouts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 87–92, 4 dez. 2001.

WEN, J.; ZHOU, S.; CHEN, J. Colorimetric detection of Shewanella oneidensis based on immunomagnetic capture and bacterial intrinsic peroxidase activity. **Scientific Reports 2014 4:1**, v. 4, n. 1, p. 1–7, 5 jun. 2014.

WENZL, H. H. et al. Determinants of decreased fecal consistency in patients with diarrhea. **Gastroenterology**, v. 108, n. 6, p. 1729–1738, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoeal Disease. 2007. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>>

CAPÍTULO II

Neste capítulo, apresentamos o método de produção e análise de imunoglobulinas Y (IgY) a partir da utilização de peptídeos sintéticos imunogênicos baseados em antígenos de *Shigella flexneri*. O método de produção foi depositado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), mediado pelo Núcleo de Inovação Tecnológica do Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD FIOCRUZ AMAZÔNIA, e protegido pela patente nº BR10202000448-7-A2.

Título da patente: “POLIPEPTÍDEO, PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UMA IMUNOGLOBULINA IGY, IMUNOGLOBULINA IGY, USO DE UMA IMUNOGLOBULINA IGY, E DE UM POLIPEPTÍDEO, E, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA”.

Situação: Depositada.

Instituição de depósito: Instituto Nacional da Propriedade Intelectual - INPI

POLIPEPTÍDEO, PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UMA IMUNOGLOBULINA IGY, IMUNOGLOBULINA IGY, USO DE UMA IMUNOGLOBULINA IGY E DE UM POLIPEPTÍDEO, E, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] *Shigella* é um patógeno Gram-negativo causador de disenteria aguda, e que acomete principalmente crianças menores de cinco anos de idade em países de baixa e média renda, ocasionando milhares de óbitos por ano. Em decorrência disso, diversos estudiosos têm se empenhado na busca por uma alternativa eficaz e segura, principalmente pela falta de uma vacina eficaz e pela disseminação de cepas multirresistentes. No presente pedido, peptídeos de proteínas de membrana externa e de proteína componente de pilus tipo 1 de membrana externa de bactérias Gram negativas foram utilizadas para avaliar sua capacidade de produção de IgY (Imunoglobulina Y). A IgY obtida e isolada, foi avaliada quanto a sua reatividade.

[002] A IgY obtida possui grande potencial para utilização em métodos de imunidade passiva contra bactérias Gram negativas, como por exemplo *Shigella* spp., e poderá servir de base para aplicação contra doenças causadas por diversas bactérias Gram negativas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[003] A shigelose, é uma doença diarreica infecciosa causada pelo enteropatógeno bacteriano Gram-negativo *Shigella* (YANG et al., 2018), o qual acomete principalmente crianças na faixa etária de zero a cinco anos de idade (PARAJULI et al., 2019), sendo a maioria dos casos ocorrentes em países de baixa e média renda (BONA et al., 2019).

[004] Fatores como condições precárias de saneamento básico e baixo nível socioeconômico, colaboram para a ocorrência de milhões de infecções e óbitos por ano, sendo considerada um problema global de saúde humana (PUZARI et al., 2018; MUTHUIRULANDI et al., 2016).

[005] O gênero *Shigella* comporta os quatro grupos *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* e *S. boydii* (FRENCK et al., 2018; FARZAM et al. 2017), restritas a primatas, o que as diferenciam dos demais membros da família *Enterobactereaceae*, a qual o gênero está inserido

(MATTOCK et al., 2017; TRIKHA et al., 2017). A infecção pode se dar com uma baixa dose infecciosa de 10-100 células bacterianas, transmitida através de moscas domésticas, pessoa a pessoa, água e alimentos contaminados por via fecal-oral, podendo também ser transmitida sexualmente (BONA et al., 2019). As espécies de *Shigella* causam a disenteria bacilar em humanos por invasão de células epiteliais do intestino, multiplicação intracelular, disseminação para células adjacentes e consequentemente a indução de respostas inflamatória no intestino (KOESTLER et al., 2018; GOPAL et al., 2017).

[006] A Organização mundial da Saúde (OMS) preconiza a utilização de antibióticos apenas para os casos grave da doença, porém alguns estudiosos têm discutido que inclusão dos casos de diarreia leve pode colaborar com a redução da mortalidade associada a *Shigella* (THIKELL et a., 2017). Espécies de *Shigella* já foram susceptíveis a ampicilina, cloranfenicol, cotrimoxazol, ácido nalidíxico, no entanto diversas cepas já desenvolveram resistência a fluoroquinolonas, cefalosporinas e azitromicina. (PUZARI et al., 2018; TRIKHA et al., 2017). Considerando o desenvolvimento de resistência a antibióticos como parte da evolução de bactérias, a OMS declarou esta situação crítica como uma questão de crise global (PUZARI et al. 2018), indicando a necessidade de revisão imediata do tratamento recomendado para shigelose, principalmente quando o mesmo é realizado empiricamente. Apesar de existirem diversos estudos em fase de ensaios clínicos, até o momento não há nenhuma vacina segura, eficaz, licenciada e disponível (FRENCK et al., 2018; NICKERSON et al., 2017).

[007] Com a latência no desenvolvimento de novos antibióticos, há uma extrema necessidade de novas abordagens terapêuticas para infecções bacterianas, sendo o direcionamento a fatores de virulência uma estratégia abordagem para impedir a adesão bacteriana (MYDOCK-MCGRANE et al., 2017). A adesão bacteriana é facilitada pela ligação da lectina FimH a glicoproteínas manosiladas que revestem o epitélio. Esta lectina, específica para manose está localizada na extremidade distal do pili tipo 1, uma classe de microfibrila proteica altamente expressa em patógenos entéricos Gram negativos (MYDOCK-MCGRANE et al., 2017).

[008] Dentre os métodos atualmente em desenvolvimento, destaca-se o uso de anticorpos para aplicação em tratamentos por imunidade passiva. Dentre eles, a tecnologia de IgY, ou seja, a produção e aplicação de imunoglobulinas Y (IgY), tem atraído bastante atenção devido às vantagens que proporcionam como baixo custo e maior rendimento produtivo na obtenção de anticorpos e aspecto positivo quanto a ética na utilização de animais, pois

possibilita a redução de animais necessários e um método não invasivo na produção anticorpos. Além disso, esses anticorpos possibilitam a redução de interferências em testes imunológicos por não apresentarem reatividade com as proteínas estafilocócica (A) e estreptocócicas(G), IgG de mamíferos, proteínas do complemento e fatores reumatóides devido à falta de receptores Fc correspondentes.

[009] As imunoglobulinas IgYs são produzidas por aves, répteis e anfíbios. A função das IgYs é semelhante à das IgGs de mamíferos. As IgYs estão presentes nos soros desses animais e são passadas para o embrião através da gema do ovo. Anticorpos IgY de ovos já foram sugeridos anteriormente contra infecções bacterianas e virais.

[0010] Acredita-se que a IgY funcione ao se ligar aos patógenos, levando à sua eliminação através do intestino e à prevenção da replicação. Em alguns casos, a imunização passiva usando anticorpos IgY tem início rápido e pode ser administrada a pacientes com infecção ativa. Também pode ser usada em seres com resposta imune imatura ou prejudicada, como bebês e adultos imunocomprometidos.

[0011] Uma vantagem adicional das IgYs é o alto teor de ácido siálico, que se acredita que possa prover um aumento da sua meia-vida em comparação com outros compostos com menor teor de ácido siálico. Esse achado sugere que a terapia baseada em IgY poderia ter uma meia-vida em circulação mais longa, o que poderia aumentar sua eficácia contra infecções (Abbas, A.T., 2019).

[0012] Nesse sentido, o documento de Amro et al. (2018) descreve o uso de epítocos sintéticos de proteínas de membrana externa OmpC para imunização de camundongos contra shigelose e obtenção de anticorpos contra *Shigella flexneri 3a* a partir do mesmo. A invenção citada, entretanto, não reivindicaria as sequências derivadas de FimH, mas sim de OmpC. Em nenhum momento descreve o uso de FimH. O documento ensina isolamento de anticorpos IgY de aves imunizadas em larga quantidade e alto grau de pureza através da precipitação com polietilenoglicol e sistema cromatográfico.

[0013] Já o documento de Jarzab et al. (2018) descreve um método de imunização em aves, incluindo um método de produção, expressão, separação, purificação, caracterização, validação e preparo de composição contendo IgY pela inoculação, via seringa, de antígenos de *Salmonella typhimurium*. Entretanto, a o antígeno utilizado inclui apenas proteínas de *Salmonella typhimurium* de grau de pureza comercial, não havendo consórcio ou combinação

de outras possíveis bactérias. Portanto tal referência não supre a necessidade de obtenção de novas alternativas para aplicação no tratamento de infecções de *Shigella*.

[0014] Por fim, o documento WO2009141455 mostra como obter sinteticamente抗ígenos naturais de membrana, ou抗ígenos-O (Ag-O). Tais são direcionados aos lipopolissacarídeos de membrana (LPS) de bactérias gram-negativas. A *Shigella flexneri* sorotipo 2a foi usada como modelo para síntese dos peptídeos antigenicos. A principal aplicação é descrita na reivindicação de uso na preparação de uma vacina através dos anticorpos responsáveis por ligarem aos ditos epítopos. O método engloba o uso de peptídeos de tamanho curto (~12aa), entretanto o documento se restringe ao uso de抗ígenos-O. O método de produção do anticorpo revelado no documento consiste em imunizar um mamífero não-humano com uma composição compreendendo o polipeptídeo, O-Ag. Entretanto, tal anticorpo é parte da família de imunoglobulinas tipo G, de mamífero (IgG), mais especificamente um mAb F22-4 murino.

[0015] Assim, surge a necessidade da identificação de novos抗ígenos de *Shigella* adequados para utilização na produção de IgYs que possam ser úteis em métodos de imunização passiva, tratamento e prevenção de infecções causadas por patógenos Gram negativos.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0016] Em um primeiro aspecto, a presente invenção se refere a um polipeptídeo possuindo pelo menos 80% de identidade com a sequência como descrita em qualquer uma das SEQ ID Nos. 1 a 12.

[0017] Em uma realização o polipeptídeo possui pelo menos 90% de identidade com qualquer uma das SEQ ID Nos. 2, 6 ou 9.

[0018] Em outra realização preferencial, o polipeptídeo de acordo com a presente invenção tem a sequência como descrita na SEQ ID No. 9.

[0019] Em um segundo aspecto, o presente pedido se refere a um processo para a obtenção de uma imunoglobulina IgY compreendendo as etapas de: a) inocular pelo menos

um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 em uma ave; e b) recuperar as imunoglobulinas IgY a partir do ovo produzido pela referida ave. [0020] Em uma realização, a referida imunoglobulina IgY é recuperada a partir da gema do dito ovo produzido pela ave.

[0021] Em outra realização, a referida ave é selecionada dentre as aves da família *Phasianidae*. Preferencialmente, a referida ave é do gênero *Gallus*.

[0022] Em uma realização preferencial, a referida ave é selecionada dentre as espécies *Gallus gallus*, *Gallus lafayettii*, *Gallus sonneratii*, e *Gallus varius*.

[0023] Em outra realização preferencial, a referida ave é selecionada dentre faisões, perdizes, galinhas, perus, codornas, pombas e pavões.

[0024] Em uma realização da presente invenção, pelo menos uma dose de reforço é administrada à ave de forma a mantê-la em um estado hiperimune.

[0025] Em um terceiro aspecto, a presente invenção se refere a uma imunoglobulina IgY obtida pelo processo como descrito acima.

[0026] Em um quarto aspecto, a invenção se refere ao uso de uma imunoglobulina IgY para a manufatura de uma composição para a prevenção ou tratamento de infecções por bactérias Gram negativas.

[0027] Em outro aspecto, a presente invenção se refere ao uso de um polipeptídeo para a manufatura de uma composição para provocar uma resposta imune contra uma bactéria Gram negativa em uma ave.

[0028] Em uma realização, a referida bactéria Gram negativa é pertencente à família *Enterobacteriaceae*.

[0029] Em outra realização de acordo com a presente invenção, a bactéria é selecionada dentre as bactérias pertencentes aos gêneros *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Grimontella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phlomobacter*,

Photorhabdus, Plesiomonas, Pragia, Proteus, Providencia, Rahnella, Raoultella, Salmonella, Samsonia, Serratia, Shigella, Sodalis, Tatumella, Trabulsiella, Wigglesworthia, Xenorhabdus, Yersinia, e Yokenella.

[0030] Em uma realização preferida, a referida bactéria é selecionada dentre as bactérias pertencentes aos gêneros *Enterobacter, Escherichia, Salmonella e Shigella*.

[0031] Em uma realização, a referida bactéria do gênero *Enterobacter* é selecionada dentre *E. amnigenus, E. arachidis, E. asburiae, E. cancerogenous, E. cloacae, E. cowanii, E. dissolvens, E. gergoviae, E. helveticus, E. hormaechei, E. intermedius, E. kobei, E. ludwigii, E. mori, E. nimipressuralis, E. oryzae, E. pulveris, E. pyrinus, E. radicincitans, E. taylorae, E. turicensis, e E. soli.* [0032] Em outra realização, a referida bactéria do gênero *Escherichia*, é selecionada dentre *E. albertii, E. coli, E. fergusonii, E. hermannii, E. marmotae, e E. vulneris*.

[0033] Em mais uma realização, a referida bactéria do gênero *Salmonella*, é selecionada dentre *Salmonella bongori, e Salmonella entérica*.

[0034] Em uma outra realização, a referida bactéria do gênero *Shigella*, é selecionada dentre *S. boydii, S. dysenteriae, S. flexneri, e S. sonnei*.

[0035] Em mais um aspecto, a presente invenção se refere a uma composição imunogênica que compreende: um elemento imunologicamente ativo selecionado do grupo consistindo de uma imunoglobulina IgY da invenção, um ovo de ave obtido pelo processo de acordo com a invenção, ou uma gema isolada desse ovo; e um excipiente, veículo ou carreador biologicamente aceitável.

[0036] Em uma realização, a formulação é formulada sob a forma de uma composição farmacêutica ou nutracêutica.

[0037] Em outra realização, o referido excipiente, veículo ou carreador biologicamente aceitável é selecionado do grupo compreendendo um desintegrante ou auxiliar de desintegrante, aglutinante, agente de revestimento, corante, diluente, base, solubilizante ou auxiliar de solubilizante, agente de isotonicidade, regulador de pH, estabilizante, propelente, adesivo e semelhantes.

[0038] Em uma outra realização, a formulação é formulada para ser administrada por via oral. Preferencialmente, a formulação está na forma de comprimido, tablete, cápsula, pó, grânulo fino, grânulo, solução, suspensão e xarope.

[0039] Em uma realização preferencial, a composição compreende como excipiente, veículo ou carreador biologicamente aceitável, pelo menos um composto selecionado de um diluente, como glucose, lactose, lactose monoidratada, D-manitol, amido, celulose cristalina; um desintegrante ou auxiliar de desintegrante, como carboximetilcelulose, amido, carboximetilcelulose de cálcio, dióxido de silício; um aglutinante, como hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmelcelulose, polivinilpirrolidona, gelatina; um lubrificante, como estearato de magnésio, talco; um material de base, como hidroxipropilmelcelulose, sacarose, polietilenoglicol, gelatina, caulin, glicerol, água purificada e gordura dura; e misturas dos mesmos.

[0040] Em outra realização, a composição é formulada para ser administrada por via parenteral. Preferencialmente, a composição está na forma de uma injeção, fluido intravenoso e solução ou suspensão para infusão.

[0041] Em uma realização preferencial, a composição compreende como excipiente, veículo ou carreador biologicamente aceitável, pelo menos um composto selecionado de um solubilizante ou auxiliar de solubilizante, como água destilada para injeção, solução salina, propileno glicol; um agente de isotonicidade, como glicose, cloreto de sódio, D-manitol, glicerol; um regulador de pH, como um ácido inorgânico, ácido orgânico, base inorgânica ou orgânica; e misturas dos mesmos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0042] Figura 1 - Resultado dos testes de triagem realizados para o ELISA para os peptídeos P1 a P12 e controle (CN).

[0043] Figura 2 - Peso médio dos camundongos imunizados com os peptídeos P1, P2, P6, P9, P+ (mix de P2, P6 e P9) e controle (C-) 0, 24, 48, 72 e 96 horas após infecção com a cepa M90T.

[0044] Figura 3 - Confirmação da obtenção dos anticorpos obtidos a partir de imunização. Gel de poliacrilamida 15%: (0 e 12) Marcador de peso molecular *Ladder protein* de 11-180 KDa (SIGMA); (1-8) tem-se IgY total (pool), provenientes das imunizações realizadas com o peptídeo sintético P9; (9) canaleta vazia; (10) IgY –padrão (anti-humano) purificada; (11) tem-se a IgY anti-P9 isolada por cromatografia de afinidade. Todas as IgYs apresentaram banda correspondente a cadeia pesada (HC) entre 65 e 75 KDa e banda correspondente a cadeia leve entre 25 e 35 KDa.

[0045] Figura 4 - Imunodetecção diferentes IgY total produzidas. Dot Blot em membrana PVDF: imunodetecção de IgY em reconhecimento aos peptídeos P9 correspondentes às imunizações realizadas (1-7).

[0046] Figura 5 - Imunodetecção dos anticorpos por *Western Blot*. Quadro 1: Gel de poliacrilamida contendo o extrato bruto de *Shigella flexneri* 5a M90T em três diferentes quantidades (A = 5 µL; B = 10 µL; C= 15 µL). Quadro 2: Membrana PVDF com imunodetecção de IgY localizado entre as bandas de 35 KDa e 48 KDa. [0047] Figura 6 - Imunodetecção de anticorpos anti-P9 em reconhecimento de cepas-padrão de bactérias diarréogênicas. Teste de Citometria de Fluxo (FAC's Canto II BD Biosciences) - Reatividade das IgY a diferentes bactérias marcadas com brometo de etídeo utilizando secundário anti-chicken cabra Alexa flúor 488.

DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0048] De acordo com uma primeira realização, a presente invenção se refere a epítopos relacionados a proteínas de membrana externa, e de proteína componente de pilus de bactérias Gram negativas, preferencialmente bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*.

[0049] Por bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, entende-se, por exemplo, as bactérias pertencentes aos gêneros *Alishewanella*,

Alterococcus, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Grimontella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*,

Leclercia, Lemnirella, Moellerella, Morganella, Obesumbacterium, Pantoea, Pectobacterium, Phlomobacter, Photorhabdus, Plesiomonas, Pragia, Proteus, Providencia, Rahnella, Raoultella, Salmonella, Samsonia, Serratia, Shigella, Sodalis, Tatumella, Trabulsiella, Wigglesworthia, Xenorhabdus, Yersinia, e Yokenella.

[0050] De forma preferencial, a presente invenção se refere às bactérias pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella* e *Shigella*.

[0051] Por bactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter*, entende-se preferencialmente as espécies *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. cancerogenous*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvens*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. intermedius*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. taylorae*, *E. turicensis*, e *E. soli*.

[0052] Por bactérias pertencentes ao gênero *Escherichia*, entende-se preferencialmente as espécies *E. albertii*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. marmotae*, e *E. vulneris*.

[0053] Por bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella*, entende-se preferencialmente as espécies *Salmonella bongori*, e *Salmonella entérica*.

[0054] Por bactérias pertencentes ao gênero *Shigella*, entende-se preferencialmente as espécies *S. boydii*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, e *S. sonnei*.

[0055] Em uma modalidade específica, a presente invenção aborda epítocos com sequências sinteticamente construídas, desenvolvidas a partir de proteínas de membrana externa da *Shigella flexneri*, ditas OmpC e OmpA, e proteína componente de pilus tipo 1 de membrana externa de bactérias Gram negativas, dita FimH.

[0056] Os presentes inventores realizaram a construção de peptídeos sintéticos de baseados na membrana externa das espécies de *Shigella*. A análise inicial foi realizada in silico, seguida da síntese manual dos peptídeos. Os presentes inventores utilizaram sequências de peptídeos diferentes daquelas encontradas na literatura, uma vez que os presentes peptídeos foram inteiramente desenhados pelos inventores, além de não utilizarem apenas proteínas da OmpC como base, mas a também as proteínas OmpA e FimH. As sequências desenvolvidas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências estudadas ao longo da pesquisa, correspondentes aos epítopes lineares

Código	Antígeno	Sequência	Posição	Tamanho	*P.M.	Carga	Atributo
P1	OmpC	SEQ ID No. 1	227-236	10	1298,41	0	Neutro
P2	OmpA	SEQ ID No. 2	19-30	12	1365,45	0	Neutro
P3	OmpA	SEQ ID No. 3	56-69	11	1172,25	0	Neutro
P4	OmpA	SEQ ID No. 4	83-95	13	1410,54	1	Básico
P5	OmpA	SEQ ID No. 5	142-159	18	1793,97	-2	Ácido
P6	OmpA	SEQ ID No. 6	107-117	11	1321,44	-2	Ácido
P7	FimH	SEQ ID No. 7	82-91	10	923,97	0	Neutro
P8	FimH	SEQ ID No. 8	95-104	10	1088,17	1	Básico
P9	FimH	SEQ ID No. 9	133-140	8	646,69	0	Neutro
P10	FimH	SEQ ID No. 10	156-161	6	725,66	-1	Ácido
P11	FimH	SEQ ID No. 11	171-180	10	985,05	-1	Ácido
P12	FimH	SEQ ID No. 12	260-269	10	860,96	0	Neutro

*P.M.: Peso molecular

[0057] Dentre os doze peptídeos testados, os mais reativos foram: P1 (OmpC); P2 e P6 (OmpA); e P9 (FimH). A sequência do antígeno OmpC, que já havia sido predita em um estudo realizado anteriormente (Jarzab et al., 2013), foi sintetizada e utilizada como um controle positivo para comparação com as outras. Os estudos conduzidos pelos presentes inventores demonstraram que tais peptídeos foram capazes de serem reconhecidos pelos anticorpos anti-*Shigella*, o que leva a concluir que possuem potencial para serem bons candidatos para a produção de composições para imunização passiva e para a produção de composições vacinais. Vale ressaltar que esses quatro peptídeos se sobressaíram de maneira significativa em relação aos oito demais peptídeos restantes, pois estes últimos não demonstraram uma elevada expressão quantitativa referente à densidade óptica do ELISA, ficando bem mais próximos ao controle negativo (Figura 1).

[0058] Os presentes inventores utilizaram, então, os peptídeos P2, P6, P9 e um conjunto de todos eles (P2+P6+P9), juntamente com o controle positivo da literatura P1 e o controle negativo (adjuvante), para imunizar camundongos Balb/C com 6 a 12 semanas (grupos de 10 animais). Após 4 imunizações com intervalos de 15 dias entre elas, todas as amostras responderam satisfatoriamente.

[0059] Após este período, foi realizada a infecção desafio com 0,1mL de cepa M90T viva a uma concentração de 10⁹ via intraperitoneal e os camundongos foram monitorados por

peso durante 96h. Após 48h todos os camundongos do controle negativo (imunizado apenas com adjuvante) foram a óbito, enquanto os animais imunizados com os peptídeos propostos sobreviveram até 96h, alguns inclusive tendo aumento de peso (Figura 2). Demonstrando a eficácia do uso desses peptídeos para a elaboração de composições vacinais e para a produção de composições para a imunização passiva.

[0060] Como mencionado anteriormente, a presente invenção refere-se também a uma abordagem alternativa aos antibióticos para a prevenção ou tratamento de infecções por bactérias Gram negativas, preferencialmente bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (enterobactérias).

[0061] Mais precisamente, a presente invenção refere-se a anticorpos IgY, sendo esses anticorpos capazes de prevenir ou tratar uma infecção por essas bactérias. Mais particularmente, os anticorpos da presente invenção são capazes de impedir a adesão das enterobactérias ao intestino.

[0062] Nesse sentido, a invenção refere-se a um anticorpo imunologicamente específico para proteínas associadas à membrana externa, e para proteínas componentes de pilus de bactérias Gram negativas, sendo o anticorpo capaz de prevenir ou tratar uma infecção intestinal por essas bactérias quando administrado a um mamífero. Numa concretização preferida, o anticorpo da invenção é resistente à digestão. Mais preferencialmente, o anticorpo da invenção é um anticorpo IgY.

[0063] Como aqui utilizado, o termo "resistente" refere-se a um anticorpo que reterá substancialmente sua função imunológica mesmo após estar em contato com ácidos gástricos por um período necessário para prevenir ou tratar uma infecção. De preferência, o anticorpo da presente invenção é um anticorpo IgY. De fato, é sabido que os anticorpos IgY mostram grande resistência a ácidos e ao calor. Entretanto, o anticorpo de acordo com a presente invenção também pode ser uma imunoglobulina humana ou animal, como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgE ou IgD, contendo regiões variáveis de ratos ou camundongos, sendo quimérico, ou CDRs, sendo humanizado. Assim, a presente invenção não está restrita a anticorpos IgY, uma vez que é concebível que a capacidade de resistência de um anticorpo, caso seja necessário, pode ser fornecida ou aumentada por engenharia genética ou por qualquer outro meio conhecido por um técnico na área.

[0064] Além disso, o anticorpo de acordo com a presente invenção também pode ser conjugado com qualquer veículo ou excipiente adequado, tal como de conhecimento por um especialista na técnica, a fim de aumentar sua resistência gastrointestinal ou fornecer, por exemplo, uma liberação em um local específico ou prolongada, seja em uma área local direcionada, como o intestino ou estômago, ou seja, para uma aplicação sistêmica.

[0065] De acordo com a presente invenção, um mamífero é preferencialmente um primata. De forma mais preferencial, um primata de acordo com a presente invenção é um humano.

[0066] De acordo com outro aspecto, a presente invenção também é direcionada a um processo para a obtenção do anticorpo acima mencionado. Embora muitos processos conhecidos na técnica possam ser adequados para obter os anticorpos contemplados pelos presentes inventores, é preferível que o processo da presente invenção compreenda as etapas de: a) a inoculação de um peptídeo de acordo com a presente invenção em uma ave para estimular a produção de anticorpos; eb) recuperação dos anticorpos do ovo.

[0067] Como fica claro para um técnico no assunto, o passo de imunização pode ser alcançado por métodos bem conhecidos. Por exemplo, os peptídeos de acordo com a presente invenção podem ser administrados de forma parenteral, por exemplo por via intravenosa, intramuscular, subcutânea.

[0068] De acordo com um aspecto adicional, a presente invenção está relacionada a um processo para a obtenção de um anticorpo, conforme definido acima, compreendendo as etapas, conforme definidas acima.

[0069] De acordo com a presente invenção, a ave utilizada para o preparo do anticorpo é preferencialmente selecionada dentre as aves da família *Phasianidae*. Dentre as aves da família *Phasianidae*, são utilizadas preferencialmente as do gênero *Gallus*, dentre as quais são preferencialmente selecionadas as das espécies *Gallus gallus*, *Gallus lafayettii*, *Gallus sonneratii*, e *Gallus varius*. Alternativamente, as aves utilizadas de acordo com a presente invenção podem ser selecionadas dentre faisões, perdizes, galinhas, perús, codornas, pombas e pavões.

[0070] O processo da presente invenção também pode compreender uma etapa de administração de pelo menos um reforço dos peptídeos de interesse, de forma a manter um estado hiperimune na ave.

[0071] De acordo com outro aspecto, a invenção refere-se a um ovo, e a uma gema isolada desse ovo, contendo um anticorpo como definido acima ou produzido pelo processo descrito acima.

[0072] A presente invenção também está relacionada a métodos e a composições para a prevenção ou tratamento de doenças associadas às enterobactérias. Particularmente, a invenção se relaciona a um método que compreende a etapa de administração oral a um mamífero de um anticorpo de acordo com a presente invenção, um ovo de ave e / ou uma gema isolada como definidos anteriormente. No entanto, a presente invenção também pode estar relacionada a métodos que envolvem uma administração parentérica do anticorpo da invenção.

[0073] De acordo com uma modalidade preferida, a composição da invenção compreende pelo menos um elemento imunologicamente ativo contra as bactérias Gram negativas e um veículo ou carreador biologicamente aceitável. Esse elemento pode ser um anticorpo, um ovo de ave ou uma gema isolada, como descritos acima. Para a preparação das composições de acordo com a presente invenção, podem ser utilizados quaisquer métodos conhecidos pelos técnicos na área.

[0074] Como aqui utilizado, o termo "imunologicamente ativo", ou qualquer referência à atividade imunológica de um elemento, como por exemplo o anticorpo ou peptídeo da invenção, refere-se à capacidade de elemento para impedir, prevenir ou tratar uma infecção por bactérias Gram negativas em um mamífero por ligação a uma proteína associada à bactéria.

[0075] Como aqui utilizado, o termo "biologicamente aceitável" refere-se a um veículo ou carreador que pode ser administrado de forma segura a um animal, particularmente mamíferos e humanos, sem efeitos colaterais excessivamente negativos ou tóxicos.

[0076] De acordo com uma modalidade da invenção, a composição pode ser formulada sob a forma de uma composição farmacêutica ou nutracêutica. Nesse sentido, a composição de acordo com a presente invenção também pode estar na forma de um aditivo alimentar compreendendo pelo menos um dos elementos mencionados acima, ou ainda compreendendo uma composição como definida acima.

[0077] Embora as composições sejam preferencialmente administradas por via oral, elas podem ser administradas por qualquer outra via adequada. Em uma modalidade preferencial, as composições farmacêuticas de acordo com a presente invenção podem ser administradas por via oral, podendo estar na forma de comprimidos, cápsulas, pó, xaropes, suspensões, soluções e outras.

[0078] Como o aditivo farmaceuticamente e farmacologicamente aceitável, por exemplo, podemos citar um excipiente, desintegrante ou auxiliar de desintegrante, aglutinante, agente de revestimento, corante, diluente, base, solubilizante ou auxiliar de solubilizante, agente de isotonicidade, regulador de pH, estabilizante, propelente, adesivo e semelhantes podem ser usados. Exemplos de uma preparação adequada para administração oral incluem comprimido, tablete, cápsula, pó, grânulo fino, grânulo, solução, suspensão, xarope e semelhantes, e exemplos de uma preparação adequada para administração parenteral incluem injeção, fluido intravenoso, solução ou suspensão para infusão, pó inalante, e semelhantes. Contudo, a forma da preparação não deve ser limitada apenas a essas.

[0079] Uma preparação adequada para administração oral pode conter, como um aditivo, por exemplo, excipientes tais como glucose, lactose, lactose monoidratada, D-manitol, amido, celulose cristalina e semelhantes; desintegrante ou auxiliar de desintegrante, tal como carboximetilcelulose, amido, carboximetilcelulose de cálcio, dióxido de silício e semelhantes; aglutinante, tal como hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetylcelulose, polivinilpirrolidona, gelatina e semelhantes; lubrificante, tal como estearato de magnésio, talco e semelhantes; base, tal como hidroxipropilmetylcelulose, sacarose, polietileno glicol, gelatina, caulim, glicerol, água purificada, gordura dura, e semelhantes.

[0080] Uma preparação adequada para injeção ou fluido intravenoso pode conter aditivos para preparação, tais como solubilizante ou auxiliar de solubilizante, capazes de constituir uma injeção aquosa ou uma injeção para ser dissolvida quando em uso, como por exemplo, em água destilada para injeção, solução salina, propileno glicol, e semelhantes; agente de isotonicidade, como por exemplo, glicose, cloreto de sódio, D-manitol, glicerol, e semelhantes; regulador de pH tal como um ácido inorgânico, ácido orgânico, base inorgânica ou orgânica ou ainda semelhantes.

[0081] Embora a dose do agente farmacêutico da presente invenção deva ser variada, dependendo do tipo de doença a ser aplicado, condições de pacientes, tais como idade, peso

corporal, sintomas e semelhantes. Em geral, a dose adequada pode ser administrada em de uma a várias porções por dia, ou pode ser administrada a cada poucos dias. Quando dois ou mais tipos de ingredientes ativos estiverem envolvidos, a quantidade total pode ser ajustada.

[0082] A presente invenção é também descrita pelos exemplos não limitantes abaixo, que são meramente ilustrativos. Várias modificações e variações das concretizações são evidentes ao técnico no assunto, sem se afastar do espírito e do escopo da invenção.

[0083] Inúmeras variações incidindo no escopo de proteção do presente pedido são permitidas. Dessa forma, reforça-se o fato de que a presente invenção não está limitada às configurações / concretizações particulares acima descritas.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

1.1 Produção de anticorpos

[0084] Com base nos resultados obtidos pelos presentes inventores, o peptídeo P9 foi escolhido para o desenvolvimento de estudos mais aprofundados.

[0085] O peptídeo P9 (FimH) de *Shigella flexneri* foi utilizado para imunização em aves afim de produzir e avaliar IgY (Imunoglobulina Y). Tal anticorpo foi obtido e isolado por métodos de precipitação, e testado para reatividade, sendo visto que é capaz de reconhecer o antígeno-alvo de *Shigella flexneri* 5a M90T.

[0086] Para a imunização de aves, foi utilizado o peptídeo sintético P9 (SEQ ID No. 9), correspondentes a epítópos imunogênicos do antígeno Fim-H de *Shigella flexneri* 5a M90T. Inicialmente, o peptídeo foi acoplado em um nanotubo de carbono (NTC) solubilizado e ativado como molécula carreadora, de acordo com o método descrito na patente BR 10 2018 071933 5. A ativação do carreador NTC solubilizado e o acoplamento de peptídeos sintéticos foi promovida pelos agentes químicos EDAC [Cloreto de 1-etil-3-(3dimetilaminopropil) carbodiimida] e NHS (N-hidroxissuccinimida).

[0087] Para a produção de anticorpos policlonais, as aves da espécie *Gallus gallus* mantidas sob manutenção da empresa EZscience Biotecnologia, foram imunizadas sete vezes com um inóculo de 200 µg de peptídeo P9, o qual foi preparado com 50µL de peptídeo (5,5 mg/mL) acoplado em 200 µL de Nanotubo de carbono solubilizado e ativado (NTC) e 300 µL de Adjuvante de Freund, totalizando volume final de 500 µL.

[0088] A amostra foi homogeneizada em ciclos alternados de sonicação e vortequização em gelo até aquisição de consistência não dispersante em água. Para a primeira imunização foi utilizado o Adjuvante Completo de *Freund* e, para as inoculações posteriores, o Adjuvante Incompleto de *Freud*. Para o procedimento de imunização, as aves foram imobilizadas manualmente e inoculadas por via intramuscular, em quatro pontos distintos do músculo peitoral, com um *buster* quinze dias após a primeira imunização e coleta de gema de ovo hiperimune, após sete dias.

Código	*Ag	Sequência peptídica	Posição e tamanho			Atributo	Cepa origem
			*P.M.	Carga			
P9	FimH	SEQ ID No 9	133-140 08 aa	646,69	0	Neutro	S. flexneri 5 str. 8401

*P.M: Peso Molecular ; *Ag: antígeno.

1.2. Extração de anticorpos utilizando PEG

[0089] Os anticorpos foram extraídos a partir da separação entre a fração proteica da gema de ovo e sua fração lipídica utilizando o método de precipitação com polietilenoglicol (PEG) de Pauly e colaboradores (2011). Para isso, foi adicionado à gema PBS 1X (NaHPO4, NaH2PO4, NaCl2) equivalente a duas vezes o seu volume e 3,5% v/m de PEG- 6000, com homogeneização durante 10 minutos em vórtex e posterior centrifugação a 4 °C por 20 minutos a 13.000xg. Após esse período, o pellet foi descartado e ao volume do sobrenadante foram adicionados 8,5% v/m de PEG, sendo o sistema submetido às condições de agitação e centrifugação, anteriormente descritas. Porém, após a centrifugação o sobrenadante foi descartado. Ao pellet foram adicionados 10 mL de PBS- 1X e 12% v/m de PEG, sendo

submetido a condições de agitação e centrifugação já descritas, com descarte do sobrenadante. Após essa etapa, o pellet foi solubilizado em 800 µL de PBS1X com volume final completado para 1,2 mL. Após esse processo, o pool de anticorpos obtido foi submetido à diálise em PBS 0,1% a 4 °C por 24 horas e posteriormente analisado eletroforeticamente em SDS-PAGE 15% e detecção de bandas proteicas utilizando Coomassie Brilliant Blue.

1.3. Purificação de anticorpos anti-peptídeo

[0090] Inicialmente, o peptídeo sintético P9 (5,5mg/mL) foi acoplado através de ligação covalente a resina cromatográfica *NHS-Activated Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences)* conforme recomendações do fabricante, para a obtenção de uma matriz sepharose-P9 (FimH). Após esse processo, a matriz cromatográfica foi lavada com 10 mL de água mili-Q e equilibrada com 10 mL de *Binding buffer* (Na₂HPO₄ 0,02M pH 7,0). O pool de anticorpos (IgY total) obtidos no processo descrito no item 1.2, foi diluído a 1µL /10 µL em *Binding buffer*, adicionado a sistema cromatográfico e mantido sob incubação durante 60 minutos a temperatura ambiente (T.A).

[0091] Posteriormente, a matriz foi lavada com 15 mL de *Binding buffer* e em seguida os anticorpos foram coletados em eluições de 450 µL de *Elution buffer* (Glicina-HCl 0,1 M pH 2,7) e 50 µL de *Neutralizer* (Tris 1M pH 9,0), utilizando o reagente de detecção de proteínas *Bradford* (SIGMA). Em seguida, a matriz foi lavada com 10 mL de *Binding buffer* e preservada com álcool etílico a 30% (EtOH). Posteriormente, o anticorpo foi concentrado 10X em coluna Amicon ® Ultra-2 Centrifugal Filter Devices de 30 KDa conforme recomendações do fabricante (Mili-Pore). Posteriormente, os anticorpos foram novamente analisados por *SDS-PAGE* 15% para confirmação da obtenção de IgYs anti-P9.

[0092] A eficiência dos métodos empregados para o isolamento dos anticorpos foi confirmada por meio de *SDS-PAGE* 15% (Figura 3). As IgYs obtidas pelo método de precipitação descritos por Pauly e colaboradores (2011), apresentaram bandas correspondentes a cadeia pesada (HC) entre 48 e 75 KDa e cadeia leve (HL) entre 17 e 25 KDa (Ladder Protein SIGMA). A IgY específica anti-P9 (B:11) purificada por cromatografia de afinidade também apresentou bandas nas alturas descritas, além de corresponder a uma IgY padrão purificada por cromatografia (B:10).

[0093] A eletroforese também evidenciou a presença de impurezas menores representadas por banda proteica de peso molecular entre 35-48 KDa. Foi possível observar que os diferentes pools de anticorpos variaram em quantidade obtida, o que pode estar relacionado a padronização do processo de isolamento do anticorpo. Em virtude dos fatos evidenciados por SDS-PAGE, considera-se que a obtenção dos anticorpos foi alcançada com êxito.

EXEMPLO 2

2.1. Imunodetecção por Dot blot

[0094] O reconhecimento dos anticorpos produzidos foi avaliado quanto ao reconhecimento do peptídeo sintético P9 immobilizado em membrana PVDF. Para isso, a membrana PVDF foi hidratada em tampão de blot (0,025 M Tris, 0,192 M glicina pH 8,5, 20% MeOH), MeOH (100%) e água destilada. Após hidratada, a membrana foi immobilizada com peptídeo P9 a 16 µg/mL em sistema de trans-blot. Em seguida, ao sistema foi adicionado 50 µL de uma solução de bloqueio PBS 1X a acrescida com 3% v/m de BSA (*Bovin Serum Albumin*) por 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, os primários IgY total obtidos foram diluídos em solução de bloqueio a 1 µL /100 µL e adicionados ao sistema e incubados durante 60 minutos a 37 °C. Após esse período, o sistema foi lavado com PBS 1X e o secundário anti-chicken cabra (peroxidase) a 1 µL /500 µL foi adicionado ao sistema e mantido sob incubação em condições descritas anteriormente.

[0095] Após esse período, o sistema foi lavado com PBS 1X e para revelação do teste, foi utilizado o cromógeno DAB (Diaminobenzidina-3,3) durante 10 minutos. O parâmetro de detecção considerado, foi presença/ausência de precipitação de coloração marrom como indício de detecção positiva/negativa dos anticorpos produzidos.

[0096] Os diferentes pools de IgY total foram testados contra os抗ígenos sintéticos a P9 (16µg/mL) e detectados por Dot-Blot, pelo qual foi possível a visualização de precipitação caracterizada por precipitação de coloração marrom resultante da reação antígeno-anticorpo presente na membrana PVDF. Através desse teste, pode-se observar a detecção de anticorpos em diferentes níveis, variando a coloração fraca, média e forte, correlacionando-se às

quantidades de anticorpos detectadas na eletroforese em gel de Poliacrilamida, anteriormente discutido.

[0097] O Protocolo desenvolvido nesse estudo, apresentou boa resolução/reação demonstrando que a IgY obtida por precipitação com PEG funcionou de forma eficiente nesse teste imunológico. Logo, pode-se afirmar que os diferentes pools de IgY total isolados nesse estudo foram e detectados através da técnica de Dot-Blot, foram eficientes quanto a atividade biológica funcional esperada, evidenciada pelos pontos circulares sobre a membrana PVDF, formados após a aplicação do substrato de revelação, apresentados na Figura 4.

EXEMPLO 3

3.1. Imunodetecção por Western Blot

[0098] Os anticorpos produzidos foram avaliados, utilizando o método de imunodetecção *Western Blot*, quanto à capacidade de reconhecimento do antígeno na forma denaturada. A fim disso, o extrato bacteriano de *Shigella flexneri* 5a M90T foi separado por SDS-PAGE 15% e eletrotransferido para uma membrana PVDF. Inicialmente, o gel de poliacrilamida e a membrana PVDF, foram devidamente hidratados, como descrito no Exemplo 2, item 2.1, e submetidos a eletrotransferência no equipamento *transblotting* (BIO-RAD), a voltagem constante de 10 V por 60 minutos. Após a eletrotransferência, a membrana foi incubada com tampão de bloqueio PBS-BSA 3% por 60 minutos a 37 °C. Após esse período, a membrana foi lava com PBS 1X e o primário IgY total a 1 µL /100 µL foi colocado em contato com a membrana por 60 minutos a 37 °C, sob agitação constante. Após esse período, a membrana foi lavada com PBS 1X e o secundário anti-chicken de cabra (peroxidase) a 1 µL /5.000 µL foi colocado em contato com a membrana por 60 minutos a 37 °C, sob agitação leve. Posteriormente, a membrana foi lava com PBS 1X e revelada com cromógeno DAB (10 mg/mL) durante 10 minutos e neutralização da reação com água destilada. A membrana foi seca a temperatura ambiente para análise da imunodetecção, considerando os parâmetros descritos anteriormente (item 2.6).

[0099] A partir da técnica de *Western Blot*, foi possível observar a reatividade do anticorpo a apenas uma banda proteica do extrato bacteriano de *Shigella flexneri* 5a M90T,

evidenciado pela imunoprecipitação formada na altura de 30 KDa aproximadamente, localizada na faixa de 25-35 KDa (Figura 5). A imunodetecção da IgY anti-P9 vai de encontro aos resultados de Barati e colaboradores (2018) e Grando e colaboradores (2017), quanto a validação do reconhecimento de IgYs produzidas em seus trabalhos utilizando a mesma técnica.

[00100] O antígeno Fim-H (30 KDa) é uma proteína que constitui a membrana externa de diversas bactérias Gram-negativas, como a *Shigella*. Considerando que o peptídeo P9 foi predito in silico a partir fragmentos da sequência peptídica desse antígeno FimH, com o presente experimento foi possível observar que a reatividade da IgY anti-P9 produzida pelos presentes inventores foi específica, pois foi direcionada apenas a uma banda correspondente ao antígeno-alvo na forma desnaturada e não apresentou reatividade cruzada com outras proteínas do extrato bacteriano. A imunodetecção de IgY foi realizada com a utilização do secundário anti-chicken de cabra adsorvido com enzima peroxidase.

EXEMPLO 4

4.1. Imunodetecção por Citometria de fluxo

[00101] Todas as cepas bacterianas utilizadas nesse estudo, foram provenientes da coleção bacteriológica do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ-AM), cedidas pela Prof. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi o Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia (DCDIA).

[00102] O reconhecimento da IgY anti-P9 foi avaliada quanto à reatividade com抗ígenos nativos, presentes na superfície celular de *Shigella flexneri* 5a M90T, através de imunodetecção realizada em citometria de fluxo, utilizando como anticorpo de detecção o anti-chicken de cabra adsorvido ao fluorocromo Alexa flúor 488. A reatividade da IgY anti-P9 foi também foi avaliada contra cepas heterólogas de *Escherichia coli*, EAEC (ATCC042), EIEC (ATCC1381), EHEC (CDC-EDL9933-171-0157:H3), ETEC (LT2871), ETEC (ST8), EPEC (ATCCE234869), DAEC (F1845), BL21 e Top-10. O painel do experimento constituiu-se de

quatro condições: C1 (somente bactéria), C2 (bactéria + brometo), C3 (bactéria + anticorpo secundário) e C4 (bactéria + brometo+ anticorpo primário + anticorpo secundário).

[00103] Inicialmente, os microrganismos foram cultivados em meio líquido Luria Bertani (LB) a 37 °C, durante 24 horas sob agitação constante. Após o cultivo, 50 µL de cada crescido bacteriano foram distribuídos em tubos de citometria e centrifugadas a 14.000 rpm, durante cinco minutos para a obtenção de um *pellet*. Em seguida, somente os tubos C3 e C4 foram incubados com 01 µL de brometo de etídeo (C₂₁H₂₀BrN₃) durante 30 minutos a T.A., sob privação de energia luminosa. Após esse período, os pellets foram lavados 02 vezes por centrifugação com PBS-1X (filtrado e autoclavado). Posteriormente, os tubos C4 foram incubados com primário 1 µL /100 µL IgY anti-P9 por 01 hora, seguido de lavagem por centrifugação. Após essa etapa, os tubos C3 e C4 foram incubados com secundário 1 µL /200 µL anti-chicken durante 01 hora a T.A. e posteriormente lavados por centrifugação, com ressuspensão de pellet em 200 µL de PBS-1X.

[00104] Após esse processo, a leitura foi realizada no Citômetro *FACS canto II (BD Biosciences)*, na Plataforma de Citometria de Fluxo do ILMD/FIOCRUZ-AM, utilizando os programas *FACS Diva Software versão 6.1.2*. A obtenção dos dados brutos e a análise de porcentagem de eventos, média de intensidade de fluorescência e formatação dos gráficos de citometria, foi realizado através do programa *Flow-Jo versão 5.6.7*.

[00105] A fim de avaliar o reconhecimento específico da IgY anti-P9 produzida, foi utilizada a técnica de Citometria de fluxo. Foi possível observar que o anti-P9 foi capaz de reconhecer o antígeno-alvo na forma nativa presente na superfície celular de uma cepa padrão de *Shigella flexneri* 5a M90T. Além disso, o anticorpo apresentou reatividade com algumas cepas de *Escherichia coli* diarreogênicas (DEC) utilizadas como controle do ensaio, evidenciando uma reatividade direcionada a EIEC, EPEC, EAEC e EHEC (Figura 6). Acredita-se que isso pode estar relacionado ao fato do antígeno-alvo (P9) compor a superfície celular de outros membros da família *Enterobacteriaceae* (BRAVO, et al., 2015), como os patótipos de *E. coli* utilizados na avaliação do anticorpo anti-P9.

[00106] Esses resultados, evidenciaram que os anticorpos produzidos nesse estudo não apresentaram especificidade de reconhecimento para *Shigella* spp. Ressalta-se que *Shigella* tem um mecanismo de patogênese indistinguível de alguns patótipos de *E. coli* como EIEC

(HAZEN et al., 2016), e que o anticorpo anti-P9 apresentou um reconhecimento cruzado, porém direcionado para *Shigella flexneri* e os patótipos de *E. coli* EIEC, EPEC, EAEC e EHEC.

[00107] Tendo em vista, que a utilização de antígenos imunogênicos comuns a patógenos é uma estratégia promissora para o controle de coinfecções (RAFIQ et al., 2019), os presentes inventores acreditam que a IgY anti-P9 pode ser útil na utilização em métodos de imunidade passiva, sendo uma promissora alternativa não antibiótica para tratamento da shigelose e de outras doenças causadas por outros patógenos Gram negativos, como por exemplo as cepas de DEC, tais como as utilizadas no presente experimento.

[00108] Isto, pode ser bastante útil não apenas para o contexto das doenças diarreicas, as quais são responsáveis por um elevado índice de mortalidade em todo o mundo, como também como base para que estes achados sirvam de base para aplicação contra outras doenças.

REFERÊNCIAS

- [00109] ANDERSON, M. Et al. Shigella Diversity and Changing Landscape: Insights for the Twenty-First Century. *Front Cell Infect Microbiol.* 2016;6:45. Published 2016 Apr 19. doi:10.3389/fcimb.2016.00045.
- [00110] FARZAM, N. et al. Vaccination with *Shigella flexneri* 2a conjugate induces type 2a and cross-reactive type 6 antibodies in humans but not in mice. *Vaccine*, 35(37). 2017 4990–4996. doi:10.1016/j.vaccine.2017.07.070 [00111] FRENCK, R. W., Baqar, S., Alexander, W., Dickey, M., McNeal, M., El-Khorazaty, J., Venkatesan, M. M. (2018). A Phase I trial to evaluate the safety and immunogenicity of WRSs2 and WRSs3; two live oral candidate vaccines against *Shigella sonnei*. *Vaccine*, 36(32), 4880–4889. doi:10.1016/j.vaccine.2018.06.063.
- [00112] Koestler, B. J., Ward, C. M., Fisher, C. R., Rajan, A., Maresso, A. W., & Payne, S. M. (2019). Human intestinal enteroids as a model system of *Shigella* pathogenesis. *Infection and Immunity*. doi:10.1128/iai.00733-18.
- [00113] Mattock, E., & Blocker, A. J. (2017). How Do the Virulence Factors of *Shigella* Work Together to Cause Disease? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00064

- [00114] Muthuirulandi Sethuvel, D. P., Devanga Ragupathi, N. K., Anandan, S., & Veeraraghavan, B. (2016). Update on: Shigella new serogroups/serotypes and their antimicrobial resistance. Letters in Applied Microbiology, 64(1), 8–18. doi:10.1111/lam.12690.
- [00115] Gopal, Ashidha et al. “A infecção por *Shigella dysenteriae* ativa a resposta próinflamatória através da via de sinalização β-catenina / NF-κB” PloS one vol. 12,4 e0174943. 21 de abril de 2017, doi: 10.1371 / journal.pone.0174943.
- [00116] Nickerson, Kourtney P et al. “Análise da resistência de *Shigella flexneri*, formação de biofilme e perfil transcricional em resposta aos sais biliares” Infection and immunity vol. 85,6 e01067-16. 23 de maio. 2017, doi: 10.1128 / IAI.01067-16.
- [00117] Parajuli, P., Deimel, L. P., & Verma, N. K. (2019). Genome analysis of *Shigella flexneri* serotype 3b strain SFL1520 reveals significant horizontal gene acquisitions including a multidrug resistance cassette. Genome Biology and Evolution. doi:10.1093/gbe/evz026.
- [00118] Puzari, M., Sharma, M., & Chetia, P. (2018). Emergence of antibiotic resistant *Shigella* species: A matter of concern. Journal of Infection and Public Health, 11(4), 451–454. doi:10.1016/j.jiph.2017.09.025 [00119] Trikha, Radhika et al. “Remediação de *Shigella dysenteriae* tipo 1intramacrofágica por lactobacilos probióticos isolados de amostras de fezes de bebês humanos” Revista indiana de pesquisa médica vol. 145,5 (2017): 679686.
- [00120] Yang, C., Wang, H., Ma, H., Bao, R., Liu, H., Yang, L., ... Song, H. (2018). Characterization and Genomic Analysis of SFPH2, a Novel T7virus Infecting *Shigella*. Frontiers in Microbiology, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.03027.
- [00121] RAFIQI, S.A. et al. Immunoprophylactic evaluation of recombinant gametocyte 22 antigen of *Eimeria tenella* in broiler chickens. Parasitology Research. 2019 <https://doi.org/10.1007/s00436-018-06198-2> [00122] Mydock-McGrane, Laurel K et al. Rational design strategies for FH antagonists: new drugs on the horizon for urinary tract infection and Crohn's disease" Expert opinion on drug Discovery. vol. 12,7 (2017): 711-731.
- [00123] KOESTLER, B.J. et al. “Formate Promotes *Shigella* Intercellular Spread and Virulence Gene Expression” mBio vol. 9,5 e0177718. 25 Sep. 2018, doi:10.1128/mBio.01777-18
- [00124] Fischer, G., Lima, M. de, Vargas, G. D., Esteves, P. A., Hübnner, S. de O., & Munhoz,

L. S. (2014). Avian IgY antibodies: characteristics and applications in immunodiagnostic. Ciência Rural, 153–160.

[00125] Jarzab, A., Witkowska, D., Ziomek, E., Dabrowska, A., Szewczuk, Z., & Gamian, A. (2013). Shigella flexneri 3a Outer Membrane Protein C Epitope Is Recognized by Human Umbilical Cord Sera and Associated with Protective Activity. PLoS ONE, 8(8).

[00126] Pereira, E. P. V., van Tilburg, M. F., Florean, E. O. P. T., & Guedes, M. I. F. (2019). Egg yolk antibodies (IgY)and their applications in human and veterinary health: A review. International Immunopharmacology, 73(May), 293–303.

[00127] Schade, R., & Terzolo, H. R. (2006). IgY-technology: application and trends. EPC 2006 - 12th European Poultry Conference, Verona, Italy, 10-14 September, 2006, (February 2006), paper-6.

REIVINDICAÇÕES

1. Polipeptídeo caracterizado pelo fato de ter pelo menos 80% de identidade com a sequência como descrita em qualquer uma das SEQ ID Nos. 1 a 12.

2. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ter pelo menos 90% de identidade com qualquer uma das SEQ ID Nos. 2, 6 ou 9.

3. Polipeptídeo, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de ter a sequência como descrita na SEQ ID No. 9.

4. Processo para a obtenção de uma imunoglobulina IgY caracterizado pelo fato de compreender as etapas de: a) inocular pelo menos um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 em uma ave; e b) recuperar as imunoglobulinas IgY a partir do ovo produzido pela referida ave.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a referida imunoglobulina IgY é recuperada a partir da gema do dito ovo produzido pela ave.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que a referida ave é selecionada dentre as aves da família Phasianidae.

7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de que a referida ave é do gênero Gallus. 8. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que a referida ave é selecionada dentre as espécies *Gallus gallus*, *Gallus lafayettii*, *Gallus sonneratii*, e *Gallus varius*.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, caracterizado pelo fato de que a referida ave é selecionada dentre faisões, perdizes, galinhas, perus, codornas, pombas, e pavões.

10. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 9, caracterizado pelo fato de que pelo menos uma dose de reforço é administrada de forma a manter um estado hiperimune na ave.

11. Imunoglobulina IgY caracterizada pelo fato de que é obtida pelo processo como definido em qualquer uma das reivindicações 4 a 10.

12. Uso de uma imunoglobulina IgY, como definida na reivindicação 11, caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de uma composição para a prevenção ou tratamento de infecções por bactérias Gram negativas.

13. Uso de um polipeptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3 caracterizado pelo fato de ser para a manufatura de uma composição para provocar uma resposta imune contra uma bactéria Gram negativa em uma ave.

14. Uso, de acordo com a reivindicação 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria Gram negativa é pertencente à família Enterobacteriaceae.

15. Uso, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é selecionada dentre as bactérias pertencentes aos gêneros *Alishewanella*, *Alterococcus*, *Aquamonas*, *Aranicola*, *Arsenophonus*, *Azotivirga*, *Blochmannia*, *Brenneria*, *Buchnera*, *Budvicia*, *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Dickeya*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Ewingella*, *Grimontella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Leminorella*, *Moellerella*, *Morganella*, *Obesumbacterium*, *Pantoea*, *Pectobacterium*, *Phlomobacter*, *Photorhabdus*, *Plesiomonas*, *Pragia*, *Proteus*, *Providencia*,

Rahnella, Raoultella, Salmonella, Samsonia, Serratia, Shigella, Sodalis, Tatumella, Trabulsiella, Wigglesworthia, Xenorhabdus, Yersinia, e Yokenella.

16. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 12 a 15, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria é selecionada dentre as bactérias pertencentes aos gêneros *Enterobacter, Escherichia, Salmonella e Shigella.*

17. Uso, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria do gênero *Enterobacter* é selecionada dentre *E. amnigenus, E. arachidis, E. asburiae, E. cancerogenous, E. cloacae, E. cowanii, E. dissolvens, E. gergoviae, E. helveticus, E. hormaechei, E. intermedius, E. kobei, E. ludwigii, E. mori, E. nimipressuralis, E. oryzae, E. pulveris, E. pyrinus, E. radicincitans, E. taylorae, E. turicensis, e E. soli.*

18. Uso, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria do gênero *Escherichia*, é selecionada dentre *E. albertii, E. coli, E. fergusonii, E. hermannii, E. marmotae, e E. vulneris.*

19. Uso, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria do gênero *Salmonella*, é selecionada dentre *Salmonella bongori, e Salmonella entérica.*

20. Uso, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que a referida bactéria do gênero *Shigella*, é selecionada dentre *S. boydii, S. dysenteriae, S. flexneri, e S. sonnei.*

21. Composição imunogênica caracterizada pelo fato de que compreende: um elemento imunologicamente ativo selecionado do grupo consistindo de uma imunoglobulina IgY como definida na reivindicação 11, um ovo de ave obtido pelo processo como definido em qualquer uma das reivindicações 4 a 10, ou uma gema isolada desse ovo; e um excipiente, veículo ou carreador biologicamente aceitável.

22. Composição, de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de é formulada sob a forma de uma composição farmacêutica ou nutracêutica.

23. Composição, de acordo com a reivindicação 21 ou 22, caracterizada pelo fato de que o referido excipiente, veículo ou carreador biologicamente aceitável é selecionado do grupo comprendendo um desintegrante ou auxiliar de desintegrante, aglutinante, agente de

revestimento, corante, diluente, base, solubilizante ou auxiliar de solubilizante, agente de isotonicidade, regulador de pH, estabilizante, propelente, adesivo e semelhantes.

24. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, caracterizada pelo fato de que é formulada para ser administrada por via oral.

25. Composição, de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de que está na forma de comprimido, tablete, cápsula, pó, grânulo fino, grânulo, solução, suspensão e xarope.

26. Composição, de acordo com a reivindicação 24 ou 25, caracterizada pelo fato de que compreende como excipiente, veículo ou carreador biologicamente aceitável, pelo menos um composto selecionado de um diluente, como glucose, lactose, lactose monoidratada, D-manitol, amido, celulose cristalina; um desintegrante ou auxiliar de desintegrante, como carboximetilcelulose, amido, carboximetilcelulose de cálcio, dióxido de silício; um aglutinante, como hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetylcelulose, polivinilpirrolidona, gelatina; um lubrificante, como estearato de magnésio, talco; um material de base, como hidroxipropilmetylcelulose, sacarose, polietileno glicol, gelatina, caulim, glicerol, água purificada e gordura dura; e misturas dos mesmos.

27. Composição, de acordo com qualquer uma das reivindicações 21 a 23, caracterizada pelo fato de que é formulada para ser administrada por via parenteral.

28. Composição, de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que está na forma de injeção, fluido intravenoso e solução ou suspensão para infusão.

29. Composição, de acordo com a reivindicação 27 ou 28, caracterizada pelo fato de que compreende como excipiente, veículo ou carreador biologicamente aceitável, pelo menos um composto selecionado de um solubilizante ou auxiliar de solubilizante, como água destilada para injeção, solução salina, propileno glicol; um agente de isotonicidade, como glicose, cloreto de sódio, D-manitol, glicerol; um regulador de pH, como um ácido inorgânico, ácido orgânico, base inorgânica ou orgânica; e misturas dos mesmos.

1 / 3

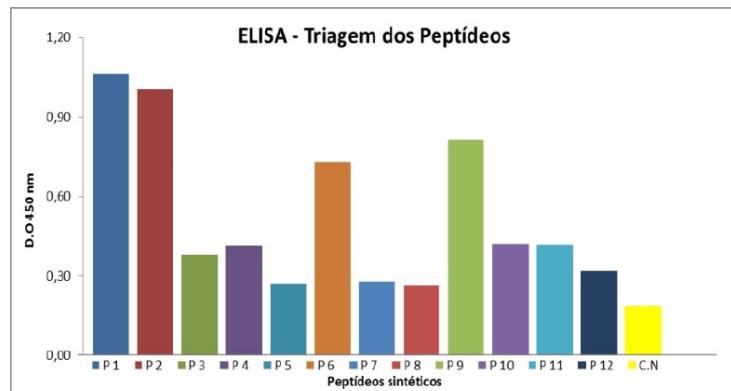


FIGURA 1

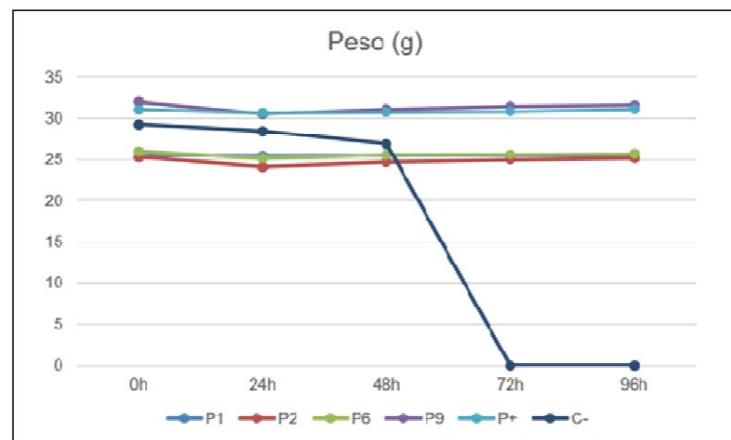


FIGURA 2

2 / 3

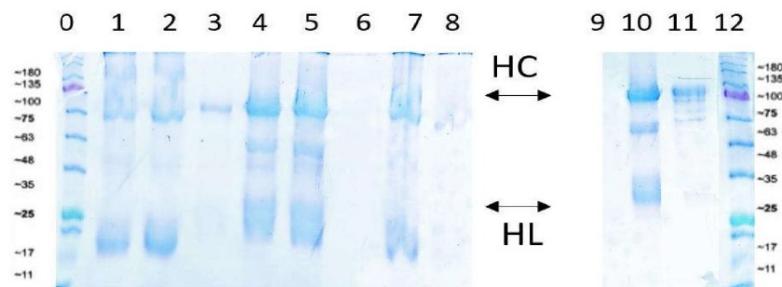


FIGURA 3

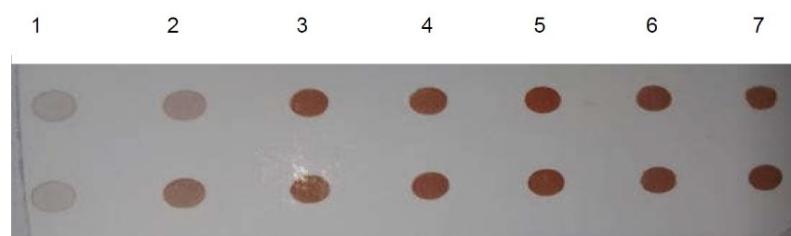


FIGURA 4

3 / 3

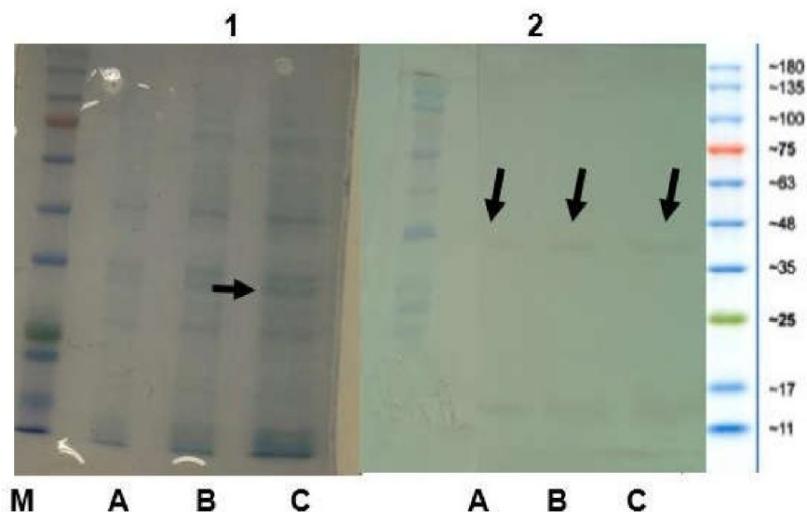


FIGURA 5

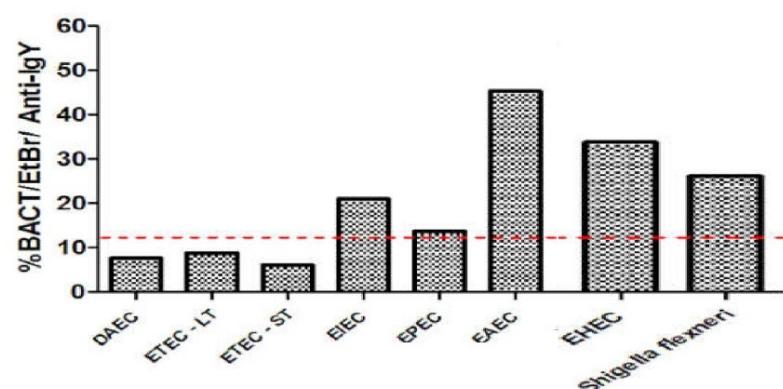


FIGURA 6

RESUMO

POLIPEPTÍDEO, PROCESSO PARA A OBTENÇÃO DE UMA IMUNOGLOBULINA IGY, IMUNOGLOBULINA IGY, USO DE UMA IMUNOGLOBULINA IGY E DE UM POLIPEPTÍDEO, E, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA

Shigella é um patógeno Gram-negativo causador de disenteria aguda, e que acomete principalmente crianças menores de cinco anos de idade em países de baixa e média renda, ocasionando milhares de óbitos por ano. Em decorrência disso, diversos estudiosos têm se empenhado na busca por uma alternativa eficaz e segura, principalmente pela falta de uma vacina eficaz e pela disseminação de cepas multirresistentes. No presente pedido, proteínas de membrana externa e proteína componente de pilus tipo 1 de membrana externa de bactérias Gram negativas foram utilizadas para avaliar sua capacidade de geração de uma resposta imune em mamíferos e de produção de IgY (Imunoglobulina Y). A IgY obtida e isolada, foi avaliada quanto a sua reatividade, possuindo grande potencial para utilização em métodos de imunidade passiva contra bactérias Gram negativas.

CAPÍTULO III

Neste capítulo, é apresentado um artigo original que descreve os resultados obtidos em experimentos associados ao desenvolvimento de imunossensores direcionados à detecção de抗ígenos encontrados na superfície dos agentes bacterianos *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e causadoras da síndrome diarreica.

Utilizamos a metodologia descrita no Capítulo II para o preparo dos anticorpos IgY. Conforme descrito, podemos observar que os animais responderam às inoculações apresentando títulos de anticorpos detectáveis contra os peptídeos-alvo utilizados. Os ensaios para análise do uso dos “quantum dots” junto aos anticorpos e o das “beads” magnéticas foram avaliados por citometria de fluxo.

Informações sobre o artigo

Título do artigo: “Avaliação de um método para isolamento e detecção de bactérias diarréicas utilizando anticorpos IgY associados à esfera magnética e quantum dots”

Situação: A ser submetido.

Revista a ser submetido: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Avaliação de um método para isolamento e detecção de bactérias diarreogênicas utilizando anticorpos IgY associados a esfera magnética e quantum dots

Jeniffer Clorives Lopes Batista^{1,2}, Juliane Corrêa Glória^{2,3}, Yury Oliveira Chaves^{2,3}, Ricardo Andrez Machado de Ávila⁴, Ivanildes dos Santos Bastos², Helber Abelini Astolpho², Mayana Pardo², Patrícia Puccinelli Orlandi^{2,3,5}, Paulo Afonso Nogueira^{1,2,3}, Luís André Morais Mariúba^{1,2,3,5}

1- Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada;

2- Instituto Leônidas e Maria Deane Fiocruz Amazonia, Laboratório de Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia;

3- Instituto Leônidas e Maria Deane Fiocruz Amazonia, Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação patógeno-hospedeiro;

4- Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, Santa Catarina, Brasil;

5- Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

RESUMO

As síndromes diarreicas são um problema de saúde pública, sendo a *Escherichia coli* ETEC e *Shigella flexneri* importantes patogenos causadores desta doença no mundo. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos rápidos, eficazes e precisos são essenciais para as medidas de controle. Dentre as abordagens existentes para o diagnóstico existem os imunoensaios, os quais necessitam de moléculas capazes de interagir especificamente com marcadores de infecções. Neste cenário, a tecnologia dos anticorpos IgY tornou-se uma alternativa para produção de anticorpos, dado os benefícios existem em sua produção, vantagens éticas e econômicas. Este estudo buscou desenvolver e avaliar anticorpos IgY direcionados contra os抗ígenos FimH de *Shigella sp/E. coli* e ETpA de *E. coli* ETEC, aplicando-os a um imunoensaio conjugado à esferas magnéticas e “quantum dots”. Os resultados obtidos demonstraram uma maior especificidade para a detecção de *E. coli* ETEC utilizando apenas anti-ETpA associados a “quantum dots”. O uso das esferas magnéticas levou a uma elevação da sensibilidade do teste, causando, porém, um aumento da inespecificidade do ensaio. Os anticorpos anti-FimH apresentaram reatividade pan-específica nos ensaios realizados. Ensaios futuros buscarão aplicar o método desenvolvido para a análise da potabilidade de amostras de água e contaminação alimentar.

Palavras-chave: Síndrome diarreica; anticorpos IgY; imunodiagnóstico; quantum dots; esferas magnéticas.

1. INTRODUÇÃO

As síndromes diarreicas continuam sendo um problema de saúde pública pertinente em decorrência dos elevados índices de morbidade e mortalidade no mundo, (STOCKMANN et al., 2017; MANI et al., 2019). *Shigella* e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) estão entre as principais causas de diarreia em crianças e adultos em países de baixa e média renda, e entre viajantes e militares de países de alta renda. ETEC é uma das primeiras doenças entéricas sintomáticas para muitas crianças, causando várias centenas de milhões casos de diarréia a cada ano, principalmente em crianças pequenas. A *Shigella* também é uma das principais causas de doença entre viajantes, militares destacados e expatriados em países de baixa e média renda, e está associada à diarreia persistente (≥ 14 dias) nessas populações (KHALIL et al., 2018).

A detecção de forma rápida do patógeno causador da infecção no paciente continua sendo um dos grandes gargalos existentes (COHEN et al., 2022), dificultando assim a determinação de um tratamento apropriado ao paciente ou mesmo da fonte de contaminação. O método padrão-ouro de diagnóstico consiste no isolamento do microrganismo em cultura e testes bioquímicos para a identificação dos patógenos. Este, além de laborioso, requer infraestrutura sofisticada, um tempo longo e mão de obra altamente qualificada para execução. Com isso, há uma demanda constante para o desenvolvimento de novos métodos para detecção específica, sensível e rápida destes microrganismos diarreogênicos em amostras ambientais ou de pacientes.

Neste sentido, novos imunoensaios vem sendo desenvolvidos associando anticorpos a nanoestruturas. Esferas magnéticas, por exemplo, têm sido utilizadas para facilitar o aumento da captura de alvo em volumes maiores de amostra, com posterior concentração simplificada pelo uso de imãs (CHO; IRUDAYARAJ, 2013; HONG et al, 2023; PARK et al.; 2020). “Quantum dots”, os quais são nanoestruturas fluorescentes, têm sido utilizadas como moléculas repórteres para elevação da sensibilidade dos ensaios e para facilitar sua análise, através do uso de luz ultravioleta (WANG et al., 2020).

Diferentes抗ígenos estão presentes tanto em *E. coli* quanto *Shigella* sp., como o抗ígeno FimH, ou são específicos a um único microrganismo, como o抗ígeno ETpA de *E. coli* ETEC. Logo, o desenvolvimento de ferramentas capazes de detectar de maneira pan-específica para tais patógenos podem ser utilizados em ensaios futuros em testes para detecção rápida de coliformes fecais e avaliação específica da presença de *E. coli* ETEC em amostras de paciente, água potável ou alimentos.

O presente estudo propõe um método para detecção pan-específica de *Shigella* sp./*E. coli* e específica para *E. coli* ETEC por meio da detecção da proteína FimH e ETpA utilizando anticorpos IgY associados a esferas magnéticas e “quantum dots”. Foi observado nas análises por citometria de fluxo um aumento na sensibilidade do ensaio quando foram utilizadas esferas magnéticas contendo o anticorpo, havendo porém uma redução da especificidade. Os ensaios utilizando apenas os anticorpos anti-ETpA ligados aos “quantum dots” apresentaram maior especificidade para *E. coli* ETEC.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e equipamentos

Os peptídeos foram sintetizados no Laboratório da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e pela empresa PEPTIDE 2.0. Os anticorpos policlonais IgY foram produzidos junto a empresa EZscience (Manaus-AM). Os “Quantum dots” utilizados foram do produto “CdTe core-type quantum dots COOH functionalized” (cod. cat. 777935, Merck). As esferas magnéticas utilizadas foram do produto “MagnaBind Carboxyl Derivatized Beads” (cod. cat. 21353, Thermo Fisher). As cepas bacterianas foram adquiridas das coleções microbiológicas da Plataforma de Bioensaios da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ). As leituras em citômetro FACS Canto II foram realizadas a partir dos serviços da Plataforma de Citometria de fluxo do ILMD-FIOCRUZ.

Aspectos éticos da pesquisa

O presente estudo utilizou galinhas poedeiras *Dekalb White* (71 dias de idade) como modelo animal para a produção de anticorpos requeridas para pesquisas vinculadas ao projeto “Desenvolvimento de imunoensaio para detecção de bactérias diarreogênicas utilizando quantum dots.”, deferido pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas-CEUA-UFAM 026/2020.

Análises de bioinformática

Sequências peptídicas das proteínas EtpA de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) (genebank: P08191.2, PDB: 8CPK) e FimH de *S. flexneri* (genebank: AAX13509.2, PDB: 4XOA) foram selecionadas utilizando o servidor BepiPred 1.0 para prever regiões imunogênicas. As análises para determinar a localização das regiões selecionadas na estrutura tridimensional da proteína foram realizadas utilizando o servidor Molstar.org (figura 1). A sequência de aminoácidos dos peptídeos utilizados está descrita na tabela 1.

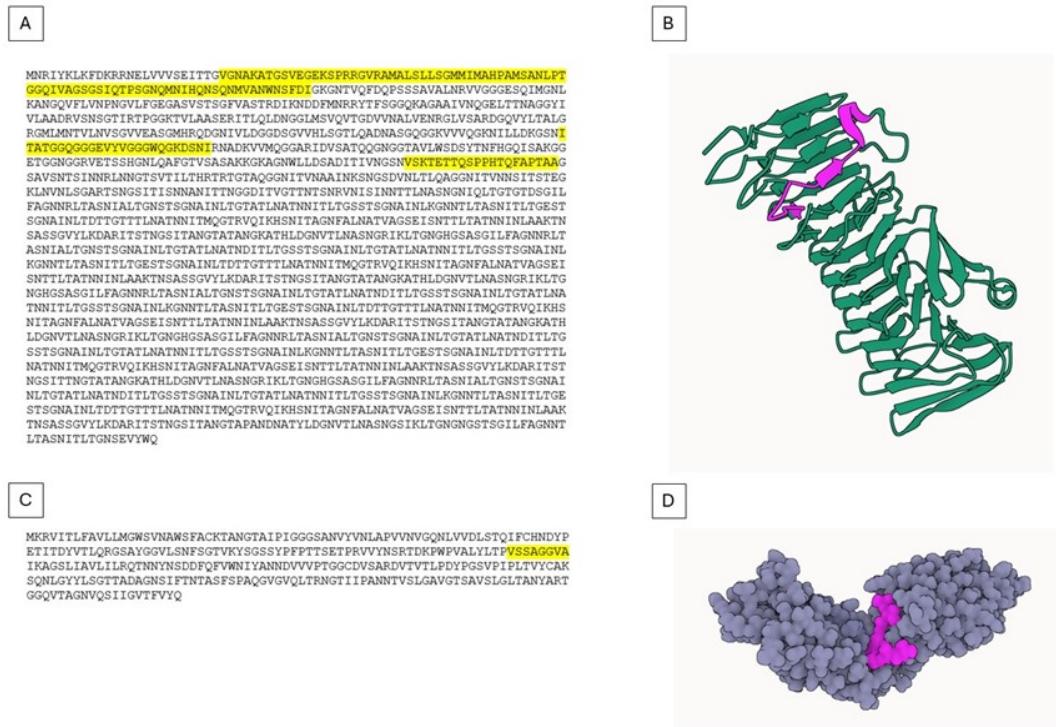


Figura 1 - Antígenos de superfície bacteriana estudados neste trabalho. **A:** Sequências de aminoácidos da proteína ETpA de *E. coli* ETEC (genebank: P08191.2). Sequências marcadas em amarelo foram utilizadas como base para síntese dos peptídeos sintéticos. **B:** Estrutura tridimensional da proteína EtpA (PDB: 8CPK), com destaque rosa para a sequência do peptídeo 2.1, estudada neste trabalho; **C:** Sequência de aminoácido da proteína FimH de *Shigella flexneri* (genebank: AAX13509.2). Sequência marcada em amarelo foi utilizada como base para síntese do peptídeo sintético P9, estudado neste trabalho; **D:** Estrutura tridimensional da proteína FimH (PDB: 4XOA), com destaque rosa para a localização da sequência do peptídeo P9, utilizado neste trabalho.

Tabela 1 - Informações sobre os peptídeos sintéticos utilizados durante a etapa de inoculação em galinhas poedeiras *Dekalb white*.

ANTÍGENO	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS	NOMECLATURA NESTE ESTUDO
FimH Origem: <i>Shigella flexneri</i> str. 8401 Genebank: ABF06190.1	VSSAGGVA	P9
EtpA Origem: <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC) Genebank: AAX13509.2	VGNAKATGSVEGEKSPRRGV	1.1
	EGEKSPRRGVRAMALSLSG	1.2
	RAMALSLSGMMIMAHPAMS	1.3
	MMIMAHPAMSANLPTGGQIV	1.4
	NLPTGGQIVAGSGSIQTPSG	1.5
	AGSGSIQTPSGNQMNIHQNS	1.6
	QMNIHQNSQNMVANWNSFDI	1.7
	ITATGGQGGGEVYVGGGWQG	2.1
	GQGGGEVYVGGGWQGKDSNI	2.2
	VSKTETTQSPPHTQFAPTA	3.0

Inoculação de galinhas poedeiras *Dekalb White*

Inicialmente, um “pool” dos peptídeos de ETpA, descritos na tabela 1, foi acoplado em nanotubo de carbono (NTC) solubilizado e ativado como molécula carreadora, método o qual foi padronizado por nosso grupo sob patente sob o número INPI BR 10 2018 071933 5. Para ligação do carreador e cada peptídeo pré-determinado, foram utilizados 50 µL de nanotubos de carbono (NTC) solubilizado e ativado com 1,14 µg/µL de EDC [Cloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] e 1 mM/µL de NHS (N-hidroxissuccinimida). Posteriormente, inóculos foram preparados utilizando 250 µg de antígeno, 3000 µl de adjuvante Montanide para um volume final de 600 µl. A homogeneização do inóculo foi realizada em vórtex até atingir consistência de uma emulsão não dispersante em água. Em seguida, a inoculação via intramuscular foi realizada distribuindo a dose em quatro diferentes pontos do músculo peitoral das aves em doses semanais por um total de 9 semanas. O mesmo processo foi realizado com o peptídeo P9 de FimH. A coleta de sangue de veia ulnar das galinhas poedeiras (*Dekalb white*) foi realizada antes do início das inoculações (D0). Uma semana após cada inóculo, uma amostra de sangue foi retirada para monitoramento de resposta imune humoral. Uma amostra foi coletada um mês após a última coleta (D93).

Avaliação de resposta humoral aviária

O procedimento para monitorar a resposta imune humoral das aves foi realizado por ensaio imunoenzimático ELISA. Antes da realização do ELISA indireto, primeiramente utilizou-se uma adaptação do protocolo fornecido pelo kit Imjet® EDC Carrier Protein (Thermo Scientific™) onde 400 µL dos peptídeos sintéticos a 1 mg/mL foi secado em concentrador de amostra (Genevac™ miVac), e ressuspensionado com 450 µL de tampão de conjugação (0.1M de MES, 0,9 M de cloreto de sódio), em seguida adicionou-se 200 µL de BSA (10 mg/mL). A essa solução foi adicionado 10 mg de EDC, homogeneizada gentilmente e incubada em temperatura ambiente. Para troca de tampão da solução, utilizou-se a coluna de concentração Amicon®Ultra (Merk-MilliPore®) com “cut off” de 10 kDa. Em seguida os 8 µg/mL de peptídeos acoplados ao BSA foram sensibilizados em placa em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, incubados a 37 °C por uma hora e bloqueados com tampão “ELISA blocking buffer” (Scienco) a 4 °C por 16 horas. Após o descarte do tampão de bloqueio, adicionou-se em triplicata, os soros de galinhas correspondentes as coletas realizadas e mais o controle negativo diluídos em tampão “ELISA blocking buffer” a 1:100 e incubou-se a 37 °C por 1 hora. Em seguida a placa foi lavada cinco vezes com PBS-tween20 0,05%. Subsequentemente adicionou-se o anticorpo secundário “goat anti-chicken-HRP” (Thermo Scientific™) diluído a 1:5000 em “ELISA blocking buffer” e incubado nas mesmas condições já descritas. Após cinco lavagens, adicionou-se aos poços a solução de revelação adicionada (One Step TMB Linear - Scienco™), com a qual ficou incubada por 10 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz, finalmente, a solução de ácido sulfúrico 2M foi adicionada à placa para interrupção da reação e esta foi submetida a leitura espectrofotométrica utilizando o filtro de 450 nm.

Extração de IgY total e análise por “dot blot”

A obtenção dos anticorpos IgY total foi realizada a partir do método patenteado por Yoon et al. (2011), o qual consistiu na diluição das gemas de ovo com água ultrapura, mudar o pH da mistura para 5, incubar à 4 °C por 6 horas e centrifugar a 2500 x g à 4 °C, com recuperação do sobrenadante. As amostras obtidas passaram por uma etapa adicional de retirada de resquícios de lipídios por ácido caprílico, seguida da determinação da concentração por reagente Bradford (BIORAD). Posterior a esse processo, o material obtido foi estocado a -20°C até o uso. Para a análise de anticorpos obtidos (IgY total), bem como sua purificação, utilizou-se a técnica de eletroforese em gel poliacrilamida-SDS-PAGE 15% SDS- (running gel) e 5% (stacking gel), segundo Maniatis (1988). Os anticorpos foram aplicados no gel com tampão de amostra (Tris 0,01M, pH 6,8; SDS 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,06% e DTT a 4%) e em seguida desnaturados por aquecimento a 95 °C por 10 minutos, a eletroforese foi realizada sob corrente constante de 150 V. Após corrida em gel de poliacrilamida, fixou-se os anticorpos em solução corante, contendo *comassie blue* 0,2%, ácido acético glacial 7%, etanol 40%, diluídos em água destilada. Uma vez corados, foram submetidos à descoloração, utilizando os mesmos reagentes citados acima, exceto o *comassie blue*, para visualização e análise de proteínas. Após extração dos anticorpos IgY, um imunoensaio “dot blot” foi realizado para analisar a capacidade de reconhecimento destes aos peptídeos utilizados na etapa de imunização. Para tanto, 20 µg dos peptídeos (tabela 1) foram immobilizados em membrana de nitrocelulose utilizando o sistema “Bio-Dot 96-Well Microfiltration” (Bio-rad). Em seguida, os poços foram bloqueados com tampão PBS-BSA 3% por 30 min. Após, foram adicionados individualmente aos poços 10 µl de IgY (16 µg/ml) anti-FimH e anti-ETpA. Após lavagem com PBS-tween, foi adicionado secundário anti-chicken conjugado a alcalino fosfatase (Sigma) na concentração recomendada pelo fabricante de 1/10.000. Os poços foram lavados novamente, a membrana retirada do sistema e revelada utilizando o tampão “1-Step™ NBT/BCIP Substrate Solution” (Thermo Fisher) por cerca de 5 min.

Conjugação de anticorpos IgY total a pontos quânticos

Para a conjugação dos anticorpos anti-ETpA e anti-FimH, foi seguida a metodologia descrita por Wang et al. (2020). Logo, foram utilizados 500 µl de NHS (10mg/mL), 500 µl de EDC (10 mg/mL), 20 microlitros de “quantum dots” (10mg/mL), sob incubação a 22 °C por 60 minutos, seguido de incubação com 16 ug/mL de anticorpos IgY durante 18 horas. Após, o material foi centrifugado a 4 °C, seguido de ressuspenção em 1 mL de tampão “Tris-Buffered Saline, 0.1% Tween”. A sonda IgY-QDs obtida foi armazenada a 4 °C até o uso, a uma concentração final de 0,02 mg/mL. Em etapa final, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8% para avaliar o perfil do anticorpo IgY conjugado ao nanomaterial.

Conjugação de anticorpos IgY total a nanopartículas magnéticas

Para ligação dos anticorpos IgY anti-ETpA e anti-FimH às esferas magnéticas (BMs), 1 mL de BMs (20 mg/mL) foi lavado com água ultrapura em base magnética. Ao sistema foi adicionado 1 mL de tampão de acoplamento (10 mM potássio fosfato + 0,15M NaCl pH 5,5) com agitação em vórtex por 30 segundos e repouso por três minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado sob base magnética e a este foi adicionado 1 mL de tampão de acoplamento. Sob essas condições as esferas magnéticas ficaram prontas para uso. A esse sistema, foram adicionados 16 ug/mL de anticorpo total IgY, com homogeneização em vórtex por três minutos. Em seguida, foram adicionados 400 µl de EDC (Cloreto de etil-3-(3dimetilaminopropil) a 10 mg/mL com homogeneização em vórtex por 3 minutos, seguido de incubação sob agitação leve por um período de 24 horas a temperatura ambiente. Após o término desse período, as “beads” foram lavadas em “rack” magnética com tampão de acoplamento (10 mM de Tris base, 0,15M NaCl, 0,1% BSA, 1mM EDTA, 0,1% Azida pH 7,0) por duas vezes, seguido de bloqueio com 1M Glicina pH 8,0, sob agitação lenta por 1 hora. Em etapa posterior, o sistema foi lavado com tampão de acoplamento duas vezes e ressuspensionado com 1 mL de tampão de lavagem, seguido de estocagem a 4 °C até o uso.

Ensaios de Citometria de fluxo

Configuração 1: avaliação dos anticorpos marcados com “quantum dots” (IgY-QDs)

Inicialmente, culturas isoladas de cepas ATCC de *E. coli* EHEC, EPEC, EAEC, DAEC, EIEC e isolados clínicos de *E. coli* ETEC, *Shigella flexneri* e *S. dysenteriae* foram utilizados foram cultivadas em caldo nutritivo a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, 500 µL de suspensão bacteriana a 1x10⁵ UFC/mL foram lavadas e ressuspensas em 100 µL de PBS 1X filtrado (pH 7,0) e marcadas com 8 µl de brometo de etídeo (1/1000), por 1h no escuro sob agitação leve e a temperatura ambiente. Em seguida, 10 µL dos anticorpos IgY-QDs anti-FimH e anti-ETpA (16 µg/mL) foram colocados em contato individualmente com cada bactéria citada e incubados por 30 minutos no escuro sob agitação leve. O sistema foi lavado com PBS 1X filtrado por centrifugação a 800 x g, 4 vezes por 3 minutos. Após esse processo, as amostras com bactérias foram lavadas 4 vezes com PBS 1X filtrado, com ressuspenção em 200 µL finais para posterior análise em citômetro FACS canto II (BD). Diferentes controles foram utilizados neste ensaio para evitar interpretação vieses: C1 (Controle 1) – apenas esferas magnéticas; C2 – apenas esferas magnéticas com IgY + anticorpo IgY marcado com “quantum dots”; C3 – apenas bactérias marcadas com brometo. As análises foram realizadas utilizando o software FACS DIVA, Flow-Jo versão 10.0 e GraphPad Prism 5.0. O método aplicado para a análise está apresentado na figura 2.

Configuração 2: avaliação do uso de beads magnéticas com IgY (IgY-BMs) em conjunto com anticorpos IgY marcados com “quantum dots” (IgY-QDs)

O preparo das bactérias com brometo para avaliação nessa configuração foi realizado conforme descrito no tópico anterior. Após, 10 µL da “beads” magnética IgY-BMs (16 µg/mL) foram adicionados e incubados por 30 minutos no escuro sob agitação leve. O sistema foi lavado com PBS 1X filtrado por separação em rack magnética, 4 vezes por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 10 µL da sonda repórter IgY-QDs, (16 µg/mL), foi adicionada ao sistema e incubada por 30 minutos, sob agitação leve no escuro. Após esse processo, as amostras foram lavadas 4 vezes com PBS 1X filtrado, com ressuspensão em 200 uL finais. Após esse processo, as amostras foram analisadas utilizando citômetro FACs Canto II (BD). As combinações de anticorpos de captura ligados as esferas magnéticas e anticorpos reveladores ligados aos “quantum dots” estão descritas na figura 4. O método aplicado para a análise em citometria está apresentado na figura 2.

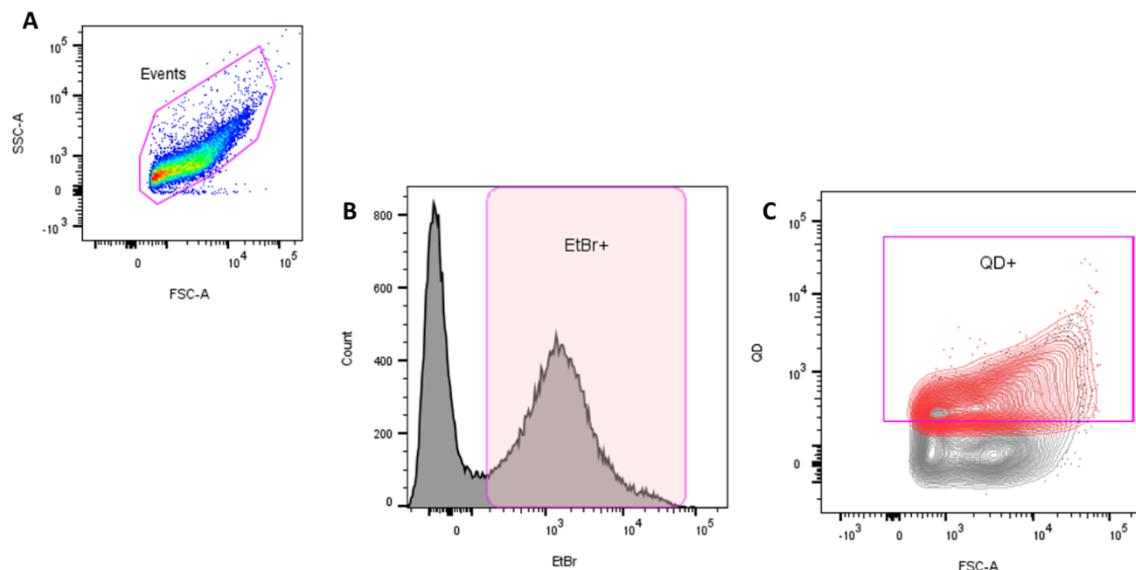


Figura 2 - Estratégia de gate para detecção de Bactérias EtBr+/QD+ por citometria de fluxo. (A) análise de tamanho (FSC-A) por complexidade (SSC-A), (B) Histograma da análise de Bactérias EtBr+, © Dot Plot para a determinação de bactérias QD+ (vermelho).

Análise estatística

As avaliações estatísticas foram realizadas utilizando o software Prism (GraphPad Inc.). As comparações entre amostras foram realizadas usando ANOVA unidirecional. Significado foi considerado quando p foi $\leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PRODUÇÃO DOS ANTICORPOS IgY

As análises de resposta imune humoral IgY produzidas pelas galinhas imunizadas revelaram que o pool de peptídeos EtpA provocou uma produção de anticorpos mais elevada e prolongada, quando comparada a resposta humoral aviária contra o antígeno FimH. Os soros dos animais imunizados com este antígeno apresentaram alta reatividade trinta dias após o último inóculo (D93) (figura 3a).

A utilização dos nanotubos de carbono como carreadores vêm se mostrando promissora em imunização de peptídeos, no entanto, alguns fatores devem ser levados em consideração, como a composição química dos peptídeos, que podem influenciar tanto a imunogenicidade quanto a capacidade de se ligarem covalentemente aos nanotubos de carbono (PARRA et al., 2013). Logo, a diferença de resposta humoral aviária observada entre os抗ígenos FimH e EtpA pode estar relacionada às suas características únicas presentes em cada peptídeo, evidenciando EtpA como o antígeno de maior imunogenicidade quando comparada a FimH. É da mesma forma notável a necessidade da realização de grande número de inoculações dos peptídeos para produção de níveis elevados de anticorpos, contudo, sempre restrito à capacidade do imunógeno em ser reconhecido pelo sistema imune do animal.

A eficiência dos métodos empregados para o isolamento dos anticorpos foi confirmada por meio de SDS-PAGE 15% (Figura 1C). As IgY's totais anti-anti-EtpA e anti-FimH obtidas apresentaram bandas correspondentes a cadeia pesada (HC), fragmento de 65 kDa e cadeia leve (HL), fragmento de 27 KDa (Figura 1C). Em virtude dos fatos evidenciados por SDS-PAGE, a obtenção dos anticorpos foi alcançada com êxito.

Os anticorpos IgY anti-FimH extraídos das gemas dos ovos das galinhas imunizadas (figura 3b) apresentaram reatividade observável em imunoensaio “dot blot” contra o peptídeo P9, corroborando também com dados de estudos anteriores realizados por nossa equipe (PARDO, 2016), no qual anticorpos IgG produzidos em camundongos apresentaram reatividade contra peptídeo P9 do antígeno FimH, utilizados em nosso estudo.

Nas análises realizadas utilizando os anticorpos IgY anti-EtpA, apenas um dos peptídeos utilizados no pool de imunização foi detectado, correspondendo ao peptídeo 2.1 (tabela 1) (figura 3c). As mesmas regiões da proteína ETpA utilizados neste estudo para síntese dos peptídeos foram utilizadas em estudos anteriores realizados por nossa equipe para a produção de uma proteína recombinante químérica (ASTOLPHO et al. 2024 – artigo no prelo). Esta foi utilizada em imunizações de camundongos para obtenção de anticorpos IgG anti-EtpA. Curiosamente, o único peptídeo reativo detectável por dot blot foi o nomeado 1.1 (tabela 1). As características de resposta humoral próprias de cada organismo podem ser a razão desta diferença de resposta. Vale pontuar que como os anticorpos direcionados ao peptídeo 1.1 foram capazes de reconhecer os isolados de ETEC, assim como os anticorpos contra o peptídeo 2.1 aqui obtidos. O que indica fácil acesso destes epítopenos no antígeno nativo, corroborando assim com as análises de bioinformática realizadas utilizando os algoritmos disponíveis no site IEDB.

Após confirmação de reatividade, os anticorpos IgY foram conjugados com sucesso aos “quantum dots” (figura 3d). A conjugação das sondas repórteres IgYQDs Anti-EtpA e IgYQDs Anti-FimH foi confirmada através da eletroforese em gel de agarose, conforme descrito por Li e colaboradores (2022), na qual não apresenta o perfil de migração quando a estrutura proteica do anticorpo está conjugada a nanopartícula quantum dots..

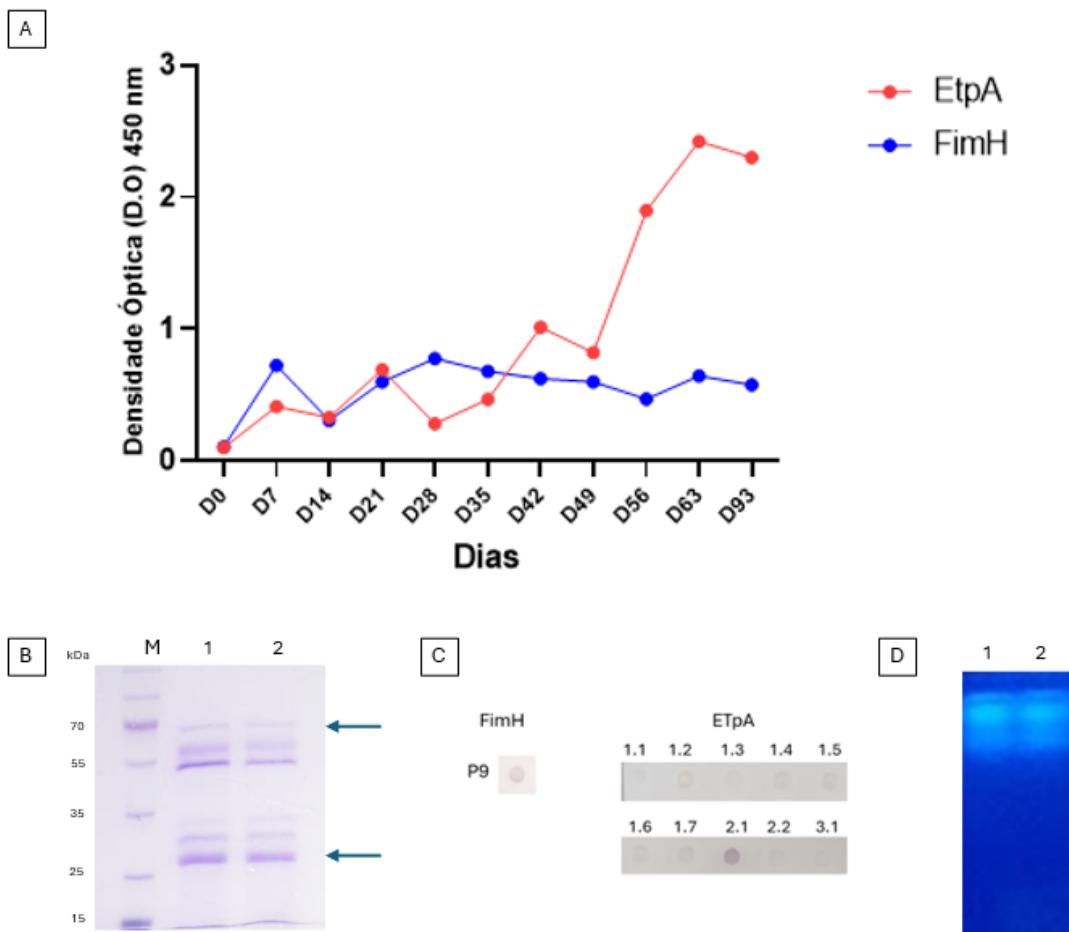


Figura 3: Produção e avaliação dos anticorpos IgY anti-FimH e anti-EtpA, e conjugação aos “quantum dots”. **1A:** análise por ELISA indireto da produção anticorpos anti-EtpA e anti-FimH; **1B:** SDS-PAGE 12% mostrando perfil eletroferético de anticorpos IgY anti-EtpA e anti-FimH isolados por precipitação ácida: **1** e **2**, **M:** marcador molecular (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder - Thermo Scientific™); **1C:** “Dot blot” utilizando os anticorpos produzidos contra os peptídeos sintéticos em membrana de nitrocelulose; **1D:** anticorpos totais anti-EtpA (canaleta 1) e anti-FimH (canaleta 2) conjugados a nanopartículas “quantum dots”.

ANÁLISE DE CITOMETRIA POR DETECÇÃO DIRETA DOS ANTICORPOS IgY-QD

Os anticorpos IgY-QDs anti-EtpA e anti-FimH foram avaliados quanto a sua capacidade de reconhecimento do antígeno alvo presente na superfície bacteriana de *E. coli* e *Shigella* spp. (figura 4a). As análises utilizando o método estatístico ANOVA revelaram que houve diferença estatística significativa entre os grupos de bactérias analisados. Nas análises das médias de intensidade de fluorescência (MIF) em ambos os ensaios, apesar do teste ANOVA apresentar uma diferença estatística significativa, fica notável a proximidade entre os valores obtidos entre os grupos analisados, dificultando assim a utilização deste parâmetro como determinante de especificidade de reconhecimento (Figura 4b e 4c).

Nas análises realizadas utilizando os anticorpos IgY-QD anti-EtpA, dado que o reconhecimento à *E. coli* ETEC-ST fica notavelmente mais elevado quanto ao percentual de fluorescência detectada (próxima a 30%) quando comparada a todas as bactérias analisadas, entende-se que esta apresentou maior significância (P valor <0,0021) (figura 4d). Os anticorpos IgY-QD anti-FimH apresentaram também um maior percentual de fluorescência para *E. coli* ETEC, havendo, contudo, uma alta reatividade cruzada com as outras bactérias analisadas. Esta reatividade cruzada já era esperada, visto que a FimH está presente em *E. coli* e *Shigella* sp. (figura 4e).

Em bactérias patogênicas, as fimbrias do tipo 1 têm um papel importante na adesão e invasão (CONNEL et al., 1996; PUSZ et al., 2014). Alguns estudos também demonstraram que a presença e alta expressão do fator de virulência FimH em bactérias patogênicas aumentam a evasão da resposta imune (SHEIK et al., 2017; VIZCARRA et al., 2016). No entanto, além das bactérias virulentas, a FimH está presente na grande maioria das bactérias comensais, ainda que em menores níveis (IIDA et al., 2001), o que corrobora a reatividade cruzada observada entre o IgY anti-FimH e a bactéria não-diarreiogênica.

Ao observar a baixa reatividade do IgY anti-FimH com *Shigella* e maior reatividade com as cepas de *E. coli*, há relatos que aproximadamente 80% de todas as cepas de *E. coli* de origem fecal são capazes de produzir fimbrias do tipo 1, que são codificadas pelo operon “fim” cromossômico (KACZMAREK; BUDZYŃSKA; GOSPODAREK, 2012). Por outro lado, ambas as bactérias podem ainda apresentar o estado fimbriado e não fimbriado (inativo ou inativado) ou completamente ausentes (deletado) em decorrências de mutações, um indicativo de que nem sempre *Shigella* spp. expressam fimbrias tipo 1 (BRAVO et al. 2015; SNELLINGS; TALL; VENKATESAN, 1997).

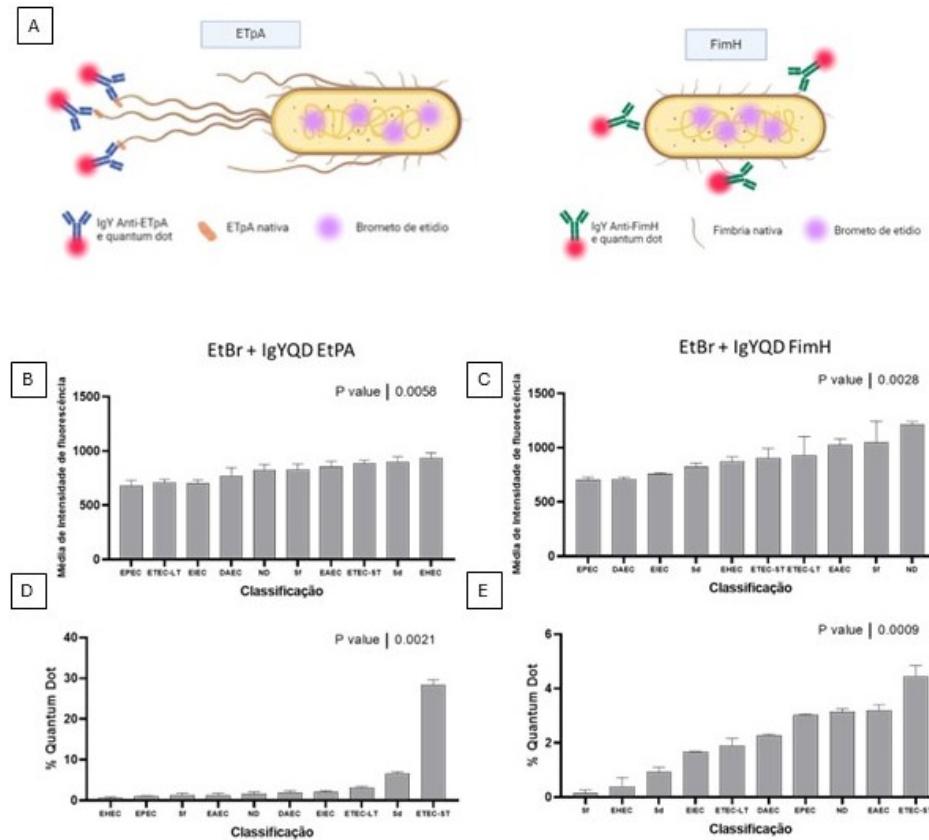


Figura 4 – Análise por citometria de fluxo por detecção direta dos anticorpos IgY-QDs. A - Esquema detalhando a “configuração 1” dos ensaios utilizando anticorpos ligados às esferas magnéticas e “quantum dots”. B - Avaliação através de MIF (média de intensidade de fluorescência) da reatividade dos anticorpos IgY-QD anti-ETpA; C - avaliação através de MIF da reatividade dos anticorpos IgY-QD anti-FimH; D - avaliação através do percentual de fluorescência utilizando IgY-QD anti-EtpA; E - avaliação através do percentual de fluorescência utilizando IgY-QD anti-FimH. Eixo X: Cepas de *Escherichia coli* diarreogênicas (EHEC, EPEC, EAEC, DAEC, EIEC, ETEC-LT e ETEC-ST); Cepa de *E. coli* não diarreogênica (ND); Sf (*Shigella flexneri*); Sd (*Shigella dysenteriae*).

ANÁLISE DE CITOMETRIA POR DETECÇÃO EM SISTEMA UTILIZANDO BEADS MAGNÉTICAS E QUANTUM DOTS

Diferentes combinações de anticorpos de captura e anticorpo primário marcado com QDs foram testadas nesta análise (figura 5a). A “combinação A” apresentou uma detecção mais elevada para *E. coli* ETEC-ST em comparação às demais bactérias testadas ao ser analisada a porcentagem de fluorescência detectada nos ensaios. Em comparação ao teste citometria anteriormente descrito (figura 4), o uso das esferas magnéticas parece ter aumentado a reatividade do ensaio, tornando-o, contudo, menos específico (figura 5b e d). Isto fica claro ao se comparar a análise de reconhecimento do IgY QD anti-ETpA em ambas as configurações testadas, onde na “configuração 2” houve uma maior detecção de bactérias não-diarreogênica (ND) em comparação a “configuração 1”.

Da mesma forma, o uso das esferas magnéticas elevou o MIF e a porcentagem de fluorescência do ensaio contendo os anticorpos anti-FimH (“combinação B”), tanto para as bactérias diarréicas quanto para a não-diarréica. Esta elevação nos valores observados pode estar associada ao próprio uso das esferas magnéticas, as quais servem como concentrador celular, elevando a sensibilidade do teste (KHAMLAAMON; NAWATTANAPAIBOON; SRIKHIRIN, 2023; SAFARIK; SAFARIKOVA, 2004; XIA et al., 2021). Ensaios contendo a combinação dos anticorpos anti-fimH e anti-ETpA no mesmo teste também foram realizados não sendo observada melhora significativa no teste (dados não mostrados no artigo, “apêndice I” desta tese).

Ao considerar que FimH é um antígeno fimbrial compartilhado entre os membros bacterianos Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae*, a utilização das sondas magnéticas e repórteres anti-FimH tem aplicação em testes que busquem a detecção de coliformes fecais em amostras como em testes para análise de alimentos ou potabilidade de água. Hong et al. (2023), por exemplo, estabeleceram uma nova estratégia para detectar *E. coli* em amostras de água utilizando esferas magnéticas conjugadas a proteína de fibra de cauda (TFP), descrevendo uma detecção mínima de 10^2 UFC/ml com análise por reação colorimétrica.

O teste aqui desenvolvido poderá em trabalhos futuros ser utilizado da mesma forma, podendo ser analisada a substituição do uso de anticorpos marcados com “quantum dots” por ensaio colorimétrico que utilize da própria bioquímica da bactéria isolada para realização do teste de confirmação de positividade da amostra. Além disso, o gene da adesina FimH de UPEC (*E. coli* uripatogênica) pode ser encontrado em 92,8% em isolados de pacientes com infecção urinária por UPEC (*E. coli* uripatogênica) em infecções extraintestinais (HOJATI et al., 2015). Logo, poderá ser avaliado o uso dos anticorpos desenvolvidos neste estudo na triagem de pacientes com infecções causadas por *E. coli* não diarréica.

Como dito anteriormente, ao comprarmos os ensaios com e sem o uso de esferas magnéticas, fica claro que a metodologia utilizando unicamente IgY QD anti-EtpA apresentou uma especificidade maior ao alvo *E. coli* ETEC. Nos ensaios utilizando esferas magnéticas com anti-EtpA e IgY QD anti-EtpA também houve uma maior reatividade para *E. coli* ETEC-ST, apresentando, contudo, um aumento de reatividade cruzada com as demais bactérias testadas. Este dado diverge do apresentado por Astolpho et al. (2024), o qual observou um aumento da especificidade ao utilizar esferas magnéticas para o isolamento prévio das bactérias. Contudo, é importante pontuar que a reatividade observada no presente estudo foi cerca de 5 vezes maior no teste sem esferas magnéticas e 3 vezes maior no ensaio com esferas magnéticas quando comparado aos resultados reportados por Astolpho et al. (2024). Uma explicação para esta diferença pode residir na diferença da resposta gerada entre as imunizações em camundongos

e galinha. Como apresentado na figura 3c, o peptídeo 2.1 foi o que gerou maior resposta nas imunizações do presente trabalho, enquanto Astolpho et al. (2024) relatou detecção apenas do peptídeo 1.1. Trabalhos futuros poderão ainda avaliar a variação de tampões de lavagem utilizado para assim aumentar a especificidade do imunoensaio.

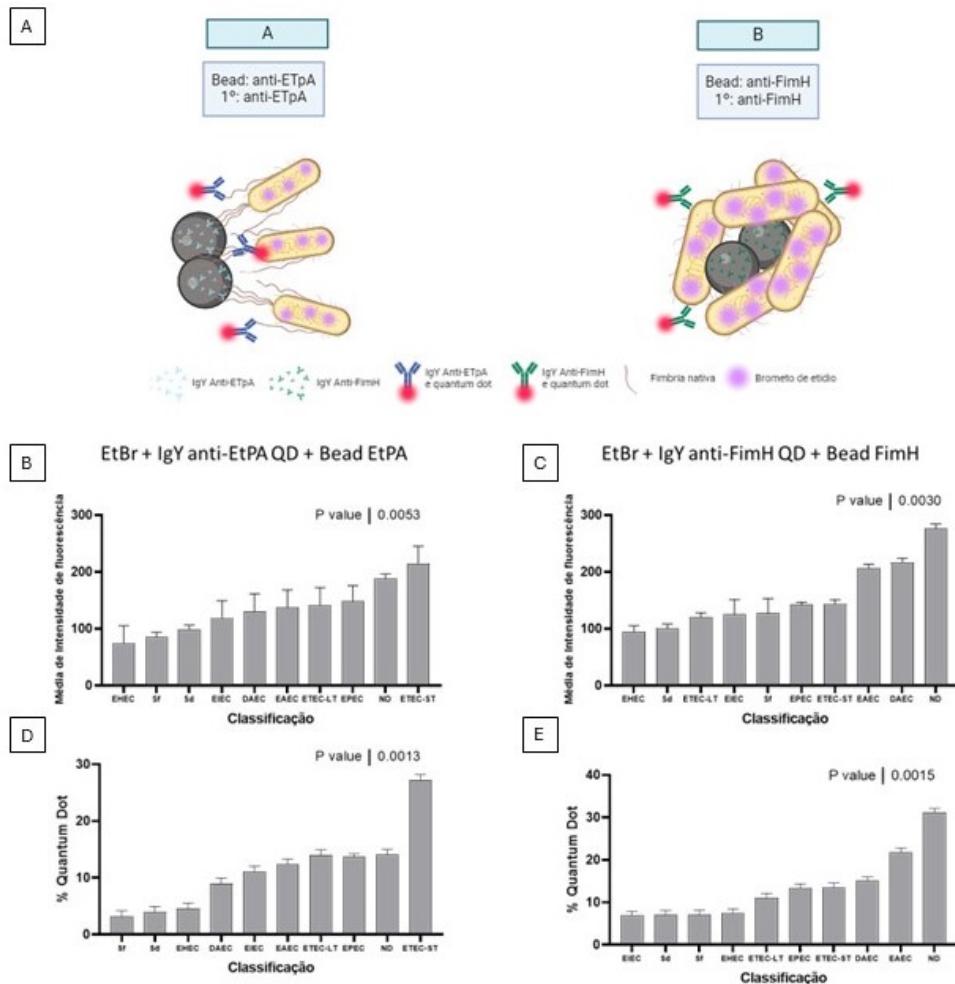


Figura 5: Análise por citometria de fluxo utilizando anticorpos IgY anti-EtpA e anti-FimH acoplados a esferas magnéticas e “quantum dots”. A - Esquema detalhando as variações realizadas na “configuração 2” dos ensaios utilizando anticorpos ligados à esferas magnéticas e “quantum dots”. B - Avaliação através de MIF (média de intensidade de fluorescência) da reatividade dos anticorpos IgY-QD anti-ETpA (combinação A); C - avaliação através de MIF da reatividade dos anticorpos IgY-QD anti-FimH (combinação B); D - avaliação através do percentual de fluorescência utilizando IgY-QD anti-ETpA (combinação A); E - avaliação através do percentual de fluorescência utilizando IgY-QD anti-FimH (combinação B). Eixo “X”: Cepas de *Escherichia coli* diarreogênicas (EHEC, EPEC, EAEC, DAEC, EIEC, ETEC-LT e ETEC-ST); Cepa de *E. coli* não diarreogênica (ND); Sf (*Shigella flexneri*); Sd (*Shigella dysenteriae*).

CONCLUSÃO

Portanto, no presente estudo, anticorpos policlonais contra as proteínas FimH de *Shigella* sp./*E. coli* e ETpA *E. coli* ETEC foram produzidos com sucesso utilizando peptídeos sintéticos baseados nestes抗ígenos. Os ensaios de citometria de fluxo com a “configuração 1” aqui descrita demonstraram a capacidade dos anticorpos anti-FimH em reconhecer de maneira pan-específica *E. coli* e *Shigella* sp., e dos anticorpos anti-ETpA de reconhecerem de forma específica *E. coli* ETEC. A “configuração 2” dos ensaios de citometria apresentaram um aumento da sensibilidade dos ensaios utilizando os anticorpos anti-FimH, havendo uma redução da especificidade nos ensaios utilizando anticorpos anti-EtpA. Trabalhos futuros poderão aplicar tais ferramentas em testes para análise de alimentos e potabilidade de amostras de água em ensaios que permitam a detecção rápida do resultado.

REFERÊNCIAS

- ASTOLPHO, H. et al. Development of na antibody against EtpA from enterotoxigenic Escherichia coli and evaluation of its use for bacterial isolation using magnetic beads. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 2024 (artigo no prelo).
- AVALOS VIZCARRA, I. et al. How type 1 fimbriae help Escherichia coli to evade extracellular antibiotics. **Scientific Reports** **2016** **6**:1, v. 6, n. 1, p. 1–13, 5 jan. 2016.
- BRAVO, V. et al. Distinct mutations led to inactivation of type 1 fimbriae expression in *Shigella* spp. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 26 mar. 2015.
- CHO, I. H.; IRUDAYARAJ, J. Lateral-flow enzyme immunoconcentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 10, p. 3313–3319, abr. 2013.
- COHEN, A. L. et al. Aetiology and incidence of diarrhoea requiring hospitalisation in children under 5 years of age in 28 low-income and middle-income countries: findings from the Global Pediatric Diarrhea Surveillance network. **BMJ Global Health**, v. 7, n. 9, p. e009548, 1 set. 2022.
- CONNELL, H. et al. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 18, p. 9827, 9 set. 1996.
- HOJATI, Z. et al. The FimH Gene in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains Isolated From Patients With Urinary Tract Infection. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 17520, 2015.
- HONG, B. et al. Separation and colorimetric detection of *Escherichia coli* by phage tail fiber protein combined with nano-magnetic beads. **Mikrochimica acta**, v. 190, n. 6, 1 jun. 2023.
- IIDA, K. I. et al. Type 1 fimbriation and its phase switching in diarrheagenic *Escherichia coli* strains. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 3, p. 489–495, 2001.

- KACZMAREK, A.; BUDZYŃSKA, A.; GOSPODAREK, E. Prevalence of genes encoding virulence factors among Escherichia coli with K1 antigen and non-K1 E. coli strains. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. Pt 10, p. 1360–1365, out. 2012.
- KHALIL, I. A. et al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic Escherichia coli diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990–2016. **The Lancet. Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1229, 1 nov. 2018.
- KHAMLAMOON, A.; NAWATTANAPAIBOON, K.; SRIKHIRIN, T. A magnetic nanoparticles-based method for nucleic acid extraction from specimen collection. **Materials Today: Proceedings**, 14 jun. 2023.
- LI, Z. et al. A Universal Fluorescent Immunochromatography Assay Based on Quantum Dot Nanoparticles for the Rapid Detection of Specific Antibodies against SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6225, 1 jun. 2022.
- MANI, S. et al. Role of antigen specific T and B cells in systemic and mucosal immune responses in ETEC and Shigella infections, and their potential to serve as correlates of protection in vaccine development. **Vaccine**, v. 37, n. 34, p. 4787–4793, 7 ago. 2019.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd edition. **Cold Spring Harbor**, New York, 1988.
- PARDO, M. C. S. Identificação de epítopes imunogênicos de *Shigella flexneri*. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.
- PARK, J. Y. et al. Detection of Escherichia coli O157:H7 Using Automated Immunomagnetic Separation and Enzyme-Based Colorimetric Assay. **Sensors (Basel, Switzerland)**, v. 20, n. 5, 1 mar. 2020.
- PARRA, J. et al. Carbon nanotube-protein carriers enhance size-dependent self-adjuvant antibody response to haptens. **Journal of Controlled Release**, 2013.
- PUSZ, P. et al. Type 1 fimbriae in commensal Escherichia coli derived from healthy humans. **Acta Biochimica Polonica**, v. 61, n. 2, p. 389-92. 2014
- SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. **Biomagnetic Research and Technology**, v. 2, p. 7, 26 nov. 2004.
- SHEIKH, A. et al. Highly conserved type 1 pili promote enterotoxigenic E. coli pathogen-host interactions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, 22 maio 2017.
- SNELLINGS, N. J.; TALL, B. D.; VENKATESAN, M. M. Characterization of *Shigella* type 1 fimbriae: expression, FimA sequence, and phase variation. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 6, p. 2462, 1997.
- STOCKMANN, C. et al. Detection of 23 Gastrointestinal Pathogens Among Children Who Present with Diarrhea. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. 231–238, 1 set. 2017.

WANG, C. et al. Layer-by-layer assembly of magnetic-core dual quantum dot-shell nanocomposites for fluorescence lateral flow detection of bacteria. **Nanoscale**, v. 12, n. 2, p. 795–807, 2 jan. 2020.

XIA, L. et al. Microfluidic magnetic analyte delivery technique for separation, enrichment, and fluorescence detection of ultratrace biomarkers. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 23, p. 8273–8280, 15 jun. 2021.

YOON, H. N. et al. **Método para fabricar imunoglobulina específica em gema de ovo (IGY), IGY específica, gema de ovo contendo IGY específica, e composição de aditivo alimentar.** China CJ CHEILJEDANG CORP – IGY INC, 2011.

DISCUSSÃO GERAL

Doenças diarreicas continuam sendo um grande problema de saúde pública no mundo, principalmente em países de baixa e média renda, sendo um fator importante para a desnutrição de crianças, afetando o seu desenvolvimento e levando à elevação das taxas de mortalidade infantil. Em crianças e adultos em países de baixa e média renda e entre viajantes e militares de países de alta renda, a *Shigella* e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) figuram entre os principais causadores de diarréia (Khalil *et al.*, 2018).

O trabalho aqui apresentado buscou contribuir para o entendimento e controle destas doenças, representando a continuidade de estudos realizados por nosso laboratório de pesquisa (DCDIA - Diagnóstico e Controle de Doenças Infecciosas na Amazônia/FIOCRUZ) ao longo dos últimos 17 anos de trabalho, que envolveram as áreas de epidemiologia, biologia molecular, imunologia e proteômica. Os trabalhos liderados pela Prof. Dra. Patricia Puccinelli Orlandi e Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira descreveram de forma inédita o perfil de infecções gastrointestinais ocorridas em crianças em Manaus - AM e na comunidade de Rio Pardo (Presidente Figueiredo - AM), buscando não só a identificação do patógeno (bacteriano ou viral) causador das infecções, como também sua caracterização molecular.

Neste estudo, buscamos unir o conhecimento adquirido na produção de anticorpos produzidos em ovos de galinha, IgY, ao uso de partículas que propiciam uma maior detecção de analitos, correspondentes às esferas magnéticas e às nanopartículas fluorescentes “quantum dots”. Logo, no primeiro capítulo desta tese, foi apresentado um levantamento dos últimos estudos publicados sobre o uso de partículas magnéticas na identificação e isolamento de bactérias.

Nota-se uma crescente aplicação desta metodologia em diferentes sistemas de imunoensaios, com a constante descrição de benefícios referentes à praticidade e aumento de sensibilidade pelo uso desta metodologia. Com a disponibilização de versões nanoestruturadas destas esferas magnéticas e a associação destas a testes imunocromatográficos, fica a expectativa de uma grande mudança, nos próximos anos, da sensibilidade dos testes rápidos comercializados, atualmente descrita como abaixo dos níveis desejáveis (Wang *et al.*, 2020).

O segundo capítulo desta tese apresenta uma patente depositada referente ao método de produção de anticorpos IgY contra peptídeos baseados nos抗ígenos OmpA, OmpC e FimH de *E. coli* e *Shigella* sp. para uso contra bactérias da família Enterobacteriaceae. A metodologia aqui descrita serviu de base para a realização do estudo descrito no Capítulo 3, além de ter sido aplicada em diversos outros estudos realizados por nossa equipe. Vale ressaltar que esta patente também tomou como base trabalhos anteriores realizados por nossa equipe, como a dissertação de Pardo (2016) e Souza (2018), que investigaram em modelo murino o uso dos peptídeos

protegidos no documento como antígenos vacinais. Os resultados promissores obtidos nestes estudos levaram à ideia da geração de anticorpo IgY contra tais antígenos e à investigação de como aplicá-los.

Para a realização das imunizações nos animais, foi utilizada uma segunda metodologia patenteada anteriormente por nossa equipe relacionada à solubilização de nanotubos de carbono e seu uso como carreador vacinal. Esta metodologia foi utilizada em galinha pela primeira vez no presente estudo. Contudo, foi observada uma dependência da imunogenicidade do peptídeo utilizado para garantir uma resposta humoral satisfatória nas aves imunizadas. Glória (2022) aplicou a mesma metodologia para a produção de anticorpos contra peptídeos baseados em antígenos de *Plasmodium vivax*. Da mesma forma, foi observada uma alta produção de anticorpos com alta capacidade de detecção de amostras clínicas em ensaios utilizando microesferas de látex com leitura por citometria de fluxo.

Os grandes benefícios desta metodologia são: o alto rendimento, dada a alta concentração de anticorpos obtidos em cada ovo dos animais imunizados; a alta possibilidade de escalonamento de produção, visto que basta aumentar o número de animais imunizados; não causar dor significativa no animal, visto que não são necessárias coletas de grandes volumes de sangue do animal, assim como realizado em mamíferos, como os cavalos; e a distância filogenética com mamíferos, o que reduz a possibilidade de reação com fatores sanguíneos (Schade *et al.*, 2005). Devido aos benefícios éticos e ao alto rendimento, esta metodologia torna-se comercialmente atrativa para o desenvolvimento de imunobiológicos para diagnóstico e tratamento de doenças.

No Capítulo 3, como continuidade ao estudo apresentado na patente anteriormente descrita, foi apresentado um artigo original contendo as análises realizadas utilizando os anticorpos anti-FimH contra o peptídeo P9 juntamente com novos anticorpos produzidos contra peptídeos baseados na proteína ETpA de *E. coli* ETEC. Estes últimos não estão contidos na patente apresentada no Capítulo 2 desta tese, carecendo ainda de uma análise de viabilidade patentária, a qual será iniciada junto à Fiocruz.

Como apresentado no artigo, os anticorpos gerados apresentaram características pan-específicas e específicas, a depender da conformação do imunoensaio utilizado. Para fins de detecção rápida, as análises indicam que o uso direto dos anticorpos anti-ETpA acoplados aos “quantum dots” apresentam uma reatividade específica para *E. coli* ETEC, com porcentagens significativas de marcação de fluorescência. O uso de *beads* magnéticas aumentou a reatividade para as outras bactérias testadas, reduzindo assim a especificidade do ensaio. Curiosamente, este resultado diverge de Astolpho (2017), que observou um aumento da especificidade ao

utilizar as esferas magnéticas em seus experimentos. Tal diferença pode residir no fato de os anticorpos produzidos reconhecerem uma região distinta dos desenvolvidos nesta tese. Contudo, vale pontuar que a porcentagem de fluorescência observada no estudo aqui apresentado foi aproximadamente 3 vezes maior que a obtida por Astolpho (2017). Logo, trabalhos futuros devem avaliar se o uso de outros tampões na etapa de lavagem propiciará uma melhora na especificidade da reação, visto que tais reconhecimentos inespecíficos podem ser fruto de ligações fracas.

De modo oposto, os anticorpos anti-FimH apresentaram uma melhora no reconhecimento do antígeno-alvo ao serem associados às *beads* magnéticas, demonstrado pela elevação da porcentagem de fluorescência, detectando um maior número de bactérias dentre as testadas. Como este é um antígeno comum entre as bactérias testadas, esta reatividade pan-específica era esperada. Aproximadamente 80% de todas as cepas de *E. coli* de origem fecal são capazes de produzir fimbrias do tipo 1, que são codificadas pelo operon “fim” cromossômico (Kaczmarek *et al.*, 2012). Por outro lado, a menor reatividade observada contra os isolados de *Shigella* sp. testados pode ser devido a esta apresentar ou não fimH sendo expressa em sua superfície, como relatado por Bravo *et al.* (2015).

A avaliação do uso destas ferramentas com diferentes tipos de amostras torna-se necessária em trabalhos futuros para completa análise do potencial uso destes insumos. Nesta etapa, a participação de institutos com área produtiva ou empresas com experiência no mercado de testes diagnósticos é imprescindível para a real comercialização e distribuição desta tecnologia. Outro ponto importante é a análise destes anticorpos em diferentes plataformas de imunoensaios. Vale ressaltar que o uso de “quantum dots” e esferas magnéticas não é essencial, podendo estes anticorpos serem avaliados em plataformas já muito bem estabelecidas, como os testes em fluxo lateral, ELISA e imunofluorescência, os quais, em suas versões clássicas, não utilizam estes nanomateriais para sua realização. Contudo, a avaliação do uso destas novas estruturas pode trazer benefícios aos imunoensaios, como já demonstrado na literatura (Cho; Irudayaraj, 2013; Sanvicens *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020).

CONCLUSÕES

- O método desenvolvido para produção de anticorpos em ovos de galinha utilizando peptídeos baseados em抗ígenos de *E. coli* e *Shigella* sp. com uso de nanotubos de carbono como carreadores vacinais foi capaz de gerar uma resposta humoral IgY detectável e com potencial escalonável de produção. A qualidade da resposta imune obtida é dependente da imunogenicidade do peptídeo aplicado, sendo a imunização inicial em pools de peptídeos para posterior determinação do peptídeo mais imunogênico por imunoensaio a melhor estratégia para escolha do抗ígeno a ser utilizado em imunizações posteriores;
- O uso dos “quantum dots” se mostrou uma estratégia simples para marcação fluorescente de anticorpos, não inibindo a capacidade dos anticorpos gerados em reconhecer o抗ígeno-alvo. As esferas magnéticas, da mesma forma, não provocaram esta inibição. Contudo, nos ensaios aqui apresentados, levaram a um aumento da sensibilidade e inespecificidade dos testes realizados.
- Os anticorpos anti-ETpA foram capazes de reconhecer especificamente *E. coli* ETEC quando conjugados unicamente com “quantum dots”. Os ensaios, somados ao uso de esferas magnéticas, aumentaram a reatividade contra as outras bactérias avaliadas;
- Os anticorpos anti-FimH apresentaram uma reatividade pan-específica, como esperado. A detecção de um maior número de bactérias foi obtida nos imunoensaios utilizando os anticorpos gerados conjugados a “quantum dots” e esferas magnéticas.
- Por fim, ferramentas e imunoensaios foram desenvolvidos para a detecção específica de *E. coli* ETEC e pan-específicas para *E. coli* e *Shigella* sp., os quais, em trabalhos futuros, poderão ser avaliados quanto ao seu potencial uso para rápida detecção em amostras clínicas e ambientais.

REFERÊNCIAS

- ABDELLATIF, A. A. H.; YOUNIS, M. A.; ALSHARIDAH, M.; RUGAIE, O. A.; TAWFEEK, H. M. Biomedical applications of quantum dots: overview, challenges, and clinical potential. **International Journal of Nanomedicine**, v. 17, p. 1951–1970, 2022.
- AKHONDI, H.; SIMONSEN, K. A. **Bacterial diarrhea**. Treasure Island: StatPearls, 2023.
- ANDERSON, J. D.; BAGAMIAN, K. H.; MUHIB, F.; AMAYA, M. P.; LAYTNER, L. A.; WIERZBA, T.; RHEIGANS, R. Burden of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *shigella* non-fatal diarrhoeal infections in 79 low-income and lower middle-income countries: a modelling analysis. **The Lancet Global Health**, v. 7, n. 3, p. e321–e330, 2019.
- ASADI KARAM, M. R.; HABIBI, M.; BOUZARI, S. Use of flagellin and cholera toxin as adjuvants in intranasal vaccination of mice to enhance protective immune responses against uropathogenic *Escherichia coli* antigens. **Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization**, v. 44, n. 5, p. 378–386, 2016.
- ASTOLPHO, H. A. **Detecção de *Escherichia coli* enterotoxigênica por anticorpos anti-EtpA ligados a nanopartículas magnéticas**. 2017. 108 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.
- AZMAN, A. S.; MOORE, S. M.; LESSLER, J. Surveillance and the global fight against cholera: Setting priorities and tracking progress. **Vaccine**, v. 38, p. A28–A30, 2020.
- BAGAMIAN, K. H.; ANDERSON, J. D.; BLOHM, G.; SCHEELE, S. *Shigella* and childhood stunting: Evidence, gaps, and future research directions. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 17, n. 9, e0011475, 2023.
- BATISTELA, D. M. **Preparação e caracterização de nanopartículas de prata para aplicação no desenvolvimento de imunoensaio para imunoglobulina G humana**. 2015. 129 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- BAYAT, M.; KHABIRI, A.; HEMATI, B. Development of IgY-Based sandwich ELISA as a robust tool for rapid detection and discrimination of toxigenic *Vibrio cholerae*. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 2018, n. 1, p. 1–9, 2018.
- BEAUGERIE, L.; SOKOL, H. Acute infectious diarrhea in adults: epidemiology and management. **La Presse Médicale**, v. 42, n. 1, p. 52–59, 2013.
- BINNICKER, M. J. Multiplex molecular panels for diagnosis of gastrointestinal infection: performance, result interpretation, and cost-effectiveness. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 3723–3728, 2015.
- BOEHM, T.; HESS, I.; SWANN, J. B. Evolution of lymphoid tissues. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 6, p. 315–321, 2012.
- BOOPATHY, L. K.; GOPAL, T.; ROY, A.; KANDY, R. R. K.; ARUMUGAM, M. K. Recent trends in macromolecule-conjugated hybrid quantum dots for cancer theranostic applications. **RSC Advances**, v. 13, n. 27, p. 18760, 2023.

BRAMBELL, F. W. The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins. *Lancet*, v. 2, n. 7473, p. 1087–1093, 1966.

BRAVO, V.; PUHAR, A.; SANSONETTI, P.; PARROT, C.; TORO, C. S. Distinct mutations led to inactivation of type 1 fimbriae expression in *Shigella* spp. *Plos One*, v. 10, n. 3, e0121785, 2015.

BRASIL JÚNIOR, A. G. **Obtenção de bioconjugados anti-NS1 DENV com pontos quânticos fluorescentes como insumos para ensaios diagnósticos da dengue**. 2014. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

BRUBAKER, J.; ZHANG, X.; BOURGEOIS, A. L.; HARRO, C.; SACK, D. A.; CHAKRABORTY, L. Intestinal and systemic inflammation induced by symptomatic and asymptomatic enterotoxigenic *E. coli* infection and impact on intestinal colonization and ETEC specific immune responses in an experimental human challenge model. *Gut Microbes*, v. 13, n. 1, p. 1–13, 2021.

BUSKIRK, A. D. *et al.* Mucosal immune profiles associated with diarrheal disease severity in *Shigella*- and Enteropathogenic *Escherichia coli*-infected children enrolled in the Global Enteric Multicenter Study. *mBio*, v. 13, n. 4, 2022.

BUTKEVICIUTE, E. *et al.* Global diarrhoea-associated mortality estimates and models in children: Recommendations for dataset and study selection. *Vaccine*, v. 39, n. 32, p. 4391–4398, 2021.

BUUCK, S.; SMITH, K.; FOWLER, R. C.; CEBELINSKI, E.; LAPPI, V.; BOXRUD, D.; MEDUS, C. Epidemiology of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in Minnesota, 2016–2017. *Epidemiology and Infection*, v. 148, n. 1, e206, 2020.

CABRAL FILHO, P. E. **Investigaçāo de antígenos eritrocitários do sistema ABO utilizando quantum dots conjugados a anticorpos monoclonais e à lectina *Ulex europaeus***. 2013. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

CAPITANI, G.; EIDAM, O.; GLOCKSHUBER, R.; GRUTTER, M. G. Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes and Infection*, v. 8, n. 8, p. 2284–2290, 2006.

CARVALHO, K. H. G. **Obtenção e caracterização de imunoconjugados baseados em pontos quânticos de CdTe para diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2014. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

CHEN, W.; KIM, J. H.; ZHANG, D.; LEE, K. H.; CANELOSI, G. A.; SOELBERG, S. D.; FRULONG, C. E.; CHUNG, J. H.; SHEN, A. Q. Microfluidic one-step synthesis of alginate microspheres immobilized with antibodies. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 10, n. 88, p. 20130566, 2013.

CHO, I. H.; IRUDAYARAJ, J. Lateral-flow enzyme immunoconcentration for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 10, p. 3313–3319, 2013.

COHEN, A. L. *et al.* Aetiology and incidence of diarrhoea requiring hospitalisation in children under 5 years of age in 28 low-income and middle-income countries: findings from the Global Pediatric Diarrhea Surveillance network. **BMJ Global Health**, v. 7, n. 9, p. e009548, 2022.

CORTÉS-SARABIA, K.; BAUTISTA-SANTOS, I.; CISNEROS-SARABIA, A.; PARRA-ROJAS, I.; ESTRADA, A.; FLORES-ALFARO, E.; TILAPA, G. F.; PERALTA, A. R.; VELÁSQUEZ, A. V. *Gardnerella vaginalis* Vaginolysin (VLY)-derived MAP8 peptide (VLY-MAP8) induced the production of egg yolk IgY antibodies that inhibit erythrocytes lysis. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 27, n. 1, p. 413–420, 2021.

COTTA, M. A. Quantum dots and their applications: what lies ahead? **ACS Applied Nano Materials**, v. 3, n. 6, p. 4920–4924, 2020.

CRUZ, C. B. N.; SOUZA, M. C. S.; SERRA, P. T.; SANTOS, I.; BALIEIRO, A.; PIERI, F. A.; NOGUEIRA, P. A.; ORLANDI, P. P. Virulence factors associated with pediatric shigellosis in Brazilian Amazon. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1, 2014.

DAHMER, P. L.; DEROUCHEY, J. M.; GEBHARDT, J. T.; PAULK, C. B.; JONES, C. K. Summary of methodology used in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) challenge experiments in weanling pigs and quantitative assessment of observed variability. **Translational Animal Science**, v. 7, n. 1, 2023.

DARFEUILLE-MICHAUD, A.; NEUT, C.; BARNICH, M.; LEDERMAN, E.; DI MARTINO, P.; DESREUMAUX, P.; GAMBIEZ, L.; JOLY, B.; CORTOT, A.; COLOMBEL, J. F. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v. 115, n. 6, p. 1405–1413, 1998.

DEL CANTO, F. *et al.* Distribution of classical and nonclassical virulence genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from Chilean children and tRNA gene screening for putative insertion sites for genomic islands. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3198–3203, 2011.

DÍAZ-GONZÁLEZ, M.; ESCOSURA-MUÑIZ, A. Strip modification and alternative architectures for signal amplification in nanoparticle-based lateral flow assays. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 413, n. 16, p. 4111–4117, 2021.

DRESSLER, D. Clinical applications of botulinum toxin. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 325–336, 2012.

DUBREUIL, J. D. *Escherichia coli*: Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). In: DUBREUIL, J. D. **Encyclopedia of food microbiology**. 2. ed. Oxford: Oxford Press, 2014. p. 728–734.

DUGUID, J. P.; SMITH, I. W.; DEMPSTER, G.; EDMUNDS, P. N. Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 70, n. 2, p. 335–348, 1955.

DUPONT, H. L. Acute infectious diarrhea in immunocompetent adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 16, p. 1532–1540, 2014.

EL-KALLINY, A. S.; ABDEL-WAHED, M. S.; EL-ZAHHAR, A. A.; HAMZA, I. A.; GAD-ALLAH, T. A. Nanomaterials: a review of emerging contaminants with potential health or environmental impact. **Discover Nano**, v. 18, n. 1, 2023.

FARZAM, N.; SARAF, R. R.; BANET-LEVI, Y.; LERNER-GEVA, L.; ASHKENAZI, S.; KUBLER-KIELB, J.; VINOGRADOV, E.; ROBBINS, J. B.; SCHNEERSON, R. Vaccination with *Shigella flexneri* 2a conjugate induces type 2a and cross-reactive type 6 antibodies in humans but not in mice. **Vaccine**, v. 35, n. 37, p. 4990–4996, 2017.

FEITOSA, K. A. **Análise toxicológica da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄) com ligantes de sulfonato de sódio (SO₃-Na⁺): in vitro e in vivo**. 2022. 103 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.

FLECKENSTEIN, J. M.; HARDWIDGE, P. R.; MUNSON, G. P.; RASKO, D. A.; SOMMERFELT, H.; STEINLAND, H. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 2, p. 89–98, 2010.

FLECKENSTEIN, J.; SHEIKH, A.; QADRI, F. Novel Antigens for enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) Vaccines. **Expert Review of Vaccines**, v. 13, n. 5, p. 631–639, 2014.

FRANKE-FAYARD, B.; FONAGER, J.; BRAKS, A.; KHAN, S. M.; JANSE, C. J. Sequestration and tissue accumulation of human malaria parasites: Can we learn anything from rodent models of malaria? **Plos Pathogens**, v. 6, n. 9, e1001032, 2010.

GAASTRA, W.; GRAAF, F. K. DE. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. **Microbiological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 129–135, 1982.

GARCIA, P.; WANG, Y.; VIALLET, J.; JILKOVA, Z. M. The chicken embryo model: a novel and relevant model for immune-based studies. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 2021.

GLÓRIA, J. C. **Novas abordagens para o desenvolvimento de insumos e métodos para o diagnóstico de malária**. 2022. 163 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2022.

GOMES, T. A. T.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C. A.; GUTH, B. E. C.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA, L. C. S. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 3–30, 2016.

GOPAL, A.; CHIDAMBARAM, I. S.; DEVARAJ, N.; DEVARAJ, H. *Shigella dysenteriae* infection activates proinflammatory response through β -catenin/NF- κ B signaling pathway. **Plos One**, v. 12, n. 4, e0174943, 2017.

GRINDSTAFF, J. L.; BRODIE, E. D.; KETTERSON, E. D. Immune function across generations: integrating mechanism and evolutionary process in maternal antibody transmission. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1531, p. 2309–2322, 2003.

GUANDALINI, S. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, n. 3, p. 37–45, 2011.

GÜL, E.; FATTINGER, S. A.; SELLIN, M. E.; HARDT, W. D. Epithelial inflammasomes, gasdermins, and mucosal inflammation - Lessons from *Salmonella* and *Shigella* infected mice. **Seminars in immunology**, v. 70, n. 1, e101812, 2023.

HAHN, E.; WILD, P.; HERMANNS; SEBBEL, P.; GLOCKSHUBER, R.; HÄNER, M.; TASCHNER, N.; BURKHARD, P.; AEBI, U.; MÜLLER, S. A. Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. **Journal of Molecular Biology**, v. 323, n. 5, p. 845–857, 2002.

HAMAL, K. R.; BURGESS, S. C.; PEVZNER, I. Y.; ERF, E. F. Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. **Poultry Science**, v. 85, n. 8, p. 1364–1372, 2006.

HAMMER, D. K. The immune system in chickens. **Avian Pathology**, v. 3, n. 2, p. 65–78, 1974.

HELI, B.; AJJI, A. Toward a nanopaper-based and solid phase immunoassay using FRET for the rapid detection of bacteria. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.

HIGA, A. M. **Sensoriamento óptico do anticorpo AQP4-IgG utilizando nanobiossensores de nanopartículas de prata associados com epítópos da proteína AQP4**. 2022. 104 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

HIYOSHI, H.; TIFFANY, C. R.; BRONNER, D. N.; BÄUMLER, A. J. Typhoidal *Salmonella* serovars: ecological opportunity and the evolution of a new pathovar. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 4, p. 527–541, 2018.

HOBOT, J. A. Bacterial ultrastructure. In: SUSSMAN, M. **Molecular Medical Microbiology**. 2. ed. Cambridge: Academic Press, 2015. p. 7–32.

HOSSAIN, N.; MOBARIK, H.; MIMONA, M. A.; ISLAM, A.; HOSSAIN, A.; ZOHURA, F. T.; CHOWDHURY, M. A. Advances and significances of nanoparticles in semiconductor applications – A review. **Results in Engineering**, v. 19, p. 101347, 2023.

HU, S.; KANG, H.; GU, S.; WANG, C.; CHENG, S.; GONG, W.; WANG, L.; GU, B.; YANG, Y. Rapid detection method for pathogenic *Candida* captured by magnetic

nanoparticles and identified using SERS via AgNPs. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 941–950, 2021.

IFRAH, M. E.; PERELMAN, B.; FINGER, A.; UNI, Z. The role of the bursa of Fabricius in the immune response to vaccinal antigens and the development of immune tolerance in chicks (*Gallus domesticus*) vaccinated at a very young age. **Poultry Science**, v. 96, n. 1, p. 51–57, 2017.

JAHANGIR, M. A.; GILANI, S. J.; MUHEEM, A.; JAFAR, M.; ASLAM, M.; ANSARI, M. T.; BARKAT, M. A. Quantum dots: next generation of smart nano-systems. **Pharmaceutical Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 234–245, 2019.

JEURISSEN, S. H. M.; BOONSTRA-BLOM, A. G.; AL-GARIB, S. O.; HARTOG, L.; KOCH, G. Defence mechanisms against viral infection in poultry: a review. **The Veterinary Quarterly**, v. 22, n. 4, p. 204–208, 2000.

JOFFRÉ, E.; VON MENTZER, A.; GHANY, M. A. E.; OEZGUEN, N.; SAVIDGE, T.; DOUGAN, G.; SVENNERHOLM, A. M.; SJÖLING, Å. Allele variants of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin are globally transmitted and associated with colonization factors. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 2, p. 392–403, 2015.

JOHNSON, D. I. Bacterial pathogens and their virulence factors. **Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors**, v. 1, p. 1–461, 2017.

JONES, C. H.; PINKNER, J. S.; ROTH, R.; HEUSER, J.; NICHOLES, A. V.; ABRAHAM, S. N.; HULTGREN, S. J. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 6, p. 2081–2085, 1995.

KACZMAREK, A.; BUDZYŃSKA, A.; GOSPODAREK, E. Prevalence of genes encoding virulence factors among *Escherichia coli* with K1 antigen and non-K1 *E. coli* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 1360–1365, 2012.

KAISER, P. The long view: a bright past, a brighter future? Forty years of chicken immunology pre- and post-genome. **Avian Pathology**, v. 41, n. 6, p. 511–518, 2012.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

KHALIL, I. A. *et al.* Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990–2016. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1229–1240, 2018.

KHAMLAMOON, A.; NAWATTANAPAIBOON, K.; SRIKHIRIN, T. A magnetic nanoparticles-based method for nucleic acid extraction from specimen collection. **Materials Today Proceedings**, v. 197, n. 2, p. 392–403, 2023.

KHAN, K. H.; HIMENO, A.; KOSUGI, G.; NAKASHIMA, Y.; RAFIQUE, A.; IMAMURA, A.; HATANAKA, T.; KATO, D. I.; ITO, Y. IgY-binding peptide screened from a random

peptide library as a ligand for IgY purification. **Journal of Peptide Science**, v. 23, n. 10, p. 790–797, 2017.

KITAGUCHI, K.; OSADA, K.; HORIO, F.; MURAI, A. Exclusion of polymeric immunoglobulins and selective immunoglobulin Y transport that recognizes its Fc region in avian ovarian follicles. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 121, n. 3–4, p. 290–299, 2008.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 1, p. 27–35, 2000.

KNUTTON, S.; LLOYD, D. R.; MCNEISH, A. S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 1, p. 69, 1987.

KOESTLER, B. J.; WARD, C. M.; FISHER, C. R.; RAJAN, A.; MARESSO, A. W.; PAYNE, S. M. Human intestinal enteroids as a model system of *Shigella* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 4, p. 733–738, 2019.

KONG, W.; YANG, X.; YANG, M.; ZHOU, H.; OUYANG, Z.; ZHAO, M. Photoluminescent nanosensors capped with quantum dots for high-throughput determination of trace contaminants: Strategies for enhancing analytical performance. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, p. 36–47, 2016.

KOTA, R. K.; REDDY, P. N.; SREERAMA, K. Application of IgY antibodies against staphylococcal protein A (SpA) of *Staphylococcus aureus* for detection and prophylactic functions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 21, p. 9387–9398, 2020.

KOTLOFF, K. L.; PLATS-MILLS, J. A.; NASRIN, D.; ROOSE, A.; BLACKWELDER, W. C.; LEVINE, M. M. Global burden of diarrheal diseases among children in developing countries: Incidence, etiology, and insights from new molecular diagnostic techniques. **Vaccine**, v. 35, n. 49, p. 6783–6789, 2017.

KOTLOFF, K. L., RIDDLE, M. S.; PLATS-MILLS, J. A.; PAVLINAC, P.; ZAIDI, A. K. M. Shigellosis. **Lancet**, v. 391, n. 10122, p. 801–812, 2018.

KOWALCZYK, K.; DAISS, J.; HALPERN, J.; ROTH, T. F. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. **Immunology**, v. 54, n. 4, p. 755–762, 1985.

KUHLMANN, F. M. *et al.* Conservation and global distribution of non-canonical antigens in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007825, 2019.

KUHLMANN, F. M.; GRIGURA, V.; VICKERS, T. J.; PROUTY, M. G.; IANNOTTI, L. I.; DULIENCE, S. J. L.; FLECKSTEIN, M. J. Seroprevalence study of conserved enterotoxigenic *Escherichia coli* antigens in globally diverse populations. **Microorganisms**, v. 11, n. 9, p. 2221–2226, 2023.

KUIAVA, V. A.; PERIN, A. T.; CHIELLE, E. O. Hospitalização e taxas de mortalidade por diarreia no Brasil: 2000-2015. **Ciência & Saúde**, v. 12, n. 2, p. e30022, 2019.

- KUMAR, P. *et al.* Enterotoxigenic *Escherichia coli*-blood group A interactions intensify diarrheal severity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 8, p. 3298–3311, 2018.
- LARSSON, A.; CAMPBELL, A.; ERIKSSON, M. Chicken antibodies are highly suitable for particle enhanced turbidimetric assays. **Frontiers in Immunology**, v. 13, 2022.
- LARSSON, A.; KARLSSON-PARRA, A.; SJOQUIST, J. Use of chicken antibodies in enzyme immunoassays to avoid interference by rheumatoid factors. **Clinical Chemistry**, v. 37, n. 3, p. 411–414, 1991.
- LI, B. *et al.* Clinical detection of neurodegenerative blood biomarkers using graphene immunosensor. **Carbon**, v. 168, p. 144–162, 2020a.
- LI, X.; BRUNNER, C.; WU, Y.; LEKA, O.; SCHNEIDER, G.; KAMMERER, R. A. Structural insights into the interaction of botulinum neurotoxin a with its neuronal receptor SV2C. **Toxicon**, v. 175, p. 36–43, 2020b.
- LI, Z. *et al.* A Universal fluorescent immunochromatography assay based on quantum dot nanoparticles for the rapid detection of specific antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, 2022.
- LIU, J. *et al.* Optimization of quantitative PCR methods for enteropathogen detection. **Plos One**, v. 11, n. 6, p. e0158199, 2016a.
- LIU, J. *et al.* Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study. **Lancet**, v. 388, n. 10051, p. 1291–1301, 2016b.
- LOPES, M. C. da P. **Conjugação de anticorpo anti-antígeno carcinoembrionário a nanopartículas magnéticas**: avaliação do potencial para detecção e tratamento de câncer. 2012. 163 f. Tese (Doutorado em Patologia Molecular) – Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, 2021.
- LUO, Q. *et al.* Conservation and immunogenicity of novel antigens in diverse isolates of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, e0003858, 2015.
- MADEJ, J. P.; STEFANIAK, T.; BEDNARCZYK, M. Effect of in ovo-delivered prebiotics and synbiotics on lymphoid-organs' morphology in chickens. **Poultry Science**, v. 94, n. 6, p. 1209–1219, 2015.
- PARDO, M. C. da S. **Identificação de epítópos imunogênicos de *Shigella flexneri***. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.
- MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 1–2, p. 2–12, 2013.

MATANZA, X. M.; CLEMENTS, A. Pathogenicity and virulence of *Shigella sonnei*: A highly drug-resistant pathogen of increasing prevalence. **Virulence**, v. 14, n. 1, 2023.

MATTOCK, E.; BLOCKER, A. J. How do the virulence factors of *Shigella* work together to cause disease? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 3, 2017.

MORENO, A. C. R. *et al.* Etiology of childhood diarrhea in the northeast of Brazil: significant emergent diarrheal pathogens. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 1, p. 50–57, 2010.

MOTA, L. S. O.; PEIXOTO, B. S.; SANTANA, L. S.; SILVA, L. C. R.; MORAES, M. C. Materiais nanoteranósticos de carbono: pontos quânticos de carbono e carbonos mesoporosos ordenados. **Revista Virtual de Química**, v. 15, n. 1, p. 171–182, 2023.

NAGUIB, G.; MAGHRABI, A. A.; MIRA, A. I.; MOUSLY, H. A.; HAJJAJ, M.; HAMED, M. T. Influence of inorganic nanoparticles on dental materials' mechanical properties. A narrative review. **BMC Oral Health**, v. 23, n. 1, 2023.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B.; BROWNE, R. R.; PRADO, V.; VIAL, V.; LEVINE, M. M. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 6, n. 9, p. 829–831, 1987.

NEWELL, D. G.; LA RAGIONE, R. M. Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 1, p. 49–71, 2018.

NUNES, M. D. R. C. M.; MAGALHÃES, P. P.; PENNA, F. J.; NUNES, J. M. M.; MENDES, E. N. Diarrhea associated with *Shigella* in children and susceptibility to antimicrobials. **Jornal de Pediatria**, v. 88, n. 2, p. 125–128, 2012.

NUNES, M. R. C. M.; PENNA, F. J.; FRANCO, R. T.; MENDES, E. N.; MAGALHÃES, P. P. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in children with acute diarrhoea and controls in Teresina/PI, Brazil: distribution of enterotoxin and colonization factor genes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 1, p. 224–232, 2011.

ORLANDI, P. P.; SILVA, T.; MAGALHÃES, G.; ALVES, F.; CUNHA, R. P.; DURLACHER, R.; SILVA, L. H. S. Enteropathogens associated with diarrheal disease in infants of poor urban areas of Porto Velho, Rondônia: a preliminary study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 621–625, 2001.

ORLANDI, P. P.; MAGALHÃES, G.; MATOS, N. B.; SILVA, P.; PENATTI, M.; NOGUEIRA, P. A.; SILVA, L. H. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 507–517, 2006.

PAKBIN, B.; BRÜCK, W. M.; BRÜCK, T. B. Molecular mechanisms of *Shigella* pathogenesis; recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, 2023.

- PAKBIN, B.; BRÜCK, W. M.; ROSSEN, J. W. A. Virulence factors of enteric pathogenic *Escherichia coli*: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, 2021.
- PANTANO, S.; MONTECUCCO, C. The blockade of the neurotransmitter release apparatus by botulinum neurotoxins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 5, p. 793–811, 2014.
- PARDO, M. C. da S. **Identificação de epitopos imunogênicos de *Shigella flexneri***. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.
- PARMA, Y. R. *et al.* Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay using chicken egg yolk IgY antibodies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 84, 2012.
- PEREIRA, E. P. V.; TILBURG, M. F.; FLOREAN, E. O. P.; GUEDES, M. I. F. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. **International Immunopharmacology**, v. 73, p. 293–303, 2019.
- PETERSON, J. W. Bacterial pathogenesis. In: PETERSON, J. W. **Medical microbiology**. 4. ed. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
- PIRAZZINI, M.; ROSSETTO, O.; ELEOPRA, R.; MONTECUCCO, C. Botulinum neurotoxins: biology, pharmacology, and toxicology. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 2, p. 200–235, 2017.
- POTGIETER, N.; LEINE, L.; NGANDU, J. P.; LEDWABA, S.; ZITHA, T.; MUDAU, L.; BECKER, P.; TRAORE, A. N.; BARNARD, T. G. High burden of co-infection with multiple enteric pathogens in children suffering with diarrhoea from rural and peri-urban communities in South Africa. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 315–322, 2023.
- QADRI, F.; SVENNERHOLM, A. M.; FARUQUE, A. S.; SACK, R. B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 3, p. 465–483, 2005.
- QADRI, F.; SAHA, A.; AHMED, T.; TARIQUE, A. A.; BEGUM, Y. A.; SVENNERHOLM, A. M. Disease burden due to enterotoxigenic *Escherichia coli* in the first 2 years of life in an urban community in Bangladesh. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3961–3968, 2007.
- RAJENDIRAN, K.; ZHAO, Z.; PEI, D. S.; FU, A. Antimicrobial activity and mechanism of functionalized quantum dots. **Polymers**, v. 11, n. 10, p. 1670–1678, 2019.
- REIS, I. F. **Desenvolvimento de imunossensor eletroquímico nanoestruturado descartável para detecção de SARS-CoV-2 em amostras ambientais**. 2023. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Centro de Ciências da Natureza, Universidade Federal de São Carlos, Buri, 2023.
- RIAZ, S.; STEINSLAND, H.; HANEVIK, K. Human mucosal IgA immune responses against enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 1–19, 2020.

RIDDLE, M. S.; DUPONT, H. L.; CONNOR, B. A. ACG Clinical guideline: diagnosis, treatment, and prevention of acute diarrheal infections in adults. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 111, n. 5, p. 602–622, 2016.

ROSE, M. E.; ORLANS, E. Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick. **Developmental and comparative immunology**, v. 5, n. 1, p. 15–20, 1981.

ROSTAMI, H.; SEIDAVI, A.; DADASHBEIKI, M.; ASADPOUR, Y.; SIMÕES, J.; SHAH, A. A.; LAUDADIO, V.; LOSACCO, C.; PERILLO, A.; TUFARELLI, V. Supplementing dietary rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) powder and vitamin E in broiler chickens: evaluation of humoral immune response, lymphoid organs, and blood proteins. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 9, p. 8836–8842, 2018.

ROY, K.; HAMILTON, D.; ALLEN, K. P.; RANDOLPH, M. P.; FLECKSTEIN, J. M. The EtpA exoprotein of enterotoxigenic *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and is a protective antigen in an experimental model of murine infection. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 5, p. 2106–2112, 2008.

ROY, K.; GILLIARD, G. M.; HAMILTON, D. J.; LUO, J.; OSTMANN, M. M.; FLECKSTEIN, J. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* EtpA mediates adhesion between flagella and host cells. **Nature**, v. 457, n. 7229, p. 594–598, 2009.

ROY, K.; HAMILTON, D. J.; FLECKENSTEIN, J. M. Cooperative role of antibodies against heat-labile toxin and the EtpA adhesin in preventing toxin delivery and intestinal colonization by enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 19, n. 10, p. 1603–1610, 2012.

SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides. **Biomagnetic Research and Technology**, v. 2, p. 7, 2004.

SAHL, J. W.; STEINSLAND, H.; REDMAN, J. C.; ANGIUOLLI, S. V.; NATARO, J. P.; SOMMERFELT, H.; RASKO, D. A. A comparative genomic analysis of diverse clonal types of enterotoxigenic *Escherichia coli* reveals pathovar-specific conservation. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 2, p. 950, 2011.

SAMARANAYAKE, H.; WIRTH, T.; SCHENKWEIN, D.; RATY, J. K.; HERTTUALA, J. Challenges in monoclonal antibody-based therapies. **Annals of Medicine**, v. 41, n. 5, p. 322–331, 2009.

SANSONETTI, P. J. Genetic and molecular basis of epithelial cell invasion by *Shigella* species. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. S285–S292, 1991.

SANVICENS, N.; PASCUAL, N.; FERNÁNDEZ-ARGÜELLES, M. T.; ADRIÁN, J.; COSTA-FERNÁNDEZ, J. M.; SÁNCHEZ-BAEZA, F.; SANZ-MEDEL, A.; MARCO, M. Quantum dot-based array for sensitive detection of *Escherichia coli*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 399, n. 8, p. 2755–2762, 2011.

SAUER, M. M.; JAKOB, R. P.; ERAS, J.; BADAY, S.; ERIS, D.; NAVARRA, G.; BERNECHE, S.; ERNST, B.; MAIER, T.; GLOCKSHUBER, R. Catch-bond mechanism of the bacterial adhesin FimH. **Nature Communications**, v. 7, n. 10738, 2016.

SCHADE, R.; CALZADO, E. Z.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P. A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H. R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 129–154, 2005.

SCHROEDER, G. N.; HILBI, H. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 134–139, 2008.

SHANE, A. L. *et al.* 2017 Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines for the diagnosis and management of infectious diarrhea. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 12, p. e45–e80, 2017.

SHRESTHA, S.; WANG, B.; DUTTA, P. Nanoparticle processing: Understanding and controlling aggregation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 279, 2020.

SILVA, B. E. A. DE S.; MOITINHO, C. O.; ARAÚJO, G. M. D.; SILVA, B. V. M.; BRITO, T. G. S.; ANDRADE, F. M.; SILVA FILHO, J. L.; SIMÃO, E. P. Avaliação da aplicação de biossensores no diagnóstico da Covid-19. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 6, p. 33178–33187, 2023.

SINGARAVELU, M.; SELVAN, A.; ANISHETTY, S. Molecular dynamics simulations of lectin domain of FimH and immunoinformatics for the design of potential vaccine candidates. **Computational Biology and Chemistry**, v. 52, p. 18–24, 2014.

SMILEY SMITH, S. E.; HOSGOOD, H. D.; MICHELSON, E. S.; STOWE, M. Americans' nanotechnology risk perception. **Journal of Industrial Ecology**, v. 12, n. 3, p. 459–473, 2008.

SNELLINGS, N. J.; TALL, B. D.; VENKATESAN, M. M. Characterization of *Shigella* type 1 fimbriae: expression, FimA sequence, and phase variation. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 6, p. 2462, 1997.

SOUSA, M. Â. B.; MENDES, E. N.; APOLÔNIO, A. C. M.; FARIA, L. M.; MAGALHÃES, P. P. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhoea. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 118, n. 2, p. 125–135, 2010.

SOUZA, A. R. de. **Avaliação do potencial vacinal de peptídeos de抗ígenos de Shigella spp.** 2018. 95 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

SOUZA, C. DE O.; MELO, T. R. B.; MELO, C. S. B.; MENEZES, E. M.; CARVALHO, A. C.; MONTEIRO, L. C. R. Enteropathogenic *Escherichia coli*/*Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreogênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 79–91, 2016.

- STANISAVLJEVIC, M.; KRIZKOVA, S.; VACULOVICOVA, M.; Kizek, R.; ADAM, V. Quantum dots-fluorescence resonance energy transfer-based nanosensors and their application. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 74, p. 562–574, 2015.
- STILLS, H. F. Polyclonal antibody production. **The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents**, p. 259–274, 2012.
- STOCKMANN, C. *et al.* Detection of 23 gastrointestinal pathogens among children who present with diarrhea. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 6, n. 3, p. 231–238, 2017.
- SUN, H.; LIU, P.; NOLAN, L. K.; LAMONT, S. J. Thymus transcriptome reveals novel pathways in response to avian pathogenic *Escherichia coli* infection. **Poultry Science**, v. 95, n. 12, p. 2803–2814, 2016.
- SVENNERHOLM, A. M.; LUNDGREN, A. Developments in oral enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccines. **Current Opinion in Immunology**, v. 84, 2023.
- TABORDA, R. L. M.; SILVA, L. A.; ORLANDI, P. P.; BATISTA, F. S.; RODRIGUES, R. S.; MATOS, N. B. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* among diarrheal children in western Brazilian Amazon. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 55, n. 4, p. 390–396, 2018.
- TANG, Y. W.; SUSSMAN, M.; LIU, D.; POXTON, I. R.; SCHWARTZMAN, J.; MERRITT, A. Molecular medical microbiology. **Molecular Medical Microbiology**, p. 1–2145, 2014.
- TENAILLON, O.; SHURNIK, D.; PICARD, B.; DENAMUR, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 207–217, 2010.
- TRIKHA, R.; RISHI, P.; TEWARI, R. Remediation of intramacrophageal *Shigella dysenteriae* type 1 by probiotic lactobacilli isolated from human infants' stool samples. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 145, n. 5, p. 679–684, 2017.
- TROEGER, C. *et al.* Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. 1211–1228, 2018.
- VANSOFLA, A. N.; NAZARIAN, S.; KORDBACHEH, E.; FATHI, J. An IgG/IgY sandwich-ELISA for the detection of heat-labile enterotoxin B subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Gene Reports**, v. 23, p. 101099, 2021.
- VIDAL, R. M. *et al.* Colonization factors among enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from children with moderate-to-severe diarrhea and from matched controls in the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 1, 2019.
- VON MENTZER, A. *et al.* Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. **Nature Genetics**, v. 46, n. 12, p. 1321–1326, 2014.

VON MENTZER, A.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human and animal-specific enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends in Microbiology**, v. 0, n. 0, 2023.

WAKSMAN, G.; HULTGREN, S. J. Structural biology of the chaperone– usher pathway of pilus biogenesis. **Nature Reviews - Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 765, 2009.

WANG, C.; SHEN, W.; RONG, Z.; LIU, X.; GU, B.; XIAO, R.; WANG, S. Layer-by-layer assembly of magnetic-core dual quantum dot-shell nanocomposites for fluorescence lateral flow detection of bacteria. **Nanoscale**, v. 12, n. 2, p. 795–807, 2020.

WANG, H.; ZHONG, Z.; LUO, Y.; COX, E.; DEVRIENDT, E. Heat-stable enterotoxins of enterotoxigenic *Escherichia coli* and their impact on host immunity. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 24–35, 2019.

WU, H. J.; WANG, A. H. J.; JENNINGS, M. P. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 12, n. 1, p. 93–101, 2008.

XIA, L.; XIAO, X.; XIA, L.; LI, G.; SHUI, L. Microfluidic magnetic analyte delivery technique for separation, enrichment, and fluorescence detection of ultratrace biomarkers. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 23, p. 8273–8280, 2021.

XU, Y.; LI, X.; JIN, L.; ZHEN, Y.; LU, Y.; LI, S.; YOU, J.; WANG, L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 860–868, 2011.

ZEINER, S. A.; DWYER, B. E.; CLEGG, S. FimA, FimF, and FimH are necessary for assembly of type 1 fimbriae on *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 9, p. 3289, 2012.

ZHANG, X.; TACHIBANA, S.; WANG, H.; HISADA, M.; WILLIAMS, G. M.; GAO, B.; SUN, Z. Interleukin-6 is an important mediator for mitochondrial DNA repair after alcoholic liver injury in mice. **Hepatology**, v. 52, n. 6, p. 2137–2147, 2010.

ZHU, H.; SIKORA, U.; OZCAN, A. Quantum dot enabled detection of *Escherichia coli* using a cell-phone. **The Analyst**, v. 137, n. 11, p. 2541–2544, 2012.

APÊNDICES

Apêndice I - Teste de citometria utilizando beads magnéticas e quantum dots com anticorpos anti-fimH e anti-etpa em combinação

Nestes ensaios foi observado uma redução da sensibilidade do teste com o uso de anticorpos anti-ETpA junto as esferas magnéticas e IgYQD anti-fimH como primário (porcentagem de fluorescência máxima próximo a 5%), havendo ainda uma maior reatividade para *E. coli* ETEC. Quando a posição dos anticorpos foi invertida, esferas com anti-FimH e IgYQD anti-ETpA como anticorpo primário, foi observada uma sensibilidade do ensaio ainda inferior às combinações “A” e “B” (porcentagem máxima próximo a 25%), apresentando maior reatividade para as bactérias *E. coli* EHEC e ETEC-ST.

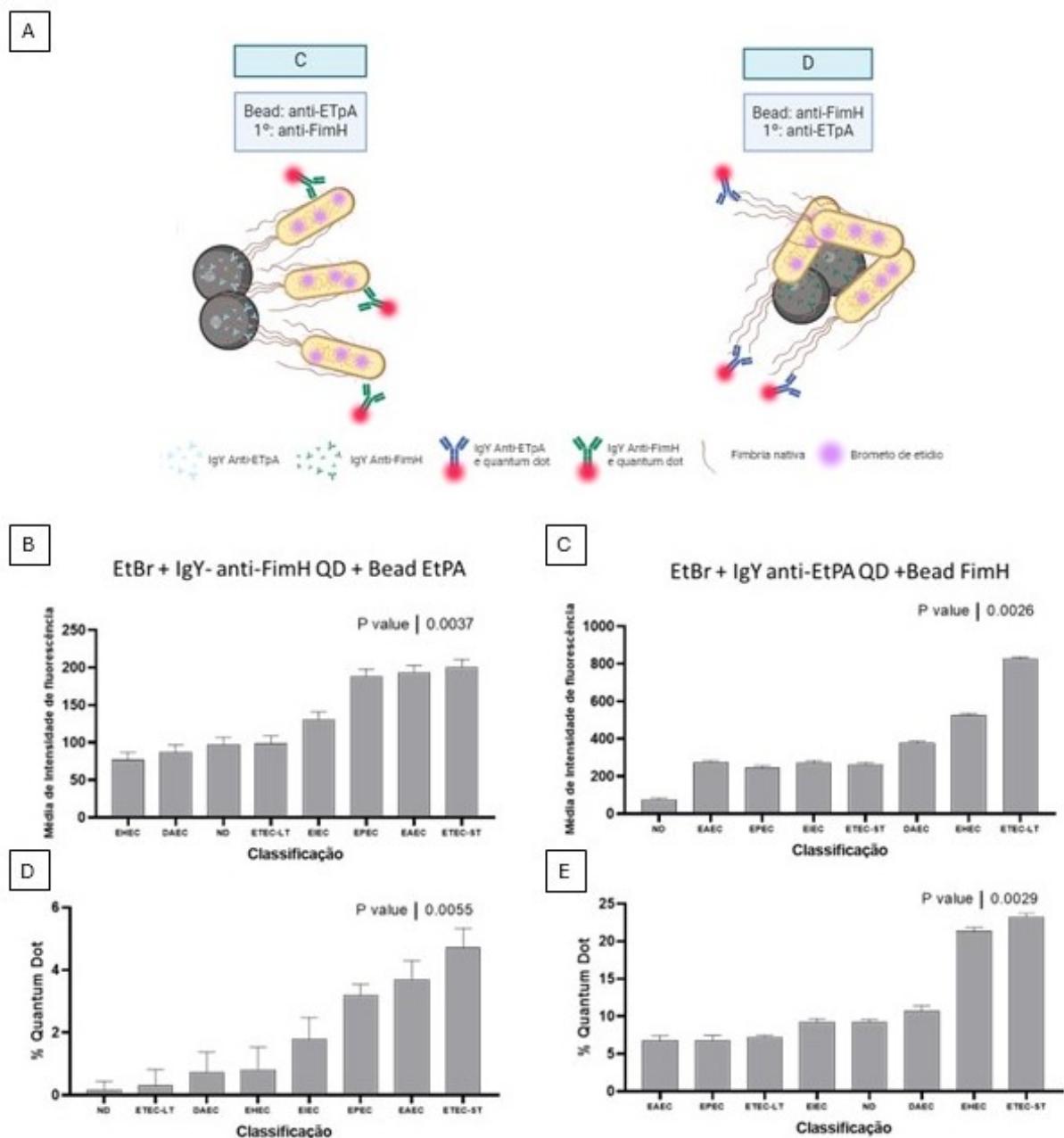


Figura anexo III: Análise por citometria de fluxo utilizando anticorpos IgY anti-ETpA e anti-FimH combinados em esferas magnéticas e “quantum dots”. A - Esquema detalhando as variações realizadas na “configuração 2” dos ensaios utilizando anticorpos ligados à esferas magnéticas e “quantum dots”. B - Avaliação através de MIF (média de intensidade de fluorescência) da reatividade dos anticorpos IgY-QD anti-FimH e esferas magnéticas com anti-ETpA (combinação C); C - avaliação através de MIF da reatividade dos anticorpos IgY-QD anti-ETpA e esferas magnéticas com anti-FimH (combinação D); D - avaliação através do percentual de fluorescência da combinação C; E - avaliação através do percentual de fluorescência da combinação D. Eixo “X”: Cepas de *Escherichia coli* diarréogênicas (EHEC, EPEC, EAEC, DAEC, EIEC, ETEC-LT e ETEC-ST); Cepa de *E. coli* não diarréogênica (ND); Sf (*Shigella flexneri*); Sd (*Shigella dysenteriae*).

Apêndice II - Análise da concentração de beads magnéticas detectáveis em citometria

A concentração mínima de nanopartículas magnéticas foi determinada por citometria de fluxo, utilizando o FACS CANTO II (Flow Jow versão 2.0) da Plataforma de Citometria do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD-FIOCRUZ AMAZONIA). Um estoque inicial de *beads* magnéticas a 20 mg/mL foi diluído em série a 1/10 (A), 1/100 (B), 1/1000 (C) e 1/10.000 (D) (figura anexo 2), sendo esta última considerada uma diluição satisfatória para iniciar os acoplamentos de anticorpos por apresentar menor quantidade de material ainda detectável.

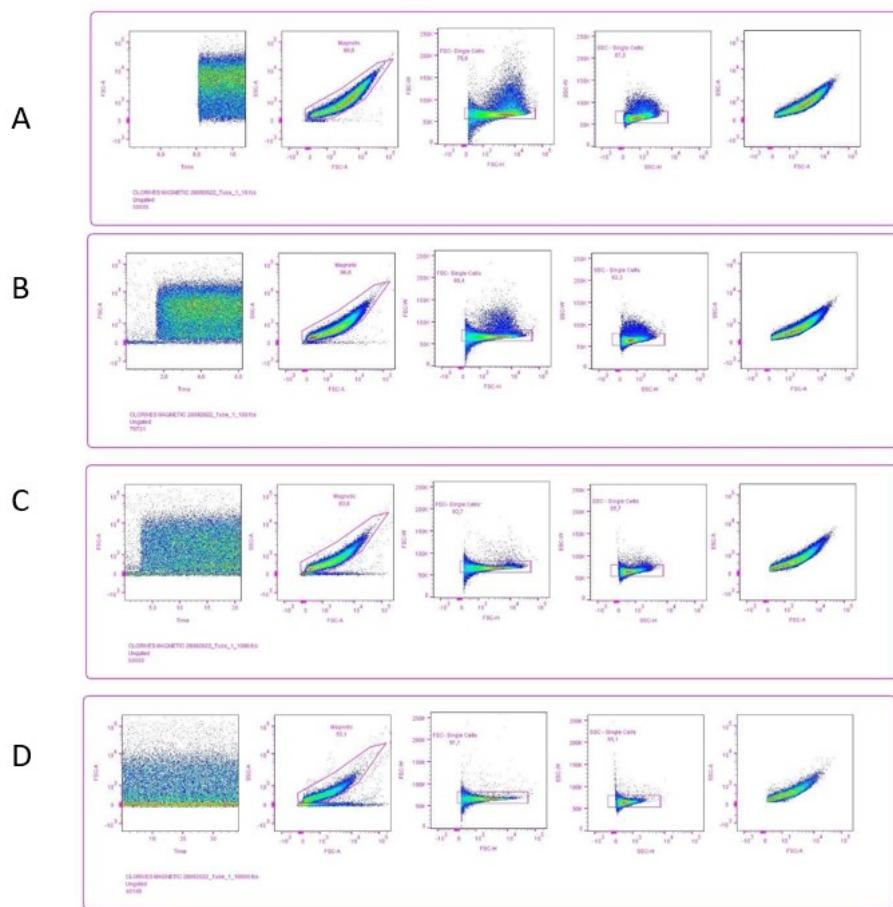


Figura Anexo II - avaliação da menor concentração de beads detectáveis em citômetro de fluxo. Perfis de detecção em diluição seriada: 1/10 (A), 1/100 (B), 1/1000 (C) e 1/10.000 (D).

ANEXOS

Anexo I – Certificado de aprovação no Conselho de Ética Animal (CEUA)



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAL PARA DETECCAO DE BACTERIAS DIARREIOGENICAS UTILIZANDO QUANTUM DOT"**, sob a responsabilidade da pesquisadora Jeniffer Clorives Lopes Batista – pós-graduanda do PPGBIOTEC/UFAM, sob a orientação do pesquisador Dr. André Mariltha – que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceção humanos), para fins de pesquisa científica – e por encontrar-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), após análise pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS, foi aprovada sob o N. 026/2020.

Finalidade	<input checked="" type="checkbox"/> Ensino / <input type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	De Fevereiro/2020 a Dezembro/2023
Espécie/Imagem/raça	<i>Gallus gallus</i> / Dekalb White
N. de animais	06
Peso/Ideia	1725 g / 71 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Ezscience Biotecnologia LTDA.

Manaus, 09 de novembro de 2020.

Profa. Dra. Crithya Jamile Frithz Brandão de Oliveira
Coordenadora da CEUA-UFAM

Anexo II - Produção científica realizada durante o doutorado

Artigo publicado: Corrêa Glória, J., Oliveira Chaves, Y., Marques de Figueiredo, A., Coutinho de Souza, C., Duarte da Silva, E. R., **Lopes Batista, J. C.**, Nogueira, P. A., Morais Mariúba, L. A. Standardization of a Cytometric Bead Assay Based on Egg-Yolk Antibodies. *J. Vis. Exp.* (195), e65123, doi:10.3791/65123 (2023).

Vídeo: <https://app.jove.com/t/65123/standardization-of-a-cytometric-bead-assay-based-on-egg-yolk-antibodies>



Standardization of a Cytometric Bead Assay Based on Egg-Yolk Antibodies

Juliane Corrêa Glória^{1,2,3}, Yury Oliveira Chaves^{2,3,4}, Adélia Marques de Figueiredo¹, Caio Coutinho de Souza², Eliza Raquel Duarte da Silva², Jeniffer Clorives Lopes Batista^{2,5}, Paulo Afonso Nogueira^{2,3,5}, Luis André Morais Mariúba^{1,2,3,5}

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - UFAM ² Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) ³ Programa de Pós-Graduação em Biologia da Intereração Patógeno-Hospedeiro do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) ⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Hematologia – Universidade Estadual do Amazonas/ Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas ⁵ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Corresponding Author

Luis André Morais Mariúba
andre.mariuba@fiocruz.br

Citation

Corrêa Glória, J., Oliveira Chaves, Y., Marques de Figueiredo, A., Coutinho de Souza, C., Duarte da Silva, E.R., Lopes Batista, J.C., Nogueira, P.A., Morais Mariúba, L.A. Standardization of a Cytometric Bead Assay Based on Egg-Yolk Antibodies. *J. Vis. Exp.* (195), e65123, doi:10.3791/65123 (2023).

Date Published

May 19, 2023

DOI

10.3791/65123

URL

jove.com/video/65123

Abstract

Immunoassays are important tests for the detection of numerous molecular targets. Among the methods currently available, the cytometric bead assay has gained prominence in recent decades. Each microsphere that is read by the equipment represents an analysis event of the interaction capacity between the molecules under test. Thousands of these events are read in a single assay, thus ensuring high assay accuracy and reproducibility. This methodology can also be used in the validation of new inputs, such as IgY antibodies, for the diagnosis of diseases. These antibodies are obtained through immunizing chickens with the antigen of interest and then extracting the immunoglobulin from the yolk of the animals' eggs; therefore, this is a painless and highly productive method for obtaining the antibodies. In addition to a methodology for the high-precision validation of the antibody recognition capacity of this assay, this paper also presents a method for extracting these antibodies, determining the best coupling conditions for the antibodies and latex beads, and determining the sensitivity of the test.

Introduction

Among the immunoassay techniques aimed at diagnosing diseases, the cytometric bead assay has emerged as a highly sensitive and reliable approach, since it allows for the analysis of thousands of particles in a single assay¹. This technique, in addition to having high productivity and allowing the use

of smaller volumes of samples, also presents great flexibility, since it allows for the detection of several molecules, such as cytokines, adhesion molecules, antibody isotypes, and proteins^{2,3}.

Artigo aceito para publicação. Revista: Anais da Academia Brasileira de Ciências, Qualis A2.

Title: Development of an antibody against EtpA from enterotoxigenic *Escherichia coli* and evaluation of its use for bacterial isolation using magnetic beads

Helber Abellini Astolpho^{1,2§} (<https://orcid.org/0000-0003-2250-8000>),
Luis André Moraes Mariúba^{1,3,4,5*} (<https://orcid.org/0000-0003-4210-6367>),
Yury Oliveira Chaves^{3,4,6} (<https://orcid.org/0000-0002-3940-4227>),
Juliane Corrêa Glória^{3,4} (<https://orcid.org/0000-0002-9122-1145>),
Maria Edilene Martins de Almeida^{3,6} (<https://orcid.org/0000-0002-3348-5409>),
Ricardo Andrez Machado-de-Ávila⁷ (<https://orcid.org/0000-0002-1303-0490>),
Camille Mezzari Generoso⁷ (<https://orcid.org/0009-0007-0206-6619>),
Jeniffer Clorives Lopes Batista^{3,5} (<https://orcid.org/0000-0002-2904-5910>),
Paulo Afonso Nogueira^{3,4,5} (<https://orcid.org/0000-0002-3940-4227>),
Patrícia Puccinelli Orlandi^{3,8} (<https://orcid.org/0000-0003-2104-577X>)

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Av. Rodrigo Otávio, nº 1200, Manaus, Amazonas, Brazil.

² Colégio Militar de Manaus – CMM, Rua José Clemente, nº Manaus 69010-070, Brazil

³ Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rua Teresina, nº 476, 69057-070, Manaus, Amazonas, Brazil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Biologia da Interação Patógeno-Hospedeiro, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rua Teresina, nº 476, 69057-070, Manaus, Amazonas, Brasil.

⁵ Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus 69067-00, Brazil.