Bruna De Lucca Caetano

Estratégias de clonagem de proteínas de alta massa molecular: α-hemolisina e CNF1 produzidas por *Escherichia coli* uropatogênica como modelos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências-Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Doutora em Ciências-Toxinologia.

São Paulo
2021

Bruna De Lucca Caetano

Estratégias de clonagem de proteínas de alta massa molecular: α-hemolisina e CNF1 produzidas por *Escherichia coli* uropatogênica como modelos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências-Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Doutora em Ciências-Toxinologia.

Orientador: Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Caetano , Bruna De Lucca

Estratégias de clonagem de proteínas de alta massa molecular: α-hemolisina e CNF1 produzidas por Escherichia coli uropatogênica como modelos / Bruna De Lucca Caetano; Orientador Roxane Maria Fontes Piazza . - - São Paulo, 2021.

Tese (Doutorado) – Instituto Butantan. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Toxinologia. Linha de Pesquisa: Toxinas e sistemas biológicos.

Título em inglês: High molecular weight protein cloning strategies: α-hemolysin and CNF1 produced by uropathogenic *Escherichia coli* as models

1. Toxinas bacterianas. 2. Escherichia coli Uropatogênica 3. Alfa-hemolisina. 4. Fator necrosante citotóxico. 5. Proteína de alta massa molecular. I. Orientador: Piazza, Roxane Maria Fontes. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências-Toxinologia. Instituto Butantan. III.Título.

CDD 615.9

Elaborada com instruções fornecidas pela Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Bruna De Lucca Caetano, aluna de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências-Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha tese por mídia impressa eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta tese após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da dissertação/tese após a data da defesa:

(X) Imediato

( ) 06 meses

( ) 12 meses

( ) Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 08 de abril de 2021.

....
Aluna

De acordo:..
Orientadora:

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA
INSTITUTO BUTANTAN

RESULTADO DA DEFESA DE TESE

DOUTORADO

NOME DA ALUNA: BRUNA DE LUCCA CAETANO

DATA DO EXAME: 21/05/2021

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Roxane Maria Fontes Piazza (Presidente)		(X)	( )
Fernanda Faria		(X)	( )
Milene Cristina Menezes dos Santos		(X)	( )
Vanessa Bueris		(X)	( )
Geraldo Santana Magalhães		(X)	( )

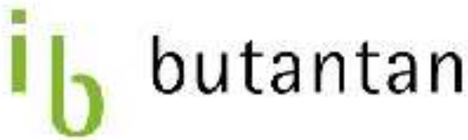
Av. Vital Brasil, 1500
São Paulo,05503-900
Tel/Fax: (11) 2627-9767
cpgibu@butantan.gov.br
http://posgraduacao.butantan.gov.br

DECISÃO FINAL: APROVADA (X) REPROVADA ( )

Comentários da Banca (opcional):

A candidata apresentou sua tese de doutorado de forma muito clara, e foi elogiada por toda a comissão julgadora, bem como durante arguição respondeu a todos os questionamentos levantados. No entanto, a banca avaliadora sugere uma revisão geral do documento escrito (Tese), principalmente no resumo, legendas das figuras e conclusão, além de uma extensa revisão na ortografia do documento.

Av. Vital Brasil, 1500
São Paulo,05503-900
Tel/Fax: (11) 2627-9767
cpgibu@butantan.gov.br
http://posgraduacao.butantan.gov.br



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 21 de agosto de 2019
CEUAx N 8266060318

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Roxane Maria Fontes Piazza
Área: Bacteriologia
Roxane Maria Fontes Piazza (orientador)

Título do projeto: "Anticorpos recombinantes contra as toxinas alfa-hemolisina e CNF1 para o diagnóstico e terapia de Escherichia coli uropatogênica ".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, na reunião de 21/03/2018, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

À minha mãe, Regina, pelo amor, paciência, apoio e incentivo que me permitiram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Roxane Maria Fontes Piazza pela orientação, compreensão e confiança ao longo desses anos.

Aos professores da Universidade de Toronto, Prof. Dr. Sachdev Sidhu por permitir minha estadia em seu laboratório e Dr. Shane Miersch pela colaboração.

À Dra. Marta Domingos pela colaboração com os isolados bacterianos.

À minha esposa, Lhiri Hanna, por ser a melhor pessoa do mundo e me amar incondicionalmente.

Aos amigos de bancada Miriam, Juliana, Bruna, Jessika, Thaís, Camila, Danielle, Daniela e Shiga.

A todos os amigos da Bacteriologia, alunos e funcionários, pelo companheirismo, apoio e colaboração.

À minha família pelo incentivo e amor. Especialmente à minha mãe Regina, a minha madrinha Helena e a Teca por estarem todos os dias ao meu lado e me ouvirem com tanto carinho.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

E ao apoio financeiro da FAPESP e CAPES.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil, com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP 2017/25406-0; 2018/13895-0 e Bolsa de Doutorado FAPESP 2016/16188-7 e BEPE/FAPESP 2019/23686-1 para Universidade de Toronto.

E auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Processo Número: 1647559, concedida através da pós-graduação em Ciências-Toxinologia do Instituto Butantan no período de 01/09/2016 a 01/02/2018. Código de financiamento 001.

RESUMO

Caetano, Bruna De Lucca. Estratégias de clonagem de proteínas de alta massa molecular: α-hemolisina e CNF1 produzidas por Escherichia coli uropatogênica como modelos. 2021. 145 f. Tese (Ciências-Toxinologia). Instituto Butantan, São Paulo, 2021.

Escherichia coli uropatogênica (UPEC) é a principal causa de infecção do trato urinário (ITU). Entre os fatores de virulência produzidos pela UPEC, destacam-se a alfa hemolisina (HlyA) e o fator necrosante citotóxico 1 (CNF1). Tendo em vista que até 60% das cepas de UPEC produzem HlyA e cerca de 40% expressam CNF1, estas toxinas se tornam bons alvos para o diagnóstico e intervenções terapêuticas. A importância das toxinas HlyA e CNF1 nos casos de ITU causados por UPEC e os enormes desafios na produção de proteínas recombinantes, levou a este trabalho que se propôs a obter diferentes formas estruturais destas toxinas pela metodologia de clonagem e expressão heteróloga. Diferentes formas estruturais destas toxinas de alta massa molecular foram propostas, deste a produção integra a proteínas de baixo peso molecular. As toxinas recombinantes foram analisadas *in silico*, expressas e purificadas. Dentre as abordagens de clonagem e expressão destacamos para HlyA a estratégia de obtenção do imunógeno intermediário dessa toxina. Já para CNF1, tanto a construção da proteína integra quanto a proteína recombinante utilizando apenas sua porção catalítica. Além disso, analisou-se uma coleção bacteriana de UPEC para definir dados epidemiológicos locais da prevalência dos genes das toxinas e capacidade de causar hemólise e multinucleação. A genes *hlyA* e *cnf1* estavam presentes nos isolados em 36% e 23%, respectivamente e o fenótipo de hemólise ocorreu em 33% e a multinucleação em 23% dos isolados bacterianos.

Palavras-chave: Toxinas bacterianas, *Escherichia coli* uropatogênica, alfa-hemolisina, fator necrosante citotóxico, proteína de alta massa molecular.

ABSTRACT

Caetano, Bruna De Lucca. High molecular weight protein cloning strategies: α-hemolysin and CNF1 produced by uropathogenic *Escherichia coli* as models. 2021. 145 p. Doctoral thesis (Science-Toxinology). Butantan Institute, São Paulo, 2021.

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the main cause of urinary tract infection (UTI). Among the virulence factors produced by UPEC, alpha hemolysin (HlyA) and cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) stand out. Keeping in mind that up to 60% of UPEC strains produce HlyA and about 40% express CNF1, these toxins become good targets for diagnosis and therapeutic interventions. The importance of HlyA and CNF1 toxins in the cases of UTI caused by UPEC and the enormous challenges in the production of recombinant proteins, led to this work proposal to obtain different structural forms of these toxins through the methodology of cloning and heterologous expression, of integral toxins, low molecular mass and intermediate immunogenic toxins. Different structural forms of these high molecular weight toxins have been proposed, from which the production integrates to low molecular weight proteins. Recombinant toxins were analyzed *in silico*, expressed and purified. Among the cloning and expression approaches, we highlight for HlyA the strategy to obtain the intermediate immunogen of this toxin. For CNF1, both the construction of the full protein and the recombinant protein using only its catalytic portion. In addition, a bacterial collection of UPEC was analyzed to define local epidemiological data on the prevalence of toxin genes and the ability to cause hemolysis and multinucleation. The *hlyA* and *cnf1* genes were present in the isolates in 36% and 23%, respectively, and the hemolysis phenotype occurred in 33% and the multinucleation in 23% of the bacterial isolates.

Keywords: Bacterial toxins, uropathogenic *Escherichia coli*, alpha-hemolysin, cytotoxic necrotizing factor, high molecular weight protein.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCA	Ácido bicinconínico
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
BSA	*Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)
CNF1	fator necrosante citotóxico
DAB	Diaminobenzina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle's medium* (*Meio* Eagle modificado por Dulbecco)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Dicloro-difenil-tricloroetano
E. coli	*Escherichia coli*
EAEC	*E. coli* enteroagregativa
EHEC	*E. coli* enterohemorrágica
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima)*
EPEC	*E. coli* enteropatogênica
EspB	*E. coli secreted protein* B
ETEC	*E. coli* enterotoxigênica
GST	Proteína glutationa S-transferase
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanossufônico
Hly	Hemolisina
HlyA	Alfa-hemolisina
IPTG	isopropil-b-D-galactosídeo
ITU	Infecções do trato urinário
LB	Luria Bertani
LT	Toxina termolábil
nm	Nanômetro
PAI-II	Ilha de patogenicidade II
PBS	*Phosphate-buffered saline* (Tampão fosfato salino)
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PEG	polietilenoglicol
Pet	Toxina codificada por plasmídeo
pH	Potencial hidrogeniônico
Pic	Proteína envolvida na colonização
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfato

PNK	Polinucleotídeo cinase
RALT	Teste rápido de aglutinação em látex
RPM	Rotações por minuto
RTX	*Repeat in toxin*
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
SST1	Sistema de secreção do tipo I
SST3	Sistema de secreção tipo III
ST	Toxina termoestável
STEC	*E. coli* produtora da toxina de Shiga
Stx	Toxina de Shiga
TEV	Protease do Tobacco Etch Virus
UPEC	*E. coli* uropatogênica
UV	Ultravioleta

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura da toxina HlyA. 20
Figura 2. Estrutura do domínio catalítico da toxina CNF1 21
Figura 3. Porção enzimática da toxina CNF1. 38
Figura 4. Temperaturas de anelamento para amplificação de hlyA de UPEC J96. 49
Figura 5. Membrana de nitrocelulose contendo extratos proteicos da toxina CNF1 pré e pós induzidos por IPTG analisada por *immunoblotting*. 51
Figura 6. Induções analisadas por SDS-PAGE a 16% contento tricina corado com Coomassie blue. (A) Proteína HlyA; (B) Proteína CNF1 A; (C) Proteína CNF1 B; (PM) Padrão de Massa Molecular Cyvita Rainbow Low-Range (Thermo Fisher Scientific); (1) Sedimento de cultivo pré-indução com IPTG; (2) Sedimento de cultivo pós-indução com IPTG; (3) Fração solúvel após lise por sonicação; (4) Fração insolúvel após lise por sonicação. No destaque em vermelhobse encontra a expressão da proteína com mobilidade relativa a 3,5 kDa utilizadas para análise por espectrometria de massas.. 52
Figura 7. Ensaio de biotinilação da porção catalítica da toxina CNF1. 53
Figura 8. Ensaio ELISA de estreptavidina. 54
Figura 9. Predição de epitopos pelo programa BepiPred. 56
Figura 10. Predição da estrutura quaternária das regiões imunogênicas das toxinas HlyA e CNF1 57
Figura 11. SDS-PAGE e *immunoblotting* das proteínas HlyA e CNF1. 58
Figura 12. Figura representativa do ensaio hemolítico realizados em ágar sangue de carneiro 60
Figura 13. Figura representativa do ensaio de multinucleação realizado em células HEp-2. 61

Tabela 1. Resumo das estratégias de clonagem e expressão realizadas. 27
Tabela 2. Sequencias dos iniciadores para sequenciamento completo dos genes *hlyA* e *cnf1* 30
Tabela 3. Sequência dos aminoácidos das proteínas formadas por regiões hidrofílicas. 33
Tabela 4. Resumo das estratégias de clonagem realizadas e das toxinas obtidas. 59

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 18
2. **OBJETIVOS** 26
3. **MATERIAL E MÉTODOS** 26

3.1. Estratégia 1 – Desenvolvimento das proteínas integras 28
3.1.1. Clonagem das proteínas integras 28
3.1.2. Construção dos plasmídeos da série pET20b e pQE30 para proteínas integras 28
3.1.3. Indução de quimiocompetência das bactérias E. coli DH5α, XL1-Blue e BL21(DE3) 29
3.1.4. Transformação das bactérias *E. coli* quimiocompetentes 30
3.1.5. Extração e análise dos plasmídeos 30
3.1.6. Produção das proteínas integras de HlyA e CNF1 31
3.2. Estratégia 2 – Racional dos fragmentos de baixa massa molecular das toxinas 32
3.2.1. Obtenção de genes sintéticos 32
3.2.2. Expressão das porções proteicas de baixa massa molecular de HlyA e CNF1 33
3.2.3. Purificação das proteínas de baixa massa molecular de HlyA e CNF1 34
3.2.4. Análise por espectrometria de massas 35
3.3. Estratégia 3 – Produção das porções intermediárias imunógenas HlyA e CNF1 37
3.3.1. Desenho estrutural da porção catalítica da toxina CNF1 37
3.3.1.1. Expressão da porção catalítica da toxina CNF1 38
3.3.1.2. Estreptavidina SDS-PAGE 39
3.3.1.3. Estreptavidina ELISA 39
3.3.1.4. Remoção da proteína GST 40
3.3.1.4.1. Enzimas de restrição 40
3.3.1.4.2. Iniciadores e PCR 40
3.3.1.4.3. Alteração da estrutura vetorial 41
3.3.2. Modelagem *in silico* das toxinas de peso molecular intermediário 43
3.3.2.1. Obtenção das toxinas intermediárias imunógenas 43
3.4. Coleção de isolados bacterianos de UPEC 45
3.4.1. Extração de DNA genômico 45
3.4.2. Avaliação do genótipo 46
3.4.3. Ágar sangue 46
3.4.4. Ensaio de hemólise em placa 47
3.4.5. Multinucleação em HEp-2 com proteínas totais de UPEC 47

4. **RESULTADOS** 48

4.1. Estratégia 1 – As toxinas HlyA e CNF1 integras 48
4.1.1. Obtenção de HlyA integra 48
4.1.2. Obtenção de CNF1 integra 49
4.2. Estratégia 2 – As toxinas HlyA e CNF1 de baixo peso molecular 51
4.3. Estratégia 3 – As toxinas HlyA e CNF1 intermediárias imunógenas 53

4.3.1. Biotinilação da porção catalítica da toxina CNF1 53
4.3.2. Expressão das proteínas HlyA e CNF1 imunogênicas de peso molecular intermediário 55
4.4. Análise genotípica e fenotípica das toxinas HlyA e CNF1 nos isolados de UPEC 59
4.4.1. Genótipo *hlyA* e *cnf1* nos isolados de UPEC 59
4.4.2. Hemólise com sobrenadante de isolados de UPEC 59
4.4.3. Multinucleação em HEp-2 com proteínas totais de UPEC 60
5. DISCUSSÃO 62
6. CONCLUSÃO 73
REFERÊNCIAS 74
ANEXO A 81
ANEXO B 94
ANEXO C 103
ANEXO D 117
ANEXO E 121
ANEXO F 131

1. INTRODUÇÃO

As toxinas são definidas como qualquer substância capaz de causar danos a organismos, e constituem uma importante parte dos fatores de virulência que medeiam os efeitos nocivos gerados por bactérias patogênicas (IVARSSON; LEROUX; CASTAGNER, 2012; TRABULSI; SAMPAIO, 2008). A primeira toxina proteica bacteriana descoberta foi a toxina diftérica em 1888 e desde então mais de 300 outras foram identificadas e creditadas como a causa de diversas doenças (ALOUF; LADANT; POPOFF, 2015).

Existem quatro classes de toxinas bacterianas, (1) toxinas capazes de se ligar a receptores de superfície de membrana das células hospedeiras e modificar a fisiologia da célula por meio da ativação de sinais intracelulares; (2) toxinas que se ligam a membrana plasmática e perturbam a bicamada lipídica pela formação de poros ou atividade fosfolipídica; (3) toxinas do tipo AB, onde o domínio A apresenta atividade enzimática e o domínio B se liga e entra na célula hospedeira; e (4) toxinas com atividade enzimática que são translocadas para a célula hospedeira, incluindo aqui toxinas secretadas pelo sistema de secreção do tipo III (SST3) (LEMICHEZ; FLATAU; BRUZZONE; BOQUET *et al.*, 1997).

A mesma bactéria pode apresentar diferentes classes de toxinas, a exemplo, as cepas de *Escherichia coli* patogênicas possuem diversas toxinas entre seus patotipos. *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC) produzem toxinas de mesmo nome (Stx) do tipo AB_5; *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e enterohemorrágica (EHEC) apresentam a toxina EspB, responsável pela formação de poros na membrana ao ser translocada pelo SST3; *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) com as toxinas termolábil (LT), do tipo AB_5, e a termoestável (ST) capaz de ativar guanilato ciclase; *E. coli* enteroagregativa (EAEC) que produz enterotoxinas e citotoxinas principalmente proteínas autotransportadoras, como Pet (toxina codificada por plasmídeo) e Pic (proteína envolvida na colonização) (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011); e *E. coli* uropatogênica (UPEC) apresenta a hemolisina (Hly) capaz de formar poros na membrana hospedeira, e o fator necrosante citotóxico (CNF), uma toxina capaz de ativar GTPases e que altera a estrutura do citoesqueleto (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; LEMICHEZ; FLATAU; BRUZZONE; BOQUET *et al.*, 1997; RUIZ-

PEREZ; NATARO, 2014). Todos os patotipos de *E. coli* são responsáveis por patologias distintas e com impacto econômico e social, sendo a UPEC e suas toxinas destacadas no presente trabalho.

Mais detalhadamente, a hemolisina é codificada pelo *operon hlyCABD* e compreende o protótipo das toxinas RTX (*repeat in toxin*), pois apresenta repetições de glicina e aspartato na região C-terminal, facilitando sua secreção por um sistema do tipo I (SST1) (BAKAS; MATE; VAZQUEZ; HERLAX, 2013). Essa toxina é um importante modelo para acilação de fatores de virulência no citoplasma bacteriano, a protoxina α-hemolisina (HlyA) é modificada pela aciltransferase HlyC em um passo que confere atividade citotóxica, e a exportação para o meio extracelular ocorre com o auxílio dos componentes HlyB e HlyD (JUSTICE; HUNSTAD, 2012). A toxina HlyA, codificada pelo gene estrutural *hlyA*, apresenta cerca de 107 kDa e seu mecanismo de ação se baseia na manipulação das vias de sobrevivência e inflamação dependentes da ativação de cascatas proteolíticas. Quando em altas doses, é responsável pela lise celular de eritrócitos e leucócitos a partir da formação de poros multiméricos na membrana eucariótica; e quando em baixas doses, leva a morte por apoptose ao interferir com as vias de sinalização celular (DHAKAL; MULVEY, 2012; GARCIA; VENTURA; SMITH; MERRELL *et al.*, 2013; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A HlyA provoca a inserção de poros na membrana por meio da degradação de paxilina, uma proteína do citoesqueleto, e de outras proteínas da célula hospedeira importantes para as interações célula-célula e célula-matriz (DHAKAL; MULVEY, 2012) (**Figura 1**). E a morte celular ocorre pela ativação do inflamassoma Caspase-1, sendo esta uma via de morte celular programada que poder ser ativada por uma variedade de infecções microbianas (NAGAMATSU; HANNAN; GUEST; KOSTAKIOTI et al., 2015).

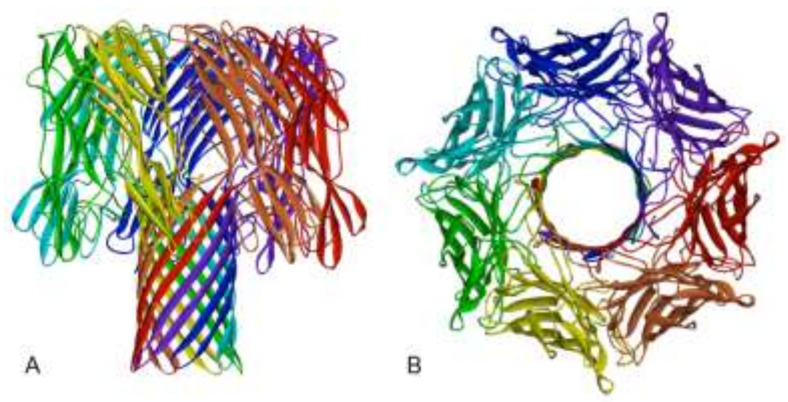


Figura 1. Estrutura da toxina HlyA.

A: Vista perpendicular do heptâmero apresentando formato do complexo em cogumelo. B: Vista superior da estrutura, os monômeros se ligam em sentido anti-horário.

Fonte: (Song *et al.*, 1996).

Quanto à família das proteínas CNF, estão presentes em *E. coli* patogênicas a CNF1, CNF2 e CNF3, e constituem-se em toxinas de 110 a 115 kDa, que apresentam um domínio catalítico conservado composto de uma tríade de histidina, cisteína e valina (SMITH *et al.*, 2015). CNF é responsável, de modo geral, por causar uma reação necrótica, alteração do citoesqueleto em diversos tipos celulares e também um dano sistêmico com hemorragia generalizada. Mais internamente, é capaz de promover a ruptura das junções epiteliais, a migração de células, induzir a internalização da bactéria por células epiteliais, a reorganização de actina no citoesqueleto, essas toxinas ativam o estresse oxidativo e diminuem a fagocitose (CAPRIOLI; FALBO; RODA; RUGGERI *et al.*, 1983; DIABATE; MUNRO; GARCIA; JACQUEL *et al.*, 2015; FABBRI; TRAVAGLIONE; BALLAN; LOIZZO *et al.*, 2013; HOFMAN; LE NEGRATE; MOGRABI; HOFMAN *et al.*, 2000; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; LEMONNIER; LANDRAUD; LEMICHEZ, 2007; RIPPERE-LAMPE; O'BRIEN; CONRAN; LOCKMAN, 2001). O mecanismo de ação se dá pela ativação de pequenas GTPases da família Rho, sendo elas RhoA, Rac1 e Cdc42 (HALL, 1990). Estas GTPases atuam como interruptores moleculares nas vias de transdução que englobam componentes do citoesqueleto como actina, miosina e microtúbulos, assim, atuam sobre a forma celular, motilidade, adesão, endocitose, divisão celular, trafego de vesículas e apoptose (FABBRI; TRAVAGLIONE; BALLAN; LOIZZO *et al.*, 2013; HOPKINS; WALSH; VERKADE; BOQUET *et al.*, 2003; SCHMIDT; SEHR; WILM; SELZER *et al.*, 1997). A ativação de Rho ocorre por meio da desaminação de um

resíduo de glutamina, em RhoA na posição 63 e em Rac1 e Cdc42 na posição 61 (KNUST; SCHMIDT, 2010).

Figura 2. Estrutura do domínio catalítico da toxina CNF1.

O domínio catalítico representado em fita, com os resíduos de cisteína (vermelho) e histidina (verde) no interior da toxina circundados por alças que podem estar relacionados com a ligação à Rho.
Fonte: (Knust e Schmidt, 2010).

Dentre as variantes, a expressão de CNF1 em casos de infecção do trato urinário (ITU) é mais frequente que as demais (FOXMAN, 2014; GARCIA; VENTURA; SMITH; MERRELL *et al.*, 2013; SCHMIDT; SEHR; WILM; SELZER *et al.*, 1997) (CHANG; KRISHNAN; PRASADARAO, 2016; CUNHA; ASSUNÇÃO; MEDEIROS; FREITAS, 2016; SHETTY; KUMAR; SHEKAR; SHETTY *et al.*, 2014) e por isso foi escolhida como um dos alvos de trabalho. A CNF1 é uma proteína de 114 kDa codificada pelo gene cromossômico *cnf1* na ilha de patogenicidade II (PAI-II) à jusante do *operon hlyCABD* (LEMONNIER; LANDRAUD; LEMICHEZ, 2007). Apresenta múltiplos domínios, sendo a porção N-terminal responsável pela ligação com a célula hospedeira; a porção C-terminal com atividade enzimática; e uma porção central envolvida na translocação da toxina para o citoplasma (**Figura 2**) (FABBRI; GAUTHIER; BOQUET, 1999; FALBO; PACE; PICCI; PIZZI *et al.*, 1993; LEMICHEZ; BARBIERI, 2013; PEI; DOYE; BOQUET, 2001).

Tendo em vista que até 60% das cepas de UPEC produzem HlyA e cerca de 40% expressam CNF1, sendo que dentre as cepas produtoras de CNF1 90% dos isolados apresenta concomitantemente HlyA (MARRS; ZHANG; TALLMAN; MANNING *et al.*, 2002; SHETTY; KUMAR; SHEKAR; SHETTY *et al.*, 2014; SMITH; WEINGARTEN; RUSSO; VENTURA *et al.*, 2015), ambas as toxinas demonstram ter funções substanciais e especificas na patogênese de UPEC e são capazes de iniciar

fortes respostas pró-inflamatórias (GARCIA; VENTURA; SMITH; MERRELL *et al.*, 2013).

A UPEC causa principalmente ITU ao colonizar regiões outrora estéreis no canal da uretra (uretrite), bexiga (cistite), ureteres (ureterite), rins (pielonefrite), e se for capaz de alcançar a corrente sanguínea resulta em bacteremia e urosepse (BARBER; NORTON; WILES; MULVEY, 2016). Os sintomas comumente associados a ITU são aumento da frequência e urgência de urinar, dor ao urinar, urina turva ou com sangue, urina com odor forte ou fétido, dor na região pélvica e costas, náuseas e vomito, e febre. Em casos de pielonefrite pode haver diminuição da função e cicatrização renal, especialmente em crianças (SHAIKH; CRAIG; ROVERS; DA DALT *et al.*, 2014).

Excedida apenas por infecções respiratórias e gastrointestinais, as ITU afetam aproximadamente 150 milhões de pessoas por ano no mundo todo, sendo uma das infecções bacterianas mais comuns (CARDWELL; CRANDON; NICOLAU; MCCLURE *et al.*, 2016; CUNHA; ASSUNÇÃO; MEDEIROS; FREITAS, 2016; HOOTON, 2012; MORALES-ESPINOSA; HERNANDEZ-CASTRO; DELGADO; MENDEZ *et al.*, 2016). Notadamente, cerca de 60% a 85% dos casos de ITU são causados por UPEC (CONOVER; HADJIFRANGISKOU; PALERMO; HIBBING *et al.*, 2016; CUNHA; ASSUNÇÃO; MEDEIROS; FREITAS, 2016; FOXMAN, 2010; FOXMAN, 2014; MOUANGA NDZIME; ONANGA; KASSA KASSA; BIGNOUMBA *et al.*, 2021). A despeito de afetar ambos os sexos, são responsáveis por uma substancial morbidade em mulheres anteriormente saudáveis (BARBER; NORTON; WILES; MULVEY, 2016). Mulheres são mais susceptíveis a desenvolver ITU devido a menor distância entre a abertura da uretra e a bexiga, além da proximidade da uretra com a vagina e ânus, locais onde há presença de potenciais uropatógenos (FOXMAN, 2014).

Aproximadamente um terço das mulheres terá uma ITU sintomática até os 24 anos de vida e metade delas terão ITU pelo menos uma vez no curso da vida (CONOVER; HADJIFRANGISKOU; PALERMO; HIBBING *et al.*, 2016; DIELUBANZA; SCHAEFFER, 2011). O período de convalescença dura em média quatro dias, sendo que por três deles há restrição das atividades normais. Um estudo nos Estados Unidos estimou o impacto econômico direto e indireto com ITU em 2010 no valor de $2,3 bilhões de dólares (FOXMAN, 2014). No Brasil, as infecções renais e ITU estão entre os maiores índices de internações por condições sensíveis à atenção primária,

compreendendo 42% dos casos, e as mortes por doenças infecciosas e parasitárias são um problema de saúde pública com forte impacto social e econômico (CAVALCANTE; OLIVEIRA; REHEM, 2016).

O diagnóstico de ITU se baseia nos sinais clínicos que os pacientes apresentam. Já a identificação de UPEC como agente causador é baseada no cultivo de amostras em meios de cultura, e também por métodos moleculares, mas estes apesar de apresentarem alta precisão são metodologias de elevado custo e que necessitam de pessoal treinado para sua realização (ENDERLE; MILLER; PYLES, 2014; PAVLOVIC; HUBER; SKALA; KONRAD et al., 2010; SALMANI; AZARNEZHAD; FAYAZI; HOSSEINI, 2016). Assim, há a necessidade de um método de diagnóstico rápido e sensível, possivelmente baseado na detecção dos fatores de virulência de UPEC para seu eficaz diagnóstico e tratamento, sendo HlyA e CNF1 excelentes candidatos.

Para as intervenções terapêuticas, o tratamento preferencial é a administração de antibióticos, no entanto, a aquisição de resistência a essas substâncias se apresenta como um desafio na rotina clínica. Diversos trabalhos mostram o aparecimento de bactérias UPEC resistentes aos antibióticos de variadas classes, de β-lactâmicos como a ampicilina, até fluorquinolonas (DIELUBANZA; SCHAEFFER, 2011; HSUEH; HOBAN; CARMELI; CHEN *et al.*, 2011; CARDWELL; CRANDON; NICOLAU; MCCLURE *et al.*, 2016; HARWALKAR; GUPTA; RAO; SRINIVASA, 2014). O mecanismo de ação dos antibióticos tem como alvo as bactérias, contudo os fatores de virulência, como as toxinas, são os reais responsáveis pelos sintomas clássicos e letais das infecções. Assim, terapias que visam à inibição dos fatores de virulência são propostas otimistas e vitais para compensar a rápida depleção do arsenal antibiótico (GORDON; WILLIAMS; CHAN, 2013). Existem vantagens ao utilizar apenas estes fatores para o tratamento das infecções, (1) estes tratamentos aplicam uma pressão evolucionária menor na bactéria e não contribuem para a geração de resistência; (2) toxinas continuam a causar danos mesmo após a erradicação da bactéria do hospedeiro; e (3) tratamentos sem antibióticos evitam a perturbação da microbiota normal do indivíduo tratado (BURNETT; RUTHEL; STEGMANN; PANCHAL et al., 2007; IVARSSON; LEROUX; CASTAGNER, 2012; RASKO; SPERANDIO, 2010).

Em vista dessa problemática anteriormente exposta, a produção das toxinas HlyA e CNF1 de UPEC é uma proposta importante para a produção de ferramentas biotecnológicas que possam nos fornecer mecanismos para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e novas terapias no futuro, contribuindo para a diminuição do impacto social e econômico desta patologia.

Para tanto, a produção de proteína recombinante surge como uma pratica vital, dado que permite a obtenção das toxinas de modo controlado e reprodutível. Fontes naturais de proteína raramente atendem aos requisitos de quantidade e facilidade de isolamento, portanto a tecnologia recombinante é muitas vezes o método mais viável e normalmente empregado (CHRISTENSEN; JOHNSEN; SKALS; HAMILTON *et al.*, 2020; DUMON-SEIGNOVERT; CARIOT; VUILLARD, 2004; GRANDE; MEYSICK; RASMUSSEN; O'BRIEN, 2009; HARTINGER; HEINL; SCHWARTZ; GRABHERR *et al.*, 2010; MEYSICK; MILLS; O'BRIEN, 2001; MIROUX; WALKER, 1996; SMITH; WEINGARTEN; RUSSO; VENTURA *et al.*, 2015; VERMA; KUMAR; GUPTA; YADAV *et al.*, 2020; ZHAO; XU; LI; LI *et al.*, 2021). Esta tecnologia se tornou rotineira em muitos laboratórios, desde as áreas acadêmicas até as industriais. Várias células hospedeiras estão disponíveis para a produção de proteína, dentre elas, *Escherichia coli* tem sido de longe a mais amplamente utilizada. Algumas vantagens dessa hospedeira são o baixo custo, infraestrutura de implementação, fácil manuseio, alto rendimento de produção e um conjunto cada vez maior de ferramentas e informações genéticas úteis para a expressão de alvos desafiadores (CORREA; ORTEGA; OBAL; ALZARI *et al.*, 2014).

Apesar de sua importância e utilidade, as proteínas recombinantes nem sempre são produzidas no estado solúvel e homogêneo. Durante a produção de proteína recombinante, a detecção de agregados de proteína é um resultado comum e é observada em sistemas de expressão eucarióticos e procarióticos. Em bactérias, os agregados, conhecidos como corpos de inclusão, ocorrem normalmente quando o nível de expressão da proteína ultrapassa 2% do total das proteínas celulares (CARRATALÁ; CISNEROS; HELLMAN; VILLAVERDE *et al.*, 2021). Alguns fatores que favorecem a alta taxa de expressão da proteína recombinante e aumentam as chances da proteína expressa ser agregada em corpos de inclusão, tais como: nível elevado de carga metabólica, ambiente redutor no citosol bacteriano, alto número de cópias do gene alvo, sistema de promotor forte, alta concentração de indutor e

sequência de aminoácidos altamente hidrofóbicas (MITRAKI; FANE; HAASE-PETTINGELL; STURTEVANT *et al.*, 1991).

Para essas proteínas de difícil expressão, várias abordagens foram desenvolvidas a fim de superar os problemas associados à insolubilidade. Alguns parâmetros que podem afetar a expressão de proteínas são: temperatura de indução, escolha do promotor, uso de cepas específicas de *E. coli*, co-expressão de chaperonas moleculares e o uso de diferentes auxiliadores de solubilidade ou proteínas de fusão (CARRATALÁ; CISNEROS; HELLMAN; VILLAVERDE *et al.*, 2021; CORREA; OPPEZZO, 2011). Ferramentas bioinformáticas também estão disponíveis para predição da solubilidade de proteínas e peptídeos e para identificar sequência de aminoácidos problemáticas, que podem ser modificadas durante o projeto de genes recombinantes (SINGH; UPADHYAY; UPADHYAY; SINGH *et al.*, 2015).

A importância das toxinas HlyA e CNF1 nos casos de ITU causados por UPEC e os enormes desafios na produção de proteínas recombinantes, levou a este trabalho que se propôs a obter diferentes formas estruturais destas toxinas pela metodologia de clonagem e expressão heteróloga, almejando a construção das proteínas pelo método mais eficaz avaliado.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste em elucidar diferentes estratégias para clonagem de distintas formas estruturais das toxinas de alta massa molecular, usando como modelo as toxinas bacterianas HlyA e CNF1 produzidas por *Escherichia coli* uropatogênica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Diversas estratégias foram empregadas para se alcançar o objetivo do presente trabalho de se obter as toxinas HlyA e CNF1 de UPEC. Os desafios da clonagem e expressão de proteínas recombinantes nos impeliram a buscar alternativas melhores e cada vez mais otimizadas para a produção destas toxinas. Um resumo das metodologias realizadas pode ser encontrado na **Tabela 1** a seguir.

Tabela 1. Resumo das estratégias de clonagem e expressão realizadas.

Estratégia 1 - Proteínas integras

	estratégia de clonagem	aa inicial	aa final	kDa proteína	enzima de restrição	plasmídeo	bactéria	indução (IPTG)	referência
HlyA	amplificação do gene de UPEC J96	1	1024	110	BamHI e NotI	pET20b(+)	BL21 (DE3)	0,1 mM	Meysick, 2001; Grande, 2009; Smith, 2015
					BamHI e KpnI	pQE30	XL1-Blue		
CNF1	gene sintético (GenScript)	1	1014	114	BamHI e NotI	pET20b(+)	BL21 (DE3)		
					BamHI e KpnI	pQE30	XL1-Blue		

Estratégia 2 - Proteínas de baixo peso

	estratégia de clonagem	aa inicial	aa final	kDa proteína	enzima de restrição	plasmídeo	bactéria	indução (IPTG)	referência
HlyA	gene sintético (GenOne)	388	410	2,09	BamHI e HindIII	pET21a(+)	*E. coli* DH5α e BL21 (DE3)	0,1 mM	Calabria *et al.*, 2019
CNF1A		388	410	2,32					
CNF1B		855	872	1,8					

Estratégia 3 - Proteínas intermediárias

	estratégia de clonagem	aa inicial	aa final	kDa proteína	enzima de restrição	plasmídeo	bactéria	indução (IPTG)	referência
CNF1 (UofT)	gene sintético (Twist Bioscience)	720	1014	32,63	SfiI e NotI	pHH0103	*E. coli* BirA	1 mM	Reppin; Cochet; El Nemer; Fritz *et al.*, 2017 Este trabalho
HlyA hibrida	gene sintético (FastBio)	542	723	20,48	NdeI e NotI	pET30a(+)	BL21 (DE3) pLysS		Este trabalho
CNF1 hibrida		381	583	22,43					

3.1. Estratégia 1 – Desenvolvimento das proteínas integras

3.1.1. Clonagem das proteínas integras

O gene *hlyA* foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) da cepa protótipo de UPEC J96 (NCBI:txid1206108; ATCC 700336). Para amplificação do gene de *hlyA* foram utilizados iniciadores externos (Exxtend, Brasil) contendo os sítios de restrição BamHI no iniciador *forward* (5' GGATCCCCACGAGTTAATAACTGA 3') e KpnI ou NotI no iniciador *reverse* (5' CCATGGTGACAAGAATCCATTATG 3') ou (5' CGCCGGCGTAATCAATTTTATGAC 3').

A PCR realizada continha água estéril em volume final de 25 µL, 2,5 µL de tampão 10X High Fidelity PCR, 1 µL 50 mM $MgSO_4$ (2 mM), 0,5 µL de 10 mM dNTP mix (0,2 mM de cada nucleotídeo), 1 µL do iniciador *forward* 20 pmol, 1 µL do iniciador *reverse* 20 pmol, 1 µL de DNA genômico e 0,1 µL da enzima Platinum Taq DNA High Fidelity Polymerase (1 U). O ciclo utilizado foi iniciado em 94 ºC por 30 s; seguido por 35 ciclos de 94 ºC por 30 s, 60 °C por 30 s e 68 ºC por 3 min; com extensão final de 68 ºC por 7 min e mantido a 4 ºC para armazenamento. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose na concentração de 1% com GelRed 10.000x (Biotium, Estados Unidos), visualizado sob luz ultravioleta (UV), purificados com o kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Alemanha) e quantificados por espectrofotometria no NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EUA).

O gene *cnf1* foi obtido por meio do desenho de um gene sintético (GenScript, EUA) baseado no genoma da cepa UPEC UTI89 (GenBank: ABE10324.1), apresentando o sítio de restrição BamHI e a marcação FLAG na porção N-terminal e as enzimas NotI e KpnI na porção C-terminal. O gene sintético estava no vetor de clonagem pUC57 e foi ressuspenso de acordo com as instruções do fabricante, em concentração de 4 µg por 20 µL de água estéril.

3.1.2. Construção dos plasmídeos da série pET20b e pQE30 para proteínas integras

Dois vetores distintos foram selecionados, pET20b(+) (Novagen, EUA) por apresentar peptídeo sinal para expressão de proteínas heterólogas no periplasma,

promotor T7 e cauda de histidina na porção C-terminal; utilizando os sítios das enzimas de restrição BamHI e NotI; gerando as construções pET20-*hlyA*-His e pET20-Flag-*cnf1*-His. E o plasmídeo pQE30 (Qiagen, Alemanha) contendo promotor T5 e histidina na porção N-terminal; utilizado os sítios de BamHI e KpnI; dando origem as construções pQE-His-*hlyA* e pQE-His-Flag-*cnf1*. A inserção dos genes nos plasmídeos foi realizada por meio de uma mistura de ligação de 10 µL de volume final, constituída de 2 µL de água estéril, 5 µL do gene de interesse (500 ng), 1 µL do vetor (100 ng) previamente linearizado com respectivas enzimas, 1 µL da T4 DNA Ligase (3 UI) e 2 µL do tampão T4 DNA Ligase (2X) (Promega Corporation, EUA), incubada a 24 ^{0}C por 1 h, seguida de 4 ^{0}C por 18 h.

3.1.3. Indução de quimiocompetência das bactérias E. coli DH5α, XL1-Blue e BL21(DE3)

Os organismos utilizados para modificação genética foram quimiotransformados. Para tanto as bactérias *E. coli* DH5α (F^{-}80*lac* ZΔM15 Δ(*lac* ZYA-*arg*F) U169 *rec* A1 *end* A1 *hsd* R17 (rk^{-}, mk^{+}) *pho* A *sup* E44 *thi* -1 *gyr* A96 *rel* A1 λ^{-}); *E. coli* XL1-Blue (*rec* A1 *end* A1 *gyr* A96 *thi* -1 *hsd* R17 *sup* E44 *rel* A1 *lac* [F´ *proAB lacIq ZΔM15* Tn*10* (Tet^{r})]); e *E. coli* BL21(DE3) (*fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHIo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5*) quimiocompetentes foram produzidas com modificações do protocolo de Chung e Miller (1988).

E. coli DH5α e *E. coli* BL21(DE3) foram cultivadas em placas de LB ágar, e uma colônia transferida para 250 mL de meio LB caldo até a densidade ótica (DO) a 600 nm com valores entre 0,3 e 0,6, e centrifugadas a 4 ^{0}C, por 5 min a 3.000 x g. O sedimento foi ressuspendido em 12,5 mL de tampão TSB (LB caldo, pH 6,1, contendo 10% de PEG 8.000, $MgSO_4$ 10 mM, $MgCl_2$ 10 mM e 5% de DMSO) e incubado no gelo por 10 min. Por último, foi adicionado glicerol em concentração final de 10% e armazenadas a -80 ^{0}C até o momento da utilização. O procedimento para *E. coli* XL1-Blue foi o mesmo, mas com a adição de tetraciclina 12 µg/mL no meio LB utilizado.

3.1.4. Transformação das bactérias *E. coli* quimiocompetentes

Para transformação das construções pQE-His-*hlyA* e pQE-His-Flag-*cnf1* foram utilizadas *E. coli* DH5α e XL1-Blue. Já para as construções pET20-*hlyA*-His, pET20-Flag-*cnf1*-His, pET21-*hlyA*-His, pET21-*cnf1*a-His e pET21-*cnf1*b-His foram utilizadas *E. coli* DH5α e BL21(DE3). Assim, 1 μL do plasmídeo (500 ng) foi incubado com 2 μL de tampão KCM 5X (KCl 0,5 M, $CaCl_2$ 0,15 M e $MgCl_2$ 0,25 M) e 7 μL de água estéril no gelo por 5 min, seguido da adição de 10 μL de células quimiocompetentes, após 20 min a solução foi transferida para 24 ºC por 10 min. Na sequência, 200 μL de meio de cultivo LB foram adicionados e mantidos a 37 ºC por 1 h antes de serem distribuídos em placas contendo LB ágar com ampicilina 100 μg/mL para *E. coli* DH5α e BL21(DE3) e LB ágar com ampicilina 100 μg/mL e tetraciclina 12 μg/mL para *E. coli* XL1-Blue, sendo armazenadas a 37 ºC por 18 h.

3.1.5. Extração e análise dos plasmídeos

Uma colônia transformada foi cultivada em meio LB por 18 h contendo os devidos antibióticos, o cultivo foi submetido a extração plasmidial por meio do kit de extração QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Alemanha). A análise de restrição constituída de água estéril para 10 μL de volume final, 2 μL de DNA plasmidial (200 ng), 1 μL da enzima de restrição BamHI (10 UI), 1 μL do tampão da BamHI (10X), 2 μL da HindIII ou KpnI (20 UI) (Thermo Fischer Scientific, EUA) foi incubada a 37 ºC por 3 h. O perfil dos plasmídeos foi analisado por meio de um gel de agarose de 1% visualizado sob luz UV. As construções foram sequenciadas com vários pares de iniciadores internos para o sequenciamento do gene completo e parcial de *hlyA* e *cnf1* (**Tabela 2**) e analisadas pela ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Tabela 2. Sequencias dos iniciadores para sequenciamento completo dos genes *hlyA* e *cnf1*.

Gene	Identificação	*Primer* 5' – 3'	Início (pb)	Fim (pb)
	HlyA01FWBamHI	GGATCCCCACGAGTTAATAACTGA	-72	-54
hlyA	HlyA02FW	TTCTCAACAACTCAATAAGCTG	614	636
	HlyA02RV	CAGCTTATTGAGTTGTTGAGAA	636	614

Gene	Identificação	*Primer* 5' – 3'	Início (pb)	Fim (pb)
	HlyA03FW	CCTCATTACTCAACAACATTGG	1418	1440
	HlyA03RV	CCAATGTTGTTGAGTAATGAGG	1440	1418
	HlyA04FW	ATATGGTGATAAAGGTAATGAT	2273	2295
	HlyA04RV	ATCATTACCTTTATCACCATAT	2295	2273
	HlyA05RVNotI	CGCCGGCGTAATCAATTTTATGAC	3151	3169
	HlyA05RVKpnI	CCATGGTGACAAGAATCCATTATG	3178	3199
cnf1	CNF01FW	ATGGGTAACCAATGGCAACAAA	1	22
	CNF02FW	AACAAACAATTACTTTCCCAAC	750	772
	CNF02RV	GTTGGGAAAGTAATTGTTTGTT	772	750
	CNF03FW	TTATCCCGAAGAATTTATCGTA	1500	1522
	CNF03RV	TACGATAAATTCTTCGGGATAA	1522	1500
	CNF04FW	CAGCGTGCAATCTATCCGTATT	2250	2272
	CNF04RV	AATACGGATAGATTGCACGCTG	2272	2250
	CNF05RV	AAATTTTTTTGAAAATACCTTC	3020	3042

3.1.6. Produção das proteínas integras de HlyA e CNF1

Para a obtenção das proteínas heterólogas HlyA e CNF1 uma pré-cultura da bactéria *E. coli* XL1-Blue contendo pQE-His-*hlyA* ou pQE-His-Flag-*cnf1* armazenada a -80 ºC foi cultivada em 2 mL de meio LB, contendo ampicilina 100 µg/mL e tetraciclina 12 µg/mL, respectivamente, a 37 ºC por 18 h em agitação de 250 RPM. A pré-cultura foi adicionada em 200 mL de meio LB suplementado com os mesmos antibióticos. Este inóculo foi cultivado a 37 ºC por 4 h e agitação de 250 RPM, uma alíquota de 1 mL do cultivo foi então retirada para verificar a multiplicação bacteriana em fase log, por meio da DO a 600 nm. A esse cultivo quando atingiu valores entre 0,6 e 0,8 foi adicionado isopropil-β-D-galactosídeo (IPTG) em concentração final 0,1 mM para induzir a expressão das proteínas. Após incubação a 18, 20, 25, 30 e 37 ºC por 18 h em 250 RPM, as células foram separadas em centrífuga 5804 R (Eppendorf, Alemanha) a 10.000 *x g* por 10 min, e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 20 mL de tampão de lise (182 mL de tampão salina fosfato (PBS) modificado, 0,05 M NaH_2PO_4, 0,3 M NaCl pH 8.0; 40 mg lisozima; 1% Triton 100; 1%

$MgCl_2$ 2 M; 1% PIC, PMSF 0,1 M, benzamidina 0,1 M; 1 µL benzonase) em leve agitação a 4 ºC por 30 min. Seguida da lise da suspensão de células por disrupção por 3 ciclos de 10 min, na amplitude 30 e ciclo 9 (Bandelin Sonopuls, Alemanha). O lisado foi centrifugado a 10.000 *x g* por 30 min.

A produção das proteínas foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% e *immunoblotting*. Primeiramente, foram aplicados 15 µL das amostras das proteínas tratadas com 2-mercaptoetanol a 100 °C por 5 min em um gel de SDS-PAGE 12%. Para o *immunoblotting* o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose embebida no tampão de transferência (Tris-glicina 0,2 M, pH 8,3, contendo 20% de etanol) através do equipamento Trans-Blot SD (Bio-Rad, EUA). Uma corrente elétrica de 10 V foi aplicada por 30 min. A membrana passou por etapas de bloqueio com PBS contendo 1% de BSA, adição de anticorpo primário anti-His 1: 5.000, anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com peroxidase 1: 5.000, todas a 24 ºC por 1 h de incubação. A membrana foi revelada com diaminobenzidina (DAB) (15 mL de Tris pH 7,6, 10 mg de DAB e 12 µL de peróxido de hidrogênio) até a visualização das bandas. A reação foi interrompida pela adição de água destilada.

3.2. Estratégia 2 – Racional dos fragmentos de baixa massa molecular das toxinas

3.2.1. Obtenção de genes sintéticos

Genes sintéticos foram desenhados para a expressão de proteínas heterólogas baseados na análise das porções hidrofílicas das toxinas da cepa UPEC UTI89 (GenBank: ABE10324.1). A escolha de utilizar somente os domínios hidrofílicos se deu devido ao fato de estas regiões serem apresentadas ao meio, e muito possivelmente sendo reconhecidas por anticorpos. Assim, há maior probabilidade de serem proteínas passiveis de gerar anticorpos capazes de reconhecimento, e com potencial neutralizante. A hidrofilicidade foi calculada no programa ProtScale Tool (http://web.expasy.org/protscale/) usando a escala Hopp-Woods (Hopp e Woods, 1981).

Dois genes foram desenhados para CNF1, um dentro da região de ligação a célula e outro dentro da região catalítica. A saber, um gene codificante do 388aa ao 410aa e outro para 855aa ao 872aa, gerando proteínas de 2,32 kDa e 1,8 kDa respectivamente. Já para HlyA um gene foi desenhado do 388aa ao 410aa compreendendo a porção mais hidrofílica da toxina com 2,09 kDa (**Tabela 3**). A massa molecular teórica foi calculada no programa ProtParam Tool (https://web.expasy.org/protparam/). Estes três genes foram produzidos pela empresa GenOne (Brasil) e entregues subclonados em vetor de expressão pET21a(+) inserido entre os sítios das enzimas de restrição BamHI e HindIII. O vetor de expressão pET21a(+) apresenta o promotor T7, histidina na porção C-terminal, resistência a ampicilina, assim, foram originadas as construções pET21-*hlyA*-His, pET21-*cnf1a*-His e pET21-*cnf1b*-His.

Tabela 3. Sequência dos aminoácidos das proteínas formadas por regiões hidrofílicas.

Toxina	Aminoácidos		Sequência	Peso molecular	Construção plasmidial
	Início	Fim			
HlyA	388	410	TSLVGAPVSALVGAVTGIISGIL	2,09 kDa	pET21-hlyA-His
CNF1	388	410	IPGLATNAVLLGLSFAIPLLISK	2,32 kDa	pET21-cnf1a-His
	855	872	PVIITSGNLSGCTTIVAR	1,80 kDa	pET21-cnf1b-His

3.2.2. Expressão das porções proteicas de baixa massa molecular de HlyA e CNF1

Para a obtenção das proteínas heterólogas das regiões hidrofílicas de HlyA e CNF1 uma pré-cultura da bactéria *E. coli* BL21(DE3) contendo pET21-*hlyA*-His ou pET21-*cnf1*a-His ou pET21-*cnf1*b-His armazenada a -80 ºC foi cultivada em 2 mL de meio LB, contendo ampicilina 100 µg/mL a 37 ºC por 18 h em agitação de 250 RPM. Adicionou-se a pré-cultura em 200 mL de meio LB suplementado com o mesmo antibiótico. Este inóculo foi cultivado a 37 ºC por 4 h e agitação de 250 RPM. Adicionou-se IPTG em concentração final 0,1 mM para induzir a expressão das proteínas. Após incubação a 30 ºC por 18 h em 250 RPM, as células foram separadas em centrífuga 5804 R (Eppendorf, Alemanha) a 10.000 *x g* por 10 min, e o

sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 20 mL de tampão de lise em leve agitação a 4 ºC por 30 min. Seguida da lise da suspensão de células por disrupção por 3 ciclos de 10 min, na amplitude 30 e ciclo 9 (Bandelin Sonopuls, Alemanha). O lisado foi centrifugado a 10.000 *x g* por 30 min.

A expressão das proteínas foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 16% contendo tricina (SCHÄGGER, 2006). Para tanto, foram utilizadas as soluções de acrilamida AB-3 (acrilamida 49,5% e bisacrilamida 3%) e AB-6 (acrilamida 49,5% e bisacrilamida 6%) para montagem do gel, e os tampões de corrida ânodo 10X (1 M Tris, 0,225 M HCl, pH 8,9) e cátodo 10X (1 M Tris, 1 M Tricina, 1% de SDS, pH 8,25). A avaliação prosseguiu com *immunoblotting* modificado apenas quanto a membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF). O marcador de peso molecular utilizado foi o Cytiva Rainbow Low-Range (RNP755E) (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

3.2.3. Purificação das proteínas de baixa massa molecular de HlyA e CNF1

A purificação das proteínas heterólogas das regiões hidrofílicas de HlyA e CNF1 foi realizada de maneiras diferentes, por cromatografia de afinidade a metal em coluna, purificação em *batch* ou lavagem de corpúsculo de inclusão.

Para a purificação por cromatografia de afinidade a metal foi utilizada uma coluna contendo o volume de 5 mL de Sepharose carregada com níquel (Ni^{2+}), com o auxílio do sistema de cromatografia ÄKTAprime plus (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido). A purificação foi realizada aplicando todo o sobrenadante após sonicação à coluna previamente equilibrada com tampão de ligação (20 mM de Tris-HCl, pH 7,4, contendo 5 mM imidazol e 0,5 M NaCl). A eluição foi realizada com tampão de eluição (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, contendo 1 M imidazol e 0,5 M NaCl). Depois de eluída, a proteína foi dialisada contra tampão fosfato salino (PBS) (0,01 M, pH 7,2) por 48 h com três trocas de tampão.

Para purificação em *batch* o sedimento pós sonicado foi ressuspenso em 10 mL de tampão de ligação (20 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 M NaCl, 20 mM de imidazol e 6 M ureia), sonicado 4 vezes ciclo 3, amplitude 20% por 2 min, homogeneizado em gangorra por 4 a 18h e centrifugado a 10,000 *x g* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi reservado para submeter à purificação (250 mL de cultura bacteriana com 1 mL de resina Agarose Ni-NTA, QIAGEN). A resina foi preparada por

centrifugação de1 mL a 1000 *x g* por 4 min para sedimentar levemente, removido o sobrenadante e adicionado 2 mL do tampão de ligação, e após misturar por inversão, centrifugada novamente para remover o sobrenadante. A proteína heteróloga foi adicionada à resina sob agitação em gangorra a 4 °C por 2 a 18h e centrifugada a 1000 *x g* por 4 min. Lavada três vezes com 10 mL de tampão de lavagem (20 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 M NaCl e 100 mM imidazol) em gangorra por 10 min e centrifugar a 1000 *x g* por 4 min. e ressuspensa em 2 mL de tampão de eluição (20 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 M NaCl e 1 M imidazol) por 1 a 18h sob agitação em gangorra. O sobrenadante foi recuperado e dialisado em membrana de diálise de 3 kDa para retirar a ureia contra tampão de ureia (20 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 M NaCl e 5 M ureia). E então dialisado contra tampão de dialise (20 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 M NaCl) em concentrações decrescentes de ureia até 0,1 M. Por fim, foi realizada a troca para o tampão PBS 0,01 M pH 7,2 a 4 °C por 18 h.

Para lavagem dos corpúsculos de inclusão o sedimento pós sonicado foi ressuspenso em 10 mL de tampão de ligação (20 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 M NaCl, 20 mM de imidazol e 6 M ureia), sonicado 4 vezes ciclo 3, amplitude 20% por 2 min., agitado em gangorra por 10 min. e centrifugado a 10,000 *x g* por 10 min a 4 °C. Este processo foi repetido três vezes o os sobrenadantes foram armazenados para retirada a ureia conforme descrito acima.

Posteriormente, em todos os procedimentos as proteínas foram concentradas na presença de polietilenoglicol 6.000 (PEG 6.000). Para confirmar a presença das proteínas foi realizada eletroforese em gel de SDS-PAGE 16% contendo tricina e *immunoblotting*.

3.2.4. Análise por espectrometria de massas

A análise foi realizada no Laboratório de Toxinologia Aplicada (LETA) do Instituto Butantan a partir das proteínas presentes no gel obtido por SDS-PAGE. Inicialmente para a digestão in gel, as bandas foram cuidadosamente cortadas e colocadas em tubos de 1,5 mL. Em seguida, foram incubadas com 0,5 mL de solução descorante (50% MeOH, 5% CH_3COOH em água ultrapura) por 2h a 24 ºC. Na sequência, a solução foi removida e lavada novamente por 1h. Após esse procedimento, a solução foi removida e 200 µL de acetonitrila foram adicionados para

desidratar o gel por 5 min. A acetonitrila remanescente foi removida com o auxílio de secador de amostras tipo speedvac (Vacufuge plus, Eppendorf, Alemanha) por 5 min.

Para a redução e alquilação foi adicionado 30 μL de 1,4-ditiotreitol (DTT) 10 mM e 30 μL de 50 mM ácido indolacético (IAA) por 30 min., sempre removendo a solução anterior antes de adicionar à seguinte e então, mais uma vez o gel foi desidratado com 200 μL de acetonitrila por 5 min. e novamente o que remanesceu do solvente foi removido com o secador de amostras.

Para a digestão, 50 ng/μL de tripsina em 50 mM de NH_4HCO_3 em volume suficiente para cobrir o gel e este foi incubado 18 h a 37 ºC. No dia seguinte, sem remover a solução de NH_4HCO_3, foi adicionado à solução de remoção 1 (5% ácido fórmico em água ultrapura) por 10 min. e seu sobrenadante foi coletado em um tubo separado, em seguida, o passo foi repetido com a solução de remoção 2 (5% ácido fórmico em água ultrapura) por 10 min. e o sobrenadante fora novamente coletado. O extrato foi totalmente seco em secador de amostras e ressuspendido em 20 μL de 0,1% ácido fórmico para subsequente análise por espectrometria de massas.

Após serem digeridas, as bandas foram analisadas por espectrometria de massas em um nanocromatógrafo EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific, Estados Unidos) acoplado a um espectrômetro de massas do tipo LTQ-XL (Thermo Scientific, Estados Unidos) em um gradiente de 5% a 45% acetonitrila e ácido fórmico 0,1% por 30 min. em um fluxo de 200 nL/min., depois 10 min. a 95% para a eliminação de quaisquer resíduos que possam ocorrer entre amostras. A fonte de eletrospray foi operada a 2.2 kV. E 5 μL do digerido de cada banda de gel foi analisada em triplicata técnica em um range de 50 a 2000 m/z para MS, com o tempo de injeção máximo de 50 milissegundos. Para a obtenção de espectros de MS/MS, 50 a 2000 m/z para MS/MS em um tempo máximo de injeção de 100 milissegundos com um tempo de exclusão dinâmica de 30 segundos.

Na a análise de bioinformática, para identificação dos espectros obtidos na análise por espectrometria de massas foi utilizado o software Peaks Studio (Versão X), com as ferramentas de sequenciamento *de novo* para a obtenção das sequências de peptídeos e a ferramenta Search DB para identificação contra o banco *Escherichia coli* da base de dados Uniprot/ Swissprot (Download: ago/2019) e posteriormente contra as sequências das toxinas HlyA (GenBank: ABE10329.1) e CNF1 (GenBank: ABE10324.1).

Os parâmetros utilizados para a realização das buscas foram: carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Com relação ao erro de massa, foram considerados 0,5 da de tolerância tanto para MS quanto MS/MS. A enzima proteolítica de escolha foi tripsina com até no máximo duas clivagens perdidas permitidas. As sequências obtidas no banco de dados são avaliadas no banco reverso (decoy). Após o término das buscas, a taxa de falsa descoberta de peptídeos (FDR) foi ajustada para 0,1% e o limiar de confiança para a identificação de aminoácidos (ALC) foi de > 80%.

3.3. Estratégia 3 – Produção das porções intermediárias imunógenas HlyA e CNF1

3.3.1. Desenho estrutural da porção catalítica da toxina CNF1

Dando início a terceira estratégia, para produção de toxinas de tamanho intermediário, a porção C-terminal de atividade enzimática de CNF1 foi primeiramente selecionada. Esta seleção da região catalítica compreende do aminoácido 726 ao 1014, e é responsável pela ação citotóxica da toxina, sendo definida com o intuito de se obter anticorpos neutralizantes no futuro. Assim, esta versão da proteína foi obtida por meio da empresa GenScript (Estados Unidos), sendo expressa em vetor comercial pET30a(+) e entregue pronta para uso. Contudo, o processo de produção pela própria empresa não foi capaz de obter a toxina de maneira solúvel, exigindo um processo de solubilização e redobramento. Devido a estes procedimentos adicionais, os ensaios de seleção de anticorpos não foram capazes de obter anticorpos com alta afinidade para a toxina.

Assim, um novo gene codificante da toxina CNF1 foi projetado e produzido pela empresa Twist Bioscience (Estados Unidos). Contendo agora a adição de uma porção de hélice alfa no início da toxina parcial, compreendendo do 720aa ao 1014aa (**Figura 3**), para uma possível melhora na seleção de anticorpos, com base em trabalhos da literatura (REPPIN; COCHET; EL NEMER; FRITZ *et al.*, 2017). A nova toxina CNF1 é codificada no vetor pHH0103, que contém uma cauda de His, fusão com a proteína GST, cauda de avidina Avitag e uma protease TEV. Sendo esta versão fusionada à proteína GST para melhorar a solubilidade. Além disso, a toxina aqui obtida apresenta biotinilação, devido a uma região Avi no vetor permite que a bactéria de expressão *E.*

coli BirA adicione biotina, previamente acrescentada ao meio. Contribuindo para a sensibilidade de reconhecimento em ensaios imunossorológicos ao utilizar avidina ou estreptavidina como substrato de reconhecimento.

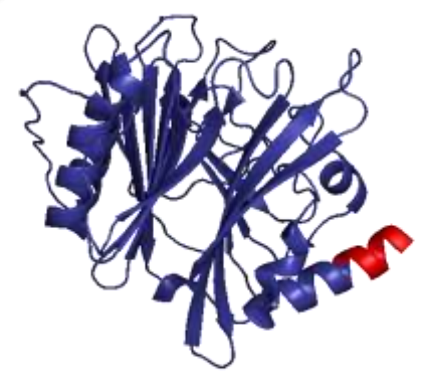


Figura 3. Porção enzimática da toxina CNF1.
Em vermelho, a alfa hélice adicional da nova proteína projetada.

3.3.1.1. Expressão da porção catalítica da toxina CNF1

Primeiro, as cepas de *E. coli* BirA com o vetor CNF1 foram transformadas usando 16 µL de água, 4 µL 5x KCM e 2 µL de DNA. Assim, 20 µL de células competentes foram adicionadas e incubadas a 4 ºC por 20 min. Seguida da adição de 1 mL de meio 2YT contendo carbenicilina (carb) 100 µL/mL e cloranfenicol 5 µg/mL e incubação a 37 ºC, 200 RPM por 18 h. O inoculo foi realizado em 100 mL de meio 2YT contendo carbenicilina 100 µL/mL e cloranfenicol 5 µg/mL com a transformação e agitado a 200 RPM a 37 ºC por 2 h ou até a DO atingir 0,8. IPTG 1 mM e biotina 30 µM foram adicionados e novamente agitados a 20 ºC por 18 h. Após centrifugação a 1.800 *x g* por 20 min o sobrenadante foi descartado e 15 mL de tampão de lise foi adicionado e agitado a 24 ºC por 1 h. O sobrenadante foi centrifugado novamente e armazenado para purificação.

Em seguida, a coluna de Níquel Sepharose Excel (General Electric, GE, Estados Unidos) foi pré-montada por centrifugação de 2 mL de resina a 1.000 *x g* por 5 min. O sedimento foi ressuspenso em 4 mL de tampão de pré-lavagem, esse processo foi repetido três vezes. A resina foi adicionada ao sobrenadante da proteína e agitada por 1 h a 4 ºC, a mistura foi vertida em uma coluna para fluir. Após, a coluna foi lavada três vezes com 15 mL de tampão de lavagem e a proteína eluída usando 1 mL de tampão de eluição por 5 vezes. A concentração foi medida por Nanodrop.

- Tampão de ligação: HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 500 mM, imidazol 5 mM e glicerol a 5%.
- Tampão de pré-lavagem: HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, glicerol a 5% e Triton-X 100 a 1%.
- Tampão de lavagem: HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 500 mM, imidazol 30 mM e glicerol a 5%.
- Tampão de eluição: HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 500 mM, imidazol 250 mM e glicerol a 5%.
- Tampão de lise: HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 500 mM, imidazol 5 mM, glicerol 5%, Triton-X 100 a 1%, benzonase 8 µL (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), 100 mg de lisozima e 1 comprimido de Mini Cocktail Inibidor de Protease sem EDTA (Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

3.3.1.2. Estreptavidina SDS-PAGE

O gel SDS-PAGE foi utilizado para determinar a percentagem de biotinilação da toxina expressa. Para isso, 1,5 molar de estreptavidina foi incubado com 4 molares da proteína. Uma vez que cada molécula de estreptavidina pode se ligar a quatro moléculas de biotina utilizamos um excesso para garantir a saturação. O software ImageJ foi utilizado para avaliar a diferença entre a toxina ligada à estreptavidina e a toxina sozinha.

3.3.1.3. Estreptavidina ELISA

Para acessar a biotinilação, um ELISA foi realizado usando diferentes concentrações de proteína recombinante contra uma estreptavidina-HRP comercialmente disponível (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Primeiro, 10 µg de proteína em uma diluição seriada de 2 vezes foi adsorvida em uma placa Nunc MaxiSorp ELISA (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) com tampão PBS 0,01 M pH 7,2 (0,137 M NaCl, 0,0027 M KCl, 0,01 M Na_2HPO_4, 0,0018 M KH_2PO_4) e incubada a 4 ºC por 18 h. A estreptavidina-HPR foi adicionada em uma diluição de 1: 10.000 em tampão PBT (PBS 0,01 M pH 7,2, 0,05% Tween 20) e agitada a 24 ºC por 45 min,

seguida pelo substrato TMB (Seracare, Estados Unidos). A reação foi interrompida pela adição de H_3PO_4 1 M. A proteína BSA (albumina de soro bovino) foi usada como controle do ensaio.

3.3.1.4. Remoção da proteína GST

3.3.1.4.1. Enzimas de restrição

Usando as enzimas de restrição SfiI e NotI, a toxina CNF1 foi removida do vetor original e inserida no vetor pHH0103-His-Avi, sem a proteína GST. Para isso, a digestão de ambos os plasmídeos ocorreu da seguinte forma. A reação de 50 µL contendo água estéril, 5 µL de tampão CutSmart 10x, 1 µL de enzima NotI (20 unidades) e 1 µg de DNA foi incubada a 37 ºC por 1 h. Após, 1 µL da enzima SfiI (20 unidades) foi adicionado e incubado a 50 ºC por 1 h. Para interromper a atividade enzimática Gel Loading Dye, Purple (6X) (2.5% Ficoll®-400, 10 mM EDTA, 3.3 mM Tris-HCl, 0,08% SDS, 0,02% Dye 1, 0,001% Dye 2, pH 8) foi utilizado. A reação foi aplicada em um gel de agarose a 1% para extração de *cnf1*. O DNA foi purificado com o kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, Alemanha).

3.3.1.4.2. Iniciadores e PCR

Usando iniciadores que anelam imediatamente antes e depois da proteína GST é possível remover esta sequência ao realizar uma PCR. Assim, foi realizada a seguinte reação: 10 µL de tampão Phusion HF 5x, 1 µL de dNTP 10 mM, 2,5 µL de iniciador direto (5' TCA GAG CGC GGC CCA GCC GGC CAG CAT TGA AAG CAC CAG CAA GTC 3'), 2,5 µL de iniciador reverso (5' GGT TTA TTA TGC GGC CGC GAA CTT CTT CGA GAA TAC CTT CAA TAC CGA G 3'), 1 µL de modelo de DNA (250 ng) e 0,5 µL de DNA polimerase de alta fidelidade Phusion (New England Biolabs, NEB, United Unidos), em volume total de 50 µL de água estéril. A amplificação ocorreu usando um ciclo de 98 ºC por 30 s, repetindo 35x 98 ºC por 10 s, 65 ºC por 30 s e 72 ºC por 4 min, e um final de 72 ºC por 10 min. Para circularizar o DNA amplificado sem GST, uma mistura de 1 µL de produto de PCR, 1 µL de tampão T4 DNA ligase, 1 µL de T4 DNA ligase, 1 µL de T4 polinucleotídeo cinase (PNK) e 1 µL de DpnI foi incubada

a 24 ºC por 1 h. Em seguida, foi realizado um gel de agarose a 1% para avaliação dos perfis de DNA e envio para sequenciamento.

3.3.1.4.3. Alteração da estrutura vetorial

O vetor original pode ser alterado para remover GST utilizando um fago auxiliar M13KO7. O DNA de fita simples do plasmídeo é obtido e depois alterado por oligonucleotídeos antes da fita dupla ser refeita (FELLOUSE; SIDHU, 2006; KUNKEL; ROBERTS; ZAKOUR, 1987).

Para isso, *E. coli* CJ236 (ou outra cepa dut-/ung-) foi transformada com o vetor contendo o gene de CNF1 e uma única colônia foi selecionada e cultivada em 1 mL de meio 2YT suplementado com fago auxiliar M13KO7 (10^{10} pfu/mL), 50 µg/mL de carbenicilina e 5 µg/mL de meio de cloranfenicol. A cultura foi agitada a 200 RPM e 37 ºC por 2 h. Em seguida 25 µg/mL de canamicina foi adicionado para selecionar os clones que foram co-infectados com M13KO7, que carrega um gene de resistência à canamicina. A cultura foi agitada a 200 RPM e 37 ºC por 6 h e adicionada em 30 mL de 2YT, contendo 50 µg/mL de carbenicilina, 25 µg/mL de canamicina e 0,25 µg/mL de uridina, para agitação por 20 h a 200 RPM e 37 ºC.

O cultivo foi centrifugado por 10 min a 27.000 *x g* e 4 ° C em um rotor Sorvall SS-34. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 1/5 do volume de PEG/NaCl (20% PEG-8000 (p/v), NaCl 2,5 M. Após, o sobrenadante foi misturado, autoclavado, incubado por 5 min em temperatura ambiente e centrifugado por 10 min a 12.000 *x g*e 4 ºC em um rotor SS-34. O sobrenadante foi decantado e após nova centrifugação a 2.000 *x g*o sobrenadante restante foi descartado. O sedimento contendo o fago foi ressuspenso em 0,5 mL de PBS e transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugado por 5 min a 14.000 *x g* em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL a purificação foi realizada usando o QIAprep M13 (Qiagen, Alemanha) para obter ssDNA. O ssDNA foi analisado por eletroforese em gel de agarose TAE (base Tris 0,04 M, EDTA dissódico 0,002 M e ácido acético 0,02 M). A concentração de DNA foi determinada na absorbância de 260 nm (A260 = 1,0 para 33 ng/µL de ssDNA). As concentrações típicas de DNA variam de 200 a 500 ng/µL.

Para a síntese *in vitro* de DNA de fita dupla heteroduplex, a fosforilação de oligonucleotídeo com polinucleotídeo quinase T4 foi realizada, usando o

oligonucleotídeo de reparo CNF1 (5 'GCG CGG CCC AGC CGG CCA GCA TTG AAA GCA CCA GC 3') e pHH0103 GST (5 'CCA TTC CAG CGG TAA GCT TGG CGG TCT GAA CGA 3 '). Primeiramente, 0,6 µg de cada oligonucleotídeo mutagênico, 2 µL de tampão 10x TM (0,1 M MgCl2, 0,5 M Tris, pH 7,5), 2 µL de ATP 10 mM e 1 µL de DTT 100 mM foram adicionados em água até um volume total de 20 µL. 20 unidades de T4 PNK foram adicionadas e incubadas por 1 h a 37 ºC. Para hibridar os oligonucleotídeos ao molde, 20 µg do molde ssDNA foi adicionado em 25 µL de tampão TM 10x, 20 µL de cada oligonucleotídeo fosforilado e água até um volume final de 250 µL. A mistura foi incubada a 90 ºC por 3 min, 50 ºC por 3 min e 20 ºC por 5 min.

Por último, a síntese enzimática de dsDNA foi obtida através da mistura de oligonucleotídeo/molde, com adição de 10 µL de ATP 10 mM, 10 µL de mistura de dNTP 100 mM, 15 µL de DTT 100 mM, 30 unidades de Weiss T4 DNA ligase e 30 unidades T7 DNA polimerase, incubada durante a noite a 20 ºC. O DNA foi purificado e dessalinizado usando o kit Qiagen QIAquick DNA Purification (Qiagen, Alemanha). O DNA pode ser usado imediatamente para eletroporação em *E. coli* ou pode ser congelado para uso posterior. Para confirmar a análise da sequência, o dsDNA precisa ser replicado em células OmniMAX (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), usando 1 µL de DNA, 2 µL 5x KCM (0,5 M KCl, 0,15 M $CaCl_2$ e 0,25 M $MgCl_2$) e 7 µL de água. 20 µL de células competentes foram adicionas e incubadas 20 min a 4 ºC. Após, 100 µL de meio 2YT foi adicionado e incubado por 1 h a 37 ºC. A transformação foi semeada em volumes de 20 e 50 µL em placas de ágar LB contendo 100 µL/mL de carbenicilina.

Colônias para PCR foram escolhidas e cultivadas em 50 µL de meio 2YT por 1 h a 37 ºC. A reação foi realizada com 4 µL de tampão Phusion HF 5x, 0,4 µL de dNTP 10 mM, 1 µL de 100 nM pHH0103 M13 pUC iniciador (5' AGT GTA AAA GCA CGG CCA GTA GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G 3’, 1 µL de 100 mM pHH0103 G8R1 RC iniciador (5' CAG GAA ACA GCT ATG ACT TCA ACA GTT TCA GCG GAG 3'), 1 µL de colônia cultivada e 0,2 µL de Polimerase de DNA de alta fidelidade Phusion (New England Biolabs, NEB, Estados Unidos). A amplificação ocorreu usando um ciclo de 94 ºC por 1 min, repetindo 35x 95 ºC por 30 s, 55 ºC por 30 s e 72 ºC por 1:30 min, e um final de 72 ºC por 7 min. Em seguida, um gel de agarose 1% foi realizado para avaliação dos perfis de DNA. Para remoção dos iniciadores e dNTP foram utilizadas duas enzimas: Exonuclease I (Exo I, NEB, Estados Unidos), que degrada

os iniciadores residuais da PCR, e Fosfatase Alcalina de Camarão (rSAP, NEB, Estados Unidos), que desfosforila o dNTP restante. Assim, foi adicionado 0,5 µL de Exo I e 1 µL de rSAP a 5 µL de produto de PCR e a mistura foi incubada a 37 ºC por 15 min. Em seguida, as enzimas foram inativadas a 80 ºC por 15 min. O sequenciamento do DNA foi realizado pela BioBasic (Canadá) através da metodologia Sanger usando o iniciador M13 (5' GTA AAA CGA CGG CCA GT 3').

3.3.2. Modelagem *in silico* das toxinas de peso molecular intermediário

Estas avaliações foram realizadas com o auxílio técnico do bioinformata Dr. José Salvatore L. Patané do Laboratório de Ciclo Celular do Instituto Butantan. O racional se baseia no conhecimento de técnicas de clonagem e expressão heteróloga de proteínas, sendo que sequências menores, representando proteínas de aproximadamente 20 kDa, são em sua maioria mais facilmente obtidas.

Para analise *in silico*, os softwares Phyre2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/), SwissModel (https://swissmodel.expasy.org/) e I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) foram utilizados para desvendar a estrutura quaternária das proteínas, uma vez que não existe esta anotação na literatura. Posteriormente, o programa 3Drefiner (http://sysbio.rnet.missouri.edu/3Drefine/) foi empregado para refinar as estruturas tridimensionais obtidas. A análise de predição linear de antigenicidade foi realizada com o software BepiPred (http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/) e a avaliação da solubilidade no ProteinSol (https://protein-sol.manchester.ac.uk/), ProtScale (https://web.expasy.org/protscale/) e SOLart (https://mybiosoftware.com/solart-1-0-protein-solubility-prediction.html). Dados gerais das proteínas parciais foram obtidos pelo programa ProtParam (https://web.expasy.org/protparam/).

3.3.2.1. Obtenção das toxinas intermediárias imunógenas

Os genes *hlyA* e *cnf1* das proteínas intermediárias foram obtidos por meio do desenho de um gene sintético (FastBio, Brasil) baseados em análises de bioinformática, apresentando os sítios das enzima de restrição NdeI e NotI e a marcação His na porção N-terminal. O gene sintético estava no vetor de expressão pET30a(+).

Para transformação foram utilizadas bactérias *E. coli* C41(DE3), C43(DE3), BL21 Star (DE3) e BL21(DE3) pLysS, assim, 1 µL do plasmídeo foi incubado com 2 µL de tampão KCM 5X (KCl 0,5 M, $CaCl_2$ 0,15 M e $MgCl_2$ 0,25 M) e 7 µL de água estéril no gelo por 5 min, seguido da adição de 10 µL de células quimiocompetentes, após 20 min a solução foi transferida para 24 ºC por 10 min. Na sequência, 200 µL de meio de cultivo LB foram adicionados e mantidos a 37 ºC por 1 h antes de serem distribuídos em placas e Petri contendo LB ágar com cloranfenicol 34 µg/mL e ampicilina 100 µg/mL a 37 ºC por 18 h.

Para a obtenção das proteínas heterólogas HlyA e CNF1 uma cultura em 200 mL de meio LB suplementado com cloranfenicol e ampicilina foi cultivada a 37 ºC por 4 h e agitação de 250 RPM, adicionamos isopropil-β-D-galactosídeo (IPTG) em concentração final 1 mM para induzir a expressão das proteínas. Após incubação a 18 ºC por 18 h em 250 RPM, as células foram separadas em centrífuga 5804 R (Eppendorf, Alemanha) a 10.000 *x g* por 10 min, e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 10 mL de tampão de lise (182 mL de tampão PBS modificado, 0,05 M NaH_2PO_4, 0,3 M NaCl pH 8.0; 40 mg lisozima; 1% Triton 100; 1% $MgCl_2$ 2 M; 1% PIC, PMSF 0,1 M, benzamidina 0,1 M; 1 µL benzonase) em leve agitação a 4 ºC por 30 min. Seguida da lise da suspensão de células por disrupção por 3 ciclos de 10 min, na amplitude 30 e ciclo 9 (Bandelin Sonopuls, Alemanha). O lisado foi centrifugado a 10.000 *x g* por 30 min.

Para purificação em *batch* o sobrenadante pós-sonicado foi submetido à purificação com 1 mL de resina Agarose Ni-NTA (QIAGEN). A resina foi preparada por centrifugação de 1 mL a 1.000 *x g* por 4 min para sedimentar levemente, removido o sobrenadante e adicionado 2 mL do tampão de ligação, e após misturar por inversão, centrifugada novamente para remover o sobrenadante. A proteína heteróloga foi adicionada à resina sob agitação em gangorra a 4 °C por 2 a 18h e centrifugada a 1000 *x g* por 4 min. Lavada três vezes com 10 mL de tampão de lavagem (20 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 M NaCl e 100 mM imidazol) em gangorra por 10 min e centrifugar a 1000 *x g* por 4 min. e ressuspensa em 2 mL de tampão de eluição (20 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 M NaCl e 1 M imidazol) por 1 a 18h sob agitação em gangorra. O sobrenadante foi recuperado e dialisado em corte de 3 kDa para retirar a ureia contra tampão de ureia (20 mM de fosfato de sódio pH 7,4, 0,5 M NaCl e 5 M ureia). E então dialisado contra tampão PBS 0.01M pH 7.2 a 4 °C por 18 h.

A expressão e purificação das proteínas foi avaliada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% e *immunoblotting*. Primeiramente, foram aplicados 15 µL das amostras das proteínas tratadas com 2-mercaptoetanol a 100 °C por 5 min em um gel de SDS-PAGE 12%. Para o *immunoblotting* o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose embebida no tampão de transferência (Tris-glicina 0,2 M, pH 8,3, contendo 20% de etanol) através do equipamento Trans-Blot SD (Bio-Rad, EUA). Uma corrente elétrica de 10 V foi aplicada por 30 min. A membrana passou por etapas de bloqueio com PBS contendo 1% de BSA, adição de anticorpo anti-His 1:5.000, anticorpo anti-camundongo conjugado com peroxidase 1:5.000, todas a 24 ºC por 1 h de incubação. A membrana foi revelada com o kit NBT/BCIP (Promega, EUA) até a visualização das bandas, e adição de água destilada para interromper a reação.

A análise de espectrometria de massas foi realizada no Instituto Butantan a partir das proteínas presentes no gel obtido por SDS-PAGE a 12%. Na a análise de bioinformática, para identificação dos espectros obtidos na análise por espectrometria de massas foi utilizado o software Peaks Studio, com as ferramentas de sequenciamento *de novo* para a obtenção das sequências de peptídeos e identificação contra o banco *Escherichia coli* da base de dados Uniprot/Swissprot (Download: ago/2019) e posteriormente contra as sequências das toxinas HlyA (GenBank: ABE10329.1) e CNF1 (GenBank: ABE10324.1).

3.4. Coleção de isolados bacterianos de UPEC

No presente trabalho foram utilizados isolados bacterianos provenientes da bacterioteca de UPEC do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, isolados de pacientes do Hospital Infantil Darcy Vargas, totalizando 78 isolados e sendo denominados pelas iniciais DV seguidos da identificação numérica (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética, CAAE 0005.0.350.3500-08).

3.4.1. Extração de DNA genômico

O DNA genômico de todos os isolados da bacterioteca de UPEC foi extraído com o kit de extração PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, EUA) de um cultivo

bacteriano de 18 h em meio Luria Bertani (LB), seguindo o recomendado pelo fabricante e armazenados a -20 ºC até o momento de sua utilização.

3.4.2. Avaliação do genótipo

A presença ou ausência dos genes *hlyA* e *cnf1* foi avaliada pela metodologia de reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi realizada em reações de 25 µL de volume final, contendo 2,5 µL de tampão próprio da polimerase (1X), 50 mM de $MgCl_2$ em concentração final de 1,5 mM, 10 mM de dNTP em concentração final de 0,2 mM, 1,25 µL de cada iniciados *forward* e *reverse* em concentração final de 1 µM, 1 µL de DNA genômico dos isolados bacterianos entre 400 a 600 ng e 0,1 µL da enzima Taq polimerase recombinante (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em concentração final de 0.5 U. As reações foram submetidas ao ciclo de 94 ºC por 3 min iniciais, seguido de 35 repetições de 94 ºC por 45 seg, 55 ºC por 30 seg e 72 ºC por 4,5 min, e por fim 72 ºC por 10 min. Para visualização os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% e expostos a luz ultravioleta (UV).

Os iniciadores (Exxtend, Brasil) para a avaliação dos genes na bacterioteca estão descritos na **Tabela 2**. Controles de reação foram inclusos, sendo a UPEC J96 representativa da presença dos dois genes analisados, *E. coli* DH5α representativa da ausência dos genes e apenas água ultrapura como controle de reação da PCR. A presença de DNA correspondente com a quantidade de 3.000 pb foi considerada como indicativo da presença dos genes, quando comparado com o perfil da cepa protótipo de UPEC J96 (NCBI:txid1206108; ATCC 700336).

3.4.3. Ágar sangue

As placas foram preparadas com ágar base de tripticaseína de soja 1,5% estéril adicionado de 5% de hemácias de carneiro (Newprov) lavadas e 10 mM de $CaCl_2$ estéril (BEUTIN; MONTENEGRO; ORSKOV; ORSKOV *et al.*, 1989). Para lavagem das hemácias o sangue de carneiro desfibrinado foi centrifugado a 2.500 *x g* por 10 min e ressuspenso em solução PBS 0,01 M pH 7,2 estéril no mesmo volume inicial de sangue. Este procedimento de lavagem foi realizado três vezes. Após as lavagens as hemácias foram adicionadas ao ágar base a uma temperatura de 40 ºC.

3.4.4. Ensaio de hemólise em placa

Os isolados bacterianos em condições de estocagem, em meio LB líquido suplementado com glicerol V/V, foram aplicados em duplicatas nas placas de ágar sangue. Para cada ensaio foram aplicados 2 µL de volume e incubados a 37 ºC por 24 h para posterior observação dos halos de hemólise formados (BEUTIN *et al.*, 1989).

3.4.5. Multinucleação em HEp-2 com proteínas totais de UPEC

A toxina CNF1 é capaz de causar multinucleação na linhagem celular HEp-2 (GRANDE; MEYSICK; RASMUSSEN; O'BRIEN, 2009; MEYSICK; MILLS; O'BRIEN, 2001; MILLS; MEYSICK; O'BRIEN, 2000; RIPPERE-LAMPE; O'BRIEN; CONRAN; LOCKMAN, 2001; SMITH; WEINGARTEN; RUSSO; VENTURA *et al.*, 2015) Uma vez que a proteína heteróloga CNF1 ainda não havia sido obtida no momento deste ensaio, este foi realizado utilizando as proteínas totais dos isolados de UPEC como descrito em literatura (RIPPERE-LAMPE; O'BRIEN; CONRAN; LOCKMAN, 2001). Brevemente, os isolados foram cultivados a 37 ºC por 18 h, seguido de centrifugação a 4.000 *x g* por 5 min. O pellet foi ressuspendido em 3 mL de PBS 0.01 M, pH 7.2 e sonicado três vezes no ciclo 3, amplitude 20% por 2 min. O lisados resultantes foram novamente centrifugados e o sobrenadante utilizado para dosagem de proteínas pelo Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, EUA) e no aparelho NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, EUA). As proteínas totais foram armazenadas a 4 ºC até o momento do uso.

As células HEp-2 foram cultivadas a 37 ºC em 5 % de CO_2, com o meio de cultivo DMEM suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1 mM de piruvato de sódio e 0,1 mM de aminoácidos não essenciais. Placas de cultivo celular de 24 poços (Kasvi, Brasil) com lamínulas circulares de 13 mm foram plaqueadas com 2 x 10^3 células e incubadas a 37 ºC em 5 % de CO_2 por 24 h. Os lisados com as proteínas totais em concentração final de 125 µg/mL em cada poço diluídas em meio de cultivo foram adicionados as células e incubados por 72 h.

Para a coloração de May-Grünwald-Giemsa as células foram lavadas com PBS 0.01 M, pH 7.2 e fixadas com metanol 100 % por 30 min. Seguidas da adição do corante May-Grünwald diluído 1:2 em tampão fosfato Sorensen 0,133 M (0,133 M Na2HPO4 e 0,133 M KH2PO4, pH 7,4) por 15 min. O corante Giemsa foi adicionado

diluído em proporção 1:2 em tampão Sorensen por 20 min. As lamínulas foram lavadas com PBS 0.01 M, pH 7.2 e retiradas da placa com auxílio de uma pinça e secas por 24 h. Após a fixação das lamínulas em lâminas com Entellan, as células foram analisadas em microscópio ZEISS Axio Lab A1 (Zeiss, Alemanha).

4. RESULTADOS

4.1. Estratégia 1 – As toxinas HlyA e CNF1 integras

4.1.1. Obtenção de HlyA integra

A amplificação do DNA genômico de UPEC J96 ocorreu nas temperaturas de 56, 58, 60 °C (**Figura 4**), os produtos de PCR apresentaram no gel de agarose o número de pares de base esperado, que é em torno de, 3.075 pb; já os controles negativos não mostraram amplificação em quaisquer reações analisadas. A temperatura de 60 ºC foi mais específica sendo considerada a melhor e utilizada em todas os experimentos futuros. Inicialmente, a padronização da PCR foi realizada apenas com o iniciador *reverse* contendo o sítio da enzina da restrição Not**I**, assim, em seguida, a utilização de ambos os iniciadores reversos permitiu verificar resultados anteriores e amplificar *hlyA* contendo as enzimas necessárias para clonagem em pET20b(+) e pQE30. Para confirmação, o DNA genômico foi sequenciado com iniciadores internos com cobertura total do gene de interesse e analisado por BLAST demonstrando um alinhamento com o genoma completo de diversas UPEC, como UTI89 (GenBank: CP000243.1), 26-1 (GenBank: CP016497.1), CFT073 (GenBank: AE014075.1), NU14 (GenBank: CP019777.1), 536 (GenBank: CP000247.1) com identidade observou-se 98 a 99%. Além disso, também houve 98% de identidade com o deposito dos genes específicos de *hlyC*, *hlyA*, *hlyB* e *hlyD* da cepa J96 (GenBank: M10133.1) mostrando que a amplificação do gene estava correta.

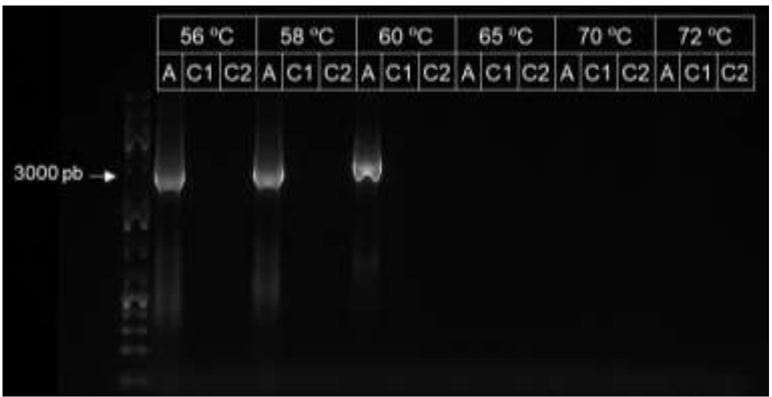


Figura 4. Temperaturas de anelamento para amplificação de *hlyA* de UPEC J96.

Amplificação por PCR de *hlyA*, tamanho de fragmento em comparação com a escala GeneRuler 1kb Plus DNA. Amplificação com diferentes temperaturas de anelamento: 56, 58, 60, 65, 70 e 72 ºC. Os controles negativos com DNA genômico de DH5α e sem presença de DNA são mostrados como C1 e C2, respectivamente. Em A o produto de amplificação da PCR. Eletroforese em gel de agarose a 1 % com GelRed revelado com UVITEC Gel Documentation Systems.

O gene foi inserido nos vetores, dando origem as construções pET20-*hlyA*-His e pQE-His-*hlyA*. A transformação de pET20-*hlyA*-His em *E. coli* DH5α foi eficaz, pois, seus cultivos em meio seletivo contendo antibiótico houve aparecimento de colônias bacterianas. No entanto, na análise de restrição apenas uma banda foi observada, representativa apenas do vetor, e pela análise de sequenciamento o gene não estava presente.

Desse modo, *E. coli* XL1-Blue foi transformada com pQE-His-*hlyA* e após cultivo em meio seletivo houve aparecimento de colônias bacterianas. Na PCR dessas colônias observou-se a presença do gene *hlyA* quando os iniciadores da amplificação do gene foram empregados. No entanto, pela análise de sequenciamento do DNA plasmidial para cobertura total do gene não foi possível observar o gene *hlyA* no plasmídeo. Para esta construção, uma pequena indução teste foi realizada na temperatura de 18 ºC, e confirmou os resultados do sequenciamento, não observamos a presença de uma proteína com mobilidade eletroforética relativa de 107 kDa no SDS-PAGE e nem no *immunoblotting*.

4.1.2. Obtenção de CNF1 integra

O gene de *cnf1* contido em pUC57 foi clonado em *E. coli* DH5α para expansão clonal. Após extração e digestão do plasmídeo o gene foi inserido em pET20b(+) e

pQE30. A transformação em *E. coli* DH5α de pET20-Flag-*cnf1*-His foi efetiva, teve o plasmídeo incorporado pela bactéria, fato evidenciado pela presença de colônias no meio seletivo. Contudo, a análise de restrição mostrou apenas uma banda, relativa ao vetor vazio.

Desta maneira, a construção pQE-His-Flag-*cnf1* foi utilizada na transformação de *E. coli* XL1-Blue com aparente eficácia, uma vez que colônias foram observadas do meio seletivo. Após sequenciamento para cobertura total do gene e alinhamento observou-se 99% de identidade dos fragmentos com toda a extensão do gene molde de UPEC UTI89 utilizado para o desenho do gene. Os mesmos fragmentos também apresentaram identidade com o genoma completo de UPEC NU14 (GenBank: CP019777.1), UTI89 (GenBank: CP000243.1) e 26-1 (GenBank: CP016497.1) entre 98 a 99% quando realizado o BLAST frente ao taxid 2, representativo dos organismos bacterianos.

A indução teste desta construção foi realizada inicialmente a temperatura de 18 ºC, mas assim como HlyA, não foi possível observar a presença da proteína CNF1 no SDS-PAGE e no *immunoblotting* com mobilidade eletroforética relativa de 114 kDa.

Os plasmídeos pQE-His-*hly*A e pQE-His-Flag-*cnf1* foram novamente construídos e inseridos em *E. coli* XL1-Blue para a expressão das respetivas proteínas, HlyA e CNF1. No entanto, para a construção contendo *hlyA* ocorreu o mesmo que no experimento anterior: apesar da presença de colônias na placa com meio seletivo e positivas para o gene por PCR, não foi observada presença do gene por sequenciamento.

Já a construção contendo *cnf1* foi sequenciada e apresentou novamente a presença do gene completo. Assim, foram testadas as temperaturas de 18, 20, 25, 30 e 37 ºC para a produção da proteína com base nos trabalhos de Grande et al. (2009) e Smith et al. (2015), mantendo os demais parâmetros já descritos. Dentre as condições testadas, observou-se a produção da toxina CNF1 quando realizada a 30 ºC. Esta produção foi observada por *immunoblotting* utilizando anticorpo contra a cauda de histidina. Esta proteína apresentou mobilidade eletroforética relativa de 100 kDa, condizente com o peso molecular de 114 kDa da toxina CNF1 (**Figura 5**).

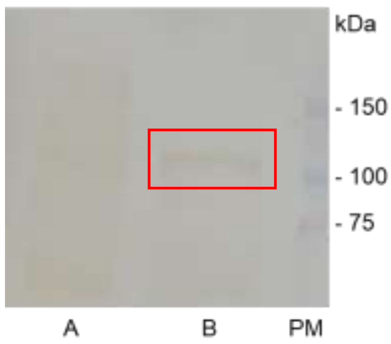


Figura 5. Membrana de nitrocelulose contendo extratos proteicos da toxina CNF1 pré e pós induzidos por IPTG analisada por *immunoblotting*.

PM. Padrão de massa molecular; A. XL1-Blue pré-indução por IPTG; B. XL1-Blue pós-indução com IPTG. O destaque em vermelho indica a proteína com mobilidade eletroforética relativa de 100 kDa.

Como este ensaio foi realizado com um volume de 9 mL de meio 2YT para indução, um novo lote foi produzido em volume maior. Contudo, não foi possível obter novamente a produção em nenhuma das inúmeras induções subsequentes desta proteína.

4.2. Estratégia 2 – As toxinas HlyA e CNF1 de baixo peso molecular

Com a utilização de novos genes sintéticos para a produção de parte da toxina HlyA e das subunidades A e B de CNF1 foi possível otimizar o processo de obtenção da proteína heteróloga. Uma vez que os processos de clonagem anteriores não foram bem-sucedidos, no entanto, foram transpostos com a aquisição do plasmídeo pronto para expressão da proteína.

Assim, o gene de *hlyA* e *cnf1* contidos em pET21a(+) foram clonados em *E. coli* DH5α para expansão clonal; bem como em BL21(DE3) para expressão das proteínas heterólogas. A indução dos genes evidenciou a produção de duas proteínas com mobilidade eletroforética relativa de 3,5 kDa em gel SDS-PAGE tricina em todos os casos, acima do esperado de 2 kDa. Após lise por sonicação foi possível observar presença de proteínas nas mesmas regiões tanto no sobrenadante, quando do agregado de proteínas insolúveis (**Figura 6**).

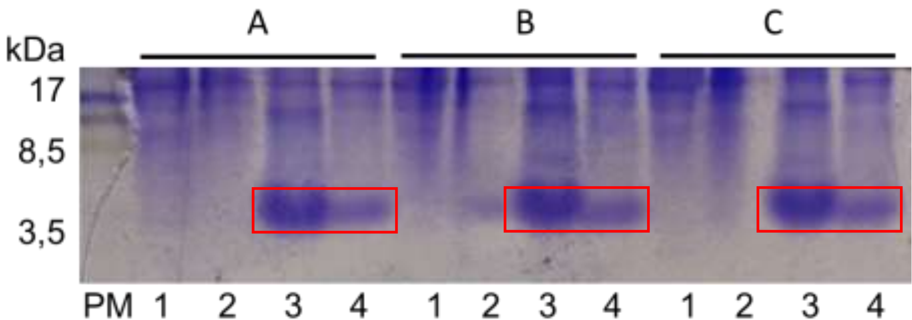


Figura 6. Induções analisadas por SDS-PAGE a 16% contento tricina corado com Coomassie blue. (A) Proteína HlyA; (B) Proteína CNF1 A; (C) Proteína CNF1 B; (PM) Padrão de Massa Molecular Cyvita Rainbow Low-Range (Thermo Fisher Scientific); (1) Sedimento de cultivo pré-indução com IPTG; (2) Sedimento de cultivo pós-indução com IPTG; (3) Fração solúvel após lise por sonicação; (4) Fração insolúvel após lise por sonicação. No destaque em vermelhobse encontra a expressão da proteína com mobilidade relativa a 3,5 kDa utilizadas para análise por espectrometria de massas.

As proteínas solúveis foram purificadas em cromatografia de afinidade a metal em coluna, contudo não ocorreu ligação da cauda de histidina ao níquel presente na coluna. Pelo perfil eletroforético observado, as proteínas estavam com mobilidade relativa maior que a esperada, uma vez que as proteínas HlyA, CNF1A e CNF1B parciais apresentam peso molecular teórico por volta de 2 kDa. Sendo assim, pensou-se na hipótese de as proteínas estarem se agregando em corpúsculos de inclusão ou se enovelando e não expondo a cauda de histidina.

Assim, foi utilizada a ureia como agente caotrópico para desnaturar as proteínas e realizar novamente a purificação por cromatografia de afinidade a metal. Nesta etapa também foram utilizadas as proteínas insolúveis. Novamente, não houve ligação da toxina parcial ao níquel, assim, foram submetidas às purificações em *batch* e lavagem de corpúsculo de inclusão. Após análise por SDS-PAGE tricina foi observado que a toxina sofreu precipitação durante o processo de retirada do agente caotrópico em todos os processos de purificação.

Em paralelo, por apresentar mobilidade eletroforética relativa divergente do peso molecular teórico as frações proteicas foram analisados por espectrometria de massas. No entanto, o resultado analisado contra o banco de dados de *E. coli* foi compatível com porinas e fatores de alongamento; e quando analisado contra as

sequências de toxinas especificas não houve identidade suficiente para ocorrer quaisquer alinhamentos.

4.3. Estratégia 3 – As toxinas HlyA e CNF1 intermediárias imunógenas

4.3.1. Biotinilação da porção catalítica da toxina CNF1

A avaliação da biotinilação da toxina CNF1 foi realizada por ensaios SDS-PAGE e ELISA utilizando estreptavidina. Como controle dos ensaios, foi utilizada a proteína GST, expressa no mesmo vetor pHH0103 e biotinilada. Primeiramente, foi realizado um gel de SDS-PAGE para avaliar o percentual de proteína que apresentava biotina em sua estrutura, pois durante a expressão nem todas as proteínas expressas são biotiniladas por *E. coli* BirA. Portanto, aplicando um gel em condições não redutoras, observamos a presença do CNF1 sozinho e quando incubado com estreptavidina em diferentes concentrações. Portanto, podemos calcular a porcentagem de biotinilação pela diferença observada no perfil eletroforético aparente da toxina isolada, com aproximadamente 35 kDa, e quando ligada à estreptavidina pelo software ImageJ (https://imagej.nih.gov/ij/download.html) **(Figura 7**).

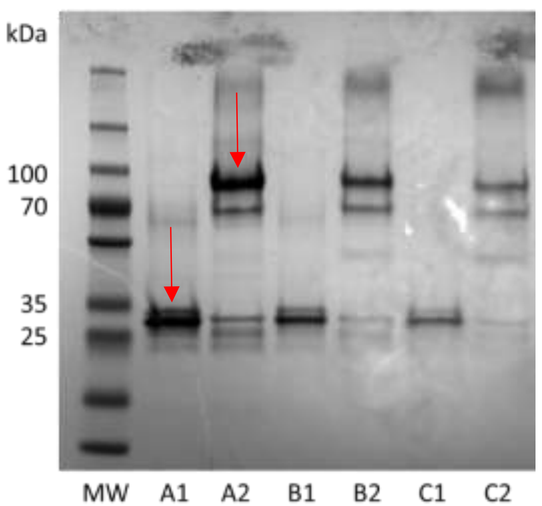


Figura 7. Ensaio de biotinilação da porção catalítica da toxina CNF1.

MW: Marcador de peso molecular, A1: toxina CNF1 5 µM, A2: toxina CNF1 5 µM com estreptavidina 1,5 µM, B1: toxina CNF1 2,5 µM, B2: toxina CNF1 2,5 µM com estreptavidina 1,5 µM, C1: toxina CNF1 1,25 µM, C2: Toxina CNF1 1,25 µM com estreptavidina 1,5 µM. Page Ruler Plus Prained Protein Ladder e Coomassie Blue. Setas indicam a toxina isolada e o complexo toxina-estreptavidina.

Como a capacidade da estreptavidina de se ligar à biotina é de 1:4 e nosso objetivo era ter excesso de ligante para garantir o reconhecimento, neste ensaio, aplicamos 1,5 moles de estreptavidina a 4 moles de proteína. A diferença entre a aplicação de CNF1 sozinho e a mesma quantidade com estreptavidina é mostrada visualmente com a diminuição da proteína nos 35 kDa esperados. Aplicando o software ImageJ e levando em consideração a área sob a curva, a toxina CNF1 está 91% biotinilada.

Outro teste utilizado para analisar a biotinilação e quantificar o reconhecimento do CNF1 pela estreptavidina via biotina conjugada foi o ELISA. Neste ensaio, uma curva de concentração de toxina foi realizada para tentar acessar o platô de reconhecimento (**Figura 8**). Assim, atingir a menor concentração de toxina necessária para ser efetivamente observada pela estreptavidina, e utilizada em ensaios futuros para a seleção de anticorpos recombinantes. Como resultado, a concentração de 2 µg/mL de CNF1 foi eleita para os ensaios anteriores.

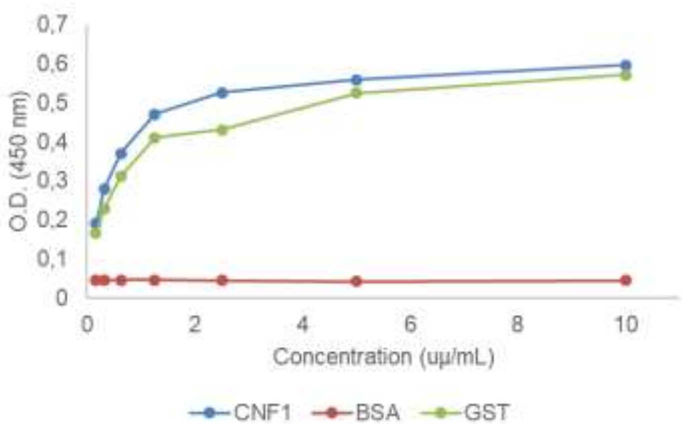


Figura 8. Ensaio ELISA de estreptavidina.

Agora, com a toxina CNF1 expressa em condições solúveis, a próxima etapa foi remover a proteína GST para facilitar o processo de seleção de anticorpos recombinantes, uma vez que anticorpos contra a proteína GST também podem ser selecionados. Para simplificar o processo de seleção, é interessante utilizar a proteína de interesse isolada, sem a presença de marcadores, principalmente com um tamanho considerável, como a GST de 25 kDa.

Portanto, várias estratégias foram utilizadas, como a modificação do vetor de expressão por meio de enzimas de restrição, a utilização de iniciadores e a

amplificação do dsDNA do vetor e, por fim, a modificação do vetor em sua estrutura de ssDNA. Infelizmente, nenhuma dessas estratégias foi eficaz e a cauda de GST não pôde ser removida, no entanto, a toxina CNF1 foi expressa de maneira solúvel.

4.3.2. Expressão das proteínas HlyA e CNF1 imunogênicas de peso molecular intermediário

As analises *in silico* das toxinas HlyA e CNF1 realizadas com auxílio do bioinformata Dr. José Salvatore L. Patané do Laboratório de Ciclo Celular do Instituto Butantan. As analises visaram identificar regiões imunogênicas das proteínas para selecionar pequenas sequências de DNA que foram obtidas comercialmente como genes sintéticos para novas clonagens e expressões.

As primeiras estruturas quaternárias das proteínas obtidas apresentaram estruturas lineares e com ausência de hélices ou folhas-beta, o que nos levou a trabalhar com regiões menores. A seleção destas regiões foi realizada com base nos resultados da predição linear de antigenicidade, que fornece a sequência de aminoácidos provável de ser um epitopo na proteína. Com estes dados foi possível eleger uma região contendo mais prováveis epitopos, em cada uma das toxinas, para a produção de novos genes sintéticos (**Figura 9**).

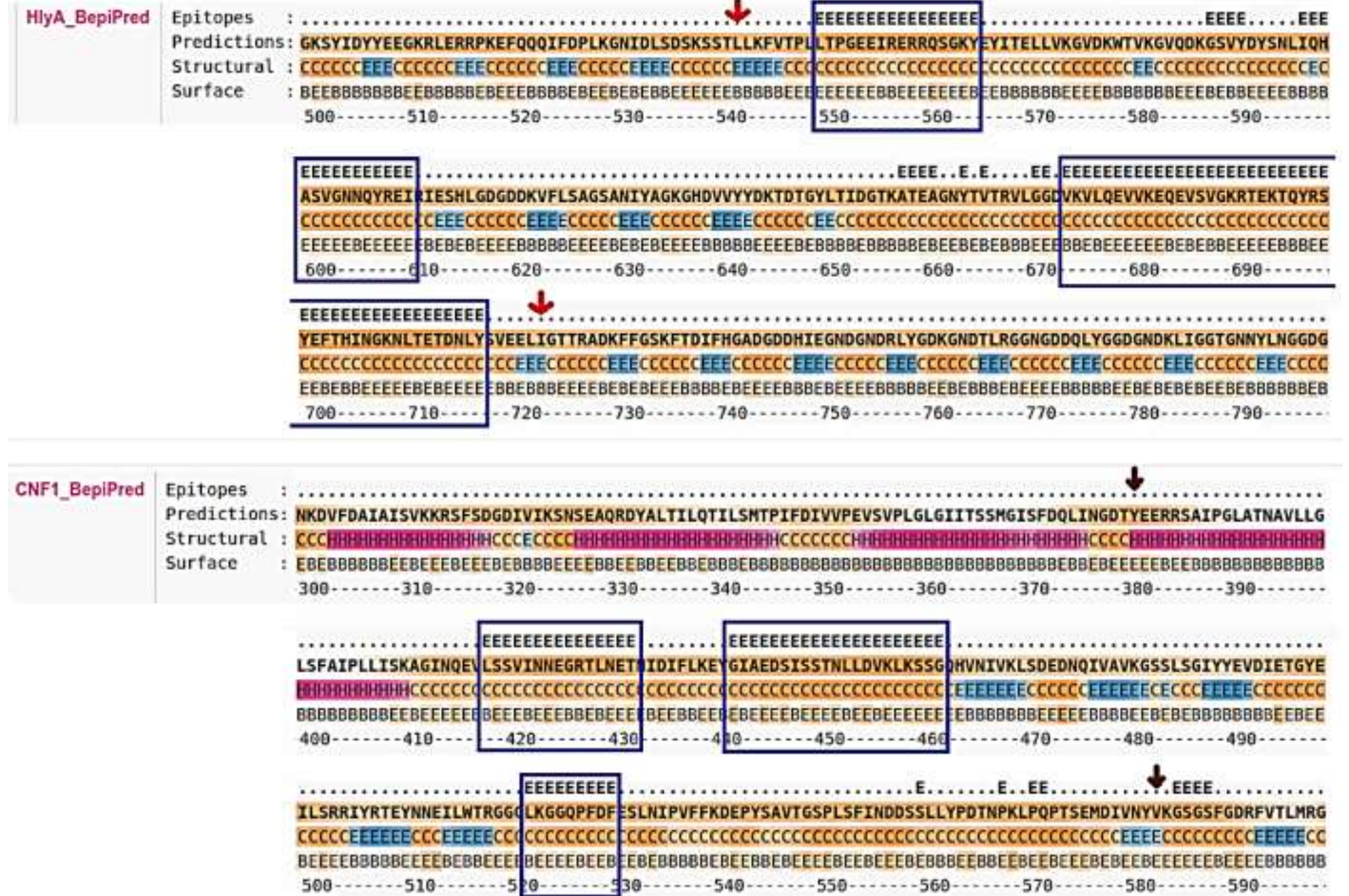


Figura 9. Predição de epitopos pelo programa BepiPred.

Os prováveis epitopos em HlyA e CNF1 estão destacados sem retângulos azuis. As setas indicam o início e o fim da sequência de aminoácidos selecionada em cada proteína para clonagem e expressão.

A solubilidade de cada porção foi avaliada, pois essas proteínas seriam expressas em sistema heterólogo. Diferentes softwares foram utilizados para assegurar a probabilidade de a região ser solúvel, e em todos o resultado foi similar, sendo um indicativo de que as proteínas seriam expressas de maneira otimizada. Assim, a toxina HlyA uma região de 182 aminoácidos (542aa – 723aa) foi selecionada apresentando 20,48 kDa. E para a toxina CNF1 uma porção de 203 aminoácidos (381aa – 583aa) com peso molecular de 22,43 kDa foi definida (**Figura 10**). A sequência do gene codificante para estas regiões foi encaminhada para síntese na empresa FastBio Ltda. EPP em vetor de expressão pET30a(+) contendo as enzimas de restrição NdeI e NotI, para possibilidade de extração e alteração do plasmídeo utilizado.

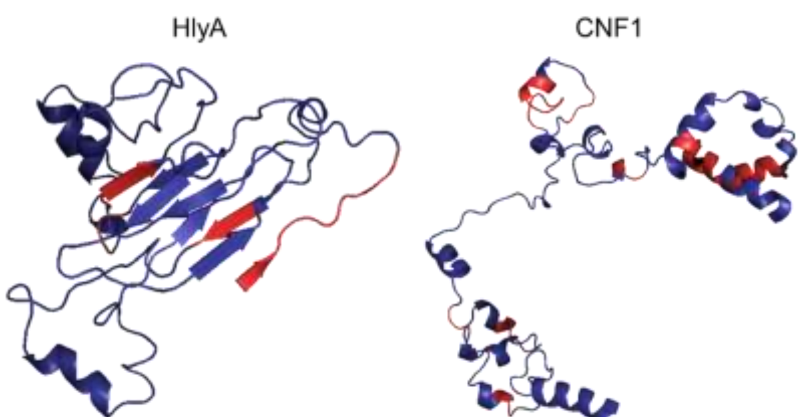


Figura 10. Predição da estrutura quaternária das regiões imunogênicas das toxinas HlyA e CNF1.

A estrutura em azul compreende em HlyA do 542aa ao 723aa, e em CNF1 do 381aa – 583aa. Os destaques em vermelho indicam as regiões de prováveis epítopos.

Após a inserção do gene sintético em bactérias *E. coli* C41(DE3), C43(DE3), BL21 Star (DE3) e BL21(DE3) pLysS e expressão, as proteínas foram analisadas por SDS-PAGE e *immunoblotting* para avaliar se estavam presentes no cultivo. Observamos dois perfis eletroforéticos com mobilidades relativas de 25 kDa e 37 kDa, sendo a primeira indicativa das proteínas parciais e a segunda de origem desconhecida, na melhor expressão obtida, na BL21(DE3) pLysS (**Figura 11**). Assim, foi realizada uma análise de espectrometria de massas *in gel* para acessar a identidade destas proteínas.

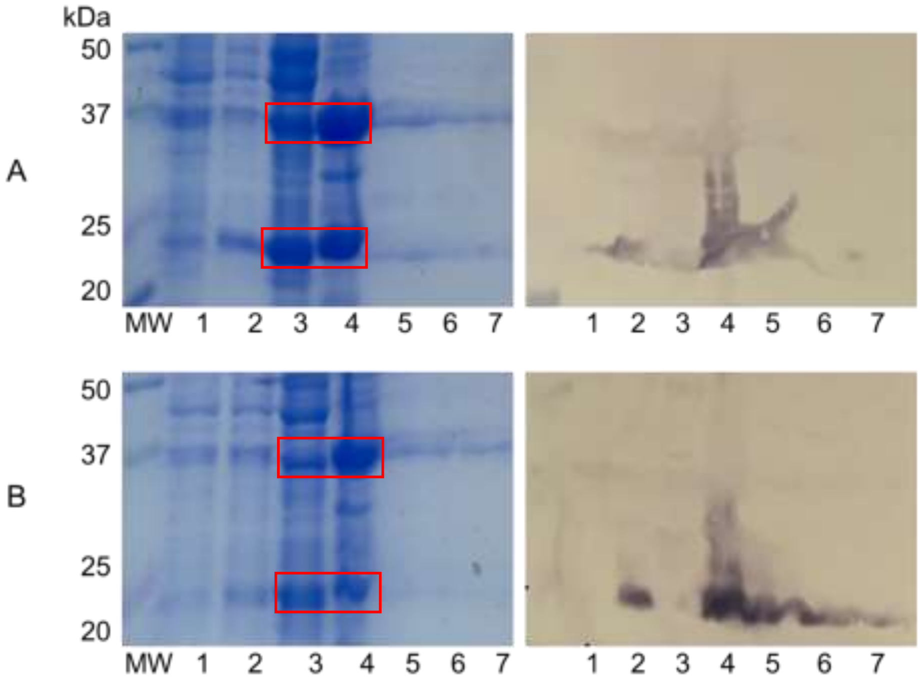


Figura 11. SDS-PAGE e *immunoblotting* das proteínas HlyA e CNF1.

A: HlyA; B: CNF1; 1: pré-induzido; 2: pós-induzido; 3: sobrenadante do sonicado; 4: sedimento do sonicado; 5, 6 e 7: frações da purificação. MW: marcador de peso molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope. Os destaques em vermelho indicam as bandas de gel submetidas a análise de espectrometria de massas.

Para a toxina parcial HlyA a mobilidade relativa de 25 kDa demonstrou ser indicativa de uma região da proteína alfa hemolisina de *E. coli* (UniProtKB: P09983, HLYAC_ECOLX), confirmando a identidade da proteína heteróloga. O perfil eletroforético em 37 kDa relevou ser uma porina de membrana externa (UniProtKB: P02931, OMPF_ECOLI), tipicamente encontrada em todas as bactérias. Para a toxina parcial CNF1 o perfil de 25 kDa foi indicativo de uma acetiltransferase de cloranfenicol (UniProtKB: P58777, CAT_KLESP), provavelmente devido ao cassete de resistência da bactéria hospedeira. A mobilidade relativa de 37 kDa os resultados indicaram uma gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (UniProtKB: P0A1P0, G3P_SALTY). Desse modo, foi possível avaliar a identidade da toxina parcial HlyA, comprovando que o gene sintético foi induzido e a proteína expressa, dessa forma gerando-se uma toxina solúvel. A **Tabela 4** mostra um resumo dos resultados obtidos.

Tabela 4. Resumo das estratégias de clonagem realizadas e das toxinas obtidas.

Toxina	Tamanho (kDa)	Vetor	Hospedeira	Expressão	Solubilidade
Estratégia 1 – Proteína integra					
HlyA	110	pET20a(+)	BL21(DE3)	Não	NA
		pQE30	XL1-Blue	Não	NA
CNF1	114	pET20a(+)	BL21(DE3)	Não	NA
		pQE30	XL1-Blue	Sim	NA
Estratégia 2 – Proteínas de baixo peso					
HlyA	2,09				
CNF1 A	2,32	pET21a(+)	BL21(DE3)	Não	NA
CNF1 B	1,8				
Estratégia 3 – Proteínas intermediárias					
CNF1 (UofT)	32,63	pHH0103	*E.coli* BirA	Sim	Solúvel
HlyA	20,48	pET30a(+)	BL21(DE3)pLysS	Sim	Solúvel
CNF1	22,43			Não	NA

NA: Não analisado este trabalho.

4.4. Análise genotípica e fenotípica das toxinas HlyA e CNF1 nos isolados de UPEC

4.4.1. Genótipo *hlyA* e *cnf1* nos isolados de UPEC

Neste trabalho estabeleceu-se dois métodos fenotípicos para avaliação da produção das toxinas HlyA e CNF1, hemólise em ágar sangue e nucleação de células HEp-2, respectivamente. Para tanto, uma coleção bacteriana de UPEC foi analisada inicialmente quanto a presença dos genes *hlyA* e *cnf1.* O gene *hlyA* foi observado em 28 isolados ou 36% e o gene *cnf1* em 18 isolados ou 23% dos isolados.

4.4.2. Hemólise com sobrenadante de isolados de UPEC

O ensaio de hemólise em ágar sangue é método padrão ouro para confirmar a ação da toxina HlyA. A presença do fenótipo hemolítico foi observada em 26 isolados ou 93% dos isolados portadores do gene *hlyA* (**Figura 12**), provavelmente em quatro

isolados há presença do gene sem se observar o fenótipo. E em dois isolados ocorreu hemólise sem a detecção do gene *hlyA.*

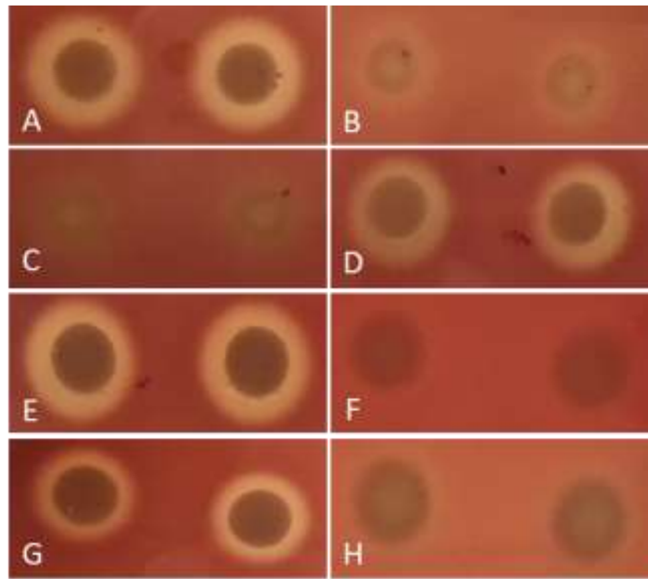


Figura 12. Figura representativa do ensaio hemolítico realizados em ágar sangue de carneiro.

A. UPEC J96 (*hlyA*+); B. *E. coli* DH5α (*hlyA*-); C. DV001 (*hlyA*-); D. DV003 (*hlyA*+); E. DV107 (*hlyA*+); F. DV111 (*hlyA*-); G. DV167 (*hlyA*+); H. DV168 (*hlyA*-). A presença do halo indica hemólise.

4.4.3. Multinucleação em HEp-2 com proteínas totais de UPEC

No ensaio de multinucleação foi observada a presença de diversos núcleos nas células, geralmente de dois a quatro. O controle negativo, sem presença de proteína, não apresentou multinucleação (**Figura 13, A**). Ao utilizar lisados de isolados *cnf1*- não ocorreu alteração celular. Já com a UPEC J96 e com todos os isolados *cnf1*+ houve a presença de múltiplos núcleos em cerca de 70% das células (**Figura 13**). Ainda, a correlação entre os genótipo e fenótipo observada foi de 92,85% para a toxina HlyA e de 100% para a toxina CNF1.

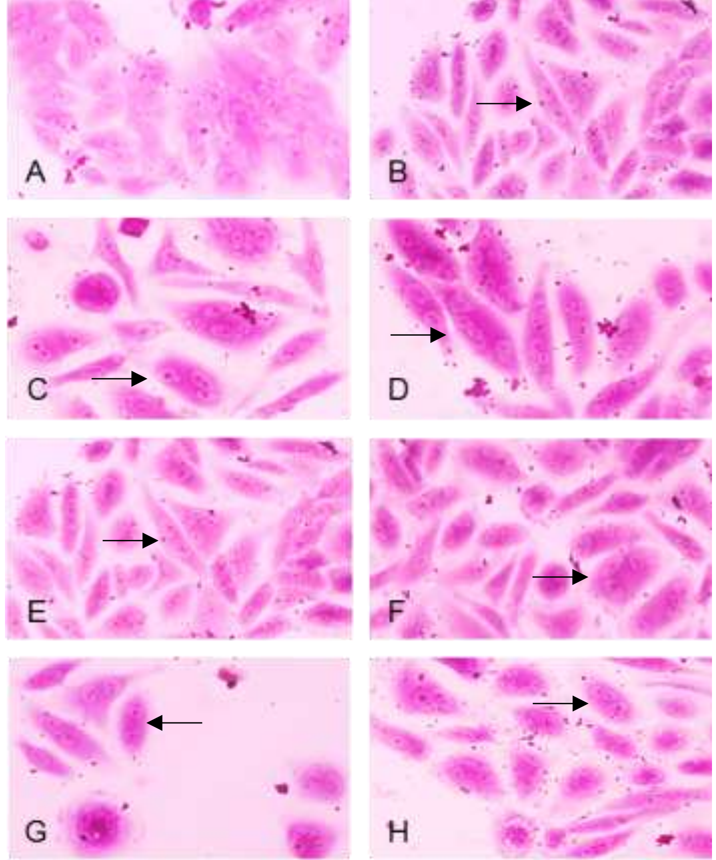


Figura 13. Figura representativa do ensaio de multinucleação realizado em células HEp-2.

A. Controle negativo; B. UPEC J96 (*cnf1*+); C. DV003 (*cnf1*+); D. DV035 (*cnf1*+); E. DV046 (*cnf1*+); F. DV074 (*cnf1*+); G. DV092 (*cnf1*+); H. DV167 (*cnf1*+). Imagens em aumento de 200X. Setas indicam células com multinucleação.

5. DISCUSSÃO

Infecções do trato urinário (ITU) afetam milhões de pessoas todos os anos e em cerca de 50 a 90% dos casos o organismo mais associado é a *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) (SHAH; BARAL; BARTAULA; SHRESTHA, 2019). Os fatores de virulência desta bactéria podem ser divididos em dois grandes grupos: componentes de membrana externa e proteínas secretadas. Dentre este último grupo se encontram as toxinas α-hemolisina (HlyA) e fator necrosante citotóxico 1 (CNF1). Ambas as toxinas demonstram ter funções substanciais e especificas na patogênese de UPEC e são capazes de iniciar fortes respostas pró-inflamatórias (GARCIA; VENTURA; SMITH; MERRELL *et al.*, 2013). Estas toxinas estão presentes nos isolados bacterianos relacionados com casos mais graves de ITU, assim, representando importantes alvos para a produção de anticorpos para terapias, vacinas e testes de diagnóstico para esta dispendiosa patologia.

Para podermos avançar na busca por soluções para os casos de ITU foi necessário entender as toxinas envolvidas nesta doença. Nesse sentido, contamos com a metodologia de produção de proteínas recombinantes, permitindo a construção e obtenção destas toxinas em ambiente controlado e reprodutível para seu estudo aprofundado. Desse modo, este trabalho se propôs a desenvolver métodos para a obtenção de diversas formas estruturais das toxinas HlyA e CNF1, visando contribuir para a construção do conhecimento acerca destas técnicas e consequentemente buscar soluções para o combate desta patologia.

Na primeira estratégia utilizada para obter as toxinas o racional se baseou em proteínas integras para mimetizar as condições reais de produção em casos de ITU. A técnica de clonagem das toxinas completas foi baseada em trabalhos que utilizaram a mesma metodologia (GRANDE; MEYSICK; RASMUSSEN; O'BRIEN, 2009; MEYSICK; MILLS; O'BRIEN, 2001; SMITH; WEINGARTEN; RUSSO; VENTURA *et al.*, 2015).

Nestes trabalhos, os autores utilizaram o vetor pQE30 por apresentar um promotor T5 otimizado com duas sequências que aumentam a ligação ao repressor *lac*, e asseguram uma repressão firme do promotor T5 para impedir expressão basal de proteínas toxicas. Os vetores pQE podem ser mantidos em qualquer cepa de *E. coli* que seja sensível à ampicilina e carregue o plasmídeo repressor de *lac* pREP4,

ou abrigue a deleção M15 do gene *lacI^{q}Z* no epissoma do fator F. Sendo assim, as cepas selecionadas para a expressão foram as *E. coli* XL1-Blue e *E. coli* M15/pREP4, por ambas as cepas apresentarem a deleção M15 no gene *lacZ* (BECKWITH, 1964). Trabalhos anteriores já utilizaram esta estratégia de obtenção de proteínas recombinantes, onde foi possível produzir a intimina e uma fimbria de *E coli* enteropatogênica capazes de ativar a resposta inflamatória em macrófagos (CAETANO; MOURÃO; ABREU; MONARIS *et al*., 2020) (Anexo A). No presente trabalho apenas a cepa XL1-Blue foi utilizada, segundo o fabricante estas cepas são ideais para armazenar e propagar plasmídeos pQE, além de serem usadas como hospedeiros de expressão (QIAGEN, 2003).

Ainda, uma vez que o DNA que foi inserido no plasmídeo por este racional apresentasse um tamanho significativo, correspondente a proteínas de cerca de 110 kDa as técnicas de clonagem precisaram ser analisadas de acordo. Vetores maiores apresentam melhores probabilidades de inserção dos genes grandes, pois conseguem abrigar o inserto com mais flexibilidade. Seguindo este raciocínio, também desenvolvemos uma estratégia alternativa de clonagem com o vetor pET20b(+), que apresenta tamanho de 3.716 pares de base, e pode ser transformado em bactérias das linhagem BL21(DE3), um sistema previamente estabelecido pelo grupo de trabalho onde este projeto foi realizado e amplamente utilizado em literatura (DUMON-SEIGNOVERT; CARIOT; VUILLARD, 2004; HARTINGER; HEINL; SCHWARTZ; GRABHERR *et al*., 2010; MIROUX; WALKER, 1996). Ainda, Navarro e Elias (2011) obtiveram duas proteínas de alto peso molecular de forma integra, Pet apresentando 104 kDa e Pic constituída de 109 kDa, da *E. coli* enteroagregativa. Para tanto utilizaram racionais similares ao empregado neste trabalho, como um vetor de tamanho grande, o pACYC184 de cerca de 4.245 pb; e também a cepa de expressão um *E. coli* HB101.

Para a obtenção da proteína HlyA integra foi utilizada a metodologia de obtenção do gene por meio da cepa de *E. coli* uropatogênica J96, visando a reprodução fiel do gene comprovadamente expresso em um isolado patogênico, para cobrir a possibilidade de possíveis mutações em sua sequência, como igualmente preconizado por Meysick (2001). Em outra alternativa, o gene de CNF1 foi obtido por meio de síntese laboratorial, já deste modo, para assegurar a correta sequência de nucleotídeos conforme anotado no banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Em ambos os casos, os plasmídeos foram extraídos e

analisados por sequenciamento utilizando a estratégia de *walking primers* para verificar, não somente sua inserção no vetor, mas também a sequência de nucleotídeos nas duas construções.

Nessa primeira estratégia, mostrou-se mais promissora a construção de CNF1 via gene sintético inserida no vetor pQE30 e expressa em *E. coli* XL1-Blue conforme postulado por Grande e colaboradores (2009) e Smith e colaboradores (2015). Apesar da expressão ter ocorrido em pequenos volumes e o escalonamento não apresentar parâmetros correlacionáveis, foi possível obter uma pequena quantidade de toxina, indicando assim uma potencial trajetória a trilhar na obtenção desta importante toxina de UPEC. Contudo, a expressão de proteínas de alto peso molecular apresenta diversos desafios. Aliado a isto, a utilização de proteínas integras para o objetivo do presente trabalho, de produzir toxinas enquanto ferramentas biotecnológicas para diagnostico e terapia de ITU, não se faz necessário que a proteína esteja em sua forma estrutural nativa e completa. Uma vez que, para a geração de anticorpos é possível utilizar apenas fragmentos da proteína para reconhecimento do epitopos (FELLOUSE; WIESMANN; SIDHU, 2004; GRANDE; MEYSICK; RASMUSSEN; O'BRIEN, 2009; MENESTRINA; ROPELE; DALLA SERRA; PEDERZOLLI *et al.*, 1995). Sendo assim, foi iniciada uma nova etapa de trabalho, cujo objetivo foi otimizar o processo de clonagem e expressão das proteínas recombinantes de UPEC.

Para tanto, a estratégia empregada foi a produção de proteínas de baixo peso molecular, objetivando a otimização da produção heteróloga das toxinas. Assim, proteínas de cerca de 2 kDa foram propostas levando em consideração as suas regiões mais hidrofílicas, seguindo o preconizado por Calabria e colaboradores (2019). Neste trabalho, por meio de análise *in silico*, foram selecionadas regiões hidrofílicas de duas toxinas comuns a diversas espécies da aranha marrom (*Loxosceles* ssp.) para a sua produção em sistema heterólogo, gerando uma toxina hibrida em corpos de inclusão, mas capaz de produzir anticorpos neutralizantes. Esta estratégia de seleção de regiões comuns a diferentes alelos já havia sido anteriormente empregada pelo grupo em trabalhos anteriores com sucesso, obtendo uma toxina de *E. coli* diarreiogênica capaz de gerar anticorpos para o desenvolvimento de propostas de testes para o diagnóstico imunossorológico (CAETANO; ROCHA; CARVALHO; PIAZZA *et al.*, 2017) (Anexo B).

Além disso, em outros trabalhos desenvolvidos durante o período foi possível adquirir conhecimento acerca da estrutura de proteínas recombinantes passível de

reconhecimento por anticorpos. Em trabalho realizado com o vírus da Dengue e Zika foi possível identificar regiões expostas da proteína viral NS1, cujo reconhecimento foi identificado a nível da sequência de aminoácidos (ROCHA; ALVES; CAETANO; PEREIRA *et al.*, 2017) (Anexo C). E também, outro trabalho apresentando os domínios imunogênicos e estrutura secundária de uma toxina de *E. coli* diarreiogênicas, obtida de maneira heteróloga (CAETANO; ROCHA; CARVALHO; PIAZZA *et al.*, 2017) (Anexo B). Demonstrando assim, a busca e a obtenção de conhecimento cientifico relativo a produção, estrutura e regiões imunogênicas de toxinas produzidas pela metodologia recombinante.

Desse modo, os genes codificantes das porções hidrofílicas das toxinas foram produzidos por via sintética, também visando a otimização de performance e tempo. A construção foi realizada em pET21a(+) para aproveitar as vantagens de indução do promotor T7 e pela facilidade de utilização das cepas BL21(DE3), protocolo já estabelecido no grupo de trabalho e na literatura (CAETANO; ROCHA; CARVALHO; PIAZZA *et al.*, 2017; DUMON-SEIGNOVERT; CARIOT; VUILLARD, 2004; MIROUX; WALKER, 1996). No entanto, apesar de identificar a presença de proteína próximo ao perfil de mobilidade eletroforética esperada, foi necessário modificar a estratégia de purificação, pois a metodologia anteriormente empregada de purificação em sistema ÄKTA não mostrou resultados positivos. Hipoteticamente, a proteína poderia estar em uma conformação estrutural diferente da teórica ou em agregados, impedindo a exposição da cauda de histidina, e consequentemente sua ligação com o níquel das colunas empregadas para purificação, como observado por Hartinger e colaboradores (2010) e Zhao e colaboradores (2021) que também obtiveram proteínas heterólogas insolúveis utilizando cepas *E. coli* BL21(DE3).

Neste processo houve a necessidade de utilizar um agente caotrópico para desnaturar a proteína produzida na tentativa de expor a cauda de histidina e otimizar sua afinidade ao metal da coluna, mesmo que este processo apresente risco de precipitação da toxina. Posteriormente, buscamos a alternativa de purificação em *batch*, onde é possível incubar a solução contendo níquel com a proteína recombinante pelo tempo desejado, aumentando a probabilidade de ligação (GE HEALTHCARE, 2000; PROMEGA, 2013). Para Bonhoure e colaboradores (2018) a estratégia de purificação em *batch* permitiu a produção de uma proteína oncogênica do papiloma vírus humano, após expressão em cepas *E. coli* BL21(DE3), em uma rápida e única etapa utilizando resina de níquel-agarose. Apesar da similaridade com

trabalhos na literatura, na nossa experiência, esta estratégia não logrou resultados e não foi possível obter as toxinas de baixo peso.

Ainda, com estas proteínas realizamos a análise de espectrometria de massas para verificar a identidade das toxinas. O resultado contra o banco de dados de *E. coli* foi compatível com porinas e fatores de alongamento em perfil de mobilidade eletroforética divergente da esperada para as proteínas recombinantes, indicando que as toxinas alvo não foram expressas e esclarecendo a problemática transcorrida durante os processos de purificação empregados. Ainda, a produção dessas proteínas de *E. coli* identificadas durante a análise de espectrometria de massas pode ser devido ao uso de IPTG, um análogo da lactose. Como algumas proteínas têm sua expressão mediada pela presença desse açúcar, utilizar uma molécula semelhante pode ser responsável pela indução excessiva (BHAGAVAN; HA, 2015; COOPER, 2000; GROGAN, 2012). Além disso, a própria replicação bacteriana que ocorre em grande quantidade durante a expressão da proteína heteróloga pode também levar a esse resultado.

Na etapa seguinte do projeto e tendo os objetivos propostos, procuramos por colaborações que possuíssem expertise na área de produção de proteínas. Assim, inicialmente buscamos contato com o Dr. Emmanuel Lemichez e o Dr. Daniel Gillet, pesquisadores do Instituto Pasteur e do CEA (Centro de Energia Atômica) unidade de Saclay na França. Este contato foi realizado decorrente da experiência do grupo de pesquisa internacional em toxinas bacterianas e mais especificamente nas que atuam sobre GTPases e hemolisinas (BOYER; LEMICHEZ, 2015; DIABATE; MUNRO; GARCIA; JACQUEL *et al.*, 2015; LEMICHEZ, 2017; LEMONNIER; LANDRAUD; LEMICHEZ, 2007; MAHTAL; BREWEE; PICHARD; VISVIKIS *et al.*, 2018; MICHEL; FERRUA; MUNRO; BOYER *et al.*, 2016). Com foco em entender o mecanismo de ação das toxinas bacterianas com maior importância na saúde pública, desenvolvendo ensaios diretamente com as próprias toxina HlyA e CNF1 (LEMICHEZ; BARBIERI, 2013; LEMICHEZ; FLATAU; BRUZZONE; BOQUET *et al.*, 1997). E ainda, por possuir vasta experiência em clonagem de toxinas de alta massa molecular utilizando cosmídeos e fagemídeos.

O racional utilizado pelo Instituto Pasteur e CEA Saclay para obtenção das toxinas HlyA e CNF1 está de acordo com o realizado previamente no presente trabalho, seguindo a metodologia de Meysick e colaboradores (2001), Grande e colaboradores (2009) e Smith e colaboradores (2015). Desse modo, a colaboração foi

idealizada como um estágio de intercâmbio para a instituição estrangeira com o objetivo de ampliar os conhecimentos acerca de métodos de clonagem e expressão de proteínas recombinantes. Contudo, devido a impasses burocráticos de obtenção de visto, o intercâmbio não foi concretizado. Assim, o Dr. Emmanuel e o Dr. Daniel gentilmente nos cederam as construções plasmidiais e os protocolos de expressão das toxinas HlyA e CNF1 (LEMONNIER; LANDRAUD; LEMICHEZ, 2007). Entretanto, a metodologia de obtenção das proteínas apresentava um processo longo e custoso, envolvendo cultivo em biorreatores e purificação sequencial em mais de uma coluna de afinidade e metal e troca iônica, fazendo com que o processo não fosse adequado a proposta do presente trabalho de otimização da produção heteróloga destas toxinas, dada a demanda de infraestrutura necessária e o tempo total para produção das proteínas recombinantes.

Neste momento, já estávamos em contado com outro grupo de pesquisa internacional, do Canadá, o grupo do Dr. Sachdev Sidhu. O laboratório de pesquisa faz parte do *Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research of Toronto University*. Sendo o Dr. Sachdev atuante no campo de engenharia de proteínas e tecnologias que exploram e moldam estruturas e funções proteicas. Anteriormente, já realizamos colaborações que permitiram a publicação de artigos científicos (LUZ; CHEN; MARANHÃO; ROCHA *et al.*, 2015; LUZ; SHIGA; CHEN; QUINTILIO *et al.*, 2018). Ainda, contamos com a colaboração do Dr. Shane Miersch, pesquisado sênior do mesmo grupo de pesquisa, e que contribuiu para a construção da porção catalítica da toxina CNF1 com a adição de uma porção de hélice alfa no início da toxina parcial, para uma possível melhora na futura seleção de anticorpos.

Igualmente, foi proposto um estágio de intercâmbio para realização desta colaboração, sendo desta vez concretizado em janeiro de 2020. Na Universidade de Toronto a construção referente a CNF1 já havia sido previamente realizada, na primeira configuração estrutural proposta. Anteriormente, essa versão da porção catalítica de CNF1 foi obtida pela empresa GenScript (Estados Unidos), sendo que a metodologia empregada de produção em sistema heterólogo resultou em uma proteína localizada em corpúsculos de inclusão. Com isso, a proteína recombinante foi submetida a ação de agente caotrópico e processo de redobramento como etapas adicionais no seu processo de obtenção, tais etapas também sendo realizadas pela própria empresa. A seleção de anticorpos sintéticos foi realizada utilizando esta toxina parcial, contudo, não foi capaz de obter anticorpos com alta avidez.

Segundo o Dr. Shane Miersch (comunicação oral) a estrutura quaternária das proteínas é de vital importância para a adequada seleção de anticorpos sintéticos, uma vez que o reconhecimento dos epitopos pode ocorrer em regiões tridimensionais e não lineares das proteínas. Em seus anos de experiência enquanto engenheiro de anticorpos ele pôde observar a importância da estrutura quaternária das proteínas recombinantes para seleção deste tipo de anticorpos de alta avidez, sendo assim, uma nova versão da toxina CNF1 foi idealizada, com uma região de alfa-hélice adicional e em vetor para ser expresso no laboratório da Universidade de Toronto, objetivando obter a proteína recombinante de maneira solúvel, eliminando as etapas de desnaturação e reenovelamento de sua estrutura.

A porção catalítica otimizada de CNF1 foi adquirida pela empresa americana Twist Bioscience já no plasmídeo pHH0103, vetor bem estabelecido para expressões heterólogas no laboratório do Dr. Sachdev (MIERSCH; LI; HANNA; MCLAUGHLIN *et al.*, 2015; MIERSCH; SIDHU, 2012). Não houve dificuldades em realizar a inserção em *E. coli* BirA e expressar a proteína recombinante da porção catalítica de CNF1. Esta construção conta com a presença de uma proteína GST para contribuir com a solubilidade da toxina de interesse, como também realizado por grupos nacionais na produção de peptídeos do veneno de serpentes jararaca com atividade biológica de agregação plaquetária e adesão a células endoteliais (DELLA-CASA; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO; BUTERA; CLISSA *et al.*, 2011). E também com uma região Avi responsável pela biotinilação para reconhecimento da proteína em ensaios imunossorológicos, sendo esta uma estratégia igualmente utilizada em trabalhos prévios para o desenvolvimento de ensaio de ELISA para o diagnóstico de diarreia causada por *E. coli* enterohemorrágica e enteropatogênica (CAETANO, 2016). Ensaios para confirmar a expressão e quantidade de biotina ligada a proteína foram realizados conforme os protocolos do laboratório e comprovaram a produção da toxina CNF1 com êxito (FELLOUSE; SIDHU, 2006).

Embora a proteína GST tenha sido essencial para a solubilidade da toxina recombinante sua presença pode, nas etapas futuras preconizadas de seleção de anticorpos, ser um fator de interferência. Isto é devido ao fato de anticorpos apresentarem alguma afinidade a GST e serem selecionados em vez de anticorpos ligantes a toxina alvo CNF1. Apesar de podermos realizar um controle de seleção utilizando GST para excluir anticorpos que reconheçam esta proteína, este processo demanda mais tempo, pois devemos primeiro excluir os anticorpos afins a GST para

então realizar a seleção contra a toxina de UPEC. Além disso, a manipulação dos anticorpos no laboratório do Dr. Sachdev envolve a utilização de vírus bacteriófagos, uma vez que se empregam anticorpos sintéticos produzidos pela tecnologia de *phage display*. Tais bibliotecas de anticorpos sintéticos devem ser manipuladas com cautela e do modo mais racional possível, assim, trabalhar com uma proteína recombinante sem a fusão com GST é uma estratégia de preferência no laboratório.

Diversas metodologias foram empregadas para remoção de GST da toxina CNF1, tais como, modificação do vetor de expressão por meio de enzimas de restrição, utilização de iniciadores para amplificação do dsDNA do vetor e, por fim, a modificação do vetor em sua estrutura de ssDNA (FELLOUSE; SIDHU, 2006). Contudo, nenhuma dessas estratégias foi eficaz e a cauda de GST não pôde ser removida. Esses testes seriam reavaliados e reempregados, no entanto, durante este período, sofremos o agravo da pandemia do COVID-19 e a Universidade de Toronto, bem como todo o Canadá, entraram em quarentena. Assim, houve um retorno antecipado ao Brasil e interrupção dos experimentos. No entanto, a colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Sachdev Sidhu continua e novos ensaios com a toxina CNF1 serão realizados pela equipe estrangeira e continuados no Brasil assim que possível. O Laboratório do Dr. Sachdev Sidhu está na vanguarda da pesquisa no Canadá e, até o momento, apenas as pesquisas relacionadas ao novo coronavírus estão tendo prosseguimento.

Após retorno ao Brasil e com o conhecimento adquirido nas experiências anteriores uma nova estratégia de produção das toxinas recombinantes foi idealizada. Baseada na análise de regiões possivelmente imunogênicas de HlyA e CNF1, visando obter proteínas solúveis e capazes de gerar anticorpos com potencial neutralizante em um futuro próximo para emprego como ferramentas biotecnológicas. Nesse sentido, paralelamente, trabalhos foram realizados na área de desenvolvimento de teste de diagnósticos para outras toxinas bacterianas. Testes rápidos utilizando a metodologia de fluxo lateral e de aglutinação em látex foram desenvolvidos para a toxina termolábil de *E. coli.* enterotoxigênica (HENRIQUE; CAETANO; MITSUNARI; DOS SANTOS *et al.*, 2018) (Anexo D) e também para a toxina de Shiga da *E. coli* produtora da toxina de Shiga (LUZ; AMARAL; SACERDOTI; BERNAL *et al.*, 2018) (Anexo E); (SILVA; SANTOS; ROCHA; CAETANO *et al.*, 2019) (Anexo F). Nestes trabalhos, além de adquirir expertise para a produção futura de um teste imunocromatográfico para detecção e diagnóstico de ITU causada por UPEC, por

meio do reconhecimento das toxinas HlyA e CNF1; foi possível também ampliar os conhecimentos acerca da produção de proteínas recombinantes, dado que os anticorpos utilizados nestes dois últimos trabalhos foram produzidos por esta metodologia.

Nesta nova etapa contamos com o auxílio do bioinformata Dr. José Salvatore L. Patané do Laboratório de Ciclo Celular do Instituto Butantan para o design *in silico* das proteínas recombinantes de HlyA e CNF1. Para esta estratégia foi utilizado o racional adquirido com as experiências previas e focamos em regiões que por predição computacional pudessem ser prováveis epitopos, fazendo com que essas fossem mais expostas nas proteínas, e permitissem no futuro a produção de anticorpos neutralizantes. O mesmo racional já havia sido empregado com o desenvolvido para proteínas de baixo peso molecular, porém acreditamos que devido ao seu tamanho reduzido a expressão heteróloga foi prejudicada. Assim, objetivou se um desenho estrutural que fornecesse proteínas de tamanho intermediário, visto o melhor sucesso ao se trabalhar com a expressão da porção catalítica de CNF1 com cerca de 33 kDa. Para produção optamos por utilizar um gene sintético em vetor pET30a(+) por ser um sistema estabelecido no grupo de pesquisa e podermos contar com diferentes cepas bacterianas para clonagem e expressão destas toxinas intermediárias.

Após testes com diversas bactérias, a *E. coli* BL21(DE3) pLysS apresentou expressão das duas proteínas recombinantes com perfil de mobilidade eletroforética condizente com o esperado. Este resultado difere de trabalhos da literatura, onde Miroux e Walker (1996) expressaram proteínas de membrana de *E. coli* em cepas de C41(DE3) e C43(DE3) com maior eficiência para superar os efeitos tóxicos de superexpressão quando comparado a BL21(DE3). Dumon-Seignovert e colaboradores (2004) sequer conseguiram obter transformantes com a cepa BL21(DE3) em 62% dos vetores testados. Em contrapartida, Hartinger e colaboradores (2010) conseguiram expressar uma aminotransferase fúngica em diversos lisógenos de DE3, incluindo a BL21. Contudo, estes autores obtiveram a proteína na fração insolúvel em corpúsculos de inclusão, assim como no presente trabalho. Ainda, Zhao e colaboradores (2021) obtiveram uma enterotoxina de *E. coli* diarreiogênica em cepas de BL21(DE3) também em corpúsculos de inclusão, mesmo com expressão a baixas temperaturas e com ajuste do indutor IPTG. Assim, podemos observar a tendência de cepas *E. coli* BL21(DE3), apesar de expressarem as

proteínas recombinantes, o fazem na fração insolúvel, necessitando de etapas adicionais para a sua obtenção, como foi o caso do ocorrido no presente trabalho.

Em seguida, testes de purificação das proteínas em sistema ÄKTA foram realizados, contudo, nas frações purificadas não foram observadas a presença das respectivas proteínas. Para comprovação da identidade a análise de espectrometria de massas *in gel* foi realizada, mostrando que a toxina recombinante parcial de HlyA apresentou identidade com porinas, classe de proteínas da qual faz parte, confirmando sua expressão.

Em vista da problemática exposta referente a gravidade dos casos de ITU causadas por UPEC, e da severidade do quadro clinico quando presentes as toxinas HlyA e CNF1, a produção as proteínas heterólogas apresenta um meio para o estudo e prospecção de novos métodos diagnósticos e terapia dessa patologia. Em consenso com o objetivo do presente trabalho, as estratégias que lograram mais resultados na produção das toxinas HlyA e CNF1 de UPEC foram as metodologias para produção de proteínas recombinantes integras, como o caso de CNF1, e de tamanho intermediário, para ambas das toxinas. Indicando assim, duas estratégias mais promissoras na produção dessas toxinas, sendo que, devida a experiência do presente trabalho, a estratégia de produção de regiões imunogênicas se sobressai sobre as demais para a obtenção otimizada das proteínas recombinantes.

Em paralelo, caracterizou-se isolados bacterianos de UPEC, essa caracterização é de grande importância, não somente para avaliar o perfil epidemiológico das cepas que acometem a população, mas também para sua utilização como controles de qualidade em ensaios laboratoriais que visam desenvolver novos métodos diagnosticos e novas terapias para as ITU causadas por UPEC. Ainda, os isolados após caracterizados podem ser utilizados como confiáveis padrões para a produção de proteínas recombinantes, integras ou parciais.

Dessa forma, os isolados bacterianos foram cedidos ao Laboratório de Bacteriologia pelo Hospital Infantil Darcy Vargas, e com esta coleção foram realizados ensaios para verificar a presença de HlyA e CNF1. Em análise de genótipo a coleção apresentou concordância com outros achados em literatura, dois trabalhos com 156 pacientes, um na Índia e outro no Irã, apresentando 29% e 30,8% para hlyA e 29,5% e 36,5% para cnf1, respectivamente (CHAKRABORTY; ADHIKARI; SHENOY; SARALAYA, 2017; TABASI; KARAM; HABIBI; MOSTAFAVI *et al.*, 2016). Outro grupo na França com um número maior de pacientes, 210 indivíduos, encontrou 27,5% de

frequência para hlyA e 28% para cnf1 (LAVIGNE; BRUYERE; BERNARD; COMBESCURE *et al.*, 2016).

A presença do gene não necessariamente implica na produção da proteína, por exemplo, pode não haver mais a necessidade do isolado bacteriano de produzir determinada toxina, pois não se encontra mais em meio que apresente estresse para a bactéria (PONCIANO; DE GELDER; TOP; JOYCE, 2007). Assim, ensaios de fenótipo também foram realizados, para verificar a produção das toxinas por cada isolado bacteriano.

Para HlyA foi realizado o ensaio de hemólise em ágar sangue, uma vez que essa toxina apresenta atividade hemolítica. A coleção de isolados bacterianos do Hospital Darcy Vargas apresentou atividade hemolítica em 93% dos isolados, este dado é um forte indicativo de que essas bactérias estão produzindo toxinas HlyA. Nos casos em que observamos hemólise sem presença do gene de *hlyA* de UPEC podemos considerar que a hemólise está ocorrendo por outros mecanismos que não mediado por HlyA. Podemos levantar a hipótese de que pode haver a transferência horizontal de DNA bacteriano entre diferentes patotipos de *E. coli* patogênicas, e o isolado adquiriu a hemolisina de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (MAGALHAES; ROSSATO; BARBOSA; DOS SANTOS *et al.*, 2011). Também são conhecidos sistemas de dois componentes como o BarA-UvrY que podem estar envolvidos na regulação de alguns fatores de virulência, sendo já demonstrado que a mutação desse sistema reduz a ocorrência de hemólise (PALANIYANDI; MITRA; HERREN; LOCKATELL *et al.*, 2012).

Já para CNF1, o ensaio de multinucleação foi realizado, uma vez que a capacidade de afetar o mecanismo celular a ponto de ocorrer multinucleação é uma característica previamente descrita desta toxina (MILLS; MEYSICK; O'BRIEN, 2000). A produção de proteínas ocorreu em 100% dos isolados, evidenciado pela multinucleação em células HEp-2, sendo estes resultados de acordo com a literatura acerca desta alteração causada nesta linhagem celular (GRANDE; MEYSICK; RASMUSSEN; O'BRIEN, 2009; MEYSICK; MILLS; O'BRIEN, 2001; MILLS; MEYSICK; O'BRIEN, 2000; RIPPERE-LAMPE; O'BRIEN; CONRAN; LOCKMAN, 2001; SMITH; WEINGARTEN; RUSSO; VENTURA *et al.*, 2015). Ainda, a padronização dos ensaios para caracterização dos isolados bacterianos de UPEC Hospital Infantil Darcy Vargas nos fornecem ferramentas para o controle de qualidade dos anticorpos que serão produzidos futuramente contra as toxinas heterólogas obtidas a partir deste trabalho.

6. CONCLUSÃO

No presente trabalho foram apresentadas três estratégias de clonagens para a geração das toxinas HlyA e CNF1 recombinantes. Dentre as abordagens de clonagem e expressão destacamos a obtenção da toxina HlyA de peso intermediário com base na análise *in silico* de suas propriedades. E para CNF1 destacamos a obtenção da proteína integra e também da proteína recombinante utilizando apenas sua porção catalítica.

Ademais, caracterizamos uma coleção de isolados bacterianos de UPEC quanto a presença dos genes *hlyA* e *cnf1* e a capacidade desses isolados de produzirem as toxinas correspondentes. Esta coleção é de grande valia para ensaios futuros utilizando ferramentas biotecnológicas, como anticorpos recombinantes, para o diagnóstico e terapia de ITU causadas por UPEC.

REFERÊNCIAS

ALOUF, J.; LADANT, D.; POPOFF, M. R. **The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins**. 4 th ed. Elsevier, 2015. 1200 p. 978-0-12-800188-2.

BAKAS, L.; MATE, S.; VAZQUEZ, R.; HERLAX, V. Action mechanism of Escherichia coli alpha-hemolysin toxin. **Acta Bioquimica Clinica Latinoamericana**, 47, n. 2, p. 353-361, 2013.

BARBER, A. E.; NORTON, J. P.; WILES, T. J.; MULVEY, M. A. Strengths and limitations of model systems for the study of urinary tract infections and related pathologies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 80, n. 2, p. 351-367, 2016.

BECKWITH, J. R. A DELETION ANALYSIS OF THE LAC OPERATOR REGION IN ESCHERICHIA COLI. **J Mol Biol**, 8, p. 427-430, Mar 1964.

BEUTIN, L.; MONTENEGRO, M. A.; ORSKOV, I.; ORSKOV, F. *et al.* Close association of verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of Escherichia coli. **J Clin Microbiol**, 27, n. 11, p. 2559-2564, Nov 1989.

BHAGAVAN, N. V.; HA, C. E. **Regulation of Gene Expression**. Elsevier, 2015. (Essentials of Medical Biochemistry.

BONHOURE, A.; DEMENGE, A.; KOSTMANN, C.; SAN JOSÉ, L. *et al.* One-step affinity purification of fusion proteins with optimal monodispersity and biological activity: application to aggregation-prone HPV E6 proteins. **Microb Cell Fact**, 17, n. 1, p. 191, Dec 2018.

BOYER, L.; LEMICHEZ, E. Switching Rho GTPase activation into effective antibacterial defenses requires the caspase-1/IL-1beta signaling axis. **Small GTPases**, 6, n. 4, p. 186-188, 10 2015.

BURNETT, J. C.; RUTHEL, G.; STEGMANN, C. M.; PANCHAL, R. G. *et al.* Inhibition of metalloprotease botulinum serotype A from a pseudo-peptide binding mode to a small molecule that is active in primary neurons. **J Biol Chem**, 282, n. 7, p. 5004-5014, Feb 2007.

CAETANO, B. A. **Propostas de desenvolvimento e padronização de testes diagnósticos para Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) e E. coli enterohemorrágica (EHEC) pela detecção da proteína EspB**. Orientador: PIAZZA, R. M. F. 2016. 118 f. - Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo.

CAETANO, B. A.; MOURÃO, D. B.; ABREU, P. A. E.; MONARIS, D. *et al.*, 2020, **Macrophage Inflammatory Response Mediated by Intimin and Bundle-Forming Pilus from Enteropathogenic Escherichia coli**. MDPI, 2020. 21. 1 v.

CAETANO, B. A.; ROCHA, L. B.; CARVALHO, E.; PIAZZA, R. M. F. *et al.* Immunogenic Domains and Secondary Structure of. **Front Immunol**, 8, p. 477, 2017.

CALABRIA, P. A. L.; SHIMOKAVA-FALCAO, L. H. A. L.; COLOMBINI, M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. *et al.* Design and Production of a Recombinant Hybrid Toxin to Raise Protective Antibodies Against. **Toxins (Basel)**, 11, n. 2, Feb 2019.

CAPRIOLI, A.; FALBO, V.; RODA, L. G.; RUGGERI, F. M. *et al.* Partial purification and characterization of an escherichia coli toxic factor that induces morphological cell alterations. **Infect Immun**, 39, n. 3, p. 1300-1306, Mar 1983.

CARDWELL, S. M.; CRANDON, J. L.; NICOLAU, D. P.; MCCLURE, M. H. *et al.* Epidemiology and economics of adult patients hospitalized with urinary tract infections. **Hosp Pract (1995)**, 44, n. 1, p. 33-40, 2016.

CARRATALÁ, J. V.; CISNEROS, A.; HELLMAN, E.; VILLAVERDE, A. *et al.* Title: insoluble proteins catch heterologous soluble proteins into inclusion bodies by intermolecular interaction of aggregating peptides. **Microb Cell Fact**, 20, n. 1, p. 30, Feb 2021.

CAVALCANTE, D. M.; OLIVEIRA, M. R. F. D.; REHEM, T. C. M. S. B. Internações por condições sensíveis à atenção primária: estudo de validação do SIH/SUS em hospital do Distrito Federal, Brasil, 2012. **Cadernos de Saúde Pública**, 32, n. 3, 2016.

CHAKRABORTY, A.; ADHIKARI, P.; SHENOY, S.; SARALAYA, V. Molecular characterisation of uropathogenic. **Indian J Med Microbiol**, 35, n. 2, p. 305-310, 2017 Apr-Jun 2017.

CHANG, A. C.; KRISHNAN, S.; PRASADARAO, N. V. The effects of cytotoxic necrotizing factor 1 expression in the uptake of Escherichia coli K1 by macrophages and the onset of meningitis in newborn mice. **Virulence**, 7, n. 7, p. 806-818, 2016. Article.

CHRISTENSEN, M. G.; JOHNSEN, N.; SKALS, M.; HAMILTON, A. D. M. *et al.* Prevention of P2 Receptor-Dependent Thrombocyte Activation by Pore-Forming Bacterial Toxins Improves Outcome in A Murine Model of Urosepsis. **Int J Mol Sci**, 21, n. 16, Aug 2020.

CONOVER, M. S.; HADJIFRANGISKOU, M.; PALERMO, J. J.; HIBBING, M. E. *et al.* Metabolic Requirements of Escherichia coli in Intracellular Bacterial Communities during Urinary Tract Infection Pathogenesis. **MBio**, 7, n. 2, p. e00104-00116, Apr 2016.

COOPER, G. M. **Transcription in Prokaryotes**. The Cell, 2000. (A Molecular Approach.

CORREA, A.; OPPEZZO, P. Tuning different expression parameters to achieve soluble recombinant proteins in E. coli: advantages of high-throughput screening. **Biotechnol J**, 6, n. 6, p. 715-730, Jun 2011.

CORREA, A.; ORTEGA, C.; OBAL, G.; ALZARI, P. *et al.* Generation of a vector suite for protein solubility screening. **Front Microbiol**, 5, p. 67, 2014.

CUNHA, M. A.; ASSUNÇÃO, G. L.; MEDEIROS, I. M.; FREITAS, M. R. ANTIBIOTIC RESISTANCE PATTERNS OF URINARY TRACT INFECTIONS IN A NORTHEASTERN BRAZILIAN CAPITAL. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 58, p. 2, 2016.

DELLA-CASA, M. S.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I.; BUTERA, D.; CLISSA, P. B. *et al.* "Insularin, a disintegrin from Bothrops insularis venom: inhibition of platelet aggregation and endothelial cell adhesion by the native and recombinant GST-insularin proteins". **Toxicon**, 57, n. 1, p. 125-133, Jan 2011.

DHAKAL, B. K.; MULVEY, M. A. The UPEC Pore Forming Toxin α- Hemolysin Triggers Proteolysis of Host Proteins to Disrupt Cell Adhesion, Inflammatory and Survival Pathways. **Cell Host & Microbe**, 11, n. 1, 2012.

DIABATE, M.; MUNRO, P.; GARCIA, E.; JACQUEL, A. *et al.* Escherichia coli α-hemolysin counteracts the anti-virulence innate immune response triggered by the Rho GTPase activating toxin CNF1 during bacteremia. **PLoS Pathog**, 11, n. 3, p. e1004732, Mar 2015.

DIELUBANZA, E. J.; SCHAEFFER, A. J. Urinary Tract Infections in Women. **Medical Clinics of North America**, 95, n. 1, p. 27-41, 2011.

DUMON-SEIGNOVERT, L.; CARIOT, G.; VUILLARD, L. The toxicity of recombinant proteins in Escherichia coli: a comparison of overexpression in BL21(DE3), C41(DE3), and C43(DE3). **Protein Expr Purif**, 37, n. 1, p. 203-206, Sep 2004.

ENDERLE, J.; MILLER, A.; PYLES, R. Quantification of Bacterial Uropathogens in Preclinical Samples Using Real-Time PCR Assays. **Current Microbiology**, 68, n. 2, p. 220-226, 2014.

FABBRI, A.; GAUTHIER, M.; BOQUET, P. the 5' region of cnf1 harbours a translational regulatory mechanism for CNF1 synthesis and encodes the cell-binding domain of the toxin. **Molecular Microbiology**, 33, n. 1, p. 108, 1999.

FABBRI, A.; TRAVAGLIONE, S.; BALLAN, G.; LOIZZO, S. *et al.* The cytotoxic necrotizing factor 1 from E. coli: a janus toxin playing with cancer regulators. **Toxins (Basel)**, 5, n. 8, p. 1462-1474, Aug 2013.

FALBO, V.; PACE, T.; PICCI, L.; PIZZI, E. *et al.* Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of Escherichia coli. **Infect Immun**, 61, n. 11, p. 4909-4914, Nov 1993.

FELLOUSE, F. A.; SIDHU, S. S. Making Antibodies in Bacteria. *In*: HOWARD, G. e KASER, M. (Ed.). **Making and Using Antibodies A Practical Handbook**: CRC Press, 2006. cap. 8, p. 157 - 180.

FELLOUSE, F. A.; WIESMANN, C.; SIDHU, S. S. Synthetic antibodies from a four-amino-acid code: A dominant role for tyrosine in antigen recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 101, n. 34, p. 12467-12472, Aug 2004. Article.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nat Rev Urol**, 7, n. 12, p. 653-660, Dec 2010.

FOXMAN, B. Urinary Tract Infection Syndromes. **Infectious Disease Clinics of North America**, 28, n. 1, p. 1-13, 2014.

GARCIA, T. A.; VENTURA, C. L.; SMITH, M. A.; MERRELL, D. S. *et al.* Cytotoxic necrotizing factor 1 and hemolysin from uropathogenic Escherichia coli elicit different host responses in the murine bladder. **Infect Immun**, 81, n. 1, p. 99-109, Jan 2013.

GE HEALTHCARE, L. S. Recombinant Protein Purification Principles and Methods. 2000.

GORDON, C. P.; WILLIAMS, P.; CHAN, W. C. Attenuating Staphylococcus aureus virulence gene regulation: a medicinal chemistry perspective. **J Med Chem**, 56, n. 4, p. 1389-1404, Feb 2013.

GRANDE, K. K.; MEYSICK, K. C.; RASMUSSEN, S. B.; O'BRIEN, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 1-neutralizing monoclonal antibody NG8 recognizes three amino acids in a C-terminal region of the toxin and reduces toxin binding to HEp-2 cells. **Infect Immun**, 77, n. 1, p. 170-179, Jan 2009.

GROGAN, D. W. **Physiology of Prokaryotic Cells**. Elsevier, 2012. (Cell Physiology Source Book.

HALL, A. The cellular functions of small GTP- binding proteins. **Science (Washington)**, 249, n. 4969, p. 635-640, 1990.

HARTINGER, D.; HEINL, S.; SCHWARTZ, H. E.; GRABHERR, R. *et al.* Enhancement of solubility in Escherichia coli and purification of an aminotransferase from Sphingopyxis sp. MTA144 for deamination of hydrolyzed fumonisin B(1). **Microb Cell Fact**, 9, p. 62, Aug 2010.

HARWALKAR, A.; GUPTA, S.; RAO, A.; SRINIVASA, H. Lower prevalence of hlyD, papC and cnf-1 genes in ciprofloxacin-resistant uropathogenic Escherichia coli than their susceptible

counterparts isolated from southern India. **J Infect Public Health**, 7, n. 5, p. 413-419, 2014 Sep-Oct 2014.

HENRIQUE, C.; CAETANO, B. A.; MITSUNARI, T.; DOS SANTOS, L. F. *et al.* Large-scale evaluation of a rapid diagnostic test for diarrhea caused by enterotoxigenic Escherichia coli targeting the heat-labile toxin. **J Microbiol Methods**, 144, p. 125-127, 01 2018.

HOFMAN, P.; LE NEGRATE, G.; MOGRABI, B.; HOFMAN, V. *et al.* Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. **J Leukoc Biol**, 68, n. 4, p. 522-528, Oct 2000.

HOOTON, T. M. Uncomplicated Urinary Tract Infection. **New England Journal Of Medicine**, 366, n. 11, p. 1028-1037, 2012.

HOPKINS, A. M.; WALSH, S. V.; VERKADE, P.; BOQUET, P. *et al.* Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function. **J Cell Sci**, 116, n. Pt 4, p. 725-742, Feb 2003.

HSUEH, P. R.; HOBAN, D. J.; CARMELI, Y.; CHEN, S. Y. *et al.* Consensus review of the epidemiology and appropriate antimicrobial therapy of complicated urinary tract infections in Asia-Pacific region. **J Infect**, 63, n. 2, p. 114-123, Aug 2011.

IVARSSON, M. E.; LEROUX, J. C.; CASTAGNER, B. Targeting Bacterial Toxins. Weinheim. 51**:** 4024-4045 p. 2012.

JUSTICE, S. S.; HUNSTAD, D. A. UPEC Hemolysin: More than Just for Making Holes. **Cell Host & Microbe**, 11, n. 1, p. 4-5, Jan 2012. Editorial Material.

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

KNUST, Z.; SCHMIDT, G. Cytotoxic Necrotizing Factors (CNFs)-A Growing Toxin Family. **Toxins (Basel)**, 2, n. 1, p. 116-127, 01 2010.

LAVIGNE, J. P.; BRUYERE, F.; BERNARD, L.; COMBESCURE, C. *et al.* Resistance and virulence potential of uropathogenic Escherichia coli strains isolated from patients hospitalized in urology departments: a French prospective multicentre study. **Journal of Medical Microbiology**, 65, p. 530-537, Jun 2016. Article.

LEMICHEZ, E. New Aspects on Bacterial Effectors Targeting Rho GTPases. **Curr Top Microbiol Immunol**, 399, p. 155-174, 2017.

LEMICHEZ, E.; BARBIERI, J. T. General aspects and recent advances on bacterial protein toxins. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 3, n. 2, p. a013573, Feb 2013.

LEMICHEZ, E.; FLATAU, G.; BRUZZONE, M.; BOQUET, P. *et al.* Molecular localization of the Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor CNF1 cell-binding and catalytic domains. **Mol Microbiol**, 24, n. 5, p. 1061-1070, Jun 1997.

LEMONNIER, M.; LANDRAUD, L.; LEMICHEZ, E. Rho GTPase- activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. Oxford, UK. 31**:** 515-534 p. 2007.

LUZ, D.; AMARAL, M. M.; SACERDOTI, F.; BERNAL, A. M. *et al.* Human Recombinant Fab Fragment Neutralizes Shiga Toxin Type 2 Cytotoxic Effects. **Toxins (Basel)**, 10, n. 12, 12 2018.

LUZ, D.; CHEN, G.; MARANHÃO, A. Q.; ROCHA, L. B. *et al.* Development and characterization of recombinant antibody fragments that recognize and neutralize in vitro Stx2 toxin from Shiga toxin-producing Escherichia coli. **PLoS One**, 10, n. 3, p. e0120481, 2015.

LUZ, D.; SHIGA, E. A.; CHEN, G.; QUINTILIO, W. *et al.* Structural Changes in Stx1 Engineering Monoclonal Antibody Improves Its Functionality as Diagnostic Tool for a Rapid Latex Agglutination Test. **Antibodies (Basel)**, 7, n. 1, Feb 2018.

MAGALHAES, C. A.; ROSSATO, S. S.; BARBOSA, A. S.; DOS SANTOS, T. O. *et al.* The ability of haemolysins expressed by atypical enteropathogenic Escherichia coli to bind to extracellular matrix components. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, 106, n. 2, p. 146-152, Mar 2011. Article.

MAHTAL, N.; BREWEE, C.; PICHARD, S.; VISVIKIS, O. *et al.* Screening of a Drug Library Identifies Inhibitors of Cell Intoxication by CNF1. **ChemMedChem**, 13, n. 7, p. 754-761, 04 2018.

MARRS, C. F.; ZHANG, L.; TALLMAN, P.; MANNING, S. D. *et al.* Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral Escherichia coli. **J Med Microbiol**, 51, n. 2, p. 138-142, Feb 2002.

MENESTRINA, G.; ROPELE, M.; DALLA SERRA, M.; PEDERZOLLI, C. *et al.* Binding of antibodies to functional epitopes on the pore formed by Escherichia coli hemolysin in cells and model membranes. **Biochim Biophys Acta**, 1238, n. 1, p. 72-80, Aug 1995.

MEYSICK, K. C.; MILLS, M.; O'BRIEN, A. D. Epitope mapping of monoclonal antibodies capable of neutralizing cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic Escherichia coli. **Infect Immun**, 69, n. 4, p. 2066-2074, Apr 2001.

MICHEL, G.; FERRUA, B.; MUNRO, P.; BOYER, L. *et al.* Immunoadjuvant Properties of the Rho Activating Factor CNF1 in Prophylactic and Curative Vaccination against Leishmania infantum. **PLoS One**, 11, n. 6, p. e0156363, 2016.

MIERSCH, S.; LI, Z. J.; HANNA, R.; MCLAUGHLIN, M. E. *et al.* Scalable High Throughput Selection From Phage-displayed Synthetic Antibody Libraries. **Jove-Journal of Visualized Experiments**, n. 95, p. 15, Jan 2015. Article.

MIERSCH, S.; SIDHU, S. S. Synthetic antibodies: concepts, potential and practical considerations. **Methods**, 57, n. 4, p. 486-498, Aug 2012.

MILLS, M.; MEYSICK, K. C.; O'BRIEN, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic Escherichia coli kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. **Infect Immun**, 68, n. 10, p. 5869-5880, Oct 2000.

MIROUX, B.; WALKER, J. E. Over-production of proteins in Escherichia coli: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. **J Mol Biol**, 260, n. 3, p. 289-298, Jul 1996.

MITRAKI, A.; FANE, B.; HAASE-PETTINGELL, C.; STURTEVANT, J. *et al.* Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. **Science**, 253, n. 5015, p. 54-58, Jul 1991.

MORALES-ESPINOSA, R.; HERNANDEZ-CASTRO, R.; DELGADO, G.; MENDEZ, J. L. *et al.* UPEC strain characterization isolated from Mexican patients with recurrent urinary infections. **Journal of Infection in Developing Countries**, 10, n. 4, p. 317-328, Apr 2016. Article.

MOUANGA NDZIME, Y.; ONANGA, R.; KASSA KASSA, R. F.; BIGNOUMBA, M. *et al.* Epidemiology of Community Origin. **Infect Drug Resist**, 14, p. 585-594, 2021.

NAGAMATSU, K.; HANNAN, T. J.; GUEST, R. L.; KOSTAKIOTI, M. *et al.* Dysregulation of Escherichia coli α-hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 112, n. 8, p. E871-880, Feb 2015.

NAVARRO-GARCIA, F.; ELIAS, W. P. Autotransporters and virulence of enteroaggregative E. coli. **Gut Microbes**, 2, n. 1, p. 13-24, 2011 Jan-Feb 2011.

PALANIYANDI, S.; MITRA, A.; HERREN, C. D.; LOCKATELL, C. V. *et al.* BarA-UvrY two-component system regulates virulence of uropathogenic E. coli CFT073. **PLoS One**, 7, n. 2, p. e31348, 2012.

PAVLOVIC, M.; HUBER, I.; SKALA, H.; KONRAD, R. *et al.* Development of a Multiplex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Detection of Enterohemorrhagic Escherichia coli and Enteropathogenic Escherichia coli Strains. **Foodborne Pathogens and Disease**, 7, n. 7, p. 801-808, Jul 2010. Article.

PEI, S.; DOYE, A.; BOQUET, P. Mutation of specific acidic residues of the CNF1 T domain into lysine alters cell membrane translocation of the toxin. **Mol Microbiol**, 41, n. 6, p. 1237-1247, Sep 2001.

PONCIANO, J. M.; DE GELDER, L.; TOP, E. M.; JOYCE, P. The population biology of bacterial plasmids: a hidden Markov model approach. **Genetics**, 176, n. 2, p. 957-968, Jun 2007.

PROMEGA. HisLink Protein Purification Resin TB327. PROMEGA. 2013.

QIAGEN. The QIAexpressionist A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. QIAGEN. 2003.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nat Rev Drug Discov**, 9, n. 2, p. 117-128, Feb 2010.

RIPPERE-LAMPE, K. E.; O'BRIEN, A. D.; CONRAN, R.; LOCKMAN, H. A. Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf(1)) attenuates the virulence of uropathogenic Escherichia coli. **Infect Immun**, 69, n. 6, p. 3954-3964, Jun 2001.

ROCHA, L. B.; ALVES, R. P. D. S.; CAETANO, B. A.; PEREIRA, L. R. *et al.* Epitope Sequences in Dengue Virus NS1 Protein Identified by Monoclonal Antibodies. **Antibodies (Basel)**, 6, n. 4, Oct 2017.

RUIZ-PEREZ, F.; NATARO, J. P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. **Cell Mol Life Sci**, 71, n. 5, p. 745-770, Mar 2014.

SALMANI, H.; AZARNEZHAD, A.; FAYAZI, M. R.; HOSSEINI, A. Pathotypic and Phylogenetic Study of Diarrheagenic Escherichia coli and Uropathogenic E. coli Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Jundishapur Journal of Microbiology**, 9, n. 2, 2016.

SCHÄGGER, H. Tricine-SDS-PAGE. **Nat Protoc**, 1, n. 1, p. 16-22, 2006.

SCHMIDT, G.; SEHR, P.; WILM, M.; SELZER, J. *et al.* Gln 63 of Rho is deamidated by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor-1. **Nature**, 387, n. 6634, p. 725-729, Jun 1997.

SHAH, C.; BARAL, R.; BARTAULA, B.; SHRESTHA, L. B. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. **BMC Microbiol**, 19, n. 1, p. 204, 09 2019.

SHAIKH, N.; CRAIG, J. C.; ROVERS, M. M.; DA DALT, L. *et al.* Identification of children and adolescents at risk for renal scarring after a first urinary tract infection: a meta-analysis with individual patient data. **JAMA Pediatr**, 168, n. 10, p. 893-900, Oct 2014.

SHETTY, A. V.; KUMAR, S. H.; SHEKAR, M.; SHETTY, A. K. *et al.* Prevalence of adhesive genes among uropathogenic Escherichia coli strains isolated from patients with urinary tract infection in Mangalore. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 32, n. 2, p. 175-178, Apr-Jun 2014. Article.

SILVA, M. A.; SANTOS, A. R. R.; ROCHA, L. B.; CAETANO, B. A. *et al.* Development and Validation of Shiga Toxin-Producing. **Microorganisms**, 7, n. 9, Aug 2019.

SINGH, A.; UPADHYAY, V.; UPADHYAY, A. K.; SINGH, S. M. *et al.* Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. **Microb Cell Fact**, 14, p. 41, Mar 2015.

SMITH, M. A.; WEINGARTEN, R. A.; RUSSO, L. M.; VENTURA, C. L. *et al.* Antibodies against hemolysin and cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1) reduce bladder inflammation in a mouse model of urinary tract infection with toxigenic uropathogenic Escherichia coli. **Infect Immun**, 83, n. 4, p. 1661-1673, Apr 2015.

TABASI, M.; KARAM, M. R.; HABIBI, M.; MOSTAFAVI, E. *et al.* Genotypic Characterization of Virulence Factors in. **J Clin Diagn Res**, 10, n. 12, p. DC01-DC07, Dec 2016.

TRABULSI, L. R.; SAMPAIO, M. C. Microbiota normal do corpo humano. *In*: **Microbiologia**. 5 ed.: Atheneu, 2008. p. 103 - 110.

VERMA, V.; KUMAR, P.; GUPTA, S.; YADAV, S. *et al.* α-Hemolysin of uropathogenic E. coli regulates NLRP3 inflammasome activation and mitochondrial dysfunction in THP-1 macrophages. **Sci Rep**, 10, n. 1, p. 12653, 07 2020.

ZHAO, H.; XU, Y.; LI, X.; LI, G. *et al.* Expression and Purification of a Recombinant Enterotoxin Protein Using Different E. coli Host Strains and Expression Vectors. **Protein J**, Mar 2021.

ANEXO A

Proceedings

Macrophage Inflammatory Response Mediated by Intimin and Bundle-Forming Pilus from Enteropathogenic *Escherichia coli* †

Bruna A. Caetano [1,‡], Daniela B. Mourão [2,‡], Patrícia A. E. Abreu [1], Denize Monaris [1], Halyka L. Vasconcellos [2], Daniela Luz [2], Cynthia Soares Galhardo [3], Marcio A. Menezes [3], Flávia A. Lima [4], Waldir P. Elias [4], Monamaris Marques Borges [1,*] and Roxane Maria Fontes Piazza [1,*,‡]

1 Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil, 1500, São Paulo 05503-900, Brazil; bruna.caetano@butantan.gov.br (B.A.C.); patricia.aniz@butantan.gov.br (P.A.E.A.); denize.monaris@butantan.gov.br (D.M.)

2 Laboratório de Química Forense, Superintendência de Polícia Técnico Científica, Avenida Nossa Sra. Da Penha, 2290, Vitória 29045-402, Brazil; dbastosmourao@yahoo.com.br (D.B.M.); halykalv@hotmail.com (H.L.V.); daniedaluz@yahoo.com.br (D.L.)

3 Setor de Triagem Sorológica—Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo, Avenida Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 155, São Paulo 05403-000, Brazil; cygal@hotmail.com (C.S.G.); menezes_marcio@yahoo.com.br (M.A.M.)

4 Laboratório de Técnicas Especiais – Biologia Molecular, Hospital Israelita Albert Einstein, Avenida Albert Einstein, 627, São Paulo 05652-900, Brazil; flavia.afonso.lima@gmail.com (F.A.L.); waldir.elias@butantan.gov.br (W.P.E.)

* Correspondence: monamaris.borges@butantan.gov.br (M.M.B.); roxane.piazza@butantan.gov.br (R.M.F.P.); Tel.: +55-11-26279724 (M.M.B.)

† Presented at the 1st International Electronic Conference on Microbiology, 2–30 November 2020; Available online: https://ecm2020.sciforum.net/.

‡ These authors contributed equally to this work.

Published: 8 January 2020

Abstract: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) are important agents of acute diarrhea in children living in developing countries. A severe dysfunction of the intestinal epithelial barrier occurs during EPEC infection, leading to diarrhea and inflammation as consequences. EPEC main virulence factors include the adhesins intimin and bundle-forming pilus (BFP), as well as several effector proteins translocated to the enterocyte by the type-three secretion system. The initial interaction of EPEC with the host cell and the role of effector proteins in this process are well known. However, the role of the EPEC virulence factors in macrophage activation is not fully understood. Hence, we analyzed the ability of intimin and bundle-forming pilus (BfpA) to activate the innate response mediated by macrophages, where the production of the proinflammatory cytokines TNF-α, IL-1, IL-6 and IL-12, as well as the anti-inflammatory cytokine IL-10 and chemokine MCP-1, were evaluated. Our results showed that recombinant intimin and BfpA activate macrophages in a dose-dependent manner, and the stimulated cells produced TNF-α, IL-12, IL-6, IL-10 and MCP-1, but not IL-1β. No synergistic effect was observed in the production of pro-inflammatory cytokines by combining BfpA and intimin, although production of IL-10, an anti-inflammatory mediator, was potentiated at a higher dose. The effect observed was largely attributed to these proteins, as the treatment of proteins with polymyxin B did not alter the production of TNF-α. Thus, herein we showed that intimin and BfpA can activate the innate immune response, inducing the production of pro- and anti-inflammatory cytokines, as well as chemokines, playing additional role as inflammatory molecules in the early steps of EPEC infection.

Keywords: enteropathogenic *E. coli*; intimin; bundle-forming pilus (BfpA); macrophage; innate immune response; cytokines

1. Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the six pathotypes comprising the diarrheagenic *E. coli* pathogroup, and it is still one of the major causes of acute diarrhea of children living in developing countries [1–5]. EPEC induce a distinctive histopathological lesion on the intestinal mucosa known as the attaching and effacing (A/E) lesion, which is characterized by intimate adherence of EPEC to the epithelium, effacement of the intestinal microvilli and formation of pedestal-like structures under the site of attachment, in consequence of the reorganization of actin filaments [6].

After entering the gastrointestinal tract, EPEC adhere to the mucosa of the small and large intestines and at least three steps for pathogenesis have been described [7]. The initial step includes adherence to the host cell. After a multifactorial attachment via adhesive structures, in which the bundle-forming pilus (BFP) [8] is an important structure, a type III secretion system (T3SS) injects virulence factors in the enterocyte. Finally, an intimate bacterial attachment via intimin, an outer membrane adhesin of 94-kDa, and its translocated intimin receptor (Tir) lead to the pedestal formation [9–12].

In EPEC infections, inflammation is characteristic, due to increased cellular permeability. There is intense infiltration of neutrophils and lymphocytes in the lamina propria to the infection site [13], and other inflammatory cells, such as tissue macrophages, participate in the inflammatory response [14]. One of the consequences of EPEC infection is the regulation of signal transduction, culminating in the activation of NF-κB [15,16], which promotes the expression of cytokines. After the interaction of phagocytic cells with microorganisms or their products, secretion of several pro- or anti-inflammatory mediators occurs, including oxygen and nitrogen derivatives, cytokines such as IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18 and TNF-α and chemokine's such as MCP-1, in addition to mediators derived from arachidonic acid [17–19]. This variety of components regulates adaptive immunity to be developed later.

Similarly, Dann et al. [20] demonstrated that in infections by *Citrobacter rodentium*, a murine intestinal pathogen widely used as an animal model of the A/E lesion [20]. Macrophages and epithelial cells present in the colon expressing IL-6, a cytokine related to the recruitment and activation of neutrophils, and induce the acute phase important for efficient bacteria control. Additionally, Ramirez et al. [21], exploring the mucosal immune response in rabbits infected with rabbit-specific EPEC (REPEC), detected an increase in mRNA expression for IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α and IL-10 produced by enterocytes during the developed diarrheal disorder.

The interaction of EPEC with the host intestinal epithelium induces an innate immune response that generates a local inflammatory response [22]. The degree of macrophage activation is one of the factors determining the severity of the inflammatory process, since these cells coordinate the resolution of inflammation [23]; consequently, they are fundamental for phagocytosis and define the development of acquired immunity with reciprocal interaction between macrophages and activated T and B lymphocytes, providing novel levels of regulation and acquisition of antimicrobial resistance.

These cells, when activated, promote the resolution of the inflammatory process through the production of various cytokines, chemokines and growth factors [24]. The initial recognition of EPEC effector proteins by phagocytic cells has not been elucidated; thus, such information is crucial for understanding the inflammatory process generated during this infection. Since macrophages are highly heterogeneous in their functions and their activation depend on the nature of the stimulus and the environment to which they adapt [25], we investigated the pattern of cytokines after the initial contact of intimin and bundle-forming pilus (BfpA) with primary bone marrow-derived macrophages. Our results suggest that intimin and BfpA are potent activators of the innate immune response that can contribute to the control of inflammation during EPEC infection.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

The experiments were conducted in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and they were approved by the Ethical Committee for Animal Research of Butantan Institute (Protocol 537/08).

2.2. Cloning, Expression and Purification of Recombinant Intimin and BfpA Proteins

The intimin-encoding gene (*eae*) was amplified by PCR using as template the genomic DNA from EPEC serotype O111ab:H2 [26], expressing intimin classified as subtype beta-3 (β3). The following primers were used for amplification: F: GGATCCGCTAGCGCTTCGTCACAGTTGCAGGC and R: AAGCTTCGATCGCATATGTACTTGATACGCC. The underlined nucleotides indicate *Bam*HI and *Hind*III restriction sites, respectively. The amplified fragment of 2176 bp, corresponding to the intimin beta-3 gene without the signal peptide-encoding sequence, was purified, digested with *Bam*HI and *Hind*III and cloned into the same restriction sites of pQE30 expression vector (Qiagen, Venlo, The Netherlands). The obtained construct was verified by DNA sequencing with appropriate vector-specific primers and named pFLβ3. Competent cells of the *E. coli* strain M15 (pREP4) (Qiagen, Venlo, The Netherlands) were transformed with pFLβ3 plasmid and grown in Luria–Bertani (LB) broth at 37 °C under constant shaking (250 rpm) until the optical density at 600 nm reached 0.6. The expression of recombinant intimin was induced with 1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) at 37 °C for 3 h under the same culture conditions. The 6x-His-tagged intimin β3 was purified using metal affinity chromatography, as previously described [27].

E. coli DH5*α* harboring the plasmid pEU84 [28] was used for BfpA production. This construction corresponds to the *bfpA*-encoding sequence from EPEC B171 cloned into the pQE-30 vector. The expression of recombinant BfpA in LB broth was induced with 0.4 mM IPTG at 37 °C for 3 h under constant shaking (250 rpm). The 6x-His-tag fusion BfpA was purified using metal affinity chromatography [29].

The production of these proteins was confirmed by immunoblotting employing the rabbit anti-intimin IgG enriched fraction [30] or with rabbit anti-BfpA polyclonal serum (IgG) [31]. The level of endotoxin present in intimin and BfpA samples was tested by the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay (Lonza, Basel, CH), with a range from 0.125 to 1.25 Endotoxin Units (EUs)/μg proteins, considering that 1 EU corresponds to 5 ng/mL of lipopolysaccharide (LPS).

2.3. Macrophages

Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were isolated from the femur and tibia from female C3H/HeJ mice 6–8 weeks according to Weischenfeldt and Porse [32]. The cells were cultivated at 37 °C and 5% CO_2 for 7 days at 1×10^6 mL and 0.5 mL were plated in 48 Costar well plates (Corning, Corning, NY, USA) in RPMI 1640 medium (Gibco Invitrogen Corporation, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco Invitrogen Corporation, Waltham, Massachusetts, USA), 0.2 mM L-glutamine, 50 UI/mL penicillin, 50 μg/mL streptomycin, 1 mM sodium pyruvate and 20% (*v*/*v*) of the L929 cell culture supernatant. At day seven, the cells were washed with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.2, to remove the non-adherent cells; the adherent ones were maintained in the same medium. These cells were exclusively F4/80 (yield of 95%), since this phenotype was confirmed by Flow Cytometry using monoclonal antibodies specific for T lymphocytes (anti-CD3), B-lymphocytes (anti-B220) and macrophages (anti-F4/80).

2.4. Activation of BMDM with Intimin or BfpA

Adherent BMDM (5×10^5 cells/well) were activated with 0.5, 1.0, 5.0 and 10.0 μg/mL of intimin or BfpA associated or not and cultured at 37 °C and 5% CO_2. The culture supernatant was harvested

after 20 h of stimulation for TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 and MCP-1 assay. As a control, another group of cells was stimulated with LPS (2.5, 5, 10, 50 and 100 ng/mL).

2.5. Effect of Intimin and Bfp on BMDM Viability

The viability of BMDM treated with intimin and BfpA (5–10 μg/mL) for 20 h was determined by the activity of succinyl dehydrogenase, using 3-(4,5)-dimethyltialzolyl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, 5 mg/mL, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) as substrate [33]. After 4 h of incubation at 37 °C and 5% CO_2 the crystals were solubilized using *v*/*v* of 0.1N HCl solution in isopropyl alcohol and the optical density (DO) was determined using an ELISA reader (Multiskan EX, Primary EIA, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 550 nm. Cells treated with 0.1% Triton X-100 representing 100% death and macrophages without treatment were used as a 100% viability control.

2.6. Effect of Intimin and BfpA Treatment with Polymyxin B and Proteinase K

To confirm the specificity of recombinant proteins intimin or BfpA (1.5 and 10 μg/mL) were preincubated for 1 h at 37 °C with polymyxin B (30 μg/mL) or proteinase K (50 μg/mL). Subsequently, samples were added to cultures of the J774 A.1 Mouse BALB/c macrophage-like cell line maintained in RPMI 1640 medium (Gibco Invitrogen Corporation, Waltham, MA, USA) containing 10% FBS (Gibco Invitrogen Corporation, Waltham, MA, USA) and 50 μg/mL gentamicin and incubated at 37 °C and 5% CO_2 for 24 h. The LPS (100 ng/mL) and Bovine Serum albumin (BSA, 10 μg/mL, Sigma-Aldrich, San Luis, MO, USA) were used as a control [34,35]. The level of TNF-α was analyzed in the culture supernatant comparing groups treated or not with the respective drugs.

2.7. Cytokines Assays

The presence of the cytokines TNF-α, IL-1, IL-6, IL-10 and IL-12 and the chemokine MCP-1 in the BMDM culture supernatant were analyzed using the immunoenzymatic assay (ELISA) from the eBioscience kit following the manufacturer's recommendation (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.8. Statistical Analysis

The results represent the mean and standard error of the mean (SEM) of 3–4 independent experiments and were analyzed by the GraphPad Prism 5® program. Differences were considered significant when $p < 0.05$ by the unpaired Student t test.

3. Results

3.1. Intimin and BfpA Had No Effect on BMDM Viability

Recombinant Intimin and BfpA were purified and their identity was confirmed by immunoblotting using specific antibodies (Figure S1). These proteins were employed throughout the experiments. Initially the effect of both proteins on the viability of BMDM was investigated using the MTT assay. These proteins did not cause cytotoxic effects, regardless of the employed concentration (5 and 10 μg/mL). The optical density values were close to the control groups (absence of recombinant proteins) (Figure S2).

3.2. Role of Intimin and BfpA in BMDM Activation

The interaction of EPEC with the host's intestinal epithelial cells has been widely studied and proven to generate a local inflammatory response [14]. Macrophages coordinate the severity and resolution of inflammation in this inflammatory site. Since the role of intimin and BfpA in the activation of these cells during EPEC intestinal colonization is not well understood, we investigated their effect on the activation of medullary macrophages.

Intimin and BfpA proteins induced dose-dependent cytokine synthesis. We found that 1 μg/mL of both proteins was sufficient to activate the macrophages, however 5–10 μg/mL had more pronounced and significant effects ($p < 0.0001$). This profile was repeated for the pro-inflammatory mediators IL-6 and IL-12p40. However, we emphasize that the level of these mediators was much higher than that described for TNF-α. The synthesis of IL-12p40 was more prominent in comparison to other cytokines production (Figure 1). No difference was observed between intimin and BfpA in terms of the ability to stimulate macrophages, with the levels of cytokines being analyzed close to each other regardless of the nature of the stimulus.

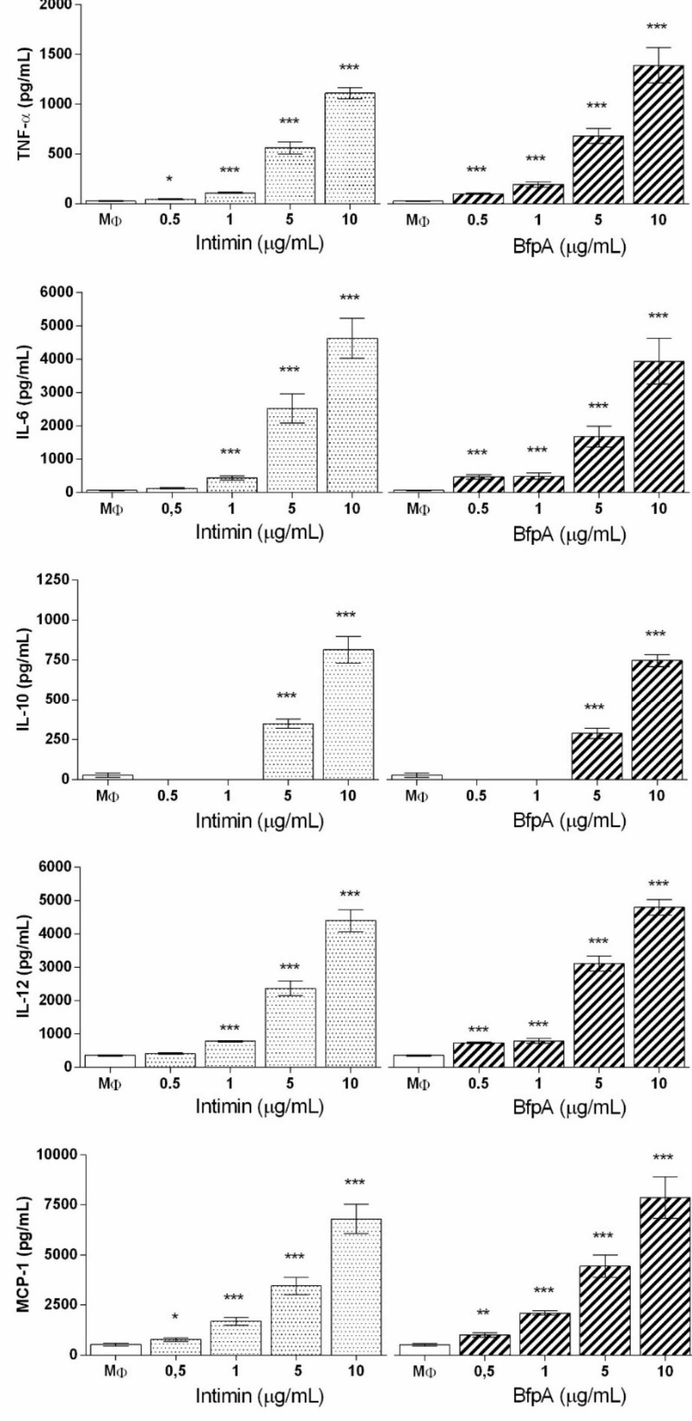


Figure 1. Mφ (6 × 10^5 cells) were stimulated with 0.5 to 10 μg/mL of intimin or BfpA for 20 h. The synthesis of cytokines and chemokine was analyzed in the culture supernatant by the ELISA assay. Data represent the mean ± standard error of the mean (SEM) of three independent experiments, performed in duplicate. The values * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ and *** $p < 0.0001$ were considered significant.

The effect of intimin and BfpA on the synthesis of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and chemokine MCP-1 was investigated. Only cells treated with 5 and 10 μg/mL of intimin and BfpA produced significant level of IL-10 ($p < 0.0001$) (Figure 1). However, these cells synthesized high levels of chemokines, especially MCP-1 and IL-12, that were dose dependent. IL-1β was not detected in the culture supernatants. These data confirm the ability of intimin and BfpA to activate macrophages during EPEC infection.

3.3. Intimin and BfpA Do Not Work Synergistically to Activate BMDM

Microorganism proteins may improve the effect on the inflammatory processes [17–19]. Herein, this effect was investigated by combining intimin and BfpA during BMDM activation. We demonstrated that 10 μg/mL of intimin or BfpA increased the production of chemokines TNF-α and MCP-1 in BMDM culture. However, the treatment of macrophages with both proteins did not change the level of these cytokines (Figure 2). Analysis of IL-6 and IL-10 production showed a slight increase in the level of these cytokines, and for IL-6 the observed difference was only in response to BfpA ($p > 0.05$). The role of intimin in combination with BfpA was significantly observed in the synthesis of IL-10 ($p > 0.001$) when compared to these proteins separately (Figure 2). This suggests that, during an EPEC infection, IL-10 production depends on the concentration of these EPEC virulence factors present at the site of infection.

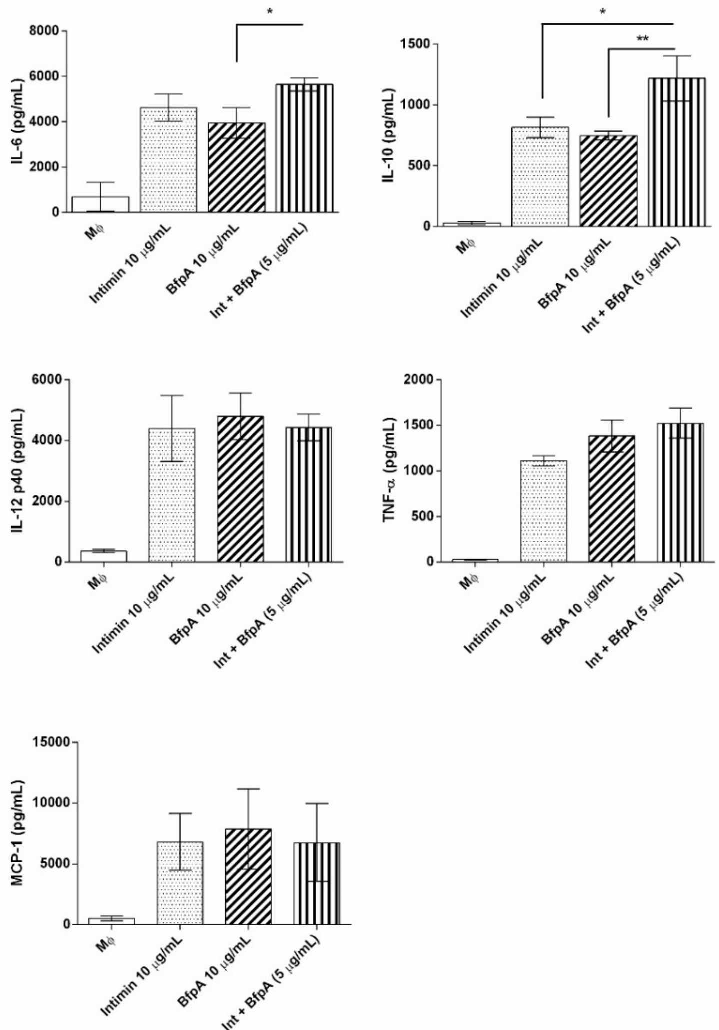


Figure 2. Mφ (6×10^5 cells) were stimulated with the combination of intimin and BfpA (5 μg/mL and 5 μg/mL). After 20 h the supernatant was obtained for cytokines and chemokine measurement. The results are representative of the mean ± SEM of three independent experiments, performed in duplicate. The values * p <0.05 and ** p <0.001 were considered significant.

3.4. The Immune Response Mediated by Intimin and BfpA Was Specific

To confirm the specificity of intimin and BfpA in macrophages activation, both proteins were pretreated before phagocytic cell stimulation with polymyxin B, which interacts with LPS, or proteinase K (PK), which is capable of breaking peptide bonds between protein amino acids. The J774 A.1 cell line was used for this assay due to its high sensitivity to endotoxins. The activation of these cells with intimin or BfpA pretreated with polymyxin B induced the production of large amounts of TNF-α, in a dose-dependent manner; however, the treatment of LPS (100 ng/mL) with polymyxin B drastically reduced the level of TNF-α to a level similar to that of the untreated controls (Figure 3A). These results indicate that the immune response detected was due to the proteins intimin and BfpA and not to endotoxins.

Subsequently, we evaluated the influence of the treatment of the two recombinant proteins with PK on the activation of the J774 phagocytic cells. As shown in Figure 3B, intimin and BfpA individually stimulated the synthesis of high levels of TNF-α. The pretreatment of these proteins with PK inhibited the TNF-α response by 100%, obtaining values close to those found in untreated cultures ($p < 0.0001$) (Figure 3B). These data differ in cells stimulated with LPS (100 ng/mL), since the treatment with proteinase K did not significantly inhibit the production of this cytokine. Thus, these data confirmed that the activation of macrophages by intimin and BfpA was not due to the action of endotoxins, but rather due to the protein activity of these molecules.

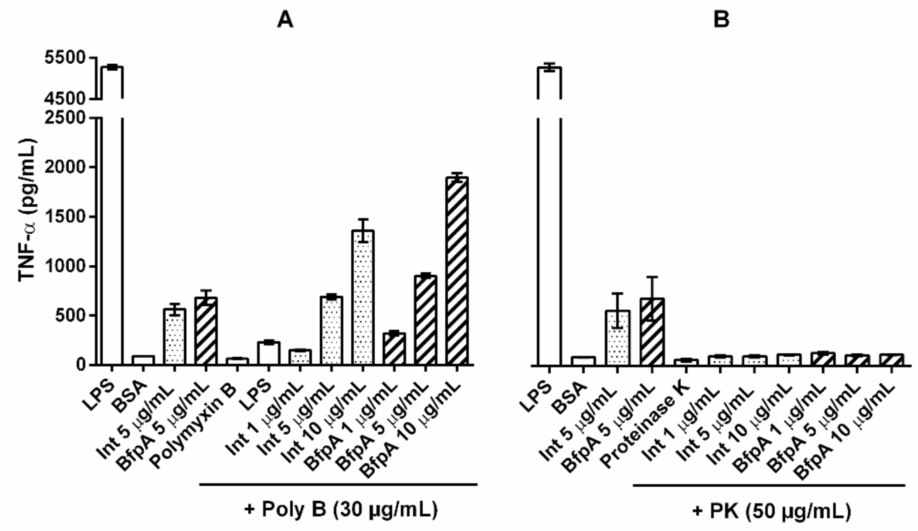


Figure 3. J774 cells (6 x 10^5 cells) were stimulated with either intimin or BfpA pretreated with 30 μg/mL of polymyxin B (**A**) and 50 μg/mL of proteinase K (**B**) for 20 h. The supernatant was obtained to measure TNF-α. The results are representative of the mean ± SEM of two independent experiments, performed in triplicate.

4. Discussion

EPEC infection starts with intestinal epithelium colonization leading to an intimate adherence that triggers the A/E lesion and inflammation [6,13,14]. Several virulence factors contribute to these steps, including BFP and intimin as adhesins as well as several effector proteins injected into the host cell via the T3SS [36]. Nevertheless, the mechanisms behind the inflammation process in the early stages of the infection are not completely known.

We employed intimin and BfpA recombinant proteins to test their role during the first contact with bone marrow-derived macrophages (BMDM), which is the origin of the various macrophage populations distributed in the organism, and the consequences for the inflammatory response. It was shown that the treatment of BMDM with recombinant intimin and BfpA did not change the viability of these cells. The fact that these cells respond to the stimulus with these proteins synthesizing inflammatory mediators and chemokines strongly suggests their viability.

During the EPEC intimate binding to the host cell, proteins associated with the T3SS are translocated directly to the infected cell, modifying and subverting the host cells function, including those of the immune system, to cause diarrhea [37]. Most of the studies with EPEC virulence factors explore epithelial cells as a target; however, the role of these effector proteins in macrophage activation and the consequences for the immune system are not fully understood.

The different steps of EPEC pathogenesis are associated with specific virulence factors [38]. Among them, the fimbrial adhesin BFP is responsible for the initial adherence to the enterocytes and contributes to the inflammatory response [3,39]. Intimin is an outer membrane protein that binds to epithelial cells through its receptor Tir [37], which is essential for the establishment of the A/E lesion and can determine tropism by different sites in the intestine [40]. Due to their importance in the early steps of the EPEC pathogenesis, they were chosen for our studies. Initially, the recombinants BfpA [29] and intimin β3 were produced.

Macrophages represent one of the main cells of the innate immune system, with multiple functions adapted to the tissues where they reside. They are fundamental for phagocytosis and define the development of acquired immunity with reciprocal interaction with activated T and B lymphocytes. When activated, they promote the resolution of the inflammatory process by releasing large amounts of immune mediators [41]. The impact of innate immunity on intestinal host defense against A/E bacterial pathogens remains an unresolved.

BfpA and intimin stimulated in a dose-dependent manner pro-inflammatory cytokines such as TNF-α, IL-6 and IL-12p40, as well as the anti-inflammatory IL-10, in addition to the chemokine MCP-1. However, the presence of IL-1β was not detected. The IL-10 synthesis was dependent of intimin high concentrations or BfpA, while low doses of these proteins were sufficient for production of pro-inflammatory cytokines.

The specific response of the proteins intimin and BfpA was demonstrated in the assays where these recombinants were pretreated with polymyxin B or proteinase K. The microenvironment created during inflammation is important to contain the infection. Excessive production of pro-inflammatory mediators in addition to being toxic to microorganisms can be toxic to the host cell [23]. To balance the inflammatory response, the presence of anti-inflammatory cytokines is essential [14].

When used in combination, intimin and BfpA did not modify the production profile of pro-inflammatory mediators; only anti-inflammatory IL-10 was enhanced. The IL-10 inhibits the production of pro-inflammatory cytokines through negative feedback [42,43]. Sharma and collaborators [44] suggest that during epithelial cell inflammation induced by T3SS proteins, different proteins act by balancing the induction of pro- or anti-inflammatory response. The same can occur with BMDM activated with a high concentration of intimin and BfpA, to balance the inflammatory response of macrophages and to define the immune response to be generated later.

Intimin and BfpA are involved with the local inflammatory response, and the presence of MCP1 (monocyte chemoattractant protein-1), which confirms this hypothesis, as it recruits leukocytes for the endothelium, in addition to controlling the activation of tissue macrophages [45]. The migration of neutrophils, monocytes and the presence of tissue macrophages located just below the intestinal mucosa are essential in the resolution of the inflammatory process, due to the release of immune mediators that favor the migration of cells to the inflammatory focus and present antigens for the local lymphocytes. To compensate, intestinal macrophages perform their anti-inflammatory function to neutralize tissue damage and restore homeostasis [46].

Toll-like receptors (TLRs) and NOD-like receptors (NLRs) are important for the initiation of the innate immune response [47]. The NOD-like receptor (NLR) regulates the processing and secretion of IL-1β via caspase-1 activation [48]. The absence of apoptosis and IL-1β in the macrophage culture supernatant suggests that intimin and BfpA do not use this signaling pathway. Toll-like receptors (TLRs) that are located on the surface and on the endosomal membrane recognize patterns of molecules conserved in bacteria (PAMPs) [49]. Although we have not studied the direct action of these receptors, the binding of PAMPs to these receptors activates inflammatory signaling pathways and leads to the production of inflammatory cytokines to further propagate and amplify the immune response [49]. The inflammatory activity of BfpA and intimin is not associated with TLR4,

since macrophages from C3H/HeJ mice (TLR4$^{-/-}$) were considered hypo-responders to endotoxins [50]. The treatment of cells with the maximum dose of intimin plus BfpA (10 μg/mL) did not potentiate the synthesis of TNF-α or MCP-1.

In conclusion, our findings show that intimin and BfpA activate the innate immune response, inducing the production of cytokines (pro- and anti-inflammatory) and chemokines independent of TLR-4, playing an additional role as an inflammatory molecule at the beginning of the infection. Understanding the complexity of the interaction between virulence factors and macrophages will help to clarify the pathogenesis and immune response of EPEC infection and may assist in future treatment strategies.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: Expression of the proteins intimin β3 and BfpA. Nitrocellulose membranes containing purified protein fractions of intimin β3 (94 kDa) and BfpA (20 kDa) were incubated in the presence of rabbit specific IgG followed by goat anti-rabbit IgG peroxidase-conjugated. A: intimin 3β protein; B: BfpA protein. Figure S2: Cell viability of macrophages after treatment with intimin and BfpA. Mφ (6×10^5 cells) were stimulated with intimin and BfpA (5 μg/mL and 10 μg/mL) for 20 h. Cell viability was determined by the MTT assay. Triton X-100 (0.1%) was used as a cytotoxicity control. The results are representative.

Author Contributions: D.B.M., P.A.E.A., M.M.B. and R.M.F.P. participated in the design of the study; D.B.M., D.M., H.L.V., C.S.G., M.A.M. and D.L. carried out the experiments; B.A.C., D.B.M., P.A.E.A., M.M.B. and R.M.F.P. participated in data analysis; P.A.E.A., W.P.E., M.M.B. and R.M.F.P. contributed reagents/materials/analysis tools; B.A.C., M.M.B., W.P.E. and R.M.F.P. participated in writing the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from the São Paulo Research Foundation (FAPESP) to W.P.E. (2004/12136-7), R.M.F.P. (2009/14845-7) and M.M.B. (2013/11212-9). R.M.F.P. and W.P.E. are fellows from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). B.A.C. was a recipient of a scholarship from FAPESP (grant 2016/16188-7). D.B.M. was a recipient of a scholarship from CNPq.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Ochoa, T.J.; Contreras, C.A. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2011**, *24*, 478–483, doi:10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b.
2. Panchalingam, S.; Antonio, M.; Hossain, A.; Mandomando, I.; Ochieng, B.; Oundo, J.; Ramamurthy, T.; Tamboura, B.; Zaidi, A.K.M.; Petri, W.; et al. Diagnostic Microbiologic Methods in the GEMS-1 Case/Control Study. *Clin. Infect. Dis.* **2012**, *55*, S294–S302, doi:10.1093/cid/cis754.
3. Gomes, T.A.; Elias, W.P.; Scaletsky, I.C.; Guth, B.E.; Rodrigues, J.F.; Piazza, R.M.; Ferreira, L.C.; Martinez, M.B. Diarrheagenic *Escherichia coli. Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47* (Suppl. 1), 3–30, doi:10.1016/j.bjm.2016.10.015.
4. Platts-Mills, J.A.; Liu, J.; Rogawski, E.T.; Kabir, F.; Lertsethtakarn, P.; Siguas, M.; Khan, S.S.; Praharaj, I.; Murei, A.; Nshama, R.; et al. Use of quantitative molecular diagnostic methods to assess the aetiology, burden, and clinical characteristics of diarrhoea in children in low-resource settings: A reanalysis of the MAL-ED cohort study. *Lancet Glob. Health* **2018**, *6*, e1309–e1318, doi:10.1016/S2214-109X(18)30349-8.
5. Merino, V.R.; Nakano, V.; Delannoy, S.; Fach, P.; Alberca, G.G.F.; Farfan, M.J.; Piazza, R.M.F.; Avila-Campos, M.J. Prevalence of Enteropathogens and Virulence Traits in Brazilian Children With and Without Diarrhea. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, doi:10.3389/fcimb.2020.549919.
6. Moon, H.W.; Whipp, S.C.; Argenzio, R.A.; Levine, M.M.; Giannella, R.A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* **1983**, *41*, 1340–1351, doi:10.1128/IAI.41.3.1340-1351.1983.
7. Donnenberg, M.S.; Kaper, J.B. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 3953–3961, doi:10.1128/IAI.60.10.3953-3961.1992.
8. Girón, J.A.; Ho, A.S.; Schoolnik, G.K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli. Science* **1991**, *254*, 710–713, doi:10.1126/science.1683004.

9. Jerse, A.E.; Yu, J.; Tall, B.D.; Kaper, J.B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 7839–7843, doi:10.1073/pnas.87.20.7839.
10. Frankel, G.; Phillips, A.D.; Novakova, M.; Field, H.; Candy, D.C.; Schauer, D.B.; Douce, G.; Dougan, G. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* restores murine virulence to a Citrobacter rodentium eaeA mutant: Induction of an immunoglobulin A response to intimin and EspB. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 5315–5325.
11. Kenny, B.; DeVinney, R.; Stein, M.; Reinscheid, D.J.; Frey, E.A.; Finlay, B.B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **1997**, *91*, 511–520, doi:10.1016/s0092-8674(00)80437-7.
12. Dean, P.; Kenny, B. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli: Ganging* up on the host cell. *Curr. Opin. Microbiol.* **2009**, *12*, 101–109, doi:10.1016/j.mib.2008.11.006.
13. Ulshen, M.H.; Rollo, J.L. Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man-another mechanism. *N. Engl. J. Med.* **1980**, *302*, 99–101, doi:10.1056/NEJM198001103020207.
14. Sanchez-Villamil, J.; Navarro-Garcia, F. Role of virulence factors on host inflammatory response induced by diarrheagenic Escherichia coli pathotypes. *Future Microbiol.* **2015**, *10*, 1009–1033, doi:10.2217/fmb.15.17.
15. Zhou, X.; Girón, J.A.; Torres, A.G.; Crawford, J.A.; Negrete, E.; Vogel, S.N.; Kaper, J.B. Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 2120–2129, doi:10.1128/iai.71.4.2120-2129.2003.
16. Santos, A.S.; Finlay, B.B. Bringing down the host: Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* effector-mediated subversion of host innate immune pathways. *Cell Microbiol.* **2015**, *17*, 318–332, doi:10.1111/cmi.12412.
17. Mahida, Y.R. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.* **2000**, *6*, 21–33, doi:10.1097/00054725-200002000-00004.
18. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* **2003**, *3*, 23–35, doi:10.1038/nri978.
19. Mantovani, A.; Sica, A.; Locati, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 14–16, doi:10.1002/eji.200636910.
20. Dann, S.M.; Spehlmann, M.E.; Hammond, D.C.; Iimura, M.; Hase, K.; Choi, L.J.; Hanson, E.; Eckmann, L. IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 6816–6826, doi:10.4049/jimmunol.180.10.6816.
21. Ramirez, K.; Huerta, R.; Oswald, E.; Garcia-Tovar, C.; Hernandez, J.M.; Navarro-Garcia, F. Role of EspA and intimin in expression of proinflammatory cytokines from enterocytes and lymphocytes by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*-infected rabbits. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 103–113, doi:10.1128/IAI.73.1.103-113.2005.
22. Lebeis, S.L.; Sherman, M.A.; Kalman, D. Protective and destructive innate immune responses to enteropathogenic *Escherichia coli* and related A/E pathogens. *Future Microbiol.* **2008**, *3*, 315–328, doi:10.2217/17460913.3.3.315.
23. Gea-Sorlí, S.; Closa, D. Role of macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J. Gastrointest. Pharmacol. Ther.* **2010**, *1*, 107–111, doi:10.4292/wjgpt.v1.i5.107.
24. Fujiwara, N.; Kobayashi, K. Macrophages in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* **2005**, *4*, 281–286.
25. Murray, P.J.; Wynn, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol* **2011**, *11*, 723–737, doi:10.1038/nri3073.
26. Campos, L.C.; Whittam, T.S.; Gomes, T.A.; Andrade, J.R.; Trabulsi, L.R. Escherichia coli serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 3282–3288, doi:10.1128/IAI.62.8.3282-3288.1994.
27. Monaris, D.; Sbrogio-Almeida, M.E.; Dib, C.C.; Canhamero, T.A.; Souza, G.O.; Vasconcellos, S.A.; Ferreira, L.C.; Abreu, P.A. Protective Immunity and Reduced Renal Colonization Induced by Vaccines Containing Recombinant Leptospira interrogans Outer Membrane Proteins and Flagellin Adjuvant. *Clin. Vaccine Immunol.* **2015**, *22*, 965–973, doi:10.1128/CVI.00285-15.
28. de Almeida, C.M.; Quintana-Flores, V.M.; Medina-Acosta, E.; Schriefer, A.; Barral-Netto, M.; Dias da Silva, W. Egg yolk anti-BfpA antibodies as a tool for recognizing and identifying enteropathogenic *Escherichia coli*. *Scand. J. Immunol.* **2003**, *57*, 573–582, doi:10.1046/j.1365-3083.2003.01243.x.

29. Vasconcellos, H.L.; Scaramuzzi, K.; Nascimento, I.P.; Da Costa Ferreira, J.M.; Abe, C.M.; Piazza, R.M.; Kipnis, A.; Dias da Silva, W. Generation of recombinant bacillus Calmette-Guérin and Mycobacterium smegmatis expressing BfpA and intimin as vaccine vectors against enteropathogenic *Escherichia coli. Vaccine* **2012**, *30*, 5999–6005, doi:10.1016/j.vaccine.2012.05.083.
30. Menezes, M.A.; Rocha, L.B.; Koga, P.C.; Fernandes, I.; Nara, J.M.; Magalhães, C.A.; Abe, C.M.; Ayala, C.O.; Burgos, Y.K.; Elias, W.P.; et al. Identification of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *108*, 878–887, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04484.x.
31. Nara, J.M.; Cianciarullo, A.M.; Culler, H.F.; Bueris, V.; Horton, D.S.; Menezes, M.A.; Franzolin, M.R.; Elias, W.P.; Piazza, R.M. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 35–43, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04625.x.
32. Weischenfeldt, J.; Porse, B. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc.* **2008**, *2008*, pdb.prot5080, doi:10.1101/pdb.prot5080.
33. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
34. Cooperstock, M.S. Inactivation of endotoxin by polymyxin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1974**, *6*, 422–425, doi:10.1128/aac.6.4.422.
35. Sandri, S.; Rodriguez, D.; Gomes, E.; Monteiro, H.P.; Russo, M.; Campa, A. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *J. Leukoc. Biol.* **2008**, *83*, 1174–1180, doi:10.1189/jlb.0407203.
36. Cleary, J.; Lai, L.C.; Shaw, R.K.; Straatman-Iwanowska, A.; Donnenberg, M.S.; Frankel, G.; Knutton, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: Role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* **2004**, *150*, 527–538, doi:10.1099/mic.0.26740-0.
37. Vallance, B.A.; Finlay, B.B. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 8799–8806, doi:10.1073/pnas.97.16.8799.
38. Humphries, R.M.; Armstrong, G.D. Sticky situation: Localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to the small intestine epithelium. *Future Microbiol.* **2010**, *5*, 1645–1661, doi:10.2217/fmb.10.124.
39. Edwards, L.A.; Bajaj-Elliott, M.; Klein, N.J.; Murch, S.H.; Phillips, A.D. Bacterial-epithelial contact is a key determinant of host innate immune responses to enteropathogenic and enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27030, doi:10.1371/journal.pone.0027030.
40. Phillips, A.D.; Frankel, G. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J. Infect. Dis.* **2000**, *181*, 1496–1500, doi:10.1086/315404.
41. Mantovani, A.; Biswas, S.K.; Galdiero, M.R.; Sica, A.; Locati, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* **2013**, *229*, 176–185, doi:10.1002/path.4133.
42. Gordon, S.; Plüddemann, A.; Martinez Estrada, F. Macrophage heterogeneity in tissues: Phenotypic diversity and functions. *Immunol. Rev.* **2014**, *262*, 36–55, doi:10.1111/imr.12223.
43. Krause, P.; Morris, V.; Greenbaum, J.A.; Park, Y.; Bjoerheden, U.; Mikulski, Z.; Muffley, T.; Shui, J.W.; Kim, G.; Cheroutre, H.; et al. IL-10-producing intestinal macrophages prevent excessive antibacterial innate immunity by limiting IL-23 synthesis. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7055, doi:10.1038/ncomms8055.
44. Sharma, R.; Tesfay, S.; Tomson, F.L.; Kanteti, R.P.; Viswanathan, V.K.; Hecht, G. Balance of bacterial pro- and anti-inflammatory mediators dictates net effect of enteropathogenic *Escherichia coli* on intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2006**, *290*, G685-694, doi:10.1152/ajpgi.00404.2005.
45. Hine, A.M.; Loke, P. Intestinal Macrophages in Resolving Inflammation. *J. Immunol.* **2019**, *203*, 593–599, doi:10.4049/jimmunol.1900345.
46. Bosurgi, L.; Cao, Y.G.; Cabeza-Cabrerizo, M.; Tucci, A.; Hughes, L.D.; Kong, Y.; Weinstein, J.S.; Licona-Limon, P.; Schmid, E.T.; Pelorosso, F.; et al. Macrophage function in tissue repair and remodeling requires IL-4 or IL-13 with apoptotic cells. *Science* **2017**, *356*, 1072–1076, doi:10.1126/science.aai8132.
47. Dolasia, K.; Bisht, M.K.; Pradhan, G.; Udgata, A.; Mukhopadhyay, S. TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity. *Int. Rev. Immunol.* **2018**, *37*, 3–19, doi:10.1080/08830185.2017.1397656.
48. Wen, H.; Miao, E.A.; Ting, J.P. Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity* **2013**, *39*, 432–441, doi:10.1016/j.immuni.2013.08.037.
49. Kumar, H.; Kawai, T.; Akira, S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *388*, 621–625, doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.062.

50. Poltorak, A.; He, X.; Smirnova, I.; Liu, M.Y.; Van Huffel, C.; Du, X.; Birdwell, D.; Alejos, E.; Silva, M.; Galanos, C.; et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science* **1998**, *282*, 2085–2088, doi:10.1126/science.282.5396.2085.

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

© 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ANEXO B

ORIGINAL RESEARCH
published: 24 April 2017
doi: 10.3389/fimmu.2017.00477

Immunogenic Domains and Secondary Structure of *Escherichia coli* Recombinant Secreted Protein *Escherichia coli*-Secreted Protein B

Bruna Alves Caetano[1], Letícia Barboza Rocha[1], Eneas Carvalho[2†], Roxane Maria Fontes Piazza[1] and Daniela Luz[1]*

[1] *Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil,* [2] *Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil*

OPEN ACCESS

Edited by:
Daniela Santoro Rosa, Federal University of São Paulo, Brazil

Reviewed by:
Eric Cox, Ghent University, Belgium
Jorge Blanco, Universidade de Santiago de Compostela, Spain
Nora Lía Padola, National University of Central Buenos Aires, Argentina

Correspondence:
Roxane Maria Fontes Piazza
roxane@butantan.gov.br

†Present address:
Eneas Carvalho, Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil

Specialty section:
This article was submitted to Vaccines and Molecular Therapeutics, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: *11 October 2016*
Accepted: *05 April 2017*
Published: *24 April 2017*

Citation:
Caetano BA, Rocha LB, Carvalho E, Piazza RMF and Luz D (2017) Immunogenic Domains and Secondary Structure of Escherichia coli Recombinant Secreted Protein Escherichia coli-Secreted Protein B. Front. Immunol. 8:477. doi: 10.3389/fimmu.2017.00477

Several pathogenic bacteria are able to induce the attaching and effacing (A/E) lesion. The A/E lesion is caused by effector proteins, such as *Escherichia coli*-secreted protein B (EspB), responsible together with *Escherichia coli*-secreted protein D for forming a pore structure on the host cell, which allows the translocation of effector proteins. Different variants of this protein can be found in *E. coli* strains, and during natural infection or when this protein is injected, this leads to variant-specific production of antibodies, which may not be able to recognize other variants of this bacterial protein. Herein, we describe the production of a hybrid recombinant EspB toxin that comprises all known variants of this protein. This recombinant protein could be useful as an antigen for the production of antibodies with broad-range detection of EspB-bearing bacteria, or as an antigen that could be used in vaccine formulation to generate antibodies against different EspB variants, thereby increasing immunization potential. In addition, the recombinant protein allowed us to analyze its secondary structure, to propose the immunogenic regions of EspB variants, and also to characterize anti-EspB antibodies. Our results suggest that this hybrid protein or a protein composed of the conserved immunogenic regions could be used for a variety of clinical applications.

Keywords: *Escherichia coli*-secreted protein B, *Escherichia coli*, protein structure, peptide sequence, immunogenic domain

INTRODUCTION

Gram-negative pathogenic bacteria, such as enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), and *Citrobacter rodentium* are able to induce attaching and effacing (A/E) lesion (1–3). The A/E lesion is characterized by intimate intestinal epithelium adhesion, microvillus effacing, pedestal formation for effector protein translocation and the aggregation of actin and other cytoskeletal elements at the bacterial binding sites, caused by effector proteins, which are secreted into the enterocyte by a type III secretion system (T3SS) (4). The genes encoding the T3SS are located in pathogenicity islands and have many conserved structural components. The system structure consists of a syringe-like conformation, with a protein complex anchored on the bacterial membrane and a needle-shaped protein crossing the extracellular space to the host membrane, where a pore for the translocation of effector proteins is assembled (5, 6).

Enteropathogenic *Escherichia coli* and EHEC are the main bacterial agents associated with diarrhea among children under 5 years old, and both pathogens are able to induce the A/E lesion (7). Among the virulence factors comprising the T3SS of these bacteria are the secreted proteins (Esps). The Esp responsible for the syringe-like structure of T3SS is secreted protein A (EspA), which is the needle-shaped protein of approximately 25 kDa, while secreted proteins B [*Escherichia coli*-secreted protein B (EspB)] and D [*Escherichia coli*-secreted protein D (EspD)] are responsible for the pore structure assembled in the eukaryotic membrane (8).

Escherichia coli-secreted protein B is approximately 37 kDa in size and forms the pore assembled "needle tip" in the host cell membrane together with EspD. Also, EspB participates in phagocytosis evasion and binding to eukaryotic cell myosin, inhibition of actin interaction, and damage to the microvilli (9). There are three variants of EspB, i.e., α, β, and γ, where the α variant is subdivided into 1, 2, and 3. Allele frequency studies have shown α EspB to be the most prevalent, followed by β EspB (5, 10–13). The EspB genetic sequence varies between all variants, as demonstrated by the necessity of different primer sets for DNA amplification in gene detection studies. However, there is no clear correlation between an EspB protein subtype and a specific serogroup of EPEC and EHEC (11–13).

Several studies have used EspB protein as an antigen for the recognition of EPEC and EHEC strains (14–17), but they employed an EspB obtained by *espB* gene amplification from specific EPEC strains—mainly the prototype (E2348/69; O127:H6). Thus, the antibodies generated are against the specific EspB variant present in these strains. Therefore, the detection coverage in these methods is limited by the variant strain, which may result in other variants not being effectively recognized, thereby reducing bacterial recognition.

Nevertheless, eliciting antibodies against bacterial colonization factors have been proposed as a vaccination strategy to prevent pathogenic *E. coli* infection (18). Antibodies against the T3SS proteins, such as EspA, EspB, and EspD, have been detected in the serum from patients with diarrheagenic *E. coli* infections, demonstrating their immunogenic potential (19–22). Previous studies have shown EspB as a target for vaccine formulations in the veterinary field, ranging from transferred maternal colostral antibodies and intramuscular immunization in cattle (18, 23), to oral and intranasal immunization in mice (24, 25). Vaccine development against enteric pathogens that are able to induce strong mucosal immune responses capable of preventing intestinal colonization are of great importance to protect humans and animals from pathologies (21, 23).

Herein, we synthetically constructed a hybrid recombinant EspB (rEspB), representative of all known variants to date, and characterized its secondary structure, which allowed us to propose an immunogenic domain.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Plasmid, and Supplies

The *E. coli* strains used were DH5α [F⁻ Φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (r_k^-, m_k^+) *pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ⁻] and BL21 (DE3) [F⁻*ompT hsdS*$_B$ (r_B^-, m_B^-) *gal dcm* (DE3)] from Invitrogen (CA, USA). The plasmid used was pET28a(+) containing a 6-histidine tag (His-tag) at both the N- and C-terminal from Novagen (Darmstadt, Germany). T4 ligase and T4 buffer DNA ligase (2×) were purchased from Promega Corporation (WI, USA). The enzymes used (*Bam*HI and *Hin*dIII) and the induction agent isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) were obtained from Thermo Scientific (MA, USA). The monoclonal anti-polyHistidine antibody produced in mouse, anti-mouse IgG (whole molecule) peroxidase antibody and 3′3′-diaminobenzidine (DAB) were purchased from Sigma-Aldrich (MO, USA). Luria–Bertani (LB) medium was from BD (NJ, USA), and kanamycin from Gibco (MA, USA).

Synthetic Gene Design

The EspB synthetic gene was developed considering common regions of all known EspB variants to date, by alignment of α1, α2, α3, β, and γ EspB sequences (GenBank number: AAC38396.1, AEW69664.1, AEW69663.1, CAA74174.1, and CAA65654.1) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). The synthetic gene for the hybrid rEspB protein was assembled on the basis of the most prevalent amino acids among the variants for each position of the protein sequence (**Figure 1**). The restriction enzymes were selected with the support program BioEdit version 7.2.0, and the restriction sites for the enzymes *Bam*HI and *Hin*dIII were inserted into the conserved sequence upstream and downstream, respectively (Figure S1 in Supplementary Material), while no stop codon was added in the sequence. The predicted recombinant protein had a molecular weight of 24.6 kDa. The EspB gene was manufactured by GenScript (NJ, USA) and cloned into pUC57 vector.

Cloning

Chemically competent *E. coli* BL21 (DE3) were obtained using the Chung and Miller protocol, with modifications (26). The gene of interest was excised from pUC57 by restriction enzyme digestion and then cloned into the pET28a expression vector. The reaction mixture consisting of 2 µL of deionized water, 5 µL of the gene, 1 µL of the pET28a vector, 1 µL of T4 DNA ligase (3 IU), and 2 µL of T4 buffer DNA ligase (2×) was incubated at 24°C for 1 h, followed by a 4°C incubation for 18 h.

For *E. coli* BL21 (DE3) transformation, 1 µL of plasmid was incubated with 2 µL of 5× KCM buffer (0.5 M KCl, 0.15 M $CaCl_2$, and 0.25 M $MgCl_2$) and 7 µL of deionized water on ice for 5 min, followed by the addition of 10 µL of chemically competent cells; after 20 min, the solution was transferred to 24°C for 10 min. Subsequently, 200 µL of LB culture medium were added and the sample was incubated at 37°C for 1 h. The cells were then streaked on a LB agar plate containing 50 µg/mL of kanamycin and incubated at 37°C for 18 h.

Expression and Purification

BL21 His-EspB transformant was cultivated in 10 mL of LB medium containing 50 µg/mL kanamycin at 37°C for 18 h with stirring at 250 rpm. The culture was then added to 500 mL of LB medium supplemented with 0.2% glucose and 50 µg/mL of kanamycin, and further grown at 37°C for 2 h at 250 rpm. After reaching an optical density of 0.6–0.8 (OD_{600}), IPTG was added to

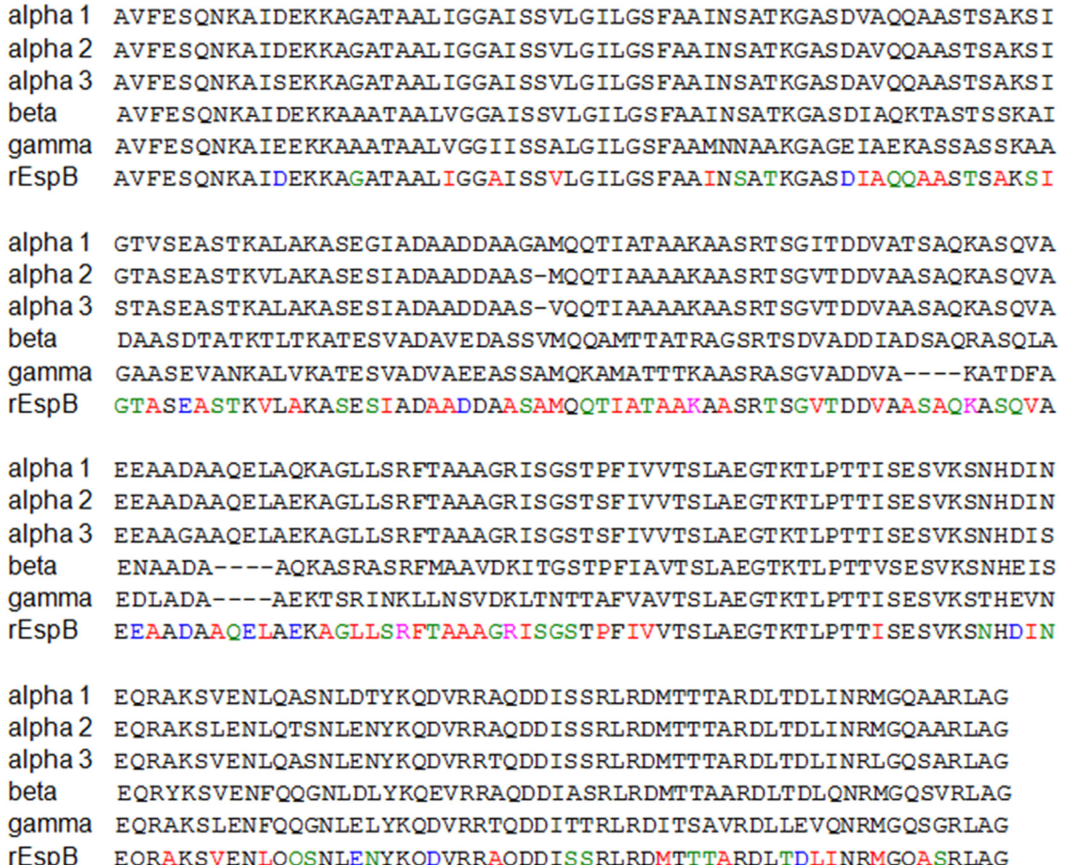


FIGURE 1 | **Recombinant *Escherichia coli*-secreted protein B (rEspB) conserved domain**. Alignment of all EspB variants known to date. Shown in black are the conserved regions and in colors the divergent amino acids along the whole protein sequence, in which we used the most prevalent amino acids among the variants.

a final concentration of 1 mM, and the culture was then incubated at 37°C for 4 h at 250 rpm. The cells were separated in a 5804 R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) at 10,000 × *g* for 10 min, and the supernatant discarded. The pellet was resuspended in 60 mL of ligation buffer (20 mM Tris–HCl, pH 7.9, containing 0.5 M NaCl) with 1% 100× protease inhibitor cocktail and 50 µg/mL lysozyme, and allowed to stand in an ice bath for 30 min. The cells were lysed by three cycles of sonication for 10 min, with the amplitude set at 30% (Sonopuls Bandelin, Berlin, Germany). The lysate was centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min and the resulting pellet was solubilized with 30 mL of buffer with 8 M urea, with stirring at 4°C for 18 h.

Purification was performed by metal affinity chromatography by gravity flow. Following urea treatment, 2 mL of Ni-NTA Agarose (Qiagen, NW, Germany) were added to the solubilized pellet and the suspension incubated at 4°C for 18 h with gentle shaking. The suspension was centrifuged at 30 × *g* for 1 min and pellet-containing agarose was gently transferred to a polypropylene column (Qiagen, NW, Germany). rEspB protein was eluted with buffer containing different concentrations of imidazole: 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400, and 500 mM. The eluted protein was refolded by long-term dialysis and subsequently concentrated by osmosis with PEG 4000. SDS-PAGE (12%) and immunoblotting were used to confirm the purification. The recombinant protein was quantified with a NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific, MA, USA) and stored at 4°C. Identification of rEspB protein was performed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC–MS/MS). After SDS-PAGE analysis, protein bands were subjected to *in gel* trypsin digestion (27) and the resulting peptide mixture was analyzed by LC–MS/MS as described elsewhere (28). LTQ-Orbitrap Velos raw data were searched against a target database (UniProt restricted to *E. coli*; 22,940 sequences) using Mascot search engine (Matrix Science, UK).

Structure Analysis

Protein secondary structure was confirmed after refolding by circular dichroism (CD). The CD spectra were recorded between 190 and 260 nm using a quartz cuvette (0.1-mm path length) in a JASCO J-810 Spectropolarimeter (Jasco Corporation, Japan). After buffer-background subtraction (10 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0), the CD data were converted to mean residue ellipticity [θ] units (degree × cm^2 $dmol^{-1}$). CD spectra were obtained at three different pH (7.0, 8.0, and 9.0) and at temperatures ranging

from 5 to 95°C. The results were analyzed on the online server DICHROWEB (29–31), using the analysis program CDSSTR (32–34).

Epitope Mapping

Antibody-binding epitopes were determined by designing a CelluSpots® peptide array (INTAVIS Bioanalytical Instruments AG, NW, Germany), with 384 dots containing the full protein sequence divided in peptides with 11 amino acids/dots, having 8 overlapping amino acids. The sequences in the array were derived from the rEspB protein, which represents the α variants, as well as the full β and γ sequences (Table S1 in Supplementary Material) (5, 10, 11, 13). The assay was performed following the manufacturer's recommendations: briefly, the slides were blocked by immersion in 1% BSA at 4°C for 18 h with shaking. Anti-EspB monoclonal antibody (mAb) (10 µg/mL) and polyclonal antibody (pAb) (30 µg/mL) were incubated at 24°C for 4 h with stirring. The slides were washed three times with 0.05% Tween in PBS (0.01 M, pH 7.2) for 5 min. The slides were then incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (1:5,000) at 24°C for 2 h with stirring. Detection was performed with DAB and hydrogen peroxide and the reaction stopped with distilled water.

Antibodies

Polyclonal serum was obtained from a New Zealand White female rabbit (60 days old) after immunizing intramuscularly, three times with 2-week intervals, using a dose of 100 µg of rEspB protein adsorbed to 2.5 mg alum (Al^{3+}) as adjuvant. Serum was obtained 45 days after the first immunization. Immune serum reactivity was tested by indirect ELISA (35). Serum samples were obtained just before immunization from the auricular vein, which were used as the negative control in specific antibody evaluation. The anti-EspB mAb A5 was raised in the present study as in previous work by our group where mAb 4D9 was obtained (17).

RESULTS

rEspB Protein

The hybrid rEspB protein was obtained from the *E. coli* BL21 transformed with a plasmid harboring the hybrid *espB* gene. Restriction analysis confirmed that all clones had the same plasmid profile, and synthetic gene cloning was confirmed by sequencing. The protein was expressed in inclusion bodies; thus, urea treatment was necessary before the purification process. Since there was no stop codon in the cloned gene and since pET28a was the expression vector, the recombinant protein was expressed with two His-tag tails, one at each end of it. The protein was eluted using different imidazole concentrations, with effective elution occurring between 100 and 200 mM imidazole (**Figure 2**).

EspB Protein Characterization

To confirm the identity of rEspB, protein bands indicated in **Figure 2A** were subjected to mass spectrometric analysis, which resulted in the identification of nine tryptic peptides (^{95}AGATAALIGGAISSVLGILGSFAAINSATK^{124}, ^{216}AGLLSR^{221}, ^{222}FTAAAGR^{228}, ^{229}ISGSTPFIVVTSLAEGTK^{246}, ^{247}TLPTTISE-SVK^{257}, ^{258}SNHDINEQR^{266}, ^{288}AQDDISSR^{295}, ^{298}DMTTTAR^{304}, and ^{305}DLTDLINR^{312}), confirming the expression and isolation of protein EaeB (UniProt entry EAEB_ECO27).

Secondary Structure Prediction under Different Conditions

The EspB CD spectra showed a negative ellipticity band at 222 nm, which corresponds to α-helix structure (36). This secondary structure was observed at all pH tested; however, ellipticity was closer to 0 at pH 7.0, indicating less α-helix content under this condition when compared to pH 8.0 and 9.0. Indeed, deconvolution analysis showed a higher level of unordered content at pH 7.0 and, on the other hand, an increase in α-helix content at pH 8.0 and 9.0 (**Figure 3**; Table S2 in Supplementary Material). Effects on protein secondary structures were observed at a higher temperature, indicating protein denaturation by heat (**Figure 4**; Table S3 in Supplementary Material).

Treatment with temperatures over 60°C resulted in altered secondary structure stability, showing this to be the necessary temperature to denature the rEspB protein. There was a slight reversible loss of secondary structure after heating to 95°C and gradual cooling to 5°C. Close to the storage temperature, at 5°C, EspB protein secondary structure exhibited approximately 18% α-helix, 20% β-sheet and 20% turns, and 42% irregular structures. As the temperature increased, the proportion of turns and irregular structures tended to be the same, while the α-helix content decreased and β-sheet content increased. Above 60°C, there were no more alterations in secondary structure, with α-helix around 5% and β-sheet 31%.

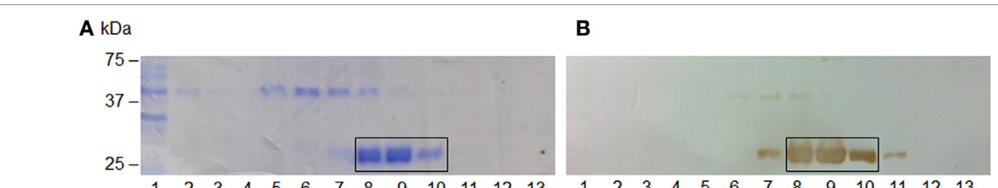


FIGURE 2 | ***Escherichia coli*-secreted protein B (EspB) protein SDS-PAGE and immunoblotting purification profile**. **(A)** 12% SDS-PAGE; **(B)** immunoblotting; (1) flow through; (2–4) wash with 20 mM Tris–HCl, pH 7.9, containing 0.5 M NaCl; (5–13) elution fractions with increasing imidazole concentration, respectively, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, and 400 mM. The steps where EspB was effectively eluted are highlighted.

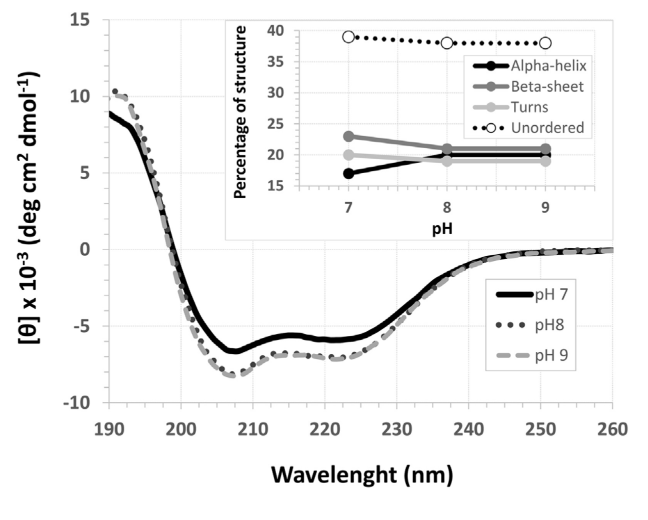


FIGURE 3 | **pH circular dichroism spectra profile of *Escherichia coli*-secreted protein B (EspB) protein**. EspB profile at pH 7.0, 8.0 and 9.0, showing maintenance of structure at pH 8.0 and 9.0. Inset shows the percentage of secondary structure for each pH tested.

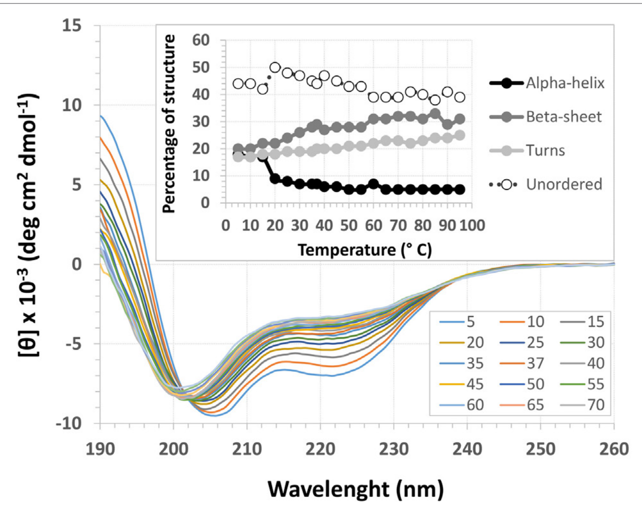


FIGURE 4 | **Temperature circular dichroism spectra of *Escherichia coli*-secreted protein B (EspB) protein**. Secondary structure of EspB at different temperatures ranging from 5 to 95°C, showing the loss of structure when approaching 0 mean residue ellipticity [θ]. Inset shows the variation in the percentage of secondary structure for each temperature tested.

Antibody-Binding Epitopes and Probable Immunogenic Domain of EspB

The anti-EspB pAb generated against the hybrid rEspB was able to recognize several dots on the peptide array, suggesting that those epitopes are involved in antibody binding. The pAb reacted with 11 points on α EspB, 4 on β EspB, and 5 on γ EspB (**Table 1**). Several spots were adjacent to each other, which resulted in three sequences for the α variant (^{198}ASQVAEEAADA^{208}, ^{231}GSTPFIVVTSLAEG^{244}, and ^{264}EQRAKSVENLQASNLDTYKQDVRRAQDDISSR^{295}) and the same two sequences for the β and γ variants (^{232}STPFIVVTSLAEGT^{245} and ^{271}ENLQASNLDTYKQDVRRAQDDISS^{294}). The common domain between all sequences could be defined as ^{232}STPFIVVTSLAEG^{244} and ^{271}ENLQASNLDTYKQDVRRAQDDISS^{294}.

TABLE 1 | **Binding epitopes of individual antibodies recognized by peptide array.**

Escherichia coli-secreted protein B (EspB) variant	Polyclonal antibody (pAb)	Monoclonal antibody (mAb) 4D9	mAb A5
α EspB	ASQVAEEAADA		
	VAEEAADAAQE		
	GSTPFIVVTSL		
	PFIVVTSLAEG		AVFESQNKAID
	DINEQRAKSVE	DAAQELAEKAG	EADAAQELAE
	EQRAKSVENLQ	ARDLTDLINRM	DAAQELAEKAG
	VENLQQSNLEN		ARDLTDLINRM
	LQQSNLENYKQ		LTDLINRMGQA
	SNLENYKQDVR		
	KQDVRRAQDDI		
	VRRAQDDISSR		
β EspB			AITASAINSSL
	TPFIAVTSLAE	KGASDIAQKTA	GKMVRILQDYQ
	NFQQGNLDLYK	MTTAARDLTDL	VRILQDYQQQQ
	QGNLDLYKQEV	AARDLTDLQNR	LQDYQQQQLSQ
	EVRRAQDDIAS		QLAVFESQNKA
			AARDLTDLQNR
γ EspB	TTAFVAVTSLA		
	FVAVTSLAEGT	AAGAASEVANK	
	ENFQQGNLELY	AASEVANKALV	AAGAASEVANK
	LYKQDVRRTQD		
	QDVRRTQDDIT		

The mAbs 4D9 and A5 were used for comparison with the pAb, since they were obtained against the α EspB variant. Individually, mAb 4D9 reacted with 2 points on α EspB, 3 on β EspB, and 2 on γ EspB, and mAb A5 reacted with 5 points on α EspB, 6 on β EspB, and 1 on γ EspB (**Table 1**). The common region between the mAbs was two dots on α EspB (^{127}DAAQELAEKAG^{137} and ^{223}ARDLTDLINRM^{233}), one dot on β EspB (^{295}AARDLTDLQNR^{305}), and one dot on γ EspB (^{139}AAGAASEVANK^{149}) (Figure S2 in Supplementary Material).

Another BLAST alignment of the two major sequences recognized by the pAb was performed against non-redundant protein sequences (nr) within bacteria (taxid:2) to evaluate if the sequences actually correlated with EspB and had 100% identity to the enterobacterial EspB protein from *E. coli* (data not shown).

DISCUSSION

Escherichia coli-secreted protein B protein is translocated into the host cell through a T3SS and together with EspD is responsible for assembling a multimeric pore in the eukaryotic membrane, contributing to the hallmarks of the A/E lesion. Due to this characteristic, EspB has a major importance in bacterial virulence and its detection can be used as a diagnostic tool for diarrheagenic *E.*

coli infections. However, the allele diversity of EspB in immune response leads to specific antibodies that may not be able to recognize different variant bacterial strains.

Considering that EspB can be found in EPEC and EHEC, both related to severe diarrhea cases in human, its diagnosis and prevention are of great value for public health. Besides, since cattle are a natural reservoir of EHEC and a source for human infection, veterinary diagnosis and prevention are of major importance as well (37, 38). Vaccine strategies to prevent EPEC and EHEC infections employing EspB as an antigen have been proposed in mice and cattle, contemplating the veterinary field (18, 23–25). We obtained a hyperimmune serum from rabbits recognizing EspB, demonstrating the protein antigenic ability. Furthermore, it is known that in cases of infection, antibodies against EspB can be found in human serum (19–21), thus making EspB a target protein for the development of diagnostic tests and vaccine formulations.

In addition, EPEC and EHEC EspB protein showed less than 50% identity when compared to the homologs from *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, and *Pseudomonas aeruginosa*, suggesting that a diagnostic test for EspB can be specific for EPEC and EHEC. Based on EspB detection, previous studies proposed diagnostic methods for human infection by EPEC and EHEC, such as an immunochromatographic test (16) and latex agglutination test (15, 17), while ELISA was proposed for herd diagnosis (37). All of those methods rely on antibody recognition ability, and they used heterologous EspB protein obtained from the *espB* gene amplified from specific strains, which can result in ineffective antigen recognition, since other EspB variants may not be effectively recognized by the antibody. It is worth mentioning that mAb 4D9, described by our group, reacted with 2 points on α EspB, 3 on β EspB, and 2 on γ EspB, thus supporting our previous results, which were 97% sensitivity, 98% specificity, and 97% efficiency for a rapid agglutination latex test. All EspB variants were detected by the mAb in the peptide array assay; however, when used for strain recognition, the mAb did not recognize the different variants (17). One hypothesis is that in the peptide array the epitopes are linearized; thus, the antibody identifies small parts of an epitope that is recognized when the protein presents quaternary structure.

Therefore, the use of an EspB protein that comprises and represents all known variants as an antigen and for antibody development continues to be necessary. Thus, herein, a hybrid recombinant protein EspB was developed and characterized in terms of secondary structure, thermostability, and immunogenic region.

For that purpose, a rEspB protein comprising all known variants was designed and expressed. The His-tag tails did not affect secondary structure. The percentage of unordered structures decreased as pH increased from 7.0 to 8.0 and then remained stable when pH increased from 8.0 to 9.0. This finding suggests that the secondary structure of EspB has greater proportions of α-helix and β-sheet and turns at pH 8.0 and 9.0 when compared to pH 7.0 (**Figure 3**; Table S2 in Supplementary Material). Moreover, our data suggest that this increase in the percentage of ordered secondary structures was due to an increase in α-helix content; on the other hand, the percentage of β-sheets and turns was slightly reduced when pH increased. This increase in the proportion of ordered secondary structures at pH 8.0 and 9.0 may produce a change in the biological activity (in efficacy or even specificity) of this protein at this basic pH. EspB is mostly composed of irregular structures, followed by almost equal proportions of α-helix and β-sheet and turns. In regard to temperature stability, the α-helix content tended to decrease with temperature increase, while the β-sheet proportion increased with temperature (**Figure 4**; Table S3 in Supplementary Material). Either way, at temperatures above 60°C, the change in secondary structure halts, leading us to believe that, in this range, EspB is heat denatured, showing a heat-sensitivity characteristic.

Furthermore, the epitope mapping assay analyses allowed not only the characterization of antibody/epitope binding described here but also the proposal of an EspB immunogenic consensus domain. pAb is generated by humoral immune response, and their recognizing domain shows the EspB protein sites capable of activating the immune system. We identified two common epitopes between all known EspB subtypes (^{232}STPFIVVTSLAEG^{244} and ^{271}ENLQASNLDTYKQDVRRAQDDISS^{294}). The peptides were aligned with the EspB protein of the prototype EPEC strain E2348/69 and showed 100% identity with two regions at the C-terminus, indicating the antibody molecule binding site to EspB. These regions were also present among the binding sites of all antibodies tested, even the mAb obtained against only α EspB, indicating that they are, indeed, conserved immunogenic domains for this protein.

This recombinant protein can be used in clinical applications, such as antigen for antibody production, enabling not only the diagnosis of A/E-producing pathotypes by EspB protein recognition but also as an alternative therapy for the disease by eliciting neutralizing antibodies against different EspB variants. Moreover, rEspB itself can serve as an antigen in a vaccine formulation to generate host antibodies able to prevent disease occurrence. In conclusion, we developed and obtained a hybrid rEspB protein capable of inducing antibody response against all known EspB subtypes, which can be a promising tool to be used as antigen for antibody development for the diagnosis and prevention of A/E lesion-producing pathogens.

ETHICS STATEMENT

The experiments were conducted in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and they were approved by the Ethical Committee for Animal Research of Butantan Institute (5492021015).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RP conceived and designed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, and wrote the paper. BC conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, and wrote the paper. LR and DL conceived and designed the experiments, analyzed the data, and wrote the paper. EC performed the experiments, analyzed the data, and wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Solange M. T. Serrano (Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil) for support in the identification of rEspB by mass spectrometry and Dr. Waldir P. Elias (Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil) for helpful discussions and suggestions. This work was supported by grants from São Paulo Research Foundation (FAPESP 2011/12928-2; 2013/06589-6) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) awarded to RP. BC was a recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship (AUXPE/PROAP - 1364/2013). DL is a PNPD/CAPES postdoctoral fellow (PNPD20132071). LR was a FAPESP postdoctoral fellow (2012/090906-2). Dr. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00477/full#supplementary-material.

FIGURE S1 | **Sequence coding for *Escherichia coli*-secreted protein B (EspB) protein**. The sequence has 245 amino acids, and 241 encoding for EspB protein. The underlined sequences represent the cleavage sites of the restriction enzymes *Bam*HI, upstream, and *Hin*dIII, downstream.

FIGURE S2 | **Antibodies binding epitope by peptide array**. The dots indicate the linear sequence of 11 peptides that the monoclonal antibody (mAb) 4D9, mAb A5, and polyclonal antibody (pAb) bind, respectively. From top to bottom, the array was designed containing the recombinant *Escherichia coli*-secreted protein B (rEspB) sequence, which represents the α variants and β and γ sequences, highlighted in bars. The two sides of the slide are duplicate of the sequence.

REFERENCES

1. Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* (1983) 41:1340–51.
2. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* (1989) 57:1290–8.
3. Gaytán MO, Martínez-Santos VI, Soto E, González-Pedrajo B. Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* (2016) 21(6):129. doi:10.3389/fcimb.2016.00129
4. Knutton S, Lloyd DR, Mcneish AS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* (1987) 55(1):69–77.
5. Elliott SJ, Wainwright LA, Mcdaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* (1998) 28(1):1–4. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00783.x
6. Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol* (2015) 13(6):343–59. doi:10.1038/nrmicro3456
7. Lanata CF, Fischer-Walker CL, Olascoaga AC, Torres CX, Aryee MJ, Black RE. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One* (2013) 8(9):e72788. doi:10.1371/journal.pone.0072788
8. Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* (2005) 73(5):2573–85. doi:10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005
9. Lodato PB, Kaper JB. Post-transcriptional processing of the LEE4 operon in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* (2009) 71(2):273–90. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06530.x
10. Ebel F, Deibel C, Kresse AU, Guzmán CA, Chakraborty T. Temperature- and medium-dependent secretion of proteins by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* (1996) 64(11):4472–9.
11. Mairena EC, Neves BC, Trabulsi LR, Elias WP. Detection of LEE 4 region-encoded genes from different enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes. *Curr Microbiol* (2004) 48(6):412–8. doi:10.1007/s00284-003-4164-8
12. Garrido P, Blanco M, Moreno-Paz M, Briones C, Dahbi G, Blanco J, et al. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic E-coli (EPEC) strains. *Clin Chem* (2006) 52(2):192–201. doi:10.1373/clinchem.2005.059766
13. Contreras CA, Ochoa TJ, Ruiz J, Lacher DW, Durand D, Debroy C, et al. Genetic diversity of locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Peruvian children. *J Med Microbiol* (2012) 61 (Pt 8):1114–20. doi:10.1099/jmm.0.045443-0
14. Frankel G, Phillips AD, Novakova M, Field H, Candy DC, Schauer DB, et al. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* restores murine virulence to a *Citrobacter rodentium* eaeA mutant: induction of an immunoglobulin A response to intimin and EspB. *Infect Immun* (1996) 64(12):5315–25.
15. Lu Y, Toma C, Honma Y, Iwanaga M. Detection of EspB using reversed passive latex agglutination: application to determination of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Diagn Microbiol Infect Dis* (2002) 43(1):7–12. doi:10.1016/S0732-8893(02)00363-2
16. Nakasone N, Toma C, Lu Y, Iwanaga M. Development of a rapid immunochromatographic test to identify enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* by detecting EspB. *PLoS Negl Trop Dis* (2014) 8(9):e3150. doi:10.1371/journal.pntd.0003150
17. Rocha LB, Santos AR, Munhoz DD, Cardoso LT, Luz DE, Andrade FB, et al. Development of a rapid agglutination latex test for diagnosis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in developing world: defining the biomarker, antibody and method. *PLoS Negl Trop Dis* (2014) 8(9):e3150. doi:10.1371/journal.pntd.0003150
18. Rabinovitz BC, Vilte DA, Larzábal M, Abdala A, Galarza R, Zotta E, et al. Physiopathological effects of *Escherichia coli* O157:H7 inoculation in weaned calves fed with colostrum containing antibodies to EspB and intimin. *Vaccine* (2014) 32:3823–9. doi:10.1016/j.vaccine.2014.04.073
19. Martinez MB, Taddei CR, Ruiz-Tagle A, Trabulsi LR, Girón JA. Antibody response of children with enteropathogenic *Escherichia coli* infection to the bundle-forming pilus and locus of enterocyte effacement-encoded virulence determinants. *J Infect Dis* (1999) 179(1):269–74. doi:10.1086/314549
20. Loureiro I, Frankel G, Adu-Bobie J, Dougan G, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MM. Human colostrum contains IgA antibodies reactive to enteropathogenic *Escherichia coli* virulence-associated proteins: intimin, BfpA, EspA, and EspB. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (1998) 27(2):166–71. doi:10.1097/00005176-199808000-00007
21. Guirro M, de Souza RL, Piazza RM, Guth BE. Antibodies to intimin and *Escherichia coli*-secreted proteins EspA and EspB in sera of Brazilian children with hemolytic uremic syndrome and healthy controls. *Vet Immunol Immunopathol* (2013) 152(1–2):121–5. doi:10.1016/j.vetimm.2012.09.016
22. Asper DJ, Karmali MA, Townsend H, Rogan D, Potter AA. Serological response of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* type III secreted proteins in sera from vaccinated rabbits, naturally infected cattle, and humans. *Clin Vaccine Immunol* (2011) 18:1052–7. doi:10.1128/Cvi.00068-11
23. Vilte DA, Larzábal M, Garbaccio S, Gammella M, Rabinovitz BC, Elizondo AM, et al. Reduced faecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle following systemic vaccination with gamma-intimin C280 and EspB proteins. *Vaccine* (2011) 29:3962–8. doi:10.1016/j.vaccine.2011.03.079
24. Ahmed B, Loos M, Vanrompay D, Cox E. Oral immunization with *Lactococcus lactis*-expressing EspB induces protective immune responses against *Escherichia coli* O157:H7 in a murine model of colonization. *Vaccine* (2014) 32(31):3909–16. doi:10.1016/j.vaccine.2014.05.054
25. Rabinovitz BC, Larzábal M, Vilte DA, Cataldi A, Mercado EC. The intranasal vaccination of pregnant dams with intimin and EspB confers protection in

neonatal mice from *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 infection. *Vaccine* (2016) 34(25):2793–7. doi:10.1016/j.vaccine.2016.04.056

26. Chung CT, Miller RH. A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res* (1988) 16(8):3580. doi:10.1093/nar/16.8.3580
27. Hanna SL, Sherman NE, Kinter MT, Goldberg JB. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiology* (2000) 146(Pt 10):2495–508. doi:10.1099/00221287-146-10-2495
28. Zelanis A, Tashima AK, Rocha MM, Furtado MF, Camargo AC, Ho PL, et al. Analysis of the ontogenetic variation in the venom proteome/peptidome of *Bothrops jararaca* reveals different strategies to deal with prey. *J Proteome Res* (2010) 9(5):2278–91. doi:10.1021/pr901027r
29. Whitmore L, Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers* (2008) 89(5):392–400. doi:10.1002/bip.20853
30. Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Res* (2004) 32:W668–73. doi:10.1093/nar/gkh371
31. Lobley A, Whitmore L, Wallace BA. DICHROWEB: an interactive website for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Bioinformatics* (2002) 18:211–2. doi:10.1093/bioinformatics/18.1.211
32. Compton LA, Johnson WC Jr. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal Biochem* (1986) 155(1):155–67. doi:10.1016/0003-2697(86)90241-1
33. Manavalan P, Johnson WC Jr. Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal Biochem* (1987) 167(1):76–85. doi:10.1016/0003-2697(87)90135-7
34. Sreerama N, Woody RW. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* (2000) 287(2):252–60. doi:10.1006/abio.2000.4880
35. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin. *Immunochemistry* (1971) 8(9):871–4. doi:10.1016/0019-2791(71)90454-X
36. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1751(2):119–39. doi:10.1016/j.bbapap.2005.06.005
37. Joris MA, Vanrompay D, Verstraete K, De Reu K, De Zutter L, Cox E. Use of antibody responses against locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded antigens to monitor enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections on cattle farms. *Appl Environ Microbiol* (2013) 79(12):3677–83. doi:10.1128/AEM.01029-13
38. Bolton DJ, Ennis C, McDowell D. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from twelve bovine farms in the north-east of Ireland. *Zoonoses Public Health* (2014) 61(2):149–56. doi:10.1111/zph.12058

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Caetano, Rocha, Carvalho, Piazza and Luz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ANEXO C

Article

Epitope Sequences in Dengue Virus NS1 Protein Identified by Monoclonal Antibodies

Leticia Barboza Rocha [1,†], Rubens Prince dos Santos Alves [2,†], Bruna Alves Caetano [1], Lennon Ramos Pereira [2], Thais Mitsunari [1], Jaime Henrique Amorim [2,‡], Juliana Moutinho Polatto [1], Viviane Fongaro Botosso [3], Neuza Maria Frazatti Gallina [4], Ricardo Palacios [5], Alexander Roberto Precioso [5], Celso Francisco Hernandes Granato [6], Danielle Bruna Leal Oliveira [7], Vanessa Barbosa da Silveira [7], Daniela Luz [1], Luís Carlos de Souza Ferreira [2] and Roxane Maria Fontes Piazza [1,*]

1. Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, 05503-900 SP, Brazil; leticia.rocha@butantan.gov.br (L.B.R.); bruna.caetano@butantan.gov.br (B.A.C.); thais.mitsunari@butantan.gov.br (T.M.); juliana.yassuda@butantan.gov.br (J.M.P.); daniedaluz@yahoo.com.br (D.L.)
2. Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 05508-000 SP, Brazil; rubens.bmc@gmail.com (R.P.d.S.A.); lennon_rp@usp.br (L.R.P.); jh.biomedico@gmail.com (J.H.A.); lcsf@usp.br (L.C.d.S.F.)
3. Laboratório de Virologia, Instituto Butantan, São Paulo, 05503-900 SP, Brazil; viviane.botosso@butantan.gov.br
4. Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção; Instituto Butantan, São Paulo, 05503-900 SP, Brazil; neuza.gallina@butantan.gov.br
5. Divisão de Ensaios Clínicos e Farmacovigilância, Instituto Butantan, São Paulo, 05503-900 SP, Brazil; ricardo.palacios@butantan.gov.br (R.P.); alexander.precioso@butantan.gov.br (A.R.P.)
6. Departamento de Medicina, Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 04023-062 SP, Brazil; celso.granato@grupofleury.com.br
7. Laboratório de Virologia Molecular e Clínica, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 05508-000 SP, Brazil; danibruna@gmail.com (D.B.L.O.); vanessa.silveirabio@gmail.com (V.B.d.S.)

* Correspondence: roxane@butantan.gov.br; Tel.: +55-11-2627-9724

† These authors contributed equally to the present work.

‡ Present address: Laboratório de Microbiologia, Centro das Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, 47805-100. Bahia, Brazil.

Received: 8 August 2017; Accepted: 22 September 2017; Published: 15 October 2017

Abstract: Dengue nonstructural protein 1 (NS1) is a multi-functional glycoprotein with essential functions both in viral replication and modulation of host innate immune responses. NS1 has been established as a good surrogate marker for infection. In the present study, we generated four anti-NS1 monoclonal antibodies against recombinant NS1 protein from dengue virus serotype 2 (DENV2), which were used to map three NS1 epitopes. The sequence ^{193}AVHADMGYWIESALNDT^{209} was recognized by monoclonal antibodies 2H5 and 4H1BC, which also cross-reacted with Zika virus (ZIKV) protein. On the other hand, the sequence ^{25}VHTWTEQYKFQPES^{38} was recognized by mAb 4F6 that did not cross react with ZIKV. Lastly, a previously unidentified DENV2 NS1-specific epitope, represented by the sequence ^{127}ELHNQTFLIDGPETAEC^{143}, is described in the present study after reaction with mAb 4H2, which also did not cross react with ZIKV. The selection and characterization of the epitope, specificity of anti-NS1 mAbs, may contribute to the development of diagnostic tools able to differentiate DENV and ZIKV infections.

Keywords: dengue virus; NS1; Zika virus; mAbs; antibody recognition; amino acid sequences

1. Introduction

Dengue fever is an important mosquito-borne and the most prevalent and costly arbovirus affecting humans, caused by one of the four serotypes of dengue virus (DENV 1–4) [1]. In the last decade, a large number of dengue epidemics have occurred, which resulted in enormous economic and human loss in parts of Asia and South America [2,3]. Considering Brazil only, more than three million cases of confirmed dengue infections occurred between 2015 and 2017, with 70 cases per 100,000 inhabitants [4].

The DENV genome is composed of a single positive-sense RNA that encodes a single viral polyprotein that is further processed by viral and host proteases into three structural proteins (C, prM/M, and E) and seven nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5). NS1 is the first nonstructural protein to be translated and is essential to virus replication [5]. It is a conserved N-linked glycoprotein with a variable molecular mass of 46–55 kDa, which depends on its glycosylation status [6]. The NS1 protein can be found as a dimer associated with vesicular compartments within the cell, where it plays an important role as an essential cofactor in the virus replication process [7]. Alternatively, NS1 can be secreted into the extracellular space as a hexameric lipoprotein particle [8] that interacts with several plasma proteins [9,10].

The recent introduction of the Zika virus (ZIKV) to the American continent represented a regional and worldwide public health challenge [11]. The close evolutionary relationship between DENV and ZIKV is reflected by the high sequence conservation of both structural and non-structural proteins [12]. In this aspect, the identification of monoclonal antibodies (mAbs) able to react specifically with DENV or cross-react with ZIKV proteins is a relevant feature for the validation of the diagnostic tools based on the NS1 protein.

In pioneering work by Falconar et al. [8], the immunogenic regions of DENV2 NS1 employing mAbs were extensively studied. Recently, certain studies have been using new methods to predict the binding epitopes of proteins to specific antibodies [13,14]. This approach was also applied to identify binding epitopes of DENV NS1 protein serotypes [15–17]. Also, the crystal structure of the DENV2 NS1 protein (PDB code: 4O6B) has been solved in both dimeric and hexameric configurations [6], which provides a useful guide for the selection of potential epitopes for therapy and vaccine strategies.

In the present study, recombinant DENV2 NS1 was used to immunize mice and generate murine mAbs. Four mAbs were isolated, purified, characterized and tested for reactivity with native NS1 produced by all DENV serotypes in Vero-infected cells and also for cross-reactivity with ZIKV NS1.

2. Results

2.1. Isolation and Characterization of NS1-Specific DENV mAbs

Fusion of popliteal lymph node cells, from mice immunized with DENV2 rNS1, with a non-Ig-secreting or synthesizing line derived from a cell line created by fusing a BALB/c mouse spleen cell and the mouse myeloma P3X63Ag8 (SP2/O-Ag14) mouse myeloma cells, generated 25 secretory hybridomas. Among them, four hybridomas were selected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and sub cloned by limiting dilution and named as 4F6, 4H2, 4H1BC, and 2H5. The clones were expanded, supernatants collected and mAbs purified for further characterization. Accordingly, mAbs 4F6 and 4H2 were characterized as IgG2a (immunoglobulin G), and 2H5 and 4H1BC as IgG1. The affinity constants were similar (10^{-8} M) as well as their reactivity with and limits of detection of NS1 (Table 1).

Table 1. Characteristics of the monoclonal antibodies (mAbs) against dengue virus (DENV) nonstructural protein 1 (NS1).

Name	4F6	4H2	2H5	4H1BC
IgG Subtype [a]	IgG2a	IgG2a	IgG1	IgG1
DENV2 NS1 reactivity [b]	Yes	Yes	Yes	Yes
Dissociation Constant (KD) [c]	1.1×10^{-8} M	6.2×10^{-8} M	7.3×10^{-8} M	8.4×10^{-8} M
Detection limit [d]	16 ng/mL	32 ng/mL	32 ng/mL	32 ng/mL
Epitope sequence [e]	^{25}VHTWTEQYKFQPES^{38}	^{127}ELHNQTFLIDGPETAEC^{143}	^{193}AVHADMGYWIESALNDT^{209}	^{193}AVHADMGYWIESALNDT^{209}
DENV (1–4) reactivity [f]	No	Yes	No	No
ZIKV reactivity [g]	No	No	Yes	Yes

[a] The Ig isotype and IgG subtypes were performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-IgA, anti-IgM, anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b and anti-IgG3 coated onto microplates; [b] The Dengue virus serotype 2 (DENV2) NS1 reactivity was evaluated by indirect ELISA and immunoblotting using rNS1; [c] Dissociation constant was performed by ELISA [18]; [d] Detection limit was evaluated by ELISA using different concentrations of rNS1; [e] The conservancy of DENV2 NS1 epitopes recognized by specific mAbs in a peptide array was analyzed among the four serotypes of DENV, using three samples of NS1 amino acid sequences as representative of each DENV serotype; [f,g] DENV (1–4) and Zika virus (ZIKV) reactivity was evaluated by immunofluorescence in Vero cells infected with the specific virus strains.

The recognition pattern of the four NS1 mAbs was evaluated by ELISA using either intact or heat-denaturated rNS1. All NS1 mAbs recognized the intact rNS1 protein, and although mAb 4F6 reacted similarly with the intact and the heated-treated rNS1 (Figure 1A), the other three mAbs (4H2, 2H5 and 4H1BC) reacted more efficiently with the intact protein (Figure 1B–D, respectively), which indicated that the recognized epitopes were, at least, partially represented by conformational structures. All four MAbs also recognized rNS1 in an immunoblot assay (Figure S1).

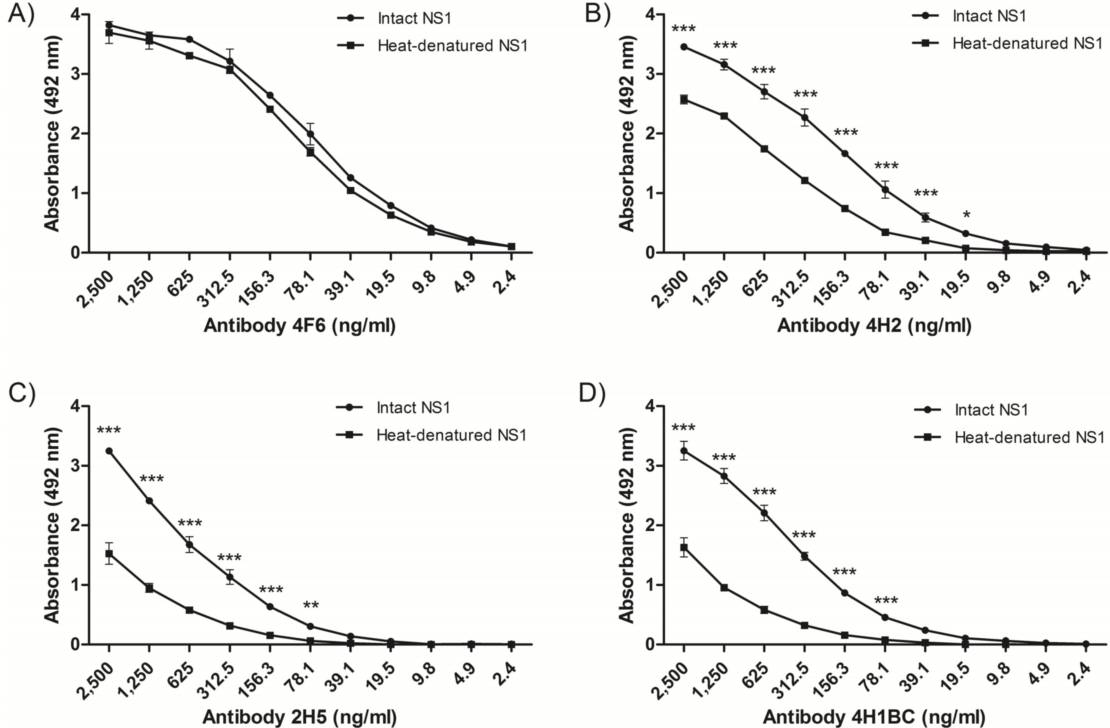


Figure 1. Characterization of nonstructural protein 1-specific (NS1) monoclonal antibodies (mAbs) reactivity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Reactivity of mAbs to heated-treated or intact rNS1, as solid phase-bound antigens. The mAbs 4F6 (**A**), 4H2 (**B**), 2H5 (**C**) and 4H1BC (**D**) were serially diluted (log2) from an initial concentration of 2.5 µg/mL. Each well was adsorbed with 400 ng of rNS1. Heat denaturation was performed at 100 °C for 10 min. Statistical analyses were performed by two-way variance analysis followed by Bonferroni's post-test. (*** $p < 0.01$; ** $p < 0.1$; * $p < 0.5$).

2.2. Detection of Native DENV2 NS1 and Epitope Mapping

After selection, mAbs were tested by immunofluorescence assays using fixed DENV2-infected Vero cells. All four mAbs recognized the native viral NS1 expressed in infected cells, as shown in Figure 2. To localize the specific mAbs binding sites/epitopes, peptide mapping array experiments were performed (Figure S2). The results showed that mAb 4F6 reacted with the peptide corresponding to the sequence ^{25}VHTWTEQYKFQPES^{38} of NS1 (Table 1), which is located in an external loop of the protein 3D structure (Figure 3). The 4H2 mAb recognized the peptide corresponding to the sequence ^{127}ELHNQTFLIDGPETAEC^{143} of NS1 (Table 1), which is located in beta-sheets in an external region of the protein 3D structure (Figure 4). The other two mAbs (2H5 and 4H1BC) showed the same binding specificity and recognized the peptide ^{193}AVHADMGYWIESALNDT^{209} (Table 1). This sequence was also located in a beta-sheet structure, located in an internal region of the protein (Figure 5). The analysis of epitope conservancy in several strains of DENV serotypes as well as Zika strains is detailed in Table S1.

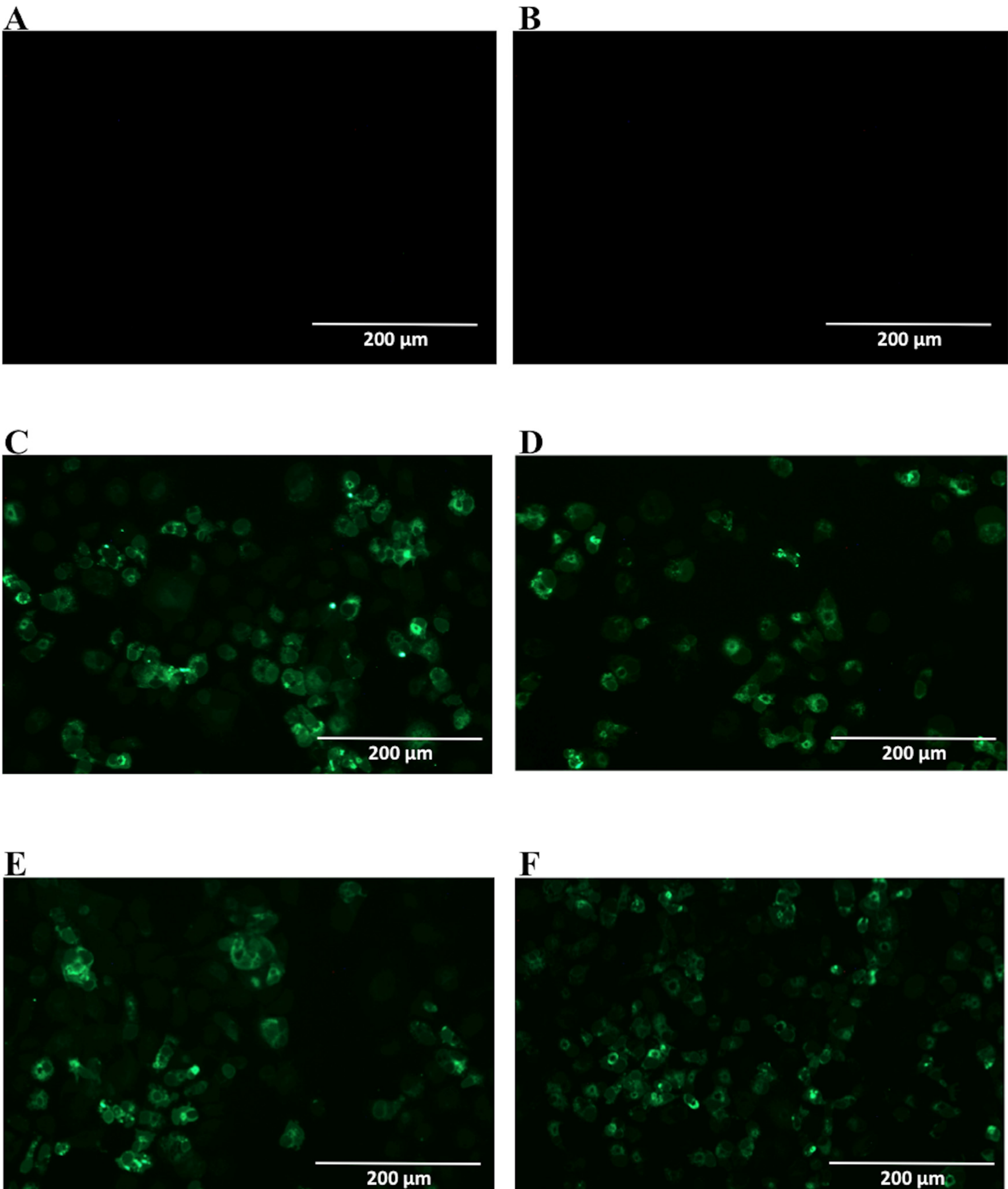


Figure 2. Reactivity of NS1-specific mAbs to dengue-serotype 2-infected Vero cells. Cells were infected with a multiplicity of infection (MOI) of 0.5, fixed, permeabilized and treated with each of the tested mAbs 48 h post infection. Then, cells were labeled with Alexa fluor® conjugated goat-anti mouse IgG. The negative controls: Mock-infected cells treated with a pool of mAbs anti-NS1 (**A**) and DENV2-infected cells labeled only with secondary antibody (**B**); Tested mAbs: (**C**) 4F6; (**D**) 4H2; (**E**) 2H5 and (**F**) 4H1BC. Magnification of 200×.

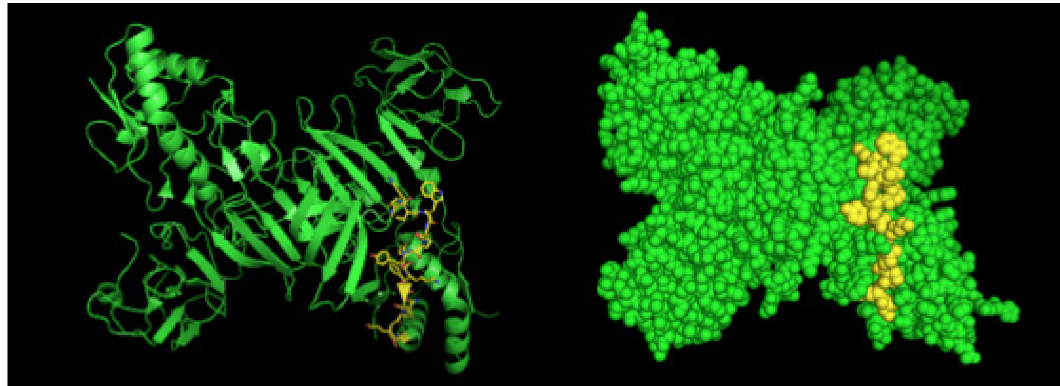


Figure 3. Three-dimensional structural model of a NS1 dimer and regions corresponding to epitopes recognized by 4F6 mAb. The NS1 3D model was generated by the program Python Molecular (PyMOL) in green. The sequence ^{25}VHTWTEQYKFQPES^{38} is highlighted in yellow.

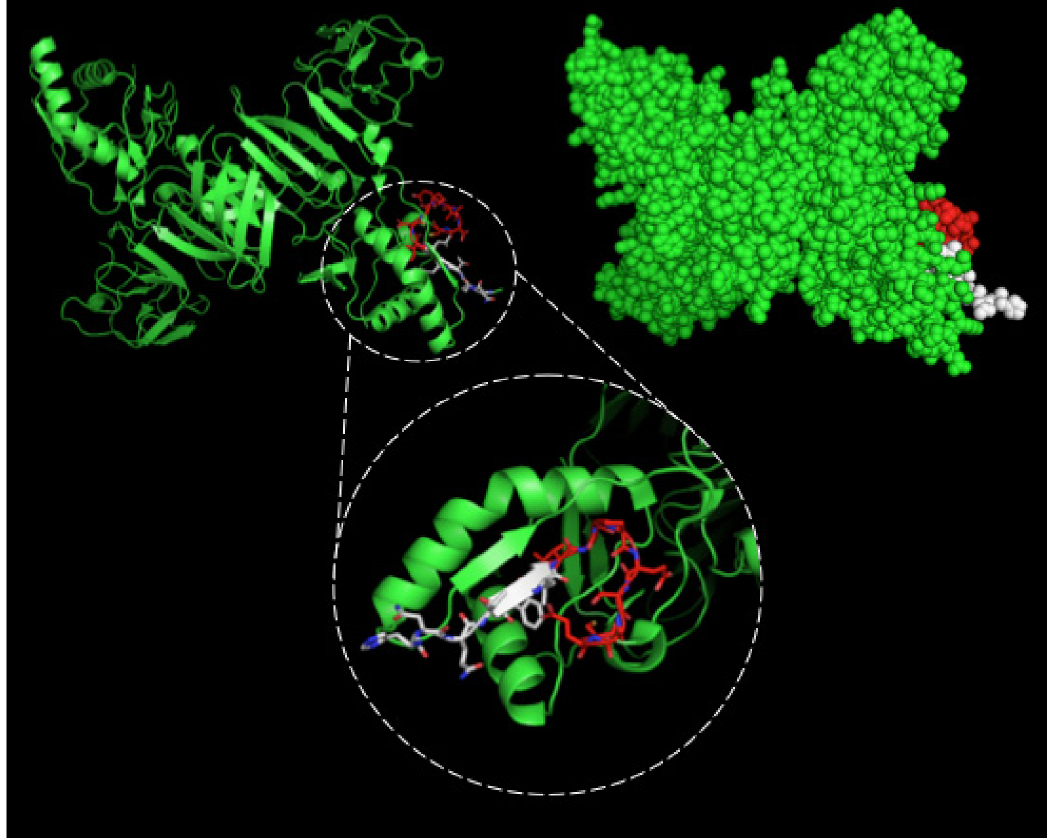


Figure 4. Three-dimensional structural model of a NS1 dimer and regions corresponding to epitopes recognized by 4H2 mAb. The NS1 3D model was generated by the program PyMOL in green. The sequence ^{127}ELHNQTFLIDGPETAEC^{143} is highlighted in red and white. In the detail the red structure represents the novel nine-amino acid sequence described herein.

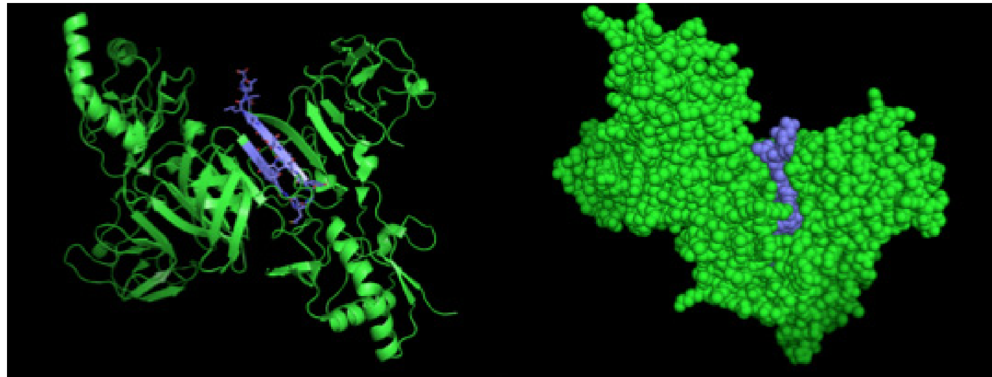


Figure 5. Three-dimensional structural model of a NS1 dimer and regions corresponding to epitopes recognized by 2H5 and 4H1BC mAbs. The NS1 3D model was generated by the program PyMOL in green. The sequence ^{193}AVHADMGYWIESALNDT^{209} is highlighted in blue.

2.3. Analyses of mAbs' Cross-Reactivity with Different DENV Serotype and ZIKV

Since NS1 shares a high homology with amino acid sequences found among different flavivirus, the selected mAbs were tested for recognition of native ZIKV NS1 by immunofluorescence assay, using fixed ZIKV-infected Vero cells. In Figure 6, two mAbs are observed to cross-react with native ZIKV-NS1 in this test (2H5 and 4H1BC) (Figure 6C,D, Table 1). The other two mAbs (4F6 and 4H2) were specific for DENV NS1 (Figure 6A,B, Table 1). We also tested in vitro the reactivity of 4F6 and 4H2 mAbs with DENV serotypes, other than DENV2, and only the 4H2 mAb reacted with all four DENV serotypes (Figure 7, Table 1).

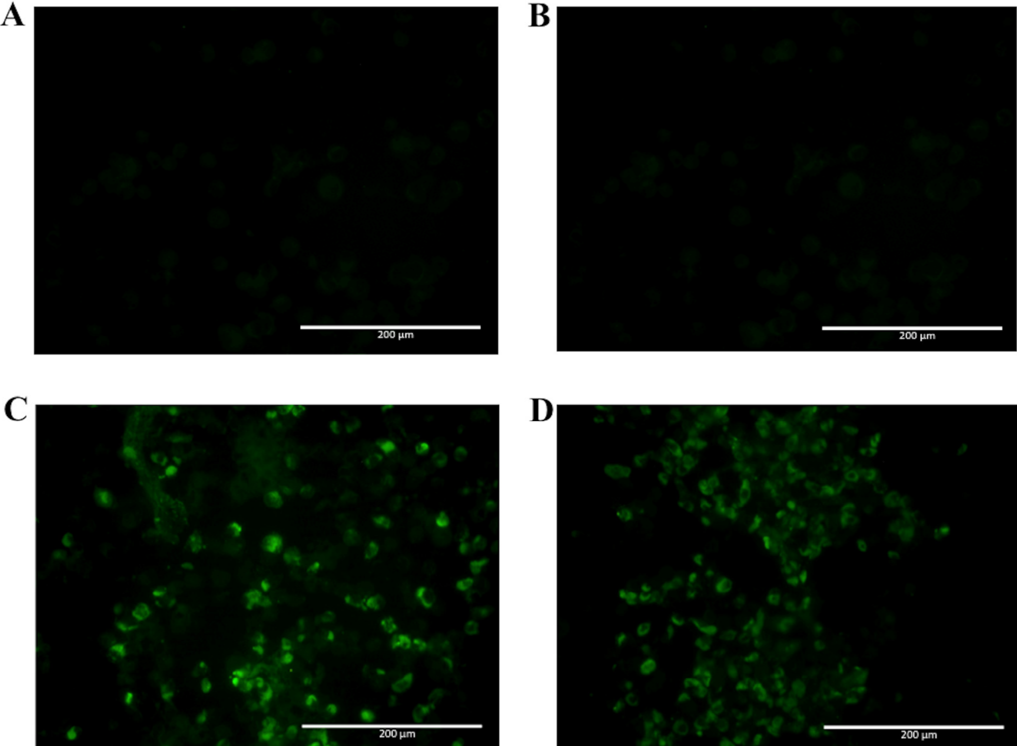


Figure 6. Reactivity of NS1-specific mAbs to zika virus-infected Vero cells. Cells were infected with a MOI of 0.05. 72 h post infection, cells were fixed, permeabilized and treated with each of the tested mAbs. Then, cells were labeled with FITC-conjugated goat-anti mouse IgG. Tested mAbs: (**A**) 4F6; (**B**) 4H2; (**C**) 2H5 and (**D**) 4H1BC. Magnification of 200×.

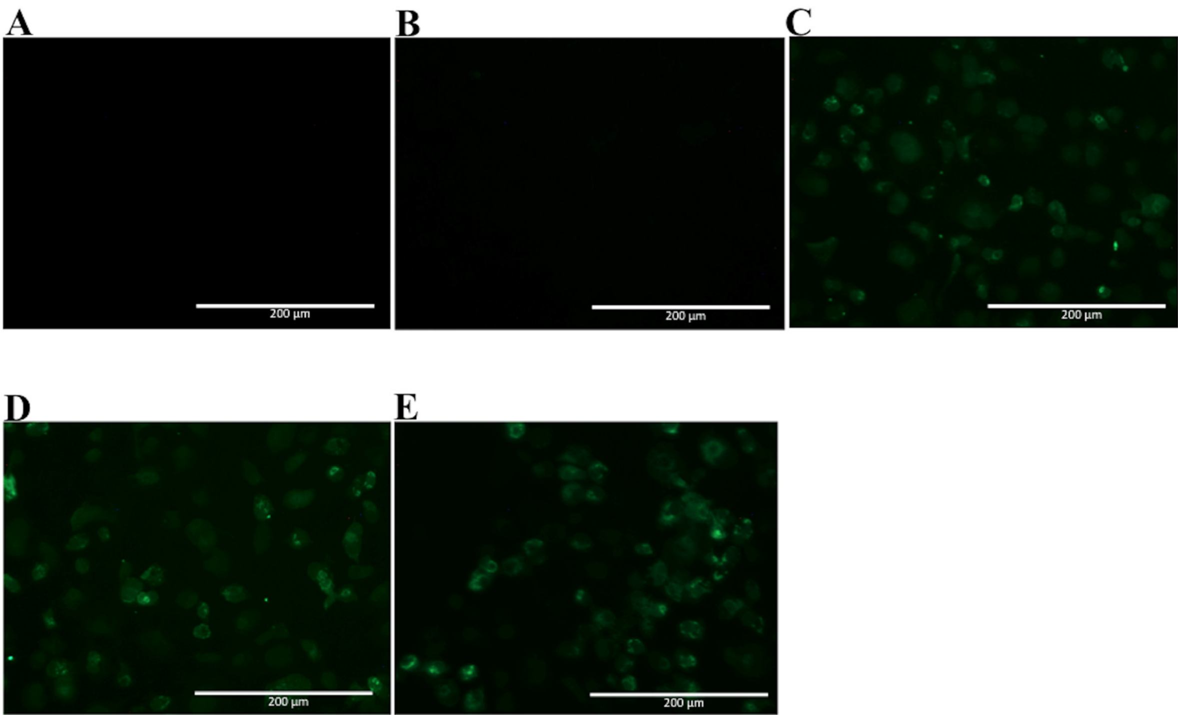


Figure 7. Reactivity of 4H2 mAb to Vero cells infected with DENV of different serotypes. Vero cells were infected with a MOI of 0.5, fixed, permeabilized and treated with mAb 4H2 48 h post infection. Then, cells were labeled with Alexa fluor® conjugated goat-anti mouse IgG. The negative controls: (**A**) Mock infected cells treated with a pool of mAbs anti-NS1 and (**B**) DENV-infected cells labeled only with secondary antibody; Tested DENV serotypes: (**C**) DENV1; (**D**) DENV3 and (**E**) DENV4. Magnification of 200×.

3. Discussion

The DENV NS1 has been used as a target antigen against dengue infection either for vaccines, antiviral drug design or diagnostic methods. Indeed, this protein is secreted by infected cells during the acute phase and circulates in the blood at high concentrations [19]. Nevertheless, the NS1 shares parts of its amino acid sequence among flavivirus. In the present study, we generated four mAbs against DENV2 recombinant NS1 and analyzed their reactivity with the dimeric-NS1 form. The mAbs were also reactive with the native NS1 produced in infected cells but showed different features. The epitope sequences recognized by different mAbs have been recently described and been considered the strategic point for understanding these interactions [15–17].

The mAbs 2H5 and 4H1BC showed a similar recognition pattern and share the same epitope binding, ^{193}AVHADMGYWIESALNDT^{209}. This epitope has been reported as one of the immunodominant B cell epitopes in DENV2 NS1 [20]. This sequence was described in silico and is buried in a beta-sheet structure [15,17]. The recognition of the heat-denatured rNS1 was lower for these mAbs when compared with the non-denatured rNS1, suggesting that these mAbs recognize mainly a conformational epitope. Indeed, by immunofluorescence, both 2H5 and 4H1BC mAbs reacted with dengue virus serotype 2 infected Vero cells. However, they cross-reacted with native ZIKV NS1 in Vero infected cells. The in silico analyses of the similarity of this peptide sequence between different flaviviruses showed that this epitope is highly conserved in these virus but not Yellow fever, Japanese encephalitis and West Nile viruses (Table S2).

The mAb 4F6 recognizes the DENV2 complex-conserved LD2 epitope ^{25}VHTWTEQYKFQPES^{38}, located on the surface of NS1 fusion loop [8,15,17]. A previous study showed a mAb that binds in this motif is able to recognize the purified NS1 hexamer from all four DENV serotypes [21]. However,

4F6 mAb was able to detect only DENV2 native monomeric NS1 by immunofluorescence but no other serotypes. The divergent results may be accounted to methodological issues, since immunofluorescence is less sensitive and aims to detect infected cells expressing mainly monomeric intracellular NS1, while the purified hexamers were used in an ELISA-based detection system. Hence, this epitope may be exposed depending on the NS1 oligomeric level and the DENV serotype.

The fourth mAb obtained, 4H2, recognized the amino acid sequence ^{127}ELHNQTFLIDGPET AEC^{143}. A preceding work described a shorter sequence, ^{125}STESHNQTFL^{134} exposed in the same loop of DENV2 NS1 [15]. Interestingly, the sequence herein described has nine additional amino acids not previously reported as a B cell epitope and shifting the exposed region to a beta-sheet structure. It recognizes the native protein assessed by immunofluorescence of the four DENV serotypes infected Vero cells, but it did not cross-react with native ZIKV NS1 in Vero-infected cells.

Differentiation of DENV and ZIKV infections is a challenge for current serological tests, particularly in areas where both viruses circulate and co-infection can occur. Thus, mAbs, like 4H2, may be particularly useful for the development of an immunofluorescence based-assay that minimizes the risks associated with false positive results among ZIKV-infected subjects.

4. Materials and Methods

4.1. Viral Strains and Viral Antigen

The obtention of purified DENV2 NS1 dimers was achieved after denaturation/refolding steps of the protein expressed in *E. coli* followed by affinity chromatography, as previously reported [22]. This recombinant protein was utilized as an antigen for monoclonal antibody development and characterization. Four dengue serotypes and one Zika virus strain were used for further characterization of the mAbs obtained: a dengue virus serotype 2 JHA1 strain [23,24], a rDEN1Δ30 vaccine strain obtained by Δ30 deletion in 3′UTR of DENV1 Western Pacific strain [25], a rDEN3Δ30/31-7164 vaccine strain obtained by Δ30 and Δ31 deletions in 3′ untranslated region (UTR) of DENV3 Slemann/78 strain [26], a rDEN4Δ30 vaccine strain obtained by Δ30 deletion in 3′ UTR of DENV4 Dominica/81 strain [27], and a Brazilian Zika virus strain (ZIKVBR) (Evandro Chagas Institute, Belem, PA, Brazil).

4.2. Dengue NS1 Monoclonal Antibody (mAb) Production

Four to six week-old female BALB/c mice were immunized via footpad route with 10 µg rNS1 adsorbed to 1 µg recombinant heat-labile toxin (rLT) [22] as adjuvant. The immunization protocols consisted of three booster injections of the rNS1 and rLT in 0.01 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4 at 15 days intervals. The mouse with the highest antibody titer was boosted with 10 µg of rNS1 three days prior to cell fusion. The popliteal lymph node cells were fused to SP2/O-Ag14 mouse myeloma cells (2:1) using polyethylene glycol 1500 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) [28], with modifications [29]. The supernatant fluids were screened for specific antibodies by indirect ELISA in which 100 µL of hybridoma supernatant was added to a 96-well MaxiSorp microplates (Nunc®, Rochester, NY, USA) previously coated with 1 µg/mL of purified rNS1 to screen cultures for antibody production. Antibody-secreting cells were expanded and cloned at limiting dilution [29]. This study was carried out in accordance with the recommendations of Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation. The protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Research of Butantan Institute (995/12).

4.3. Dengue NS1 mAbs Characterization

Hybridoma supernatants were incubated with each of the anti-isotype (anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgA and anti-IgM antibodies) previously coated at MaxiSorp microplates followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse-IgG+A+M+ (1:1000) (Zymed, San Francisco, CA, USA) [27]. The supernatants from selected clones were filtered (0.45 µm)

and purified by protein G affinity chromatography (GE-Healthcare, Freiburg, Germany). MAb purity was observed in a 12% polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) staining with Coomassie blue R-250.

The detection limit was established using rNS1 concentrations from 1 to 512 ng coated on microplates, followed incubation with 10 μg/mL of NS1 mAb and with goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibody (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) diluted 1:5000. The three-step ELISA was employed to determine the dissociation constants (KD) of antigen-antibody interactions under equilibrium conditions [28].

ELISA assay was also applied in order to observe the reactivity of mAb NS1 against intact and denatured rNS1. For this, MaxiSorp microplates (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) were coated with 4 μg/mL of Dengue virus serotype 2 (DENV2) rNS1 heat-treated (100 °C for 10 min) or non-heated. The NS1 mAbs were serially diluted (log2) in an initial concentration of 2.5 μg/mL followed by incubation with goat anti-IgG mouse conjugated with horseradish peroxidase (1:10,000).

The reactivity of NS1 mAb against intact and denatured rNS1 was also analyzed by immunoblotting. Thus, 1 μg or 0.5 μg of rNS1 denatured (heat-treated for 10 min at 100 °C) or intact (non-heated) were separated by electrophoresis in denaturing condition polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulphate (SDS-PAGE) 15%. Nitrocellulose membranes (GE-Healthcare, Freiburg, Germany) containing the transferred proteins were tested with NS1 mAbs at a final concentration of 200 ng/mL. Thus, the membranes were incubated with goat anti-IgG mouse conjugated with peroxidase (1:10,000). The reactive protein bands were identified by exposing membranes to a solution of luminol-hydrogen peroxide according to the manufacturer's instructions (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Images were captured by Image Lab™ software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.4. Epitope Characterization and Structure Analysis

Peptide mapping was performed using CelluSpot Peptide Array (Intavis, Heidelberg, Germany) following the manufacturer's recommendations. The slides were produced with dots containing 11 amino acids with overlapping of eight amino acids. Briefly, the slides were blocked, followed by incubation with 30 μg/mL mAb. Next, the slides were incubated with anti-mouse horseradish peroxidase conjugate (1:5000). After washing, diaminobenzidine and hydrogen peroxide were added and the reaction was stopped by the addition of distilled water.

We employed PyMol program (DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA, 2009) to predict the structure and the epitope of NS1. For the NS1 structure, we used the available PDB file from Protein Data Bank (code: 4O6B) [6]. For the structure of monoclonal antibodies, we first performed the prediction with Phyre [30].

4.5. NS1 Sequences Database Building

One database consisting of amino acid sequences of the NS1 protein in FASTA format was built. Sequences were retrieved from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) protein database. Sequences from serotype 1 of DENV have the following accession numbers: ABG75766, ABG75761 and AFN54943. Sequences from serotype 2 of DENV have the following accession numbers: AIE17400, ABK51383 and AFZ40226. Sequences from serotype 3 of DENV have the following accession numbers: ADM63678, AAT79552 and ALI16137. Sequences from serotype 4 of DENV have the following accession numbers: AGI95993, ALB78116 and AFD53008. Sequences from ZIKV isolates have the following accession numbers: AMR39836, AMD61710, ASK51714, ARB07991, AMD16557 and ARB07967.

4.6. Conservancy Analysis

The IEDB conservancy analysis was used to determine the conservancy of epitopes for monoclonal antibodies 4F6, 4H2, 2H5 and 4H1BC. A sequence identity threshold of $\geq$20% was applied.

4.7. NS1 mAbs Reactivity to Dengue Virus Serotypes and Zika Virus

Vero cells grown on six-well plates were infected with the viral strains at a MOI of 0.5 for 48 h for DENV and at a MOI of 0.05 for 72 h for ZIKV. The cells were fixed with 1% formaldehyde for 10 min at 4 °C and then permeabilized with 0.5% saponin in PBS for DENV and with cold acetone at −20 °C for ZIKV. The cells were then blocked with PBS containing 10% bovine fetal serum for 30 min. Both cells were treated with mAbs diluted in permeabilization buffer at a concentration of 10 µg/mL for 1 h at room temperature for DENV and 37 °C for 30 min for ZIKV. After three washing steps with PBS, the cells were further treated with Alexa fluor488® (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) conjugated goat anti-mouse IgG at room temperature for 1 h. After another washing period (five times) with PBS, cells were examined using an EVOS digital inverted microscope. Mock infected and cell infected marked with just secondary antibody was the negative control. Also, Vero cells infected with ZIKVBR were tested in order to determine the cross reactivity of the mAbs.

5. Conclusions

In the present study we generated four monoclonal antibodies against the nonstructural protein 1 (NS1) of dengue virus serotype 2. One of them (4H2 mAb) recognizes by immunofluorescence the four-dengue virus serotype and did not cross react to zika virus. Thus, the selection and characterization of the epitope, specificity of anti-NS1 mAbs, may contribute to the development of diagnostic tools able to differentiate DENV and ZIKV infections.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2073-4468/6/3/14/s1, Figure S1: Characterization of NS1-specific mAbs reactivity by immunoblotting; Figure S2: Epitope mapping with NS1-derived synthetic peptides; Table S1: Epitope analysis of conservancy in DENV serotypes. Table S2: Epitope analysis of conservancy in different strains of DENV, ZIKV, YFV, JEV and WNV strains.

Acknowledgments: We would like to thank Pedro Vasconcelos, from Evandro Chagas Institute, Belém, PA, Brazil for providing a lyophilized ZIKVBR seed. This work was supported by grants from São Paulo Research Foundation (FAPESP): 2009/53894-3; 2011/51761-6; 2014/17595-0 to L.C.S.F. 2013/06589-6; 2013/50955-7 to R.M.F.P and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) awarded to R.M.F.P. LBR was a recipient of post-doctoral FAPESP fellowship (2012/09096-8).

Author Contributions: L.B.R., R.P.d.S.A., L.R.P., V.F.B., D.B.L.O., L.C.d.S.F. and R.M.F.P. conceived and designed the experiments; L.B.R., R.P.d.S.A., B.A.C., L.R.P., T.M. and J.M.P. performed the experiments; L.B.R., R.P.d.S.A., B.A.C., L.R.P., T.M., D.B.L.O., D.L., L.C.d.S.F. and R.M.F.P. analyzed the data; J.H.A., N.M.F.G., R.P., A.R.P., C.F.H.G., L.C.d.S.F. and R.M.F.P. contributed reagents/materials/analysis tools; L.B.R., R.P.d.S.A., B.A.C., D.L., L.C.d.S.F. and R.M.F.P. wrote the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results.

References

1. Guzman, M.G.; Halstead, S.B.; Artsob, H.; Buchy, P.; Farrar, J.; Gubler, D.J.; Hunsperger, E.; Kroeger, A.; Margolis, H.S.; Martínez, E.; et al. Dengue: A continuing global threat. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, S7–S16. [CrossRef] [PubMed]
2. Bhatt, S.; Gething, P.W.; Brady, O.J.; Messina, J.P.; Farlow, A.W.; Moyes, C.L.; Drake, J.M.; Brownstein, J.S.; Hoen, A.G. The global distribution and burden of dengue. *Nature* **2013**, *496*, 504–507. [CrossRef] [PubMed]
3. Daep, C.A.; Muñoz-Jordán, J.L.; Eugenin, E.A. Flaviviruses, an expanding threat in public health: Focus on dengue, West Nile, and Japanese encephalitis virus. *J. Neurovirol.* **2014**, *6*, 539–560. [CrossRef] [PubMed]
4. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. *Bol. Epidemiol.* **2017**, *48*, 1–9.
5. Chambers, T.J.; Hahn, C.S.; Galler, R.; Rice, C.M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **1990**, *44*, 649–688. [CrossRef] [PubMed]
6. Akey, D.L.; Brown, W.C.; Dutta, S.; Konwerski, J.; Jose, J.; Jurkiw, T.K.; DelProposto, J.; Ogata, C.W.; Skiniotis, G.; Kuhn, R.J.; et al. Flavivirus NS1 structures reveal surfaces for associations with membranes and the immune system. *Science* **2014**, *343*, 881–885. [CrossRef] [PubMed]

7. Mackenzie, J.M.; Jones, M.K.; Young, P.R. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication. *Virology* **1996**, *1*, 232–240. [CrossRef] [PubMed]
8. Falconar, A.K.; Young, P.R.; Miles, M.A. Precise location of sequential dengue virus subcomplex and complex B cell epitopes on the nonstructural-1 glycoprotein. *Arch. Virol.* **1994**, *137*, 315–326. [CrossRef] [PubMed]
9. Silva, E.M.; Conde, J.N.; Allonso, D.; Nogueira, M.L.; Mohana-Borges, R. Mapping the interactions of dengue virus NS1 protein with human liver proteins using a yeast two-hybrid system: Identification of C1q as an interacting partner. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57514. [CrossRef] [PubMed]
10. Muller, D.A.; Young, P.R. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antivir. Res.* **2013**, *98*, 192–208. [CrossRef] [PubMed]
11. Gyawali, N.; Bradbury, R.S.; Taylor-Robinson, A.W. The global spread of Zika virus: Is public and media concern justified in regions currently unaffected? *Infect. Dis. Poverty* **2016**, *19*, 5. [CrossRef] [PubMed]
12. Kochakarn, T.; Kotanan, N.; Kümpornsin, K.; Loesbanluechai, D.; Thammasatta, M.; Auewarakul, P.; Wilairat, P.; Chookajorn, T. Comparative genome analysis between Southeast Asian and South American Zika viruses. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2016**, *9*, 1048–1054. [CrossRef] [PubMed]
13. Zhang, X.; Sheng, J.; Plevka, P.; Kuhn, R.J.; Diamond, M.S.; Rossmann, M.G. Dengue structure differs at the temperatures of its human and mosquito hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 6795–6799. [CrossRef] [PubMed]
14. Jiao, Y.; Legge, F.S.; Zeng, X.; Treutlein, H.R.; Zeng, J. Antibody recognition of Shiga toxins (Stxs): Computational identification of the epitopes of Stx2 subunit A to the antibodies 11E10 and S2C4. *PLoS ONE* **2014**, *2*, e88191. [CrossRef] [PubMed]
15. Jones, M.L.; Legge, F.S.; Lebani, K.; Mahler, S.M.; Young, P.R.; Watterson, D.; Treutlein, H.R.; Zeng, J. Computational Identification of Antibody Epitopes on the Dengue Virus NS1 Protein. *Molecules* **2017**, *22*, 607. [CrossRef] [PubMed]
16. Lebani, K.; Jones, M.L.; Watterson, D.; Ranzoni, A.; Traves, R.J.; Young, P.R.; Mahler, S.M. Isolation of serotype-specific antibodies against dengue virus non-structural protein 1 using phage display and application in a multiplexed serotyping assay. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0180669. [CrossRef] [PubMed]
17. Chaudhury, S.; Gromowski, G.D.; Ripoll, D.R.; Khavrutskii, I.V.; Desai, V.; Wallqvist, A. Dengue virus antibody database: Systematically linking serotype-specificity with epitope mapping in dengue virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005395. [CrossRef] [PubMed]
18. Friguet, B.; Chaffotte, A.F.; Djavadi-Ohaniance, L.; Goldberg, M.E. 1985. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* **1985**, *77*, 305–319. [CrossRef]
19. Vaughn, D.W.; Green, S.; Kalayanarooj, S.; Innis, B.L.; Nimmannitya, S.; Suntayakorn, S.; Rothman, A.L.; Ennis, F.A.; Nisalak, A. Dengue in the early febrile phase: Viremia and antibody responses. *J. Infect. Dis.* **1997**, *76*, 322–330. [CrossRef]
20. Jiang, L.; Zhou, J.M.; Yin, Y.; Fang, D.Y.; Tang, Y.X.; Jiang, L.F. Selection and identification of B-cell epitope on NS1 protein of dengue virus type 2. *Virus Res.* **2010**, *150*, 49–55. [CrossRef] [PubMed]
21. Gelanew, T.; Poole-Smith, B.K.; Hunsperger, E. Development and characterization of mouse monoclonal antibodies against monomeric dengue virus non-structural glycoprotein 1 (NS1). *J. Virol. Methods* **2015**, *222*, 214–223. [CrossRef] [PubMed]
22. Amorim, J.H.; Porchia, B.F.M.M.; Balan, A.; Cavalcante, R.C.M.; da Costa, S.M.; de Barcelos Alves, A.M.; de Souza Ferreira, L.C. Refolded dengue virus type 2 NS1 protein expressed in Escherichia coli preserves structural and immunological properties of the native protein. *J. Virol. Methods* **2010**, *167*, 186–192. [CrossRef] [PubMed]
23. Salvador, F.S.; Amorim, J.H.; Alves, R.P.S.; Pereira, S.A.; Ferreira, L.C.S.; Romano, C.M. Complete Genome Sequence of an Atypical Dengue Virus Serotype 2 Lineage Isolated in Brazil. *Genome Announc.* **2015**, *3*, e00779-15. [CrossRef] [PubMed]
24. Amorim, J.H.; Pereira Bizerra, R.S.; dos Santos Alves, R.P.; Sbrogio-Almeida, M.E.; Levi, J.E.; Capurro, M.L.; de Souza Ferreira, L.C. A genetic and pathologic study of a DENV2 clinical isolate capable of inducing encephalitis and hematological disturbances in immunocompetent mice. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44984. [CrossRef] [PubMed]

25. Whitehead, S.S.; Falgout, B.; Hanley, K.A.; Blaney, J.E., Jr.; Markoff, L.; Murphy, B.R. A live, attenuated Dengue virus type 1 vaccine candidate with a 30-nucleotide deletion in the 3′ untranslated region is highly attenuated and immunogenic in monkeys. *J. Virol.* **2003**, *77*, 1653–1657. [CrossRef] [PubMed]
26. Blaney, J.E., Jr.; Sathe, N.S.; Goddard, L.; Hanson, C.T.; Romero, T.A.; Hanley, K.A.; Murphy, B.R.; Whitehead, S.S. Dengue virus type 3 vaccine candidates generated by introduction of deletions in the 3′ untranslated region (3′-UTR) or by exchange of the DENV-3 3′-UTR with that of DENV-4. *Vaccine* **2008**, *26*, 817–828. [CrossRef] [PubMed]
27. Blaney, J.E., Jr.; Johnson, D.H.; Manipon, G.G.; Firestone, C.Y.; Hanson, C.T.; Murphy, B.R.; Whitehead, S.S. Genetic basis of attenuation of Dengue virus type 4 small plaque mutants with restricted replication in suckling mice and in SCID mice transplanted with human liver cells. *Virology* **2002**, *300*, 125–139. [CrossRef] [PubMed]
28. Khöler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Biotechnology* **1975**, *24*, 524–526.
29. Rocha, L.B.; Luz, D.E.; Moraes, C.T.P.; Caravelli, A.; Fernandes, I.; Guth, B.E.C.; Horton, D.S.P.Q.; Piazza, R.M.F. Interaction between Shiga toxin and monoclonal antibodies: Binding characteristics and in vitro neutralizing abilities. *Toxins (Basel)* **2012**, *4*, 729–747. [CrossRef] [PubMed]
30. Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J.E. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 845–858. [CrossRef] [PubMed]

© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ANEXO D

Journal of Microbiological Methods 144 (2018) 125–127

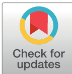
Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Note

Large-scale evaluation of a rapid diagnostic test for diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* targeting the heat-labile toxin



Camila Henrique[a], Bruna A. Caetano[a], Thais Mitsunari[a], Luís Fernando dos Santos[b], Roxane M.F. Piazza[a,*], Letícia B. Rocha[a]

[a] *Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil*
[b] *Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil*

ARTICLE INFO

Keywords:
ETEC
Heat-labile toxin
Antibodies
Immunochromatographic test
Diagnosis

ABSTRACT

We standardized an immunochromatographic test (IC) for heat-labile toxin I (LT-I) detection using LT-I antibodies and a specific platform containing the apparatus for application, assembly and cutting. IC detected as little as 62.5 ng/mL of purified LT-I toxin and presented 91% sensitivity, 99.5% specificity and 96.0% accuracy, thereby proving to be an excellent point-of-care test for the diagnosis of enterotoxigenic *E. coli* infection in low-income countries.

Diarrhea is the second leading cause of mortality by infectious pathogens in under-five children, responsible worldwide for 526,000 deaths in 2015 (Liu et al., 2016). Among the pathogens responsible for diarrhea, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) has been identified as a major cause of severe diarrheal diseases in children of this age group, mainly in sub-Saharan Africa and South Asia, and in travelers as well (Liu et al., 2016). Among the virulence factors, ETEC produces heat-labile enterotoxin (LT), responsible for a clinical picture of profuse watery diarrhea (Spangler, 1992).

Accordingly, diagnosis is an important tool for appropriate treatment and control of outbreaks. Over the decades, different methods have been described for the detection of LT toxin, but few diagnostic methods are used in low-income countries, and others are limited to research and epidemiological studies (reviewed by Qadri et al., 2005). Indeed, GM1-ELISA (Ristaino et al., 1983) and capture ELISA (cELISA) making use of antibodies (Menezes et al., 2003, 2006) and the Biken test, a precipitation assay (Honda et al., 1981), have all been tested, showing high sensitivity and specificity but presenting some disadvantages, such as requiring spectrophotometer readings and long assay time, respectively.

Point-of-care tests are an alternative to conventional methods, and they include the immunochromatographic (IC) test, which has many advantages such as easy to perform, rapid generation of results and high sensitivity and specificity (Chiao et al., 2004; Paek et al., 2000). The IC test basically consists of three types of membranes, i.e., cellulose fiber (sample pad), glass fiber and nitrocellulose (NM), mounted on a plastic support. In the capture format, a detection antibody is labeled with a signal generator (e.g., colloidal gold) and coupled to the glass fiber membrane. The second antibody, which binds to a different epitope as the first antibody, is linked to NM, defining the line test. A third antibody, which is specific for the detection antibody, is also added to NM, thereby defining the control line.

Recently, a manually prepared IC test for the detection of LT toxin from pigs (LTp) was developed (Arimitsu et al., 2017), which demonstrated in preliminary trials the feasibility of this technique, and likewise the cross-reactivity between LT and cholera toxins (CT). At the same time, we also have been working on a large-scale IC test for the detection of LT-I toxin in a large number of bacterial strains, employing the already obtained and characterized LT-I antibodies (Menezes et al., 2003, 2006; Rocha et al., 2013). In the present work, we used a platform for uniform IC test performance, and we were able to standardize the IC test and evaluate it for sensitivity, specificity and accuracy by assaying a large bacterial collection for the detection of LT-I toxin and comparing the IC test to the cELISA described elsewhere (Menezes et al., 2003, 2006).

The anti-LT-I rabbit serum IgG enriched fraction (Menezes et al., 2003; 2006) was used as capture antibody conjugated to colloidal gold particles (BB International, Cardiff, United Kingdom) (Oliver, 2010). The LT-I monoclonal antibody (mAb) (Menezes et al., 2006) was used for detection, and it was applied directly to the NM (Millipore, MA, USA) to form the test line. As control line of the IC, rabbit anti-mouse IgG antibody was applied above the detection line. The IC tests were prepared on a large scale on a semi-automatic platform, consisting of a Matrix 1600 Reagent Dispensing Module (applies the antibodies in

* Corresponding author at: Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brazil, 1500, 05503-900 São Paulo, SP, Brazil.
E-mail address: roxane@butantan.gov.br (R.M.F. Piazza).

https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.11.020
Received 13 September 2017; Received in revised form 22 November 2017; Accepted 22 November 2017
Available online 23 November 2017
0167-7012/ © 2017 Published by Elsevier B.V.

Fig. 1. Equipment for the production of immunochromatographic tests: (A) Matrix 1600 Reagent Dispensing Module; (B) Matrix 2210 Universal Laminator Module; (C) Matrix 2360 Programmable Shear.

Table 1
Conditions and membranes evaluated for IC standardization.

NM - HF	Pre-treatment of sample pad portion	mAb concentrations on the test line (mg/mL)
240, 180 and 135	Pad solution (PS)[a]; PS with 1% bovine serum albumin (BSA); PS with 1% BSA[b] and different concentrations of Tween detergent[c] (0.25 to 1.5%)	1, 2, 3 and 4

[a] 20 mM sodium borate, 0.1% Triton X-100 and 0.1% sodium azide.
[b] Prevents NM reagent detection and analysis of non-specificity.
[c] Enables the best flow of the antigen/conjugate complex through NM.

NM), Matrix 2210 Universal Laminator Module (mounts/overlaps all test membranes), and Matrix 2360 Programmable Shear (cuts IC test strips), all obtained from Kinematic Automation, Inc. (Sonora, CA, USA) (Fig. 1).

For standardization, the sample pad portion was submerged in different pre-treatments (Table 1) and dried at 50 °C for 30 min, then coupled to NM in the Matrix 2360 Programmable Shear. The sensitivity of NMs 240, 180 and 135, from lowest to highest porosity, respectively, was evaluated, demonstrating that the higher the capillary flow rate, the lower the sensitivity. To see if there was an increase in sensitivity/reactivity on the test line, different concentrations of LT-I mAb (Table 1) were applied to the NMs by the Matrix 1600 Reagent Dispensing Module, and strips were dried at room temperature in a vacuum chamber overnight, immersed in solutions of 1000 to 30.25 ng/mL LT-I toxin, and then evaluated.

Reproducible conditions for the IC test were obtained with the use of HF180 NM. On the other hand, HF240 NM, probably because of a slower flow, hampered the continued flow ability of the complex formed by anti-LT-I rabbit serum IgG labeled with colloidal gold resulting in NM with background stain (data not shown), while HF135 NM with a faster flow showed a low reactivity of the test line (data not shown). Besides, treatment of the sample pad portion with buffer containing 1% BSA and 1% Tween and the application of 2 mg/mL LT-I mAb on the capture line were required. Thus, with the use of these conditions, the IC test was able to detect, after 20 min, as little as 62.5 ng/mL LT-I toxin (Fig. 2).

The sensitivity and specificity of the IC test were determined in 351 bacterial clinical isolates belonging to the Center of Bacteriology at Adolfo Lutz Institute and Bacteriology Laboratory of the Butantan Institute. These included 139 ETEC positive isolates for the *eltA* gene and another 212 isolates used as negative controls, including five non-

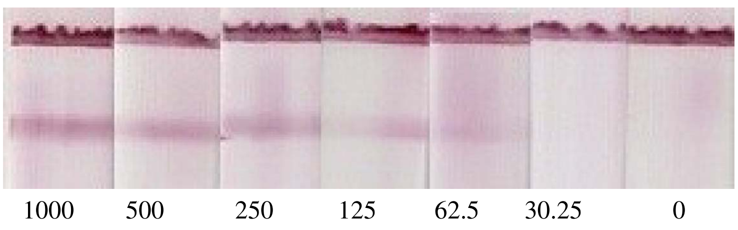


Fig. 2. IC test detection limit for LT-I toxin. Nitrocellulose membrane HF180 with 2 mg/mL LT-I mAb on the test line assayed with different LT-I toxin concentrations (ng/mL) and *E. coli* broth as negative control (0). The test was performed in triplicate and the strip evaluated at 20 min.

Fig. 3. Representative figure of the IC test displaying different reactivity intensities on the line after reaction with several LT-producing ETEC strains. Negative control was performed with a non-LT-I-producing ETEC strain. Highest intensity to lowest intensity is from left to right. The test was performed in triplicate and evaluated in 20 min.

Table 2
Comparison between IC and cELISA for LT-I toxin detection in bacterial isolates.

		cELISA (Menezes et al., 2003; 2006)		
		Positive	Negative	Total
IC test	Positive	127 (A)	1 (B)	128
	Negative	13 (C)	210 (D)	223
	Total	140	211	351

True positive; (B) false positive; (C) false negative; (D) true negative; Sensitivity is the probability of a positive result (true positive) given that the disease is present; Specificity is the probability of a negative results (true negative) given that the disease is not present (Crowther, 2001).

ETEC *E. coli* diarrheagenic strains and other *Enterobacteriaceae*, such as *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia spp*., *Shigella flexneri*, *Salmonella Panama* and *Salmonella ssp*., among others. Isolates were cultured and treated as previously described (Rocha et al., 2013) in 3 mL of Luria Bertani broth (Becton Dickinson, Pont de Claix, France) at 37 °C for 16–18 h. Subsequently, a 1:100 dilution of the bacterial cultures was added to *E. coli* broth (Becton Dickinson) containing 5 ng/mL ciprofloxacin and 0.1 mg/mL lincomycin, to increase LT-I toxin production, followed by incubation at 37 °C and 250 rpm, for 6 h. The bacterial culture was treated with 0.2 mg/mL polymyxin B sulfate (Gibco, Grand Island, NY, USA) and incubated at 37 °C for 1 h with shaking at 250 rpm. The treated bacterial cultures were centrifuged at 10,000 × *g* for 10 min at 4 °C, and the culture supernatant used in the IC test and cELISA.

According to cELISA previously standardized by our laboratory (Menezes et al., 2003; 2006), sensitivity was 97.87% and specificity was 99.05% according to ROC curve analysis. The culture supernatants of LT-I toxin-positive ETEC strains, when analyzed by the IC test, displayed different levels of color intensity on the test line (Fig. 3), where all of them were visible and considered positive.

The results of the IC test showed 91% sensitivity, 99.5% specificity and 96.0% accuracy, giving a kappa index of 0.9 between the two diagnostic methods (Table 2) (Cohen, 1960).

The standardized IC test can be used not only in reference laboratories but also essentially in clinical laboratories and hospitals, given the importance of diagnosis for appropriate patient treatment and the prevention of outbreaks and contamination by ETEC. In conclusion, the present point-of-care assay described herein can be considered an alternative assay for infection diagnosis in diarrhea cases in low-income countries since it achieved 91% sensitivity, 99.5% specificity and 96.0% accuracy for detection of LT-I toxin, allowing the detection of LT-I-producing ETEC clinical isolates.

Financial support

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP – 2013/06589-6, 2013/50955-7) and R.M.F·P is a fellow of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 301,302/2013-8). CH was a recipient of a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and LBR was a FAPESP postdoctoral fellow (2012/090906-2).

Acknowledgments

To Dr. John D Clements, Department of Microbiology and Immunology, Tulane University Health Sciences Center, New Orleans, LA, USA for kindly providing purified LT-I toxin. Dr. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

Arimitsu, H., Sasaki, K., Tsuji, T., 2017. Immunochromatographic detection of the heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* with cross-detection of cholera toxin. J. Microbiol. Methods 132, 148–152. http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2016.12.007.

Chiao, D.J., et al., 2004. Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of botulinum neurotoxin type B. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 809, 37–41. http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.05.033.

Cohen, J.A., 1960. Coefficient of agreement for nominal scales. Ed. Psych. Meas. 20, 37–46. http://dx.doi.org/10.1177/001316446002000104.

Crowther, J.R., 2001. Methods in Molecular Biology: The Elisa Guidebook. vol. 149 Humana Press Inc., Totowa, New Jersey (421 p).

Honda, T., Taga, S., Takeda, Y., Miwatani, T., 1981. Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 13, 1–5.

Liu, L., Hill, K., Oza, S., Hogan, D., Chu, Y., Cousens, S., Mathers, C., Stanton, C., Lawn, J., Black, R.E., 2016. Levels and Causes of Mortality under Age Five Years. In: Disease Control Priorities: Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health. 2. World Bank, Washington, DC, pp. 70–84.

Menezes, C.A., Gonçalves, D.S., Amianti, J., Fernandes, I., Taddei, C.R., Koga, P.C.M., Trabulsi, R.L., Martinez, M.B., Piazza, R.M.F., 2003. Capture immunoassay for LT detection produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in bacterial isolates. Braz. J. Microbiol. 34, 11–13. http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000500004.

Menezes, C.A., Imamura, S.Y., Trabulsi, L.R., Fernandes-Filho, A., Martinez, M.B., Guth, B.E.C., Girão, D.M., Piazza, R.M.F., 2006. Production, characterization, and application of antibodies against heat-labile type-I toxin for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101, 875–880. http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762006000800009.

Oliver, C., 2010. Immunocytochemical methods and protocols. In: Methods in Molecular Biology, 3rd ed. Humana Press, New York (401 pp.). https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000500004.

Paek, S.H., Lee, S.H., Cho, J.H., 2000. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. Methods 22, 53–60. http://dx.doi.org/10.1006/meth.2000.1036.

Qadri, F., Svennerholm, A.M., Faruque, A.S., Sack, R.B., 2005. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin. Microbiol. Rev. 18, 465–483. http://dx.doi.org/10.1128/CMR.18.3.465-483.2005.

Ristaino, P.A., Levine, M.M., Young, C.R., 1983. Improved GM1-enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 18, 808–8015 (doi: 0095-1137/83/100808).

Rocha, L.B., Ozaki, C.Y., Horton, D.S.P.Q., Menezes, C.A., Silva, A., Fernandes, I., Magnoli, F.C., Vaz, T.M.I., Guth, B.E.C., Piazza, R.M.F., 2013. Different assay conditions for detecting the production and release of heat-labile and heat-stable toxins in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates. Toxins 5, 2384–2402. http://dx.doi.org/10.3390/toxins5122384.

Spangler, B.D., 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiol. Rev. 56, 622–647 (0146-0749/92/040622-26$02.00/0).

ANEXO E

Communication

Structural Changes in Stx1 Engineering Monoclonal Antibody Improves Its Functionality as Diagnostic Tool for a Rapid Latex Agglutination Test

Daniela Luz [1,†], Emerson A. Shiga [1,†], Gang Chen [2], Wagner Quintilio [3], Fernanda B. Andrade [1], Andrea Q. Maranhão [4], Bruna A. Caetano [1], Thaís Mitsunari [1], Míriam A. Silva [1], Letícia B. Rocha [1], Ana M. Moro [3], Sachdev S. Sidhu [2] and Roxane M. F. Piazza [1,*]

1. Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP 05503-900, Brazil; daniedaluz@yahoo.com.br (D.L.); emerson.shiga@butantan.gov.br (E.A.S.); fernanda.andrade@butantan.gov.br (F.B.A.); bruna.caetano@butantan.gov.br (B.A.C.); thais.mitsunari@butantan.gov.br (T.M.); miriam.silva@butantan.gov.br (M.A.S.); leticia.rocha@butantan.gov.br (L.B.R.)
2. Department of Molecular Genetics, Terrence Donnelly Centre for Cellular and Biomolecular Research, University of Toronto, Toronto, ON M5S 3E1, Canada; gchen2012@gmail.com (G.C.); sachdev.sidhu@utoronto.ca (S.S.S.)
3. Laboratório de Biofármacos em Células Animais, Instituto Butantan, São Paulo, SP 05503-900, Brazil; wagner.quintilio@butantan.gov.br (W.Q.); ana.moro@butantan.gov.br (A.M.M.)
4. Laboratório de Imunologia, Universidade de Brasília, Brasília 70910-900, Brazil; andreaqm@unb.br

* Correspondence: roxane@butantan.gov.br

† These authors contributed equally to this paper.

Received: 6 December 2017; Accepted: 26 January 2018; Published: 1 February 2018

Abstract: Stx1 toxin is one of the AB_5 toxins of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) responsible for foodborne intoxication during outbreaks. The single-chain variable fragment (scFv) is the most common recombinant antibody format; it consists of both variable chains connected by a peptide linker with conserved specificity and affinity for antigen. The drawbacks of scFv production in bacteria are the heterologous expression, conformation and stability of the molecule, which could change the affinity for the antigen. In this work, we obtained a stable and functional scFv-Stx1 in bacteria, starting from IgG produced by hybridoma cells. After structural modifications, i.e., change in protein orientation, vector and linker, its solubility for expression in bacteria was increased as well as the affinity for its antigen, demonstrated by a scFv dissociation constant (K_D) of 2.26×10^{-7} M. Also, it was able to recognize purified Stx1 and cross-reacted with Stx2 toxin by ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), and detected 88% of Stx1-producing strains using a rapid latex agglutination test. Thus, the scFv fragment obtained in the present work is a bacteria-produced tool for use in a rapid diagnosis test, providing an alternative for STEC diagnosis.

Keywords: antibody; scFv; Stx1; STEC

1. Introduction

The single-chain variable fragment (scFv) is a common format of recombinant antibody fragments, and consists of heavy (VH) and light (VL) variable domains, retaining the specificity of parental immunoglobulin [1]. Successful construction of scFvs depends on the choice of the peptide linker and connection of the VH and VL domains, which affect the stability and recognition properties of these antibody molecules [2,3]. Improvements in engineered recombinant antibody fragments could lead to ideal tools for therapy and diagnosis [1]. Indeed, it is possible to increase the antigen-binding affinity and specificity by mimicking somatic hypermutation during an immune response [4]. Moreover,

with recombinant antibody technology, it is possible to replace animal immunization and hybridoma development with a bacterial system, which is capable of synthesizing and expressing practically unlimited quantities of antibodies, which would provide for a more cost-effective diagnostic tool [5].

Shiga toxin 1 (Stx1) is a potent bacterial toxin produced by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). It is a member of the AB_5 bacterial toxin family, of which the B subunit (StxB) binds to globotriaosylceramide receptors (Gb3) on the host cell membrane and translocate the active A subunit (StxA) into the cytosol. StxA exhibits RNA *N*-glycosidase activity towards 28S rRNA, resulting in inhibition of protein synthesis in eukaryotic cells. This inhibition is associated with the ability of STEC bacteria to cause hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans [6–9]. Even though the impact of foodborne illness on a global scale is difficult to estimate, the spread of disease through contaminated food still plays a major role in mortality, raising the importance of the standardization of rapid diagnostic methods, to minimize economic costs in terms of productivity loss, incomes, and health care [10].

Herein, we report the construction of a monoclonal scFv fragment targeting Stx1 by antibody engineering for diagnostic application. We demonstrated here the importance of testing different gene assembly and cloning strategies to obtain a functional scFv fragment, since a recombinant antibody can sometimes lose its affinity for the antigen after purification. The resulting molecule was able to bind purified antigen, and recognize toxin-producing strains using a rapid latex agglutination test, and thus it is considered a promising tool for STEC diagnosis.

2. Materials and Methods

2.1. scFvStx1(I) Gene Design, Expression and Purification

The scFvStx1(I) gene was constructed on the basis of murine hybridoma (mAb 3E2) secreting Stx1 IgG monoclonal antibodies [11], using the same protocol as described by Luz et al. [12]. The DNA encoding the scFvStx1(I) fragment was designed using the BioEdit program (www.bioedit.com) in a VH-linker-VL orientation, using a regular (Gly4Ser)3 linker type, and synthesized by GenScript (Jiangsu, China), (Figure 1). This gene was first cloned into the pAE vector through restriction enzymes BamHI/HindIII (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Cloning was performed using T4 ligase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's recommendations and transformed into E. coli BL21 (DE3) (Promega, Madison, WI, USA) competent cells [13]. The recombinant vector was confirmed by plasmid sequencing. The scFvStx1(I) expression was induced by the addition of IPTG to 1 mM (Invitrogen). The purification was performed under denaturing conditions by the addition of 8 M urea by IMAC chromatography on AKTA Primeplus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), using a His-Trap HP Ni Sepharose column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The first purified scFvStx1(I) was dialyzed to reestablish protein conformation with a Slide-A-Lyser Dialysis G2 (Thermo Scientific, USA) against decreasing concentrations of urea (5, 3, 2, 1 and 0.5 M). The purified protein was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting, detected by HRP-conjugated anti-His-tag monoclonal antibody (1:5000) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

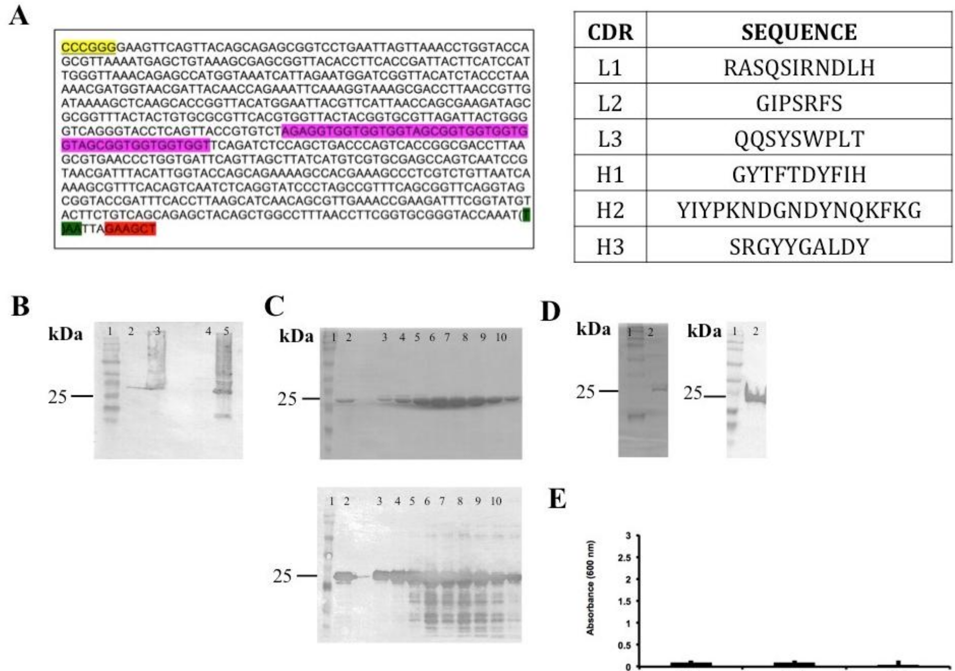


Figure 1. Summary of scFvStx1(I) cloning and procurement. (**A**) Gene sequence and identification of variable chain CDR (complementarity-determining regions). Restriction enzyme *BamHI* site is highlighted in yellow, *HindIII* site is highlighted in red, linker sequence is highlighted in pink and a stop codon is highlighted in green; (**B**) Immunoblotting membrane with anti-6XHis-tag analysis of scFvStx1(I) recombinant protein expression induction: molecular marker (lane 1); fraction before induction (lane 2); fraction post-induction (lane 3); soluble fraction (lane 4); insoluble fraction (lane 5); (**C**) 12% SDS-PAGE analysis (above) of scFvStx1(I) recombinant protein affinity purification and mirror immunoblotting membrane with anti-6XHis-tag (below): molecular marker (lane 1); sample flow through (lane 2); imidazole-eluted fractions (lanes 3 to 10); (**D**) 12% SDS-PAGE analysis (**left**) of scFvStx1(I) recombinant protein after dialysis, and mirror immunoblotting membrane with anti-6XHis-tag (**right**): molecular marker (lane 1); post-dialysis sample (lane 2); (**E**) ELISA for cross-reaction employing 2 µg of each toxin and 0.2% BSA (bovine serum albumin) as control. scFvStx1 was used at 30 µg/mL concentration and the detection antibody was peroxidase-conjugated anti-His-tag (SIGMA). The assay was performed in triplicate.

2.2. *scFvStx1(I) Gene Modifications*

For the second scFv arrangement gene, the DNA fragments encoding the corresponding VL and VH domains were amplified from the previous synthetic gene, using as primers: VLFw (5′ CCT ATG CAT CCG ATT ACA AAG ATG ACG ATG ACA AAG GCG GTG ATA TCC AGC TGA CCC AGA G 3′), VLRv (5′ CTG CCA CCA CTA CTA CCA CTA GCG GCA GTA GTA CCC TTC AGT TCT AAT TTG GTA CC 3′), VHFw (5′ GTG GTA GTA GTG GTG GCA GTA GCA GTG GTG CCG AAG TTC AGT TAC AGC AGA GC 3′) and VHRv (5′ TTG TCG GCC GAA GAC ACG GTA ACT GAG GTA C 3′). The resulting gene was designated *scFvStx1,* and for this construction, the orientation was VL-Linker-VH, while the linker was also changed (Figure 2). Both *scFvStx1* DNA and the pscFvHis-MBP [14] vector were double-digested with NsiI and EagI (NEB, Knowl Piece, Wilbury Way, Hitchin, UK) and purified with Qiaquick PCR purification (Qiagen, Hilden, Germany). Cloning was performed using T4 ligase (Invitrogen), following the manufacturer's recommendations and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Promega, Madison, WI, USA) competent cells [13]. The recombinant vector was confirmed by plasmid sequencing, and the final construction was designated p*scfvStx1*.

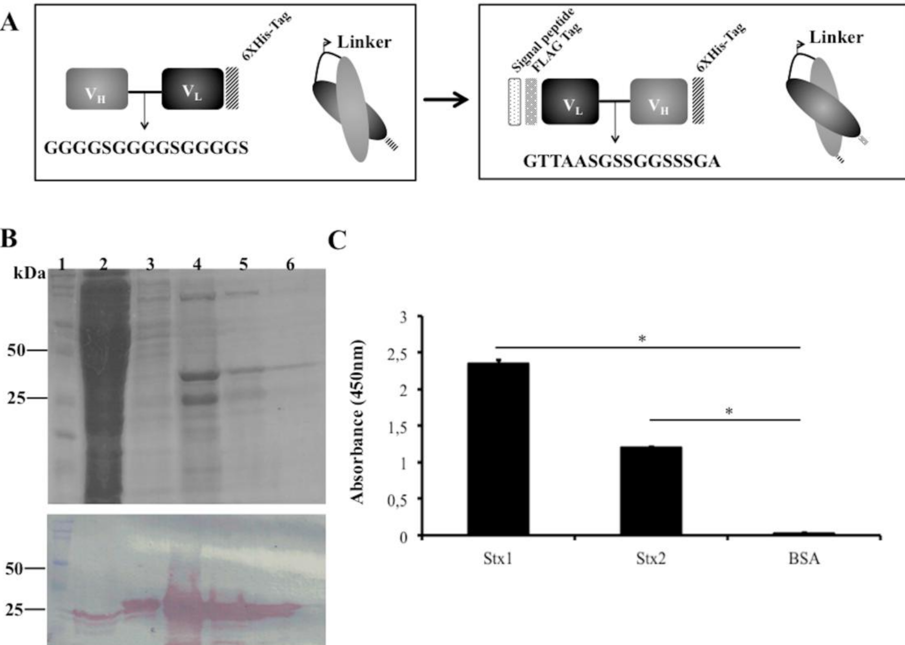


Figure 2. scFvStx1 molecule designs and purified protein. (**A**) Schematic representation of scFvStx1 assembly and modifications; (**B**) 12% SDS-PAGE analysis of scFvStx1 recombinant fragment affinity purification. Molecular marker (lane 1); flow-through fraction (lane 2); wash fraction (lane 3); elution fractions with 20 to 40 mM imidazole (lanes 4–6) showing a 25-kDa protein. Below, immunoblotting detected by peroxidase-conjugated anti-Flag antibody (1:5000), showing detection of a 25-kDa protein; (**C**) ELISA for cross-reaction employing 2 µg of each toxin and 0.2% BSA as control. scFvStx1 was used at EC50 concentration and peroxidase-conjugated anti-Flag antibody (SIGMA) was used for detection. The assay was performed in triplicate and considered positive when $p > 0.05$ by Student's *t*-test versus control (*).

2.3. *scFvStx1 Fragment Procurement*

The scFvStx1 fragment was obtained from p*scFvStx1* construction. Gene expression and purification was performed as described by Luz et al. [12]. Briefly, gene expression was induced by the addition of IPTG to 0.01 mM, and purification performed by IMAC chromatography. The purified protein was analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting, with detection by HRP-conjugated anti-His-tag monoclonal antibody (1:5000) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Affinity was determined by surface plasmon resonance (BIAcore T200, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) following the manufacturer's recommendations. Briefly, Stx1 (purchased from Tufts University School of Medicine, Boston, MA, USA) at 5 µg/mL was immobilized in 10 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 (152 RU) on CM5 sensor chips activated by mixing equal amounts of *N*-ethyl-*N*′-(dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS). Analyses were done using the BIAcore T200 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) instrument. The running buffer used was HBS-EP buffer, pH 7.4, containing 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.05% Tween 20. All samples were prepared in HBS-EP buffer (0–7.4 µM, twofold dilutions), and the kinetic study was carried out in a multicycle model at 25 °C and a flow rate of 30 µL/min (contact of 120 s and dissociation of 600 s). Between cycles the sensor chip was regenerated by a 15 µL pulse of 100 mM glycine containing 2 mM $MgCl_2$, pH 2. The kinetic affinity constant (K_D) was calculated using BIAevaluation version 3.0 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), using the Langmuir 1:1 binding model. The experiments were performed in duplicate. For the effective binding concentration EC50, the antibody concentration required to reach half of the maximal absorbance in ELISA [12] was determined. This concentration was used to perform the cross-reactive ELISA using both Stx toxins (2 µg/mL) immobilized in a

96-well plate using 0.2% BSA as control. For ELISA assays, 0.2% BSA was used as blocking solution for 1 h at room temperature, and the same conditions were used in the following incubations, such as the scFvStx1 and the HRP-conjugated anti-His-tag monoclonal antibody (1:5000, diluted in blocking solution). Between each step, the plates were washed three times with PBS-0.05% Tween 20. Student's t-test was used for statistical analysis, where the differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

2.4. Rapid Latex Agglutination Test (RALT)

RALT was performed as described by Ristori et al. [15], with modifications. Briefly, the latex suspension was incubated with scFvStx1 (500 µg/mL) for 18 h at room temperature, followed by two blocking steps (with 0.2 M ethanolamine and with 1% BSA) for conjugation. After the blocking steps, the sample was maintained in stock buffer. As samples for agglutination tests, logarithmic phase (OD 0.5–0.8) lysates of 23 STEC strains were used as positive controls [11] and lysates of enteropathogenic *E. coli*, enterotoxigenic *E. coli*, and *Shigella flexneri* as negative controls. The bacterial cells were cultured in *E. coli* broth enriched with 0.5 ng/mL ciprofloxacin for 4 h at 37 °C, and then lysed with Triton X-100 for 1 h at 37 °C. The assay was performed on a glass slide, using a mixture of 20 µL of scFvStx1-latex and 20 µL of bacterial lysate, checking for agglutination after 1 min of gentle mixing. Three independent experiments were performed.

3. Results

The DNA encoding the variable domains of both heavy and light chains were isolated from mRNA extracted from hybridoma cells (mAb 3E2) [11] and used for scFv fragment design (Figure 1A). The first scFv design/construct was the VH-linker-VL, using (Gly4Ser)3 as the linker for the *scFvStx1(I)* gene. Even after several attempts, this construction resulted in inclusion body expression and non-functional protein afterwards (Figure 1).

As an alternative to increasing scFv stability during production, we changed the scFvStx1(I) design by adopting another linker (GTTAASGSSGGSSSGA), a linker identified from a phage library designed to optimize the linker between VL and VH of an anti-MBP scFv. In addition, the orientation of the variable domains was reversed as VL-linker-VH. A Ptac-driven expression vector that harbors a signal peptide sequence for periplasmic expression was used for scFv expression, the new gene was designated *scFvStx1* (Figure 2A).

scFvStx1 was purified using a nickel affinity column (IMAC), yielding 2 mg/L, resulting in a 25-kDa protein on SDS-PAGE and immunoblotting (Figure 2B). The affinity constant (K_D) was determined by SPR as 2.26×10^{-7} M. The half-maximal effective concentration (EC50) was determined to be 600 nM by ELISA, and this concentration was used to test cross-reactivity with the homologous toxin Stx2. scFvStx1 was able to bind to both toxins with significant difference compared to the control (Figure 2C). Compared with the parental IgG monoclonal antibody, scFvStx1 was more rapidly obtained in a bacterial system, remaining with the same yield and cross-reactivity (Table 1).

Table 1. Comparison of scFvstx1 and IgG parental antibody. IgG characteristics were obtained from Rocha et al. (2012).

	scFvStx1(II)	IgG mAb
Affinity constant (K_D)	2.26×10^{-7} M	2.5×10^{-10} M
Expression system	Bacterial	Hybridoma
Yield after purification	2 mg/L	2 mg/L
Time to obtain (weeks)	1	5–7
Cross-reactivity to Stx2 *	Yes	Yes

* Tested by ELISA.

Moreover, scFvStx1 was conjugated with latex particles and employed in a rapid latex agglutination test. After a 1-min reaction, the recombinant fragment recognized 88% of the 23 Stx1-producing isolates (STEC) tested. Figure 3 shows a representative agglutination assay. In addition, the scFvStx1-latex complex was stable even after 2 months, giving the same percentage of detection.

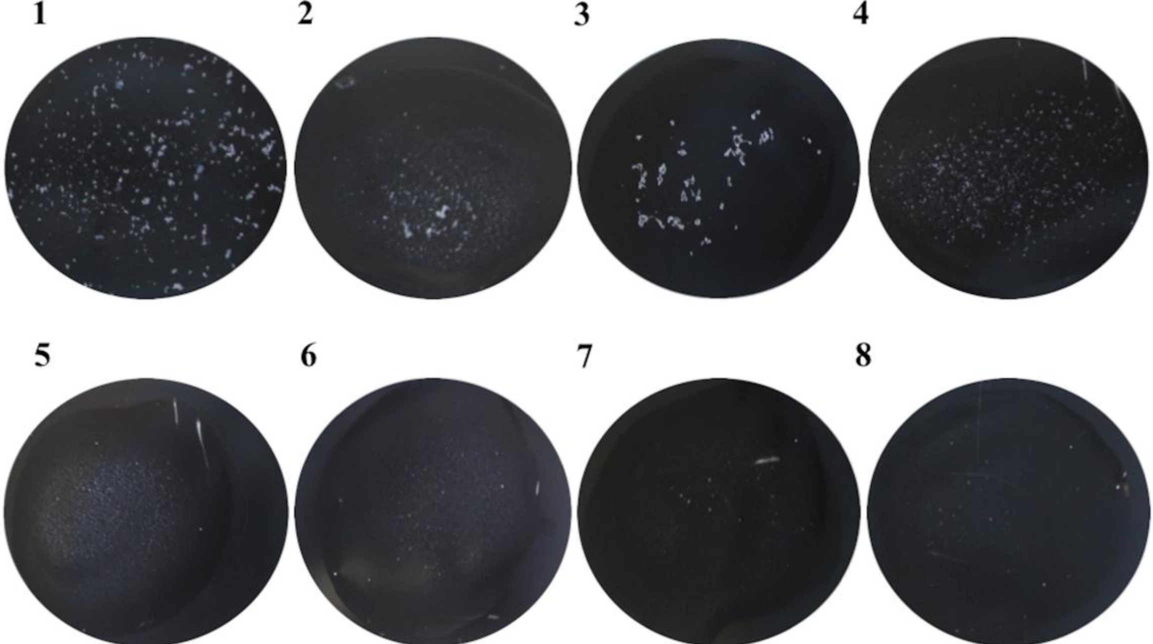


Figure 3. Representative example of the rapid latex agglutination test, with scFvStx1, against positive and negative isolates. The figure represents a 1-min reaction. (**1**) STEC O111:NM (human origin); (**2**) STEC O26:H11 (animal origin); (**3**) STEC O111:H8 (human origin); (**4**) STEC O157:H7 (human origin); (**5**) enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC); (**6**) enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC); (**7**) *Shigella flexneri*; (**8**) *E. coli* broth.

4. Discussion

STECs are foodborne pathogens responsible for 90% of HUS cases [16]. The Shiga toxins produced by these strains are the main targets for detection [17]. Although commercial tests are available for Stx detection, none of them use a recombinant antibody produced in bacteria [18], which could decrease the cost of the final product, since this product is costly which makes it difficult to use in every routine laboratory. Here, we developed a recombinant scFv antibody fragment against Stx1 produced in bacteria, which has a potential for a rapid STEC diagnosis.

The most important challenges in protein engineering are to determine which factors influence recombinant protein stability and functionality [19]. The first strategy used to obtain the scFvStx1(I) fragment resulted in a protein occurring as inclusion bodies, and consequently, the purification was performed under denaturing conditions. The refolding process resulted in many aggregates, which interfered with functionality; this could have been due to the fact that under cytoplasmic reducing conditions, the intra-domain disulfide bonds of conserved antibody domains cannot form, which can interfere with the stability of purified scFv [20,21]. As reviewed by Worn [19], the highly conserved intra-domain disulfide bonds are critical for the stability of scFv fragments [22,23], where only intrinsically very stable scFv fragments will be able to fold correctly in sufficient amounts to be active as cytoplasmic intrabodies. This is also consistent with the finding that many cytoplasmic intrabodies show low expression levels and short half-lives [24].

Thus, to overcome the non-functional insoluble molecule, we made some changes in the *scFvStx1(I)* gene (then designated *scFvStx1*), in which the orientation was changed to VL-linker-VH.

This arrangement allowed the CDH3 to be free at the C-terminal end, since this CDR is likely the most important contributor to antigen binding for most natural antibodies [25]. In addition, based on the fact that the linker could also interfere with molecule stability during expression or storage [26,27], the linker that connects the VL and VH domains was optimized for a common framework by phage display technology (data not shown). Compared with the classic Gly4Ser linker, this linker, GTTAASGSSGGSSSGA, was less flexible and more hydrophilic. Less flexible linkers with proline, threonine and alanine increase stability and the biological activity of recombinant proteins [27].

The *scFvStx1* gene was also cloned into a more specific expression vector for scFv expression [14], which contained besides the histidine tag (6XHis) for nickel affinity chromatography, a FLAG® tag (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), which is composed of 8 hydrophilic amino acids (N-Y-K-N-N-N-K). FLAG® tag (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) is a small tag that does not interfere with protein conformation and activity, but it does increase detection sensitivity 20- to 200-fold compared with His-tag. The expression of this recombinant antibody was driven to host cell periplasm. Unlike the cytoplasm, the periplasm is an oxidative environment, and thus, it is more suitable for disulfide bond formation, which improves the stability of the molecule [28].

The new scFvStx1 was expressed with a yield of 2 mg/L, in a soluble manner, with a K_D of 2.26×10^{-7} M, lower than its precursor mAb 3E2 [11]. Differences in the affinity constant of mono or dimeric antibodies are due to avidity [29]. The recombinant antibody affinity constant is usually lower compared to IgG molecules, which was previously demonstrated by our group with the scFv anti-Stx2 [12]. Moreover, the scFv purification process resulted in a less expensive and faster protocol compared to that for parental IgG (Table 1). scFv-Stx1 also showed cross-reactivity with both toxins, as observed with the scFvStx2 [12] constructed on the basis of Stx2 mAb, which showed cross-reactivity as well [11]. Additionally, scFv was able to detect Stx1-producing isolates with the rapid latex agglutination test. This test is a possible alternative for the current commercial tests.

Taken together, these results strengthen the importance of using structural and expression strategies to improve the functionality and stability of scFv molecules, which contributes to the development of scFv fragments for use in identifying the agent of a worldwide foodborne outbreak, such as STEC.

Acknowledgments: This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP—2011/12928-2). RMFP and AMM received a fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq—301302/2013-8 and 307636/2016-0, respectively). D.L. is a recipient of a FAPESP fellowship (2017/17006-2) also was recipient FAPESP and PNPD-CAPES fellowship (2010/201484; 2013/03160-9; PNPD20132071); E.A.S. is a recipient of a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

Author Contributions: Conceived and designed the experiments: D.L., E.A.S., G.C., A.Q.M., W.Q., M.A.S., R.M.F.P.; Performed the experiments: D.L., W.Q., E.A.S., F.B.A., T.M., B.A.C.; Analyzed the data: D.L., E.A.S., G.C., S.S.S, M.A.S., W.Q., A.M.M., R.M.F.P.; Contributed reagents/materials/analysis tools: S.S.S, L.B.R., A.M.M., R.M.F.P.; Wrote the paper: D.L., E.A.S., R.M.F.P.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Holliger, P.; Hudson, P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1126–1136. [CrossRef] [PubMed]
2. Weatherill, E.E.; Cain, K.L.; Heywood, S.P.; Heywood, S.P.; Compson, J.E.; Heads, J.T.; Adams, R.; Humphreys, D.P. Towards a universal disulphide stabilised single chain Fv format: Importance of interchain disulphide bond location and vL-vH orientation. *Protein Eng. Des. Sel.* **2012**, *25*, 321–329. [CrossRef] [PubMed]
3. Gu, X.; Jia, X.; Feng, J.; Shen, B.; Huang, Y.; Geng, S.; Sun, Y.; Wang, Y.; Li, Y.; Long, M. Molecular modeling and affinity determination of scFv antibody: Proper linker peptide enhances its activity. *Ann. Biomed. Eng.* **2010**, *38*, 537–549. [CrossRef] [PubMed]

4. Gram, H.; Marconi, L.A.; Barbas, C.F.; Collet, T.A.; Lerner, R.A.; Kang, A.S. In vitro selection and affinity maturation of antibodies from a naive combinatorial immunoglobulin library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 3576–3580. [CrossRef] [PubMed]
5. Ahmad, A.Z.; Yeap, S.K.; Ali, A.M.; Ho, W.Y.; Alitheen, N.B.; Hamid, M. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**. [CrossRef] [PubMed]
6. Melton-Celsa, A.R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol. Spectr.* **2014**. [CrossRef] [PubMed]
7. Fontaine, A.; Arondel, J.; Sansonetti, P.J. Role of Shiga toxin in the pathogenesis of bacillary dysentery, studied by using a Tox-mutant of Shigella dysenteriae 1. *Infect. Immun.* **1988**, *56*, 3099–3109. [PubMed]
8. Thompson, G.S.; Shimizu, H.; Homans, S.W.; Donohue-Rolfe, A. Localization of the binding site for the oligosaccharide moiety of Gb3 on verotoxin 1 using NMR residual dipolar coupling measurements. *Biochemistry* **2000**, *39*, 13153–13156. [CrossRef] [PubMed]
9. Ibarra, C.; Amaral, M.M.; Palermo, M.S. Advances in pathogenesis and therapy of hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-2. *IUBMB Life* **2013**, *65*, 827–835. [CrossRef] [PubMed]
10. Anderson, K.M.; Abbott, J.; Zhao, S.; Liu, E.; Himathongkham, S. Molecular subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using a commercial repetitive sequence-based PCR assay. *J. Food Prot.* **2015**, *78*, 902–911. [CrossRef] [PubMed]
11. Rocha, L.B.; Luz, D.E.; Moraes, C.T.P.; Caravelli, A.; Fernandes, I.; Guth, B.E.C.; Horton, D.S.P.Q.; Piazza, R.M.F. Interaction between Shiga toxin and monoclonal antibodies: Binding characteristics and in vitro neutralizing abilities. *Toxins* **2012**, *4*, 729–747. [CrossRef] [PubMed]
12. Luz, D.; Chen, G.; Maranhão, A.Q.; Rocha, L.B.; Sidhu, S.; Piazza, R.M. Development and characterization of recombinant antibody fragments that recognize and neutralize in vitro Stx2 toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120481. [CrossRef] [PubMed]
13. Chung, C.T.; Niemela, S.L.; Miller, R.H. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2172–2175. [CrossRef] [PubMed]
14. Persson, H.; Ye, W.; Wernimont, A.; Adams, J.J.; Koide, A.; Koide, S.; Lam, R.; Sidhu, S.S. CDR-H3 diversity is not required for antigen recognition by synthetic antibodies. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 803–811. [CrossRef] [PubMed]
15. Ristori, C.A.; Rowlands, R.E.G.; Jakabi, M.; Gelli, D.S.; Scola, M.C.G.; de Gaspari, E.N. Detecção de Vibrio cholerae O1 em ostras utilizando anticorpo monoclonal em ensaio de aglutinação. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* **2006**, *65*, 127–132. (In Portuguese)
16. Melli, L.J.; Ciocchini, A.E.; Caillava, A.J.; Vozza, N. Serogroup-specific bacterial engineered glycoproteins as novel antigenic targets for diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **2014**. [CrossRef] [PubMed]
17. Zoja, C.; Buelli, S.; Morigi, M. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: Pathophysiology of endothelial dysfunction. *Pediatr. Nephrol.* **2010**, *25*, 2231–2240. [CrossRef] [PubMed]
18. Gould, L.H.; Bopp, C.; Strockbine, N.; Atkinson, R.; Baselski, V.; Body, B.; Carey, R.; Crandall, C.; Hurd, S.; Kaplan, R.; et al. Recommendations for diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR Recomm. Rep.* **2009**, *58*, 1–12. [CrossRef] [PubMed]
19. Worn, A.; Pluckthun, A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 989–1010. [CrossRef] [PubMed]
20. Gilbert, H.F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulphide exchange. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1990**, *63*, 69–172. [PubMed]
21. Williams, A.F.; Barclay, A.N. The immunoglobulin superfamily, domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **1988**, *6*, 381–405. [CrossRef] [PubMed]
22. Proba, K.; Honegger, A.; Pluckthun, A. A natural antibody missing a cysteine in VH: Consequences for thermodynamic stability and folding. *J. Mol. Biol.* **1997**, *265*, 161–172. [CrossRef] [PubMed]
23. Glockshuber, R.; Schmidt, T.; Plukthun, A. The disulphide bonds in antibody variable domains: Effects on stability, folding in vitro, and functional expression in *Escherichia coli*. *Biocheimistry* **1992**, *31*, 1270–1279. [CrossRef]
24. Cattaneo, A.; Biocca, S. The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol.* **1999**, *17*, 115–121. [CrossRef]

25. Cheng, Y.; Li, Z.; Xi, H.; Gu, T.; Yuan, R.; Chen, X.; Jiang, C.; Kong, W.; Wu, Y. A VL-linker-VH orientation dependent single chain variable antibody fragment against rabies virus G protein with enhanced neutralizing potency in vivo. *Protein Pept. Lett.* **2016**, *23*, 24–32. [CrossRef] [PubMed]
26. Gustavsson, M.; Lehtiö, J.; Denman, S.; Teeri, T.T.; Hult, K.; Martinelle, M. Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in Pichia pastoris. *Protein Eng.* **2001**, *14*, 711–715. [CrossRef] [PubMed]
27. Zhao, H.L.; Yao, X.Q.; Xue, C.; Wang, Y.; Xiong, X.H.; Liu, Z.M. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein by linker engineering. *Protein Expr. Purif.* **2008**, *61*, 73–77. [CrossRef] [PubMed]
28. Feije, M.J.; Buchner, J. Principles and engineering of antibody folding and assembly. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1844*, 2024–2031. [CrossRef] [PubMed]
29. Andrade, E.V.; Freitas, S.M.; Ventura, M.M.; Maranhão, A.Q.; Brigido, M.M. Thermodynamic basis for antibody binding to Z-DNA: Comparison of a monoclonal antibody and its recombinant derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1726*, 293–301. [CrossRef] [PubMed]

© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

ANEXO F

Article

Development and Validation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Immunodiagnostic Assay

Miriam A. Silva [1,†], Anna Raquel R. Santos [1,†,‡], Leticia B. Rocha [1,†], Bruna A. Caetano [1], Thais Mitsunari [1], Luanda I. Santos [1], Juliana M. Polatto [1], Denise S. P. Q. Horton [1], Beatriz E. C. Guth [2], Luís Fernando dos Santos [3] and Roxane M. F. Piazza [1,*]

1 Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo 05503-900, Brazil
2 Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia, Escola Paulista de Medicina Universidade Federal de São Paulo, São Paulo 04023-062, Brazil
3 Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo 01246-000, Brazil
* Correspondence: roxane@butantan.gov.br
† These authors equally contributed to the present work.
‡ Current address: Centro de Tecnologia em Vacinas Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil.

Received: 1 July 2019; Accepted: 2 August 2019; Published: 21 August 2019

Abstract: Shiga toxin (Stx)–producing *Escherichia coli* (STEC) and its subgroup enterohemorrhagic *E. coli* are important pathogens involved in diarrhea, which may be complicated by hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome, the leading cause of acute renal failure in children. Early diagnosis is essential for clinical management, as an antibiotic treatment in STEC infections is not recommended. Previously obtained antibodies against Stx_1 and Stx_2 toxins were employed to evaluate the sensitivity and specificity of the latex Agglutination test (LAT), lateral flow assay (LFA), and capture ELISA (cEIA) for STEC detection. The LAT (mAb Stx_1 plus mAb stx_2) showed 99% sensitivity and 97% specificity. Individually, Stx_1 antibodies showed 95.5% and 94% sensitivity and a specificity of 97% and 99% in the cEIA and LFA assay, respectively. Stx_2 antibodies showed a sensitivity of 92% in both assays and a specificity of 100% and 98% in the cEIA and LFA assay, respectively. These results allow us to conclude that we have robust tools for the diagnosis of STEC infections.

Keywords: STEC; Shiga toxins; antibodies; capture ELISA; latex agglutination test; lateral flow assay

1. Introduction

Among the *E. coli* human pathogens, the Shiga toxin (Stx)–producing *Escherichia coli* (STEC) and its subgroup enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) have gained importance in the three last decades due to their involvement in diarrhea [1], that may be complicated by hemorrhagic colitis (HC) [2] and the hemolytic uremic syndrome (HUS) [3,4], the foremost cause of acute renal failure in children [1] due to action of the two major types of the phage-encoded Stxs, Stx_1 and/or Stx_2. HUS is associated more commonly with strains that produce Stx_2 alone or in combination with Stx_1 rather than those that produce Stx_1 only [5,6]. Most cases of the STEC infection are acquired by consuming food of bovine origin; however, other foodstuffs, water, environmental contact, and person-to-person transmission are also important sources [7]. A large fraction of the reported STEC infections is due to *E. coli* O157:H7, the most involved serotype in complicated cases, which often evolve into HUS [8]. However, six serogroups (O26, O45, O103, O111, O121, and O145) account for many cases of non-O157 STEC infections; furthermore the non-O157 serotypes [9,10].

In the Latin American countries, human infections by STEC are endemic in Argentina and are mainly linked to O157 strains. In other Latin American countries STEC (O157 and non-O157) causes sporadic cases of diarrhea, bloody diarrhea, hemolytic anemia and HUS [11–17]. However, it is essential to point out that the distribution of STEC/EHEC in the gastrointestinal tract of a wide variety of animals indicates the zoonotic character of its infections. The role of different animal species as asymptomatic carriers of STEC/EHEC has been extensively studied in the last years in Brazil. In addition to cattle, which are their most common natural reservoir [18,19] the presence of these pathogens has been identified in the feces of dairy buffaloes [20], sheep [21,22], pigs [23,24], birds [25,26], and fishes [27]. It is noteworthy that some relevant serotypes linked to human infections such as O103:H2 and O157:H7 have been recovered from the feces of sheep and cattle [18,28].

Thus, early diagnosis certainly is fundamental for clinical management of the etiological agent involved in diarrhea; specifically for STEC infections, as the antibiotic treatment is not recommended, since its use may induce the Shiga toxins release, thus allowing its dissemination [29]. Moreover, the diagnosis may be indicative of a likely outbreak, followed by the required measures such as implementation of control and detection of emerging strains [30], thus a key point for therapeutic conduct and consequently to control the disease. The diagnosis of STEC in a routine laboratory is difficult, and only specific virulence factors such as the presence of the Shiga toxin, which is common to all STEC, allows differentiation from other *E. coli* [31].

Immunoserological methods have advantages for clinical laboratories because they significantly reduce the time of analysis, have excellent sensitivity and specificity, and are easy to perform [32]. Despite the availability of commercial immunoassays, such as the ELISA immunoassay (EIA): ProSpecT™ Shiga Toxin *E. coli* (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK), Premier® EHEC (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH, USA), Ridascreen® Verotoxin test (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany); Shiga toxin Check™ (TECHLAB, Inc., Blacksburg, VA, USA) and Shiga Toxins, EIA with Reflex to *E coli* O157, Culture (Quest Diagnostics, Inc., Saint Louis, MO, USA); lateral flow assay (LFA): Duopath®Verotoxins (Merck & Co., Inc. Palo Alto, CA, USA), ImmunoCard STAT!®EHEC (Meridian Bioscience, Inc., Cincinnati, OH, USA), Ridascreen® Quick Verotoxin/O157 (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany) and Shiga toxin Quick Check™ (TECHLAB, Inc., Blacksburg, VA, USA); immunomagnetic separation, such as the RapidCheck®Confirm™STEC (Romer Labs Holding, Tulln, Austria) and an optical immunoassay, such as the Biostar OIA Shigatoxin (Inverness Medical Professional Diagnostics, Waltham, MA, USA). These commercial available assays are not implemented in the routine of clinical laboratories of low and middle-income regions' of developing countries (https://datahelpdesk.worldbank.org/knowledgebase/articles/906519), thus encouraging the present work, i.e., the desire of development of a screening test for the Shiga toxin detection for countries with high incidence, endemic or low information on this infection. Thus, the key of our study is affordability, i.e., to provide the health market, whether a private or public one, an option when analyzing the cost benefit issue (bureaucracy, quality, time to obtain the product and final value). The main project involves two steps: (a) Searching robust tools for the development of the test; (b) will focus on making the use of feces directly, calculating costs and price in the market.

In the present study we limited the search for robust tools, thus essaying the generated polyclonal (pAb) and monoclonal (mAb) antibodies against Stx_1 and Stx_2 [33–35] and the standardization of three platforms using these antibodies in order to verify their performance. Therefore, these antibodies were employed in an evaluation of the sensitivity and specificity of the immunoserological methods, LAT, cEIA and LFA for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* using a collection of bacterial isolates, of which 96 STEC presenting several serotypes and harboring different Stx subtypes and the achieved results indicated that we have robust tools for the the diagnosis of STEC infections.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Isolates

We used in this study a collection of 96 Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains belonging to different serotypes and *stx* subtypes (Table 1). We also included for the ELISA (EIA) cut-off definition and specificity of the latex agglutination (LA) and lateral flow assay (LFA), 12 typical enteropathogenic *E. coli* (tEPEC) [36,37], 11 atypical enteropathogenic *E. coli* (aEPEC) [38], 45 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) [39,40], nine enteroaggregative *E. coli* (EAEC) [41], eight enteroinvasive *E. coli* (EIEC) [42], 14 diffusely-adherent *E. coli* (DAEC) [42], three fecal *E. coli* negative for DEC virulence factors (NVF *E. coli*), four microbiota *E. coli* isolates and 19 Enterobacteriaceae isolates (*Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxitoca*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia spp*., Salmonella Agona, S. Enteritidis, S. Infantis, S. Newport, S. Typhimurium, *Serratia marcescens*, *Shigella boydii*, *S. flexneri*, and *S. sonnei*) from our laboratory collection. The prototype EHEC EDL933 [43] was included in the assay as a positive control for the Stx_1/Stx_2 producing strain. To estimate the sample size for sensitivity and specificity of the diagnostic methods herein standardized nomogram determination was done according to Malhotra and Indrayan [44] and Hajian-Tilak [45] based on the studies of the diarrheagenic *E. coli* pathotypes infection prevalence [46,47].

Table 1. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains immunoassay results.

Strain ID	Serotype	Gene Presence stx_1/stx_2	*stx* Subtype	cEIA (Stx_1)	cEIA (Stx_2)	LAT (Stx_1 + Stx_2)	LFA (Stx_1)	LFA (Stx_2)
IAL6189	O24:H4	1	1a	1.149	0.000	+	+	−
IAL6206	O24:H4	1	1a	0.717	0.000	+	+	+
IAL6163	O26:H11	1	1a	0.810	0.000	+	+	−
IAL6162	O26:H11	1	1a	0.777	0.000	+	+	−
H30	O26:H11	1	1a	1.207	0.003	+	+	−
H19	O26:H11	1	1a	1.109	0.000	+	+	−
199	O26:H11	1	1a	0.892	0.000	+	+	−
3529	O26:H11	1	1a	0.772	0.000	+	+	−
EPM16	O26:H11	1	1a	1.019	0.006	+	+	−
BA4123	O26:H11	1	1a	0.853	0.000	+	+	−
D360-4-1	O26:H11	1	1a	0.832	0.000	+	+	−
1557-77	O26:H11	1	1a	2.416	0.061	+	+	−
CL5	O26:H12	1	1a	0.760	0.000	+	+	−
EPM5	O55:H19	1	1a	0.896	0.008	+	+	−
IAL6174	O71:H8	1	1a	0.767	0.000	+	+	−
IAL6290	O76:H19	1	1c	0.545	0.000	+	+	−
IAL6173	O91:H14	1	1a	0.288	0.013	+	+	−
IAL6186	O103:H^-	1	1a	1.027	0.016	+	+	−
IAL6175	O111:H^+	1	1a	1.900	0.100	+	+	−
IAL6191	O111:H^+	1	1a	0.739	0.000	+	+	−
IAL6184	O111:H8	1	1a	0.857	0.007	+	+	−
IAL6177	O111:H8	1	1a	2.093	0.088	+	+	−
IAL6200	O111:H8	1	1a	0.741	0.000	+	+	−
EPM20	O111:H8	1	1a	0.539	0.000	+	+	−
IAL6183	O111:H8	1	1a	0.893	0.000	+	+	−
EPM23	O111:H8	1	1a	0.831	0.000	+	+	−
IAL6187	O111:H11	1	1a	0.783	0.011	+	+	−
IAL6178	O111:HNM	1	1a	0.354	0.000	+	+	−
EPM26	O111:HNM	1	1a	0.931	0.000	+	+	−
EPM27	O111:HNM	1	1a	1.053	0.000	+	+	−
EPM017	O112:H2	1	1c	0.610	0.000	+	+	−
EPM11	O118:H16	1	1a	0.869	0.000	+	+	−
IAL6196	O118:H16	1	1a	0.801	0.000	+	+	−

Table 1. *Cont.*

Strain ID	Serotype	Gene Presence stx_1/stx_2	*stx* Subtype	cEIA (Stx_1)	cEIA (Stx_2)	LAT (Stx_1 + Stx_2)	LFA (Stx_1)	LFA (Stx_2)
IAL6188	O118:H16	1	1a	0.566	0.009	+	+	−
IAL6171	O123:H$^-$	1	1a	0.897	0.000	+	+	−
IAL6181	O123:H2	1	1a	1.857	0.098	+	+	−
IAL6180	O123:H2	1	1a	0.888	0.010	+	+	−
IAL6197	O123:HNM	1	1a	0.749	0.000	+	+	−
IAL6192	O153:H21	1	1a	0.733	0.000	+	+	−
82	O157:H7	1	1a	0.963	0.000	+	+	−
3299-85	O157:H7	1	1a	1.032	0.078	+	+	−
46240	O157:H7	1	1NT	1.188	0.000	+	+	−
3077-88	O157:H7	1	1a	1.281	0.076	+	+	−
C7-88	O157:H7	1	1a	1.312	0.006	+	+	−
EPM01	ONT:H8	1	1c	0.584	0.000	+	−	−
184332	OR:H19	1	1a	0.408	0.000	+	+	−
BA597	OR:NM	1	1a	1.312	0.000	+	+	−
IAL6176	O8:H19	2	2a + 2d	0.017	0.181	+	−	−
01-9582-01	O39:HR	2	2f	0.018	2.929	+	−	+
IALEc1054/05	O91:H21	2	2a + 2c	0.025	0.829	+	−	+
IAL6201	O100:H$^-$	2	2e	0.028	0.602	+	−	+
EPM82	O112:H21	2	2c	0.020	0.747	+	−	+
IALEc226/04	O113:H21	2	2a	0.100	0.585	+	−	+
IALEc678/04	O113:H21	2	2a	0.024	2.858	+	−	+
IALEc603/04	O141:H49	2	2a	0.013	2.165	+	−	+
IAL6182	O153:H28	2	2NT	0.000	0.202	+	−	+
IALEc1167/05	O157:H$^-$	2	2a + 2c + 2e	0.768	0.339	+	+	+
IALEc703/04	O157:H$^-$	2	2a + 2d	0.017	0.737	+	−	+
IAL6193	O157:H7	2	2a + 2c	0.000	1.022	+	−	+
IAL6207	O157:H7	2	2a + 2c	0.000	0.621	+	−	+
IAL6179	O157:H7	2	2a + 2c	0.000	0.268	−	−	+
IAL6202	O157:H7	2	2a + 2c	0.054	0.764	+	−	+
EPM1	O157:H7	2	2a + 2c	0.092	2.847	+	−	+
EPM2	O157:H7	2	2a + 2c	0.014	0.776	+	−	+
EPM03	O172:NM	2	2a	0.000	0.637	+	−	+
IAL6199	O177:H$^-$	2	2c	0.000	0.752	+	−	+
IAL6172	O178:H19	2	2c	0.102	0.810	+	+	+
IALEc170/04	ONT:H7	2	2a + 2f	0.463	0.000	+	+	−
EPM59	ONT:H16	2	2d	0.000	0.349	+	−	+
EPM022	ONT:H16	2	2b	0.012	0.058	+	−	−
IALEc157/05	ONT:H23	2	2c + 2d	0.027	0.332	+	−	+
IAL6195	ONT:H46	2	2a + 2d	0.000	0.489	+	−	+
BA1132	ONT:H49	2	2a + 2c + 2d	0.010	0.809	+	−	+
BA1189	ONT:H49	2	2a + 2d	0.016	0.792	+	−	+
IAL6198	OR:H$^-$	2	2c	0.005	1.985	+	−	+
EPM79	O22:H16	1/2	1a + 2c + 2d	0.022	0.633	+	−	+
IALEc515/05	O43:H2	1/2	1NT + 2NT	0.558	0.176	+	+	+
BA3003	O48:H7	1/2	1a + 2a	0.651	0.638	+	+	+
IALEc169/04	O74:H25	1/2	1a + 2c	2.267	1.149	+	+	+
EPM036	O75:H8	1/2	1c + 2b	1.153	0.005	+	+	−
IAL6208	O75:H14	1/2	1c + 2NT	1.819	0.141	+	+	+
IALEc617/04	O84:HNM	1/2	1NT + 2NT	0.049	0.794	+	−	+
EPM50	O87:H16	1/2	1NT + 2b	0.008	0.071	+	−	+
EPM4	O93:H19	1/2	1a + 2d	2.538	0.703	+	+	+
EPM44	O98:H4	1/2	1a + 2NT	0.910	0.778	+	+	+
EPM53	O98:H17	1/2	1a + 2a + 2c	0.747	0.781	+	+	+
EPM55	O98:H17	1/2	1a + 2a + 2c	0.839	0.712	+	+	+

Table 1. *Cont.*

Strain ID	Serotype	Gene Presence stx_1/stx_2	*stx* Subtype	cEIA (Stx_1)	cEIA (Stx_2)	LAT (Stx_1 + Stx_2)	LFA (Stx_1)	LFA (Stx_2)
EPM9	O103:H2	1/2	1a + 2c	0.940	0.912	+	+	+
EPM66	O105:H18	1/2	1a + 2a + 2b	1.069	0.839	+	+	+
EPM055	O146:H21	1/2	1a + 2a + 2b	1.144	0.674	+	+	+
3104-88	O157:H7	1/2	1a + 2a	0.502	1.111	+	+	+
EDL933	O157:H7	1/2	1a + 2a	1.348	1.277	+	+	+
EPM45	O181:H4	1/2	1a + 2a	0.941	0.274	+	+	+
IALEc161/04	ONT:H18	1/2	1a + 2a + 2c	2.252	2.927	+	+	+
EPM81	ONT:H38	1/2	1NT + 2a	0.517	0.990	+	+	+
IALEc630/04	ONT:H46	1/2	1a + 2f	0.532	0.323	+	+	+

2.2. Bacterial Supernatant Preparation

Bacterial supernatants were obtained by sequential bacterial culture in the LB medium for 18 h (1:100), followed by a further 4 h in the EC broth (1:10) containing ciprofloxacin (5 ng/mL) [33] and then lysed with 20% Triton X-100 for capture ELISA (cEIA) and latex agglutination test (LAT) [48] or 200 µg/mL polymyxin sulfate B for lateral flow assay (LFA).

2.3. Antibodies

The antibodies employed herein were produced in previous work from our group. Stx_1 and Stx_2 polyclonal antibodies (pAbs) were raised in rabbits and characterized elsewhere [33,34]. The generation and characterization of Stx_1 and Stx_2 monoclonal antibodies (mAbs) are also described elsewhere [35].

2.4. Capture ELISA Immunoassay (cEIA)

Microtiter plates (C96 Polysorp-NUNC) were incubated with 10 µg/mL of Stx_1-pAb or 25 µg/mL of Stx_2-pAb in carbonate-bicarbonate-buffered, pH 9.6 at 37 °C for 2 h and then further at 4 °C for 16 h. Phosphate buffered saline (PBS) with bovine serum albumin (BSA) 1% was added as a blocking agent and incubated for 1 h at 37 °C. The supernatant of bacterial cultures were incubated for 1 h at 37 °C. Toxin bound to Stx_1-pAb or Stx_2-pAb was then detected with 5 µg/mL of Stx_1-mAb or Stx_2-mAb followed by goat anti-mouse IgG peroxidase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluted 1:5000 in the blocking solution. Reactions were developed with 0.5 mg/mL O-phenylenediamine (OPD; Sigma Aldrich Co, St Louis, MO, USA) plus 0.5-µL/mL hydrogen peroxide in 0.05 M citrate-phosphate buffer, pH 5.0, in the dark at room temperature. The reactions were interrupted after 15 min by the addition of 50 µL of 1 M HCl. The absorbance was measured at 492 nm in a Multiskan EX ELISA reader (Labsystems, Milford, MA, USA). At each step, the volume added was 100 µL/well, except in the washing and blocking steps, when the volume was 200 µL/well. Between incubations, the plates were washed three times with PBS-Tween 0.05%. All experiments were carried out in duplicate, and results correspond to three independent experiments.

2.5. Latex Agglutination Test (LAT)

The beads were coupled with 100 µg of Stx_1 mAb for LAT-Stx^1 or 100 µg of Stx_2 mAb for LAT-Stx_2. For detection of Stx without subtype discrimination, the beads were coupled with Stx_1 and Stx_2 mAbs (1:1). The principle used was the nucleophilic addition to aldehyde group with amines. The glutaraldehyde was used as a spacer *arm* between the bead and mAbs. Briefly, the polybeads amino microsphere in a 2.5% aqueous suspension (1 µm diameter–Polyscience, Warrington, PA, USA) were washed three times with PBS and incubated with 8% glutaraldehyde in the PBS at room temperature for 4 h [48]. Next, 50 µg of Stx_1 and 50 µg of Stx_2 mAbs were added and the mixture incubated at room temperature for 16–18 h for coupling, followed by further incubation in the presence of 0.2 M

ethanolamine and BSA. Both incubations were with gentle mixing at room temperature for 60 min. Between incubations, the coated beads were washed and centrifuged (7200× *g*) for 6 min. After the last washing procedure, the pellet was resuspended in the storage buffer (Polyscience, Warrington, PA, USA) and kept at 4 °C.

For LAT, bacterial lysate were obtained by sequential bacterial growth in the LB medium for 18 h (1:100), followed by a further 4 h in the EC broth (1:10) containing ciprofloxacin (5 ng/mL) and then, lysed with 20% Triton X-100 during 1 h and centrifuged (14,500× *g*) for 15 min. The assay was performed on a slide glass using 20 µL of bacterial lysate and 20 µL of latex beads coupled to Stx_1 plus Stx_2 mAbs, and checking for agglutination between 1–2 min of gentle mixing.

2.6. Lateral Flow Assay (LFA)

The Stx_1 or Stx_2 pAb rabbit sera were used as a capture antibody conjugated to colloidal gold particles. The protocol for conjugation of the pAbs with colloidal gold was performed according to Oliver (2010) [49], with some modifications. Briefly: 0.01% colloidal gold solution (20 nm diameter particles) (BBInternational, Cardiff, England) was previously adjusted to pH 9.0 with 0.1 M potassium carbonate solution (K_2CO_3). First, 1 mg of each of the pAb was resuspended in 1 mL of 0.2 M borate buffer (0.2 M sodium borate, 0.15 M NaCl, pH 9.0) and dialyzed against 2 mM borate buffer (2 mM sodium borate, 1.5 mM NaCl, pH 9.0) at room temperature for 2 h.

The amount of antibody required to stabilize colloidal gold was determined as follows: 100 µL of colloidal gold was added in microtubes containing 10 µL of serially diluted previously dialyzed pAb. After 10 min, 11 µL of 10% sodium chloride (NaCl) was added to each tube. The amount of antibody sufficient to stabilize the gold was the dilution in which the solution did not change color, i.e., an insufficient amount of antibody altered the coloration of the solution from red to blue [49].

After determination of the optimal ratio between the antibody and colloidal gold made in the previous step, a total volume of 10 mL of solution was obtained, which was kept under stirring at room temperature for 30 min. To block the reaction, a 10% BSA solution (10% BSA in 0.02 M borate buffer, pH 9.0) was added in sufficient volume to the final concentration of 1%. After incubation at room temperature for 30 min, the solution was centrifuged at 11,000× *g* for 20 min at room temperature and the supernatant discarded. The pellet was then resuspended in 2 mL of a 2% BSA solution (2% BSA in 0.01 M borate buffer) and centrifuged at 11,000× *g* for 10 min at room temperature. Finally, the pellet was resuspended in 1 mL of the storage buffer (3% BSA, 3% sucrose, 0.01 M sodium borate, and 0.05% sodium azide, pH 7.5) and the pAbs conjugated to colloidal gold (pAb-Au) were stored at 4 °C. Finally, 600 µL of pAb-Au was applied at 30 cm in the dried glass fiber in a desiccator whose relative humidity is 20% for 24 h.

The Stx_1 (3 mg/mL) or Stx_2 (4 mg/mL) mAbs were used for detection, and they were applied directly to the nitrocellulose membrane (Millipore HF180 NM) as the test line. As a control line of the LFA, the goat anti-rabbit IgG antibody was applied above the test line. The LFA tests were prepared on a large scale on a semi-automatic platform, consisting of a Matrix 1600 Reagent Dispensing Module (applies the antibodies in NM), Matrix 2210 Universal Laminator Module (mounts/overlaps all test membranes), and Matrix 2360 Programmable Shear (cuts LFA test strips), all obtained from Kinematic Automation, Inc. (Sonora, CA, USA). The strips were dried at room temperature in a desiccator whose UR is 20% for 24 h. The treatment of the sample pad portion was made by buffer containing 1% BSA, 0.25% Tween-20, and sodium azide.

For LFA, the bacterial supernatant were obtained by sequential bacterial growth in the LB medium for 18 h (1:100), followed by a further 4 h in the EC broth (1:10) containing ciprofloxacin (5 ng/mL) and then, lysed with 200 µg/mL polymyxin sulfate B during 1 h and centrifuged (14,500× *g*) for 15 min. Supernatant were kept at −20 °C until test analyzes.

2.7. Stx Subtyping

Stx subtyping was performed by PCR using the primers and amplification conditions as previously described [50].

2.8. Statistical Analyses

The Vero cell assay (VCA) was employed as the gold standard method for the Stx production [51]. Additionally, we differentiated the toxin subtype by PCR for stx_1 and or stx_2 in order to evaluate the sensitivity and specificity of Stx_1 or Stx_2 antibodies. The absorbance values from the duplicates of three independent experiments from Stx-positive and Stx-negative isolates after reaction with Stx_1 or Stx_2 antibodies were analyzed by GraphPrism 5.01, using the Student's *t*-test and two-way ANOVA. The differences were considered statistically significant when $p \geq 0.05$. The receiver operating characteristic (ROC) curve was employed for determining the calculation of the ELISA's cut-off as well as providing the sensitivity and specificity report. Furthermore, the Cohen's Kappa statistic was employed to test the interrater reliability [52].

3. Results

3.1. Presence and Production of Stx_1 and Stx_2

The production of Stx was analyzed in the bacterial collection (221 isolates) employing the gold standard Vero cell assay (VCA). The 96 STEC were confirmed as Stx producers, and the 125 other enterobacterial strains were Stx negative. In addition, the *stx* subtype was defined by PCR in the 96 STEC strains, in which 47 were stx_1 and 28 were stx_2 and 21 presented both genes (Table 1).

3.2. Validation of Diagnostic Immunoassays

In order to test the bacterial supernatants for each different assay, bacterial cultures were prepared differently. Thus, for capture ELISA (cEIA) and latex agglutination test (LAT) bacterial culture was lysed with Triton X-100 or polymyxin sulfate B for the lateral flow assay (LFA), since the detergent presence impaired the sample flow in LFA.

The bacterial collection mentioned above was analyzed using three different immunoassays employing Stx_1 and Stx_2 polyclonal and monoclonal antibodies raised in-house [33–35] in order to observe their performance in the screening assay (LAT and/or LFA) and/or confirmatory assay (cELISA). These analyses allowed calculating the assay parameters as predictive value (PV) for the positive (PPV) and negative (NPV) samples, the accuracy (A), the sensitivity (Se) and specificity (Sp). In addition, the kappa concordance index (κ) was evaluated using the *p* value < 0.001.

The analysis of the Stx_1 detection in 68 strains (positive samples) and 153 strains (negative samples) by the three methods revealed for cEIA was PPV = 94%, NPV = 98%, A = 97%, Se = 95.5%, Sp = 97% and $\kappa = 0.957$. For LAT: PPV of 82%, NPV of 97% and A of 92%, thus the Se and Sp was 94% and 91%, respectively, and $\kappa = 0.846$. The parameters observed for LFA: 97% for PPV, 97% for NPV, 97% for A, 94% for Se, 99% for Sp and $\kappa = 0.925$ (Figure 1 and Figure 3).

Concerning the detection of Stx_2 by 49 strains (positive samples) and 171 strains (negative samples) by the three methods revealed for cEIA: PPV = 100%, NPV = 98%, A = 98%, Se = 92%, Sp = 100% and $\kappa = 0.933$. These values for LAT: PPV of 81%, NPV of 99% and A of 94%, thus the Se and Sp was 96% and 93.5%, respectively, and $\kappa = 0.829$. The parameters observed for LFA: 94% for PPV, 98% for NPV, 97% for A, 92% for Se, 98% for Sp and $\kappa = 0.883$ (Figures 2 and 3).

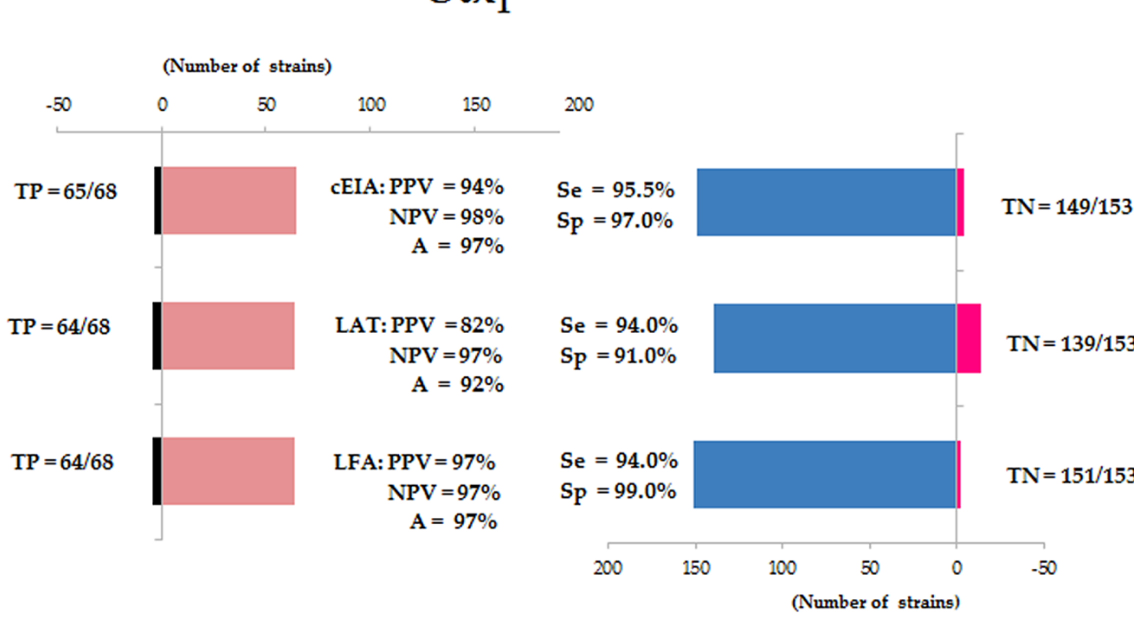


Figure 1. Analysis of Stx_1 detection by capture ELISA (cEIA), latex agglutination test (LAT) and the lateral flow assay (LFA). TP = true positive strains; TN = true negative strains; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; A = accuracy; Se = sensitivity and Sp = specificity.

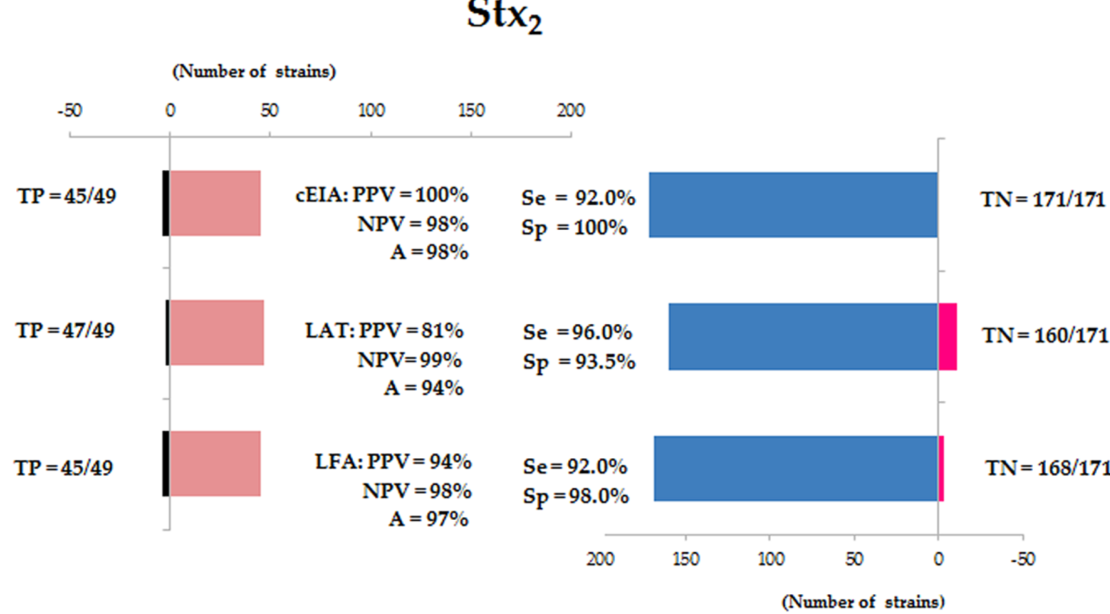


Figure 2. Analysis of Stx_2 detection by capture ELISA (cEIA), latex agglutination test (LAT) and lateral flow assay (LFA). TP = true positive strains; TN = true negative strains; PPV = predictive positive value; NPV = negative predictive value; A = accuracy; Se = sensitivity and Sp = specificity.

Comparing the values of the three immunoassays for Stx_1 and Stx_2, LAT employing mAbs individually coupled to latex particles always showed lower predictive values than LFA and cEIA. Thus, we decided to combine both monoclonal antibodies (Stx_1 and Stx_2) in order to detect Stx without distinction between the toxin types. We achieved the following values: PPV of 96%, NPV of 99% and A of 98%, thus the Se and Sp was 99% and 97%, respectively and $\kappa = 0.945$. Therefore, we observed five false positives ((three strains of DAEC (190 and 203), one EAEC (BA1348) and one EIEC (167(48)) and one false negative, the test was not able to detect one O157:H7 strain (Figures 4 and 5).

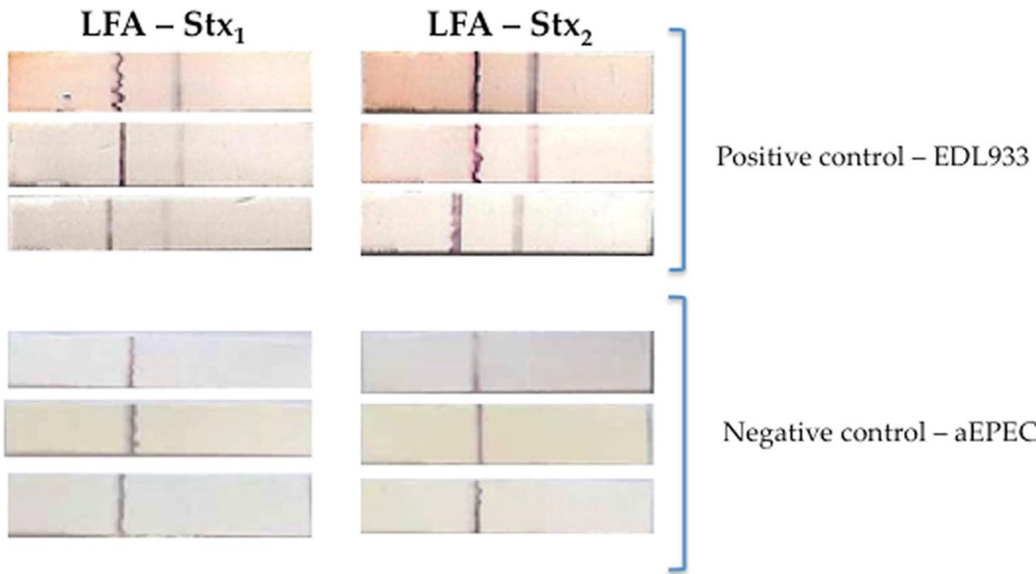


Figure 3. Representative image of positive (EDL933 – O157:H7) and negative (atypical EPEC–aEPEC-O127:H7) controls strains in a lateral flow assay (LFA) employing Stx_1 or Stx_2 antibodies. Triplicates of each experiment.

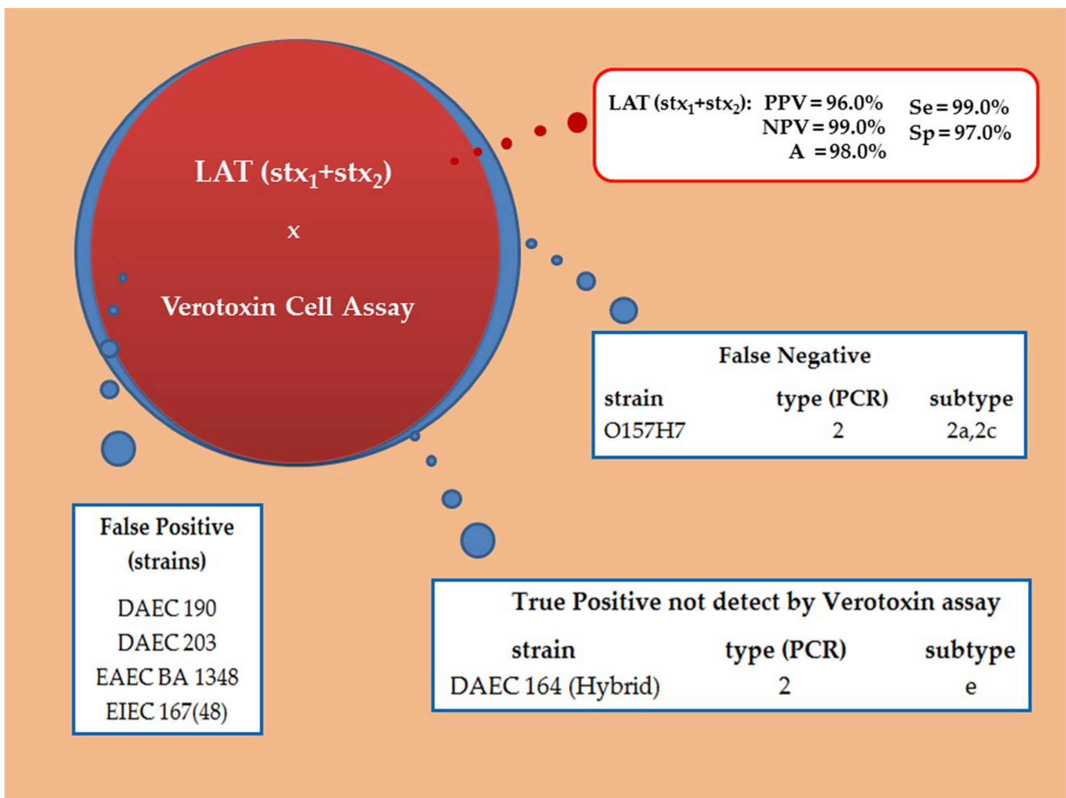


Figure 4. Venn diagram of latex agglutination test (LAT) employing Stx_1 mAb combined with Stx_2 mAb; PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value; A = accuracy; Se = sensitivity and Sp= specificity. Blue = VCA results; Red = LAT results.

In the cEIA, the Stx_1 Abs (mAb and pAb) were able to recognize the Stx_1 producers, showing 95.5% of sensitivity and 97% of specificity and an A_{492nm} of 0.195 cut off (Figure 6A) and Stx_2 Abs (mAb and pAb) were able to recognize the Stx_2 producing strains, showing 92% of sensitivity and 100% of specificity and an A_{492nm} of 0.1205 cut off (Figure 6B).

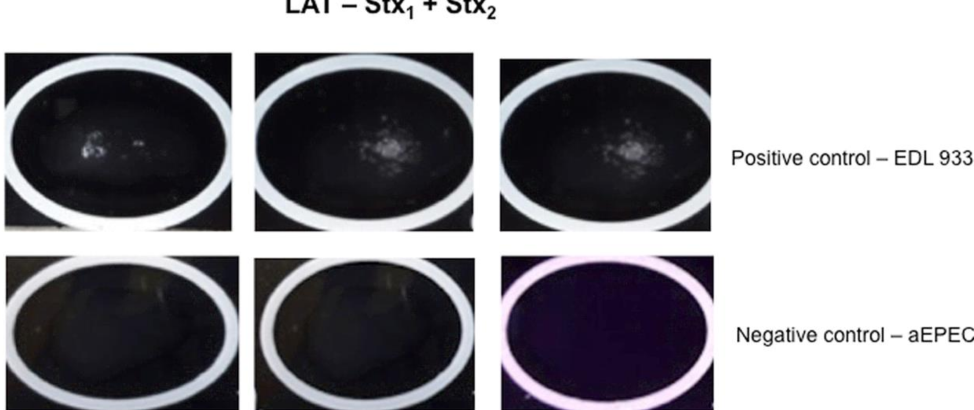


Figure 5. Representative image of positive (EDL 933 – O157:H7) and negative (atypical EPEC–aEPEC – O127:H7) controls strains in a latex agglutination test (LAT) employing Stx_1 and Stx_2 antibodies. Triplicates of each experiment.

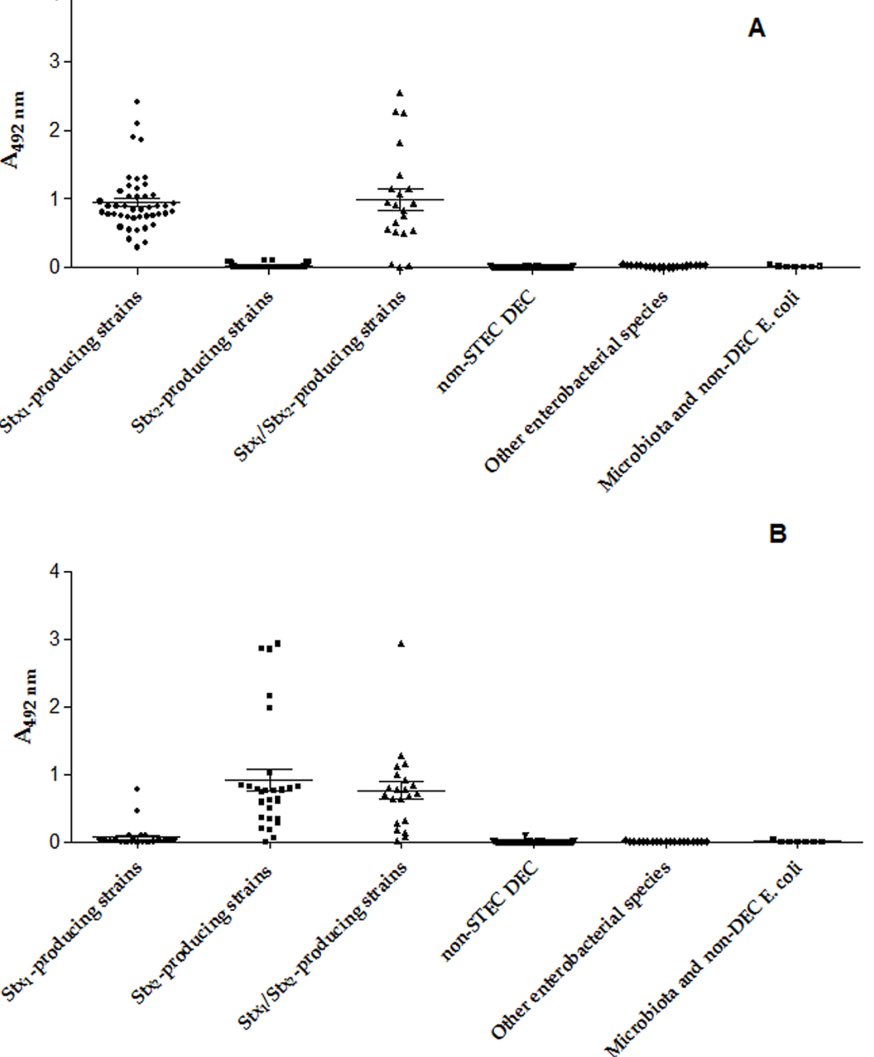


Figure 6. Capture ELISA (cEIA) analysis: (**A**) Employing Stx_1 pAb and mAb; (**B**) Employing Stx_2 pAb and mAb. The optical densities obtained for the isolates reacted with Stx_1, or Stx_2 pAb and mAb were analyzed by GraphPrism 5.01, using the Student's t-test and two-way ANOVA. The differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

4. Discussion

Different protocols for detection of Shiga toxin-producing strains either in the feces of infected patients or contaminated food have already been described for routine diagnosis [53–55]. Currently, the PCR for *stx* has been employed in reference diagnosis centers and some laboratories of upper-middle-income regions of developing countries using bacterial confluent growth zones or sorbitol-fermenting and non-fermenting colonies taken from MacConkey sorbitol agar (SMAC plates) [47,53]. Nevertheless, the gold standard for Stx detection is the evaluation of the cytotoxicity of bacterial culture supernatants for eukaryotic cells (VCA) [3,51].

Thus encouraging the present work, i.e., the request of a development of a screening test for the Shiga toxin detection for countries with high incidence, endemic or low information on this infection. Thus, Stx_1 and Stx_2 pAbs and mAbs were generated in previous studies [33–35]; and different formats of immunoassays, employing these antibodies were developed and standardized. Herein, we evaluated the sensitivity and specificity of LAT, cEIA, and LFA employing VCA as gold standard.

An important point is which protocol should be used for toxin production and secretion. Usually, Stx_1 is secreted into the medium [56], whereas Stx_2 has been shown to be either periplasmatic [56] or liberated inside vesicles [57] therefore not secreted into the medium. In a former work of our group we have established a protocol for in vitro cultivation by sequential bacterial culture in LB medium for 18 h (1:100), followed by a further 4 h in the EC broth (1:100), and in order to enhance toxins secretion we added ciprofloxacin (5 ng/mL) [33]. Herein, we established a 1:10 dilution from the LB to the EC broth, in turn; to better stimulate toxin production, since in 1:100 dilutions the very low-producers strains were not detected. Another critical point we established is the different procedures for toxins secretion according to the assay requirements. Thus, bacterial supernatants were prepared differently; bacterial culture was lysed with Triton X-100 for cEIA and LAT or polymyxin sulfate B for LFA. Usually, the commercial available tests also employ different procedures for toxin secretion, except for the Ridascreen® Verotoxin test and Ridascreen® Quick Verotoxin/O157, that mention the use of mitomycin C as an inductor for the formation of Shiga toxins, the others refer generically to the diluent.

The sensitivity and specificity of each tested assay reached percentages as the commercial ones (pertaining the datasheet of each company), therefore encouraging results; concerning cEIA-Stx_1 95.5 and 97%, respectively and cEIA-Stx_2 92 and 100%, respectively, comparable to ProSpecT™ Shiga Toxin *E. coli* (92.3 and 99.6%); Premier® EHEC (100 and 97.9%); Ridascreen® Verotoxin test (93.9 and 96.1%) and Shiga toxin check™ (97.1 and 99.7%). For LFA-Stx_1 (94 and 99%) and LFA-Stx_2 (92 and 98%) for sensitivity and specificity, respectively; comparable to Duopath®Verotoxins (100 and 99.6%); ImmunoCard STAT!®EHEC (92.3 and 98.7%); Ridascreen® Quick Verotoxin/O157 (85 and 98.7%) and Shiga toxin Quick Check™ Stx_1 (100 and 99.5%) and Stx_2 (95.7 and 99.9%).

Regarding the sensitivity and specificity of the latex agglutination assay, LAT-Stx_1 (94 and 91%); LAT-Stx_2 (96 and 93.5%), respectively, but when both mAbs were combined these results reached to 99 and 97%, respectively. Our results cannot be compared to those of the reverse passive latex agglutination kits (VTEC-RPLA toxin detection and VTECRPLA "Seiken", Japan) since they were no longer commercially accessible. Early diagnosis of diarrhea is the key to therapeutic behavior, accordingly, for a diagnostic assessment method we may employed RALT for EspB (97% sensitivity and 98% specificity) [48] and LAT-Stx (99% sensitivity and 97% specificity), so we may define in a short term if the diarrhea was due to EPEC/EHEC or STEC. Only one false negative occurred and five false-positives, in fact, among them, one strain initially described as the adherent diffuse *E. coli* (DAEC) by the *daaC* probe [42]. Herein it is a real positive, detected by PCR as Stx_2e, but a non-producer Stx by VCA. Moreover, no cross-reaction was observed neither with *E. coli* negative for the DEC virulence factors nor with the microbiota strains and among the enterobacterial species.

Due to the feasibility of LFA, the LFA-Stx_1 and LFA-Stx_2 we consider that it can be used as a rapid test, such as described elsewhere [58,59], since it did not require expensive equipment or trained personnel to interpret the results. Unlike ELISA or PCR methods, colloidal gold technology can be used for point-of-care applications and screening as they require the only assessment of red colored

lines for the end-point detection. Both standardized methods are reproducible, fast, easy to perform, showing high sensitivity in detecting Stx.

The same features were observed in cEIA, even detecting Stx in low-producing isolates, but, cEIA can be used as a diagnostic helper or confirmatory since a spectrophotometer is necessary for the absorbance's reading. Currently, these assessment immunoassays are under technology transfer to a Brazilian start-up in order to validate those employing fecal samples and the commercial availability of them.

5. Conclusions

The standardized tests can be used not only in reference laboratories but also mainly in clinical laboratories and hospitals, given the importance of diagnosis for appropriate patient treatment and the prevention of outbreaks and contamination by STEC. The comparative analysis of cEIA, LAT and LFA allows the conclusion that we have robust tools for STEC diagnosis infections. Assessing all our data, including the rapidity of feedback to the patient, feasibility, and accuracy of the test, we can also conclude that when the Stx_1 and Stx_2 mAbs were coupled, better performance was observed for a screening test for the Shiga toxin detection.

Author Contributions: Conceptualization, M.A.S., A.R.R.S., L.B.R., D.S.P.Q.H., B.E.C.G., L.F.d.S. and R.M.F.P.; Methodology, M.A.S., A.R.R.S., L.B.R., B.A.C., T.M., L.I.S. and J.M.P.; Resources, L.F.d.S., B.E.C.G. and R.M.F.P.; Writing—original draft preparation, M.A.S., A.R.R.S., L.B.R. and R.M.F.P.; Writing—review and editing, M.A.S., A.R.R.S., L.B.R., B.A.C., T.M., D.S.P.Q.H., B.E.C.G., L.F.d.S. and R.M.F.P.; Project administration, R.M.F.P.; Funding acquisition, R.M.F.P.

Funding: This research was funded by São Paulo Research Foundation (FAPESP-2013/06589-6, 2013/50955-7). BECG and RMFP are research fellows of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. ARRS and LBR were FAPESP fellows (2012/02618-9, 2012/090906-2).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Karmali, M.A.; Gannon, V.; Sargeant, J.M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 360–370. [CrossRef] [PubMed]
2. Riley, L.W.; Remis, R.S.; Helgerson, S.D.; McGee, H.B.; Wells, J.G.; Davis, B.R.; Hebert, R.J.; Olcott, E.S.; Johnson, L.M.; Hargrett, N.T.; et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* **1983**, *308*, 681–685. [CrossRef] [PubMed]
3. Karmali, M.A.; Steele, B.T.; Petric, M.; Lim, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* **1983**, *1*, 619–620. [CrossRef]
4. Karmali, M.A.; Petric, M.; Lim, C.; Fleming, P.C.; Arbus, G.S.; Lior, H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **1985**, *151*, 775–782. [CrossRef] [PubMed]
5. Byrne, L.; Jenkins, C.; Launders, N.; Elson, R.; Adak, G.K. The epidemiology, microbiology and clinical impact of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in England, 2009–2012. *Epidemiol. Infect.* **2015**, *143*, 3475–3487. [CrossRef] [PubMed]
6. Melton-Celsa, A.R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol. Spectr.* **2014**, *2*. [CrossRef] [PubMed]
7. Heiman, K.E.; Mody, R.K.; Johnson, S.D.; Griffin, P.M.; Gould, L.H. *Escherichia coli* O157 outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 1293–1301. [CrossRef] [PubMed]
8. Tarr, P.I.; Gordon, C.A.; Chandler, W.L. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* **2005**, *365*, 1073–1086. [CrossRef]
9. Byrne, L.; Vanstone, G.L.; Perry, N.T.; Launders, N.; Adak, G.K.; Godbole, G.; Grant, K.A.; Smith, R.; Jenkins, C. Epidemiology and microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in England, 2009–2013. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 1181–1188. [CrossRef]

10. Kuehne, A.; Bouwknegt, M.; Havelaar, A.; Gilsdorf, A.; Hoyer, P.; Stark, K.; Werber, D. HUS active surveillance network Germany. Estimating true incidence of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* illness in Germany based on notification data of haemolytic uraemic syndrome. *Epidemiol. Infect.* **2016**, *114*, 3305–3315. [CrossRef]
11. Rivas, M.; Padola, N.L.; Lucchesi, P.M.A.; Masana, M. Diarrheogenic *Escherichia coli* in Argentina. In *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*; Torres, A.G., Ed.; Bentham Books: Potomac, MD, USA, 2010; Volume 1, pp. 142–161.
12. Vidal, R.M.; Oñate, A.; Salazar, J.C.; Prado, V. Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Chile. In *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*; Torres, A.G., Ed.; Bentham Books: Potomac, MD, USA, 2010; Volume 1, pp. 179–190.
13. Guth, B.E.C.; Picheth, C.; Gomes, T.A.T. Escherichia coli situation in Brazil. In *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*; Torres, A.G., Ed.; Bentham Books: Potomac, MD, USA, 2010; Volume 1, pp. 162–178.
14. Varela, G.; Gómez-Garcia, O.; Ochoa, T. Diarrheogenic *Escherichia coli* in children from Uruguay, Colombia and Peru. In *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*; Torres, A.G., Ed.; Bentham Books: Potomac, MD, USA, 2010; Volume 1, pp. 209–222.
15. Navarro, A.; Estrada-Garcia, T. Epidemiology of diarrheogenic *Escherichia coli* Pathotypes in Mexico, past and present. In *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*; Torres, A.G., Ed.; Bentham Books: Potomac, MD, USA, 2010; Volume 1, pp. 191–208.
16. Rivas, M.; Chinen, I.; Guth, B.E.C. Enterohemorrhagic (Shiga Toxin-Producing) *Escherichia coli*. In *Escherichia coli in the Americas*; Torres, A.G., Ed.; Springer Nature: Basel, Switzerland, 2016; Volume 1, pp. 97–123.
17. Torres, A.G.; Amaral, M.M.; Betancor, L.; Galli, L.; Goldstein, J.; Krüger, A.; Rojas-López, M. Recent Advances in Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Research in Latin America. *Microorganisms* **2018**, *6*, 100. [CrossRef] [PubMed]
18. Gonzalez, A.G.; Cerqueira, A.M.; Guth, B.E.; Coutinho, C.A.; Liberal, M.H.; Souza, R.M.; Andrade, J.R. Serotypes, virulence markers and cell invasion ability of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains isolated from healthy dairy cattle. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121*, 1130–1143. [CrossRef] [PubMed]
19. Lascowski, K.M.S.; Guth, B.E.C.; Martins, F.H.; Rocha, S.P.D.; Irino, K.; Pelayo, J.S. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in drinking water supplies of North Paraná State, Brazil. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *114*, 1230–1239. [CrossRef] [PubMed]
20. Beraldo, L.G.; Borges, C.A.; Maluta, R.P.; Cardozo, M.V.; Rigobelo, E.C.; Ávila, F.A. Detection of Shiga toxigenic (STEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in dairy buffalo. *Vet. Microbiol.* **2014**, *170*, 162–166. [CrossRef] [PubMed]
21. Maluta, R.P.; Fairbrother, J.M.; Stella, A.E.; Rigobelo, E.C.; Martinez, R.; Ávila, F.A. Potentially pathogenic *Escherichia coli* in healthy, pasture-raised sheep on farms and at the abattoir in Brazil. *Vet. Microbiol.* **2014**, *169*, 89–95. [CrossRef] [PubMed]
22. Martins, F.H.; Guth, B.E.; Piazza, R.M.; Leão, S.C.; Ludovico, A.; Ludovico, M.S.; Dahbi, G.; Marzoa, J.; Mora, A.; Blanco, J.; et al. Diversity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep flocks of Paraná State, southern Brazil. *Vet. Microbiol.* **2015**, *175*, 150–156. [CrossRef] [PubMed]
23. Borges, C.A.; Beraldo, L.G.; Maluta, R.P.; Cardozo, M.V.; Guth, B.E.; Rigobelo, E.C.; Ávila, F.A. Shiga toxigenic and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in the feces and carcasses of slaughtered pigs. *Food Path. Dis.* **2012**, *10*, 1–7.
24. Martins, R.P.; Silva, M.C.; Dutra, V.; Nakazato, L.; Leite, D.S. Preliminary virulence genotyping and phylogeny of *Escherichia coli* from the gut of pigs at slaughtering stage in Brazil. *Meat Sci.* **2013**, *93*, 437–440. [CrossRef] [PubMed]
25. Gioia-Di Chiacchio, R.M.C.; Cunha, M.P.; Sturn, R.M.; Moreno, L.Z.; Moreno, A.M.; Pereira, C.B.; Martins, F.H.; Franzolin, M.R.; Piazza, R.M.; Knöbl, T. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Zoonotic risks associated with psittacine pet birds in home environments. *Vet. Microbiol.* **2016**, *184*, 27–30. [CrossRef]
26. Gioia-Di Chiacchio, R.M.; Cunha, M.P.V.; Sá, L.R.M.; Davies, Y.M.; Pereira, C.B.P.; Martins, F.H.; Munhoz, D.D.; Abe, C.M.; Franzolin, M.R.; Santos, L.F.; et al. Novel Hybrid of Typical Enteropathogenic *Escherichia coli* and Shiga-Toxin-3 *E. coli* (tEPEC/STEC) Emerging From Pet Birds. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–10. [CrossRef]
27. Ribeiro, L.F.; Barbosa, M.M.C.; Pinto, F.R. Shiga toxigenic andenteropathogenic *Escherichia coli* in water and fishfrom pay-to-fish ponds. *Lett. Appl. Microbiol.* **2015**, *62*, 216–220. [CrossRef] [PubMed]

28. Martins, F.H.; Guth, B.E.; Piazza, R.M.; Blanco, J.; Pelayo, J.S. First description of a Shiga toxin-producing Escherichia coli O103:H2 strain isolated from sheep in Brazil. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2014**, *8*, 126–128. [CrossRef]
29. Clements, A.; Young, J.C.; Constantinou, N.; Frankel, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* **2012**, *3*, 71–87. [CrossRef] [PubMed]
30. Bettelheim, K.A.; Beutin, L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *J. Appl. Microbiol.* **2003**, *95*, 205–217. [CrossRef]
31. Paton, J.C.; Paton, A.W. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **1998**, *11*, 450–479. [CrossRef]
32. Gould, L.H.; Bopp, C.; Strockbine, N.; Atkinson, R.; Baselski, V.; Body, B.; Carey, R.; Crandall, C.; Hurd, S.; Kaplan, R.; et al. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for Diagnosis of Shiga Toxin. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2009**, *58*, 1–14.
33. Rocha, L.B.; Piazza, R.M.F. Production of Shiga toxin by Shiga toxin-expressing *Escherichia coli* (STEC) in broth media: From divergence to definition. *Lett. Appl. Microbiol.* **2007**, *45*, 411–417. [CrossRef]
34. Mendes-Ledesma, M.R.; Rocha, L.B.; Bueris, V.; Krause, G.; Beutin, L.; Franzolin, M.R.; Trabulsi, L.R.; Elias, W.P.; Piazza, R.M. Production and characterization of rabbit polyclonal sera against Shiga toxins Stx_1 and Stx_2 for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Microbiol. Immunol.* **2008**, *52*, 484–491. [CrossRef] [PubMed]
35. Rocha, L.B.; Luz, D.E.; Moraes, C.T.; Caravelli, A.; Fernandes, I.; Guth, B.E.; Horton, D.S.; Piazza, R.M. Interaction between Shiga toxin and monoclonal antibodies: Binding characteristics and in vitro neutralizing abilities. *Toxins* **2012**, *4*, 729–747. [CrossRef]
36. Nara, J.M.; Cianciarullo, A.M.; Culler, H.F.; Bueris, V.; Horton, D.S.; Menezes, M.A.; Franzolin, M.R.; Elias, W.P.; Piazza, R.M. Differentiation of typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli* using colony immunoblot for detection of bundle-forming pilus expression. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 35–43.
37. Menezes, M.A.; Rocha, L.B.; Koga, P.C.; Fernandes, I.; Nara, J.M.; Magalhães, C.A.; Abe, C.M.; Ayala, C.O.; Burgos, Y.K.; Elias, W.P.; et al. Identification of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains by immunoserological detection of intimin. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *108*, 878–887. [CrossRef] [PubMed]
38. Abe, C.M.; Trabulsi, L.R.; Blanco, J.; Blanco, M.; Dahbi, G.; Blanco, J.E.; Mora, A.; Franzolin, M.R.; Taddei, C.R.; Martinez, M.B.; et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae(+) EAF-negative stx(-) genetic profile. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *64*, 357–365. [CrossRef] [PubMed]
39. Rocha, L.B.; Ozaki, C.Y.; Horton, D.S.; Menezes, C.A.; Silva, A.; Fernandes, I.; Magnoli, F.C.; Vaz, T.M.; Guth, B.E.; Piazza, R.M. Different assay conditions for detecting the production and release of heat-labile and heat-stable toxins in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates. *Toxins* **2013**, *5*, 2384–2402. [CrossRef]
40. Ozaki, C.Y.; Silveira, C.R.; Andrade, F.B.; Nepomuceno, R.; Silva, A.; Munhoz, D.D.; Yamamoto, B.B.; Luz, D.; Abreu, P.A.; Horton, D.S.; et al. Single Chain Variable Fragments Produced in *Escherichia coli* against Heat-Labile and Heat-Stable Toxins from Enterotoxigenic, *E. coli*. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 1–14. [CrossRef]
41. Bueris, V.; Sircili, M.P.; Taddei, C.R.; Santos, M.F.; Franzolin, M.R.; Martinez, M.B.; Ferrer, S.R.; Barreto, M.L.; Trabulsi, L.R. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* from children with and without diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* **2007**, *102*, 839–844. [CrossRef] [PubMed]
42. Taddei, C.R.; Moreno, A.C.; Fernandes Filho, A.; Montemor, L.P.; Martinez, M.B. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. *FEMS Microbiol. Lett.* **2003**, *227*, 249–253. [CrossRef]
43. Perna, N.T.; Plunkett, G., 3rd; Burland, V.; Mau, B.; Glasner, J.D.; Rose, D.J.; Mayhew, G.F.; Evans, P.S.; Gregor, J.; Kirkpatrick, H.A.; et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **2001**, *409*, 529–533. [CrossRef] [PubMed]
44. Malhotra, R.K.; Indrayan, A. A simple nomogram for sample size for estimating sensitivity and specificity of medical tests. *Indian J. Ophthalmol.* **2010**, *58*, 519–522. [CrossRef]
45. Hajian-Tilaki, K. Sample size estimation in diagnostic test studies of biomedical informatics. *J. Biomed. Inform.* **2014**, *49*, 193–204. [CrossRef]
46. Lanata, C.F.; Fischer-Walker, C.L.; Olascoaga, A.C.; Torres, C.X.; Aryee, M.J.; Black, R.E.; Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: A systematic review. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e72788. [CrossRef]

47. Ori, E.L.; Takagi, E.H.; Andrade, T.S.; Miguel, B.T.; Cergole-Novella, M.C.; Guth, B.E.C.; Hernandes, R.T.; Dias, R.C.B.; Pinheiro, S.R.S.; Camargo, C.H.; et al. Diarrhoeagenic *Escherichia coli* and *Escherichia albertii* in Brazil: Pathotypes and serotypes over a 6-year period of surveillance. *Epidemiol. Infect.* **2018**, *19*, 1–9. [CrossRef]
48. Rocha, L.B.; Santos, A.R.; Munhoz, D.D.; Cardoso, L.T.; Luz, D.E.; Andrade, F.B.; Horton, D.S.; Elias, W.P.; Piazza, R.M. Development of a rapid agglutination latex test for diagnosis of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection in developing world: Defining the biomarker, antibody and method. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
49. Oliver, C. Immunocytochemical methods and protocols. In *Methods in Molecular Biology*, 3rd ed.; Walker, J.M., Ed.; Humana Press: New York, NY, USA, 2010; Volume 588, pp. 363–387.
50. Scheutz, F.; Teel, L.D.; Beutin, L.; Piérard, D.; Buvens, G.; Karch, H.; Mellmann, A.; Caprioli, A.; Tozzoli, R.; Morabito, S.; et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 2951–2963. [CrossRef] [PubMed]
51. Konowalchuk, J.; Speirs, J.I.; Stravic, S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **1977**, *18*, 775–779. [PubMed]
52. Cohen, J.A. Coefficient of agreement for nominal scales. *Ed. Psych. Meas* **1960**, *20*, 37–46. [CrossRef]
53. Piazza, R.M.F.; Abe, C.M.; Horton, D.S.P.Q.; Miliwebsky, E.; Chinen, I.; Vaz, T.M.I.; Irino, K. Detection and subtyping methods of diarrheogenic *Escherichia coli* strains. In *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*; Torres, A.G., Ed.; Bentham Books: Potomac, MD, USA, 2010; Volume 1, pp. 95–115.
54. Miliwebsky, E.; Schelotto, F.; Varela, G.; Luz, D.; Chinen, I.; Piazza, R.M.F. Human diarrheal infections: Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes diagnosis. In *Escherichia coli in the Americas*; Torres, A.G., Ed.; Springer Nature: Basel, Switzerland, 2016; Volume 1, pp. 343–369.
55. Gomes, T.A.; Elias, W.P.; Scaletsky, I.C.; Guth, B.E.; Rodrigues, J.F.; Piazza, R.M.; Ferreira, L.C.; Martinez, M.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Braz. J. Microbiol.* **2016**, *47*, 3–30.
56. De Mena, M.F.; Tous, M.; Miliwebsky, E.; Chillemi, G.; Rivas, M. Differential kinetic patterns for Shiga toxin production by *Escherichia coli*. *Rev. Argent. Microbiol.* **1997**, *29*, 167–175.
57. Kolling, G.L.; Matthews, K.R. Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 1843–1848.
58. Ching, K.H.; He, X.; Stanker, L.H.; Lin, A.V.; McGarvey, J.A.; Hnasko, R. Detection of Shiga Toxins by Lateral Flow Assay. *Toxins* **2015**, *7*, 1163–1173. [CrossRef] [PubMed]
59. Wang, J.; Katani, R.; Li, L.; Hegde, N.; Roberts, E.L.; Kapur, V.; DebRoy, C. Rapid Detection of *Escherichia coli* O157 and Shiga Toxins by Lateral Flow Immunoassays. *Toxins* **2016**, *8*, 92. [CrossRef]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).