

Detecção de *Vibrio cholerae* O1 em ostras utilizando anticorpo monoclonal em ensaio de aglutinação

Use of monoclonal antibody for detecting *Vibrio cholerae* O1 in oysters by means of agglutination test

RIALA6/1077

Christiane Asturiano RISTORI¹, Ruth Estela Gravato ROWLANDS¹, Miyoko JAKABI¹, Dilma Scala GELLI¹, Mônica CG SCOLA³, Elizabeth N de GASPARI^{2*}

* Endereço para correspondência : ²Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av Dr Arnaldo, 355, Cerqueira César, 01246-902, São Paulo, SP.

¹ Seção de Microbiologia Alimentar ³Seção de Coleção de Culturas, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Recebido: 28/11/2005 – Aceito para publicação: 30/08/2006

RESUMO

O *V. cholerae* sorogrupo O1 é o agente etiológico da cólera pandêmica, sendo considerado dentre os vibrios patogênicos ao homem, o mais importante. Os sintomas das infecções por esta bactéria variam de diarreia branda a doença grave podendo até levar a óbito. Dentre os alimentos marinhos, as ostras representam uma das principais vias na transmissão de cólera. Os métodos convencionais para detecção do *V. cholerae* O1 são laboriosos e demorados havendo, portando, a necessidade de implantar métodos rápidos, sensíveis, específicos, simples e de baixo custo. O objetivo deste estudo foi avaliar a técnica de aglutinação de partículas de látex sensibilizadas com anticorpo monoclonal (AcMo) na detecção de *V. cholerae* O1 em ostras, contaminadas laboratorialmente. A técnica de aglutinação com látex sensibilizado detectou $1,2 \times 10^2$ UFC da bactéria (diluição 1/32). As amostras de ostras utilizadas para contaminação originalmente não continham *V. cholerae*, mas outras bactérias foram detectadas, tais como: *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp. e outros vibrios. O presente estudo demonstrou que a detecção de *V. cholerae* em alimentos foi reduzida para 18 horas, considerando que pela metodologia convencional a análise é finalizada, em média, em 7 dias. O AcMo produzido apresentou uma sensibilidade e especificidade de 100% para *V. cholerae*.

Palavras-Chave. *V. cholerae*, anticorpo monoclonal, ostras, ensaio diagnóstico, reação de aglutinação

ABSTRACT

V. cholerae serovar O1 is the etiologic agent responsible for pandemic cholera, and it is considered the most important human pathogenic Vibrio. The symptoms presented by patients affected by this bacterium vary from mild diarrhea to severe disease, and may even lead to death. Among the diverse types of seafood, the oysters pose as an important means for cholera transmission. Traditional methods used to detect *V. cholerae* are laborious and time-consuming, and there is an urgent need to establish a rapid, sensitive, specific, simple, and low-cost testing. The objective of this trial was, therefore, to assess the performance of a slide agglutination test using latex particles sensitized with specific monoclonal antibodies (MAB) for detecting *V. cholerae* O1 in experimentally-contaminated oysters. The slide agglutination test based on sensitized latex detected 1.2×10^2 CFU of bacteria (dilution 1:32). Oyster samples used in the present study, for being experimentally contaminated, were originally free of *V. cholerae*, but other bacteria were found, such as: *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp, and other vibrios. The present study demonstrated that the period of time needed to verify the food contamination with *V. cholerae* is 18 hours, taking in consideration that traditional methods require an average of 7-day period for getting the final results. The produced MAB presented 100% of specificity to *V. cholerae* O1.

Key Words. *V. cholerae*, monoclonal antibodies, oysters.

INTRODUÇÃO

O *V. cholerae* sorogrupo O1 é o agente etiológico da cólera pandêmica, sendo considerado dentre os vibrios patogênicos ao homem, o mais importante e debilitante. Sete pandemias de cólera foram descritas desde 1817. A sétima pandemia iniciou em 1961 na Indonésia, disseminou-se pela Ásia e África atingindo a América Latina em 1991¹.

A classificação do *V. cholerae* é baseada nos anticorpos somáticos (antígenos O) e são conhecidos pelo menos 206 sorogrupos^{2,3}. O sorogrupo O1 é dividido em dois biótipos, o Clássico e o El Tor. Fatores antigênicos permitem a diferenciação desses dois biótipos em três sorotipos, Ogawa, Inaba e Hikojima, sendo este último raro. Em 1993, durante os surtos de cólera em Bangladesh, na Baía de Bengal e Índia detectou-se a presença de *V. cholerae* não O1⁴, mais tarde identificado como pertencente a um novo sorogrupo, o O139, chamado Bengal, como referência ao local da sua origem⁵.

Apesar do *V. cholerae* ser considerado parte da biota normal de áreas estuarinas e rios^{6,7}, a natureza da sobrevivência e persistência de *V. cholerae* O1 toxigênico e O139 em ecossistemas aquáticos e os fatores relacionados com sua patogenicidade nestes ambientes não estão claros¹. A sobrevivência pode ser decorrente da influência de fatores bióticos e abióticos, tais como: pH, temperatura, salinidade da água e associação específica da bactéria com plantas e animais aquáticos⁸.

A água constitui o principal veículo da cólera em áreas onde a doença é endêmica⁹, entretanto, os alimentos marinhos, principalmente as ostras, representam uma importante via de transmissão de *V. cholerae*^{10,11}. O primeiro relato na literatura de transmissão de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor por ingestão de ostras cruas foi descrito em 1986, na Flórida, EUA¹². Surtos de cólera têm sido descritos mundialmente, assim como seu reaparecimento em regiões que já estavam livres^{13,14,15}. No Brasil, de 1991 a 2001, foram descritos 168.598 casos e 2.036 óbitos. Em 2002 e 2003, não foram detectados casos confirmados de cólera. Entretanto, em Pernambuco foram confirmados 21 casos em 2004 e cinco em 2005¹⁶.

Os sintomas causados pela ingestão de *V. cholerae* O1 variam de diarreia branda a doença grave. A forma mais comum (*cholera gravis*) é causada pelas cepas do sorogrupo O1 produtoras de uma enterotoxina denominada toxina colérica (CT). Cepas não toxigênicas também podem causar a doença, porém de forma mais branda¹⁷.

A detecção de microrganismos patogênicos, em amostras de alimentos e água, é fundamental para minimizar e/ou evitar a ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Os métodos tradicionais de cultura normalmente são demorados havendo, portanto, a necessidade de implantar métodos rápidos, sensíveis, específicos, simples e de baixo custo. Métodos rápidos, como a aglutinação com partículas de látex sensibilizadas com anticorpos monoclonais (AcMo), podem ser úteis para os Laboratórios de Saúde Pública na investigação, diagnóstico e prevenção de surtos de DTAs.

A primeira técnica para obtenção de AcMo de especificidade definida foi descrita por Kohler & Milstein (1975)¹⁸. Esta técnica, amplamente utilizada, baseia-se no fato de que cada linfócito B produz anticorpo de especificidade única. Consiste na fusão de células secretoras de anticorpo, isoladas de um animal imune, com células de mieloma, um tipo de tumor de linfócito B, não secretor de anticorpo, no qual foram induzidas falhas na via de síntese de nucleotídeos, tornando-os deficientes nas enzimas hipoxantina guanina fosforibosil transferase ou timidina quinase, o que faz com que não sobrevivam em meio seletivo contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT). Desta forma, somente os híbridos ou hibridomas sobrevivem, pois os linfócitos B morrem após uma a duas semanas em cultura¹⁹. As imunoglobulinas oriundas de um único clone possuem especificidade única.

O objetivo deste estudo foi avaliar a técnica de aglutinação com partículas de látex sensibilizadas com AcMo na detecção de *V. cholerae* O1 em ostras, contaminadas laboratorialmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa

A cepa *V. cholerae* O1, não toxigênico, CETESB 16457, IAL 1965 foi obtida na Seção de Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz.

Animais

Camundongos da linhagem BALB/C foram imunizados pela via subplantar com 1×10^2 células inteiras de *V. cholerae*, inativadas com formalina 0,5% no volume de 10 μ L, previamente emulsificadas na mesma proporção em adjuvante completo de Freund (Sigma). Após 20 dias, os animais receberam uma dose reforço pela mesma via e a mesma quantidade de antígeno, embora a emulsão tenha sido feita em adjuvante incompleto de Freund (Sigma). Os camundongos foram sangrados pelo plexo oftálmico para análise, por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA), da quantidade dos anticorpos produzidos antes da fusão. Utilizamos o protocolo técnico baseado em estudos para obtenção de AcMo em nosso laboratório²⁰⁻²⁴, com algumas modificações²⁵. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de ética e pesquisa do Instituto Adolfo Lutz CTC/BM 44/99.

Obtenção de células de linfonodos poplíteos

Foi utilizado um camundongo para a fusão celular. Três dias antes da fusão celular, que corresponde dois dias após ter sido realizada a última coleta da amostra de sangue, foi dado reforço contendo 1×10^2 células íntegras de *V. cholerae* em solução salina. Os linfonodos poplíteos do camundongo imunizado foram retirados assepticamente e macerados com lâminas de microscopia com um dos lados do vidro esmerilhada em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco), suplementado com

L-glutamina (Gibco) a 1%, piruvato de sódio (Gibco) a 2%, meio não essencial MEM a 1%, gentamicina (Gibco) a 0,1% e HEPES (Gibco) a 1,5%. As células assim obtidas foram reservadas para a técnica de fusão celular.

O cultivo das células de mieloma P3X63-Ag8.653 foi realizado até atingirem a fase logarítmica de crescimento um dia antes da fusão (acertando a concentração para 5×10^4 células/mL). Um dia antes da fusão foi obtido o *feeder layer* de macrófagos, injetando 5 mL de RPMI com SFB (soro fetal bovino) no peritônio de um camundongo. O lavado peritoneal foi diluído em 45 mL de meio e distribuído em placa de cultura de 96 orifícios. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%.

Obtenção dos hibridomas (Fusão celular)

Os linfócitos e as células mielomatosas foram lavados separadamente utilizando o meio RPMI e centrifugados durante 5 minutos a 800xg. Os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 10 mL do meio, tanto no *pellet* de linfócitos como naquele das células de mieloma. Foi realizada contagem das células diluídas a 1:2 em *tryplan blue* (Gibco) a 0,1%. As células foram misturadas na proporção 1:1 (células de linfonodo/mieloma) e após centrifugação, foi realizada a fusão celular com o sedimento utilizando uma solução, previamente autoclavada, de 0,5 g de polietilenglicol 3500 (MERCK) diluída em 0,7 mL de PBS (pH 7,4), contendo 50 µL de dimetilsulfóxido (Sigma), gota a gota, por 1 min. a 37°C. Na seqüência, as células foram mantidas em repouso por 1,5 min a 37°C, foi adicionado 1 mL de RPMI com SFB, gota a gota por 1 min. a 37°C, e mais 20 mL de RPMI, gota a gota por 4 min. a 37°C. As células foram mantidas em repouso por 4 min. a 37°C. Em seguida foram centrifugadas em meio RPMI com SFB, contendo HAT a 3% (Gibco) na proporção de 1×10^6 células por mL de meio. Após duas horas de incubação a 37°C, as células foram distribuídas em volume de 100 µL por orifício em placas contendo *feeder layers* de macrófagos e mantidas a 37°C com 5% de CO₂.

A primeira troca de meio foi realizada após 3 dias, as subseqüentes a cada 2 dias, e após uma semana o HAT foi substituído por hipoxantina e timidina (HT) (Gibco) a 2% e mantido por mais duas semanas, quando se passou a utilizar RPMI-SFB. A seleção dos clones por ELISA foi iniciada 10 dias após a fusão celular, quando os hibridomas já se apresentavam com bom crescimento (ocupando 1/3 do poço). O ELISA para a seleção dos clones foi feito com células íntegras de *V. cholerae*. Para a seleção foi utilizado conjugado anti-IgG de camundongo pelo interesse em obter AcMo do isótipo IgG. Os clones que apresentaram maior reatividade por ELISA foram submetidos à diluição limitante. As células selecionadas na reclonagem (2x) foram isotipadas e expandidas *in vitro* e *in vivo*. Os isótipos dos AcMo foram determinados por meio de ELISA. As placas foram sensibilizadas com 100 µL de Acs anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 de camundongos diluídos a 1:1000 em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6 e incubados durante 16 h a 4°C. Na seqüência, as placas foram lavadas

com solução PBS-Tween 0,05% e bloqueadas por 1h com 200 µL de leite 5%. Repetidas as lavagens, foram incubadas com 100 µL de sobrenadante de cultura de células. Após 1h a 37°C foram feitas novas lavagens e adicionados 100 µL do conjugado de anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase na diluição 1:2000 em leite desnatado (Gloria-Brasil) 1%. Após a incubação de mais uma hora a 37°C, novas lavagens foram feitas, e a reação foi revelada com o substrato preparado com 10 µL de água oxigenada e 9 mL de uma solução de tampão (citrato-fosfato) contendo cromógeno 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB). A leitura foi feita após 15 minutos a 450 nm.

Determinação do índice de avidéz dos anticorpos anti-bactérias íntegras de *V. cholerae*

O índice de avidéz (IA) do anticorpo 1E21B3 [IgG2a] para células íntegras de *V. cholerae* foi realizado basicamente com o mesmo procedimento utilizado para técnica de ELISA, sendo que os monoclonais foram incubados na ausência e na presença de tiocianato de potássio (KSCN) 1.5M em PBS (Sigma). O índice de avidéz foi expresso como a razão entre as médias das absorbâncias na presença de KSCN e na ausência de KSCN (com PBS)²⁶.

Especificidade do AcMo anti - *V. cholerae*

A especificidade dos AcMo anti - *V. cholerae* foi avaliada por *immunoblot*²⁷. As preparações antigênicas, de células *V. cholerae* íntegras, em uma concentração de 1×10^8 foram submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE²⁸, com uma concentração de acrilamida de 13%, corado pelo método da prata, Comassie blue (Pharmacia). Para a análise por *immunoblot* os antígenos foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose (BioRad). O anticorpo monoclonal selecionado foi diluído à 1:1000 e o conjugado anti-IgG (Sigma) diluído a 1:5000. Foi utilizado 3-Amino-9-ethyl carbazole (AEC) 0,4% PIERCE como substrato.

Protocolo utilizado para a sensibilização de partículas de Látex com AcMo1E21B3

Uma alíquota de 0,75 mL de uma suspensão à 2,5% de partículas de látex (1µm de diâmetro) diluídas em PBS estéril foi centrifugada durante 6 min. a 7200xg em uma microcentrífuga. O sobrenadante foi removido e descartado. Em seguida foi acrescentado 0,75 mL de PBS e agitado (vortex) até o *pellet* se desprender completamente, sendo acrescentado mais 0,75 mL de PBS estéril. A solução foi centrifugada por mais 6 min. na mesma velocidade e o sobrenadante descartado. A seguir o *pellet* foi ressuspenso em uma solução de glutaraldeído 8% diluída em PBS. A suspensão foi agitada por 4h. Depois deste período foi acrescentado 0,75 mL de PBS, seguido de centrifugação a 7200xg/10min e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de PBS e adicionado 0,2 mL de anticorpo monoclonal, na concentração de 1mg/mL,

purificado em coluna de Sepharose 4B-proteína A. A mistura foi agitada *overnight*, lentamente, a temperatura ambiente. O tubo foi completado com 0,5 mL de PBS, centrifugado 7200xg/10min e o sobrenadante descartado. Após este procedimento o sedimento foi ressuspensionado em 1,5 mL de uma solução a 0.2M de etanolamina, seguido de agitação a temperatura ambiente por 30 min. Essa fase é importante para bloquear os sítios das micropartículas de látex que não se ligaram o AcMo. A mistura foi centrifugada por 6 min. na mesma velocidade e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensionado em 1,5 mL de albumina de soro bovino (BSA) e agitado 30 minutos a temperatura ambiente, para o bloqueio de sítios ativos remanescentes na partícula. A mistura foi submetida à nova centrifugação por 6 min. a 7.200xg e o sobrenadante descartado. No final do procedimento a amostra foi completada para 2,5 mL de tampão de estocagem. Os procedimentos utilizados estão de acordo com as instruções do fabricante (Polyscience - USA).

Amostras analisadas

As amostras de ostras foram provenientes do litoral norte do Estado de São Paulo (São Sebastião). Antes da realização dos testes, foi realizada a pesquisa de *V. cholerae* O1 nas ostras por metodologia convencional, segundo FDA²⁹.

Contaminação das ostras

As ostras foram abertas assepticamente com auxílio de abridor de ostras em aço inox, previamente desinfetado. A parte comestível (tecido mole e intervalvar) foi retirada da concha e homogeneizada. Deste homogeneizado, foram pesados 25g e adicionado 225 mL de água peptonada alcalina (APA); esta alíquota foi dividida em dois frascos. Em um dos frascos foi adicionado 50 µL da cultura de *V. cholerae* (controle positivo) e o outro, sem a adição da bactéria, foi utilizado como controle negativo; ambos foram incubados a 35°C/18h.

Teste de aglutinação em látex sensibilizado com AcMo

A partir dos frascos (controle positivo e negativo) foram realizadas as seguintes diluições: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32. O teste de aglutinação foi realizado em uma placa por meio da adição de 20 µL de cada diluição e 20 µL de partículas de látex sensibilizadas. Após agitação (movimentos circulares), verificava-se a presença de aglutinação.

A quantificação de *V. cholerae* em cada diluição utilizada no ensaio foi realizada por semeadura em superfície no ágar tiosulfato-citrato-sais-biliares-sacarose (TCBS).

RESULTADOS

O clone 1E21B3

O clone 1E21B3 foi selecionado e o sobrenadante de cultura de células foi precipitado com sulfato de amônio a

50%. O AcMo obtido após precipitação com sulfato de amônio foi purificado em coluna de Sepharose-4B-Proteína A²².

Análise de diferentes lotes do AcMo 1E21B3

Por meio de ELISA podemos observar boa reprodutibilidade da quantidade de anticorpos IgG2a produzidos para o clone 1E21B3 selecionado, produtor de AcMo para células íntegras de *V. cholerae* obtidas de diferentes partidas. Ascite foi produzida em camundongos²², a análise por meio de ELISA (Figura 1) mostra a reprodutibilidade dos lotes obtidos.

Especificidade e caracterização imunológica por SDS-PAGE e Immunoblot do AcMo produzido

O perfil eletroforético de peptídeos de *V. cholerae* foi demonstrado utilizando o método de coloração por prata (Figura 2. 1.A). O AcMo 1E21B3 utilizado em nosso estudo reconheceu o antígeno de massa molecular de 4 kDa aproximadamente (Figura 2. 1.B). Na Figura 2. 2. podemos observar o perfil de antígenos de células íntegras de *V. cholerae* após separação eletroforética e coradas por *Commasie blue* R (Pharmacie). Antígenos na faixa de 2 a 180 kDa foram analisados.

Índice de avides

O clone selecionado do isótipo IgG2a, apresentou um índice de avides de 96%.

Análise do teste de aglutinação em látex sensibilizado com AcMo

A contagem de cada diluição de *V. cholerae* O1 foi de: 2,0x10³ UFC, 1,0x10³ UFC, 5,0x10² UFC, 2,5x10² UFC, 1,2x10² UFC para as diluições 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 e 1/32 respectivamente. O resultado foi positivo até a diluição de 1/32 (Figura 3. A). Importante salientar que na amostra

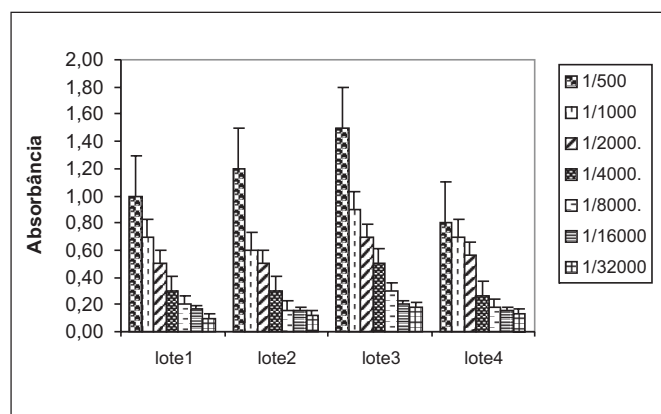


Figura 1. Análise de sobrenadante de cultura de células dos lotes (1 a 4) do AcMo 1E21B3 do isótipo IgG selecionado por meio de ELISA utilizando células íntegras de *V. cholerae*. Os resultados mostram a média de três ensaios independentes.

utilizada antes da contaminação não havia *V. cholerae*, mas foi detectada a presença de outras bactérias, tais como: *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas* spp e outros vibrios. A especificidade da reação de aglutinação foi de 100%.

DISCUSSÃO

No amplo quadro da investigação científica na área da saúde observam-se inúmeras aplicações para os AcMo, pois estes anticorpos possuem especificidade única¹⁸, como também observado em estudos realizados em nosso laboratório^{30,31,32,33}. Dentre estas destacam-se a identificação de tumores, de estruturas protéicas, em testes de identificação de antígenos de histocompatibilidade, técnicas de purificação de moléculas por cromatografia de afinidade, de marcadores fenotípicos únicos

para determinados tipos celulares e para análise funcional de moléculas secretadas ou de superfície celular³⁴.

O local de administração de um antígeno determinará o local em que células são ativadas. A vantagem do método para a produção de anticorpo monoclonal utilizando linfonodos poplíteos permitiu a produção de um anticorpo monoclonal estável em um curto período de tempo para *V. cholerae*.

O emprego de AcMo se justifica por se tratar de imunoglobulina com especificidade única e como tal representa um excelente instrumento na identificação de estruturas. A utilização de misturas de anticorpos diferentes, muitas vezes limita sua aplicação, devido à múltipla especificidade para diferentes epítomos antigênicos e heterogeneidade da resposta imune humoral³⁵.

O isolamento e a identificação de microrganismos patogênicos ao homem visam, principalmente, o monitoramento das espécies circulantes no meio ambiente e em alimentos, bem como o controle e prevenção destes microrganismos, para a caracterização dos perigos bacteriológicos nos alimentos, bem como seu controle³⁶. No caso específico da cólera, dados internacionais têm demonstrado que sua introdução em um país dificilmente pode ser evitada. Entretanto, a disseminação pode ser controlada, quando a infraestrutura de saneamento básico é adequada e existe um sistema de vigilância epidemiológica das diarreias e monitoramento ambiental que permitam sua detecção precoce.

As reações de aglutinação utilizam partículas de látex que são sensibilizadas com antígenos ou anticorpos. Como toda prova de aglutinação, baseia-se no princípio de que as partículas sensibilizadas se aglutinam na presença de antígenos ou anticorpos. Pode ser utilizada como método de triagem, principalmente em estudos epidemiológicos, valendo salientar a especificidade do método.

O látex reativo utilizado é uma suspensão de partículas de tamanho uniforme sensibilizadas com AcMo específico para *V. cholerae*. As partículas de látex reagem prontamente formando a reação antígeno – anticorpo, perdendo o aspecto uniforme, iniciando a formação de uma malha.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que foi possível detectar números de células de *V. cholerae* abaixo da dose infectante, que em indivíduos sadios é relativamente alta, em média, 10^8 UFC/g do alimento. Além disso, a detecção deste patógeno foi realizada em 18 horas.

Na metodologia convencional a detecção de *V. cholerae* em alimentos, leva em média de 7 a 10 dias. Portanto, a liberação do resultado demanda tempo. A Seção de Microbiologia Alimentar, do Instituto Adolfo Lutz Central, realiza monitoramento de *V. cholerae* O1 em amostras do litoral de São Paulo, desta forma a introdução de novas técnicas, como a de látex, irá diminuir o tempo e facilitar o trabalho.

A redução no tempo de diagnóstico deste patógeno permitirá que medidas de controle possam ser tomadas de forma rápida pelos órgãos competentes, prevenindo a disseminação da doença e surgimento de novos casos.

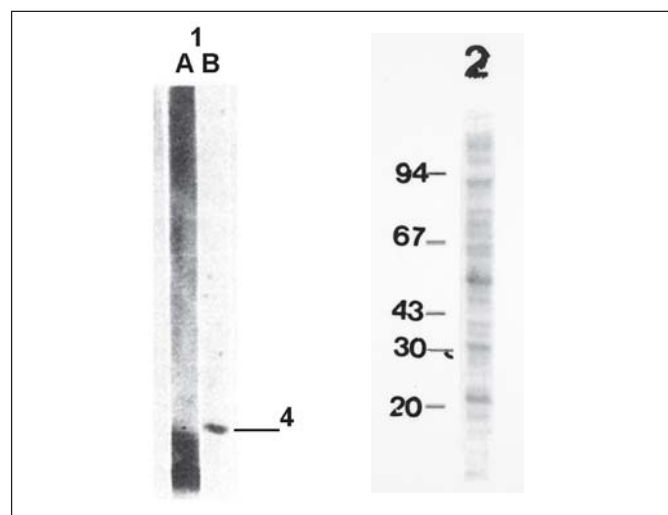


Figura 2. 1.a) SDS-PAGE de células íntegras de *V. cholerae* após coloração por meio da prata. 1.b) Immunoblot- Reatividade do AcMo 1E21B3. 2. SDS-PAGE de células íntegras de *V. cholerae* após coloração por Coomassie .

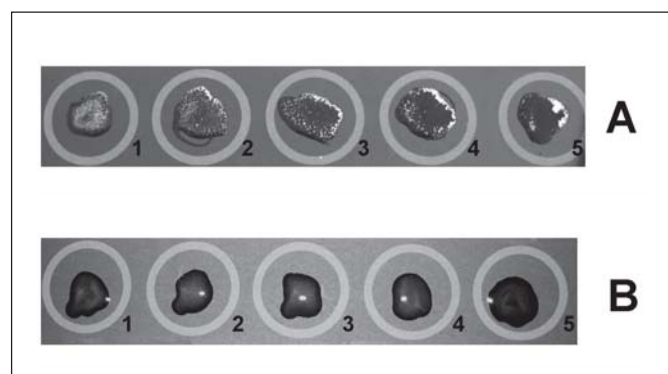


Figure 3. A) Reação de látex para *V. cholerae* : 20 μ L da amostra (positiva) diluída (1) 1/2, (2) 1/4, (3) 1/8, (4) 1/16 e (5) 1/32. B) amostra (negativa) diluída (1) 1/2, (2) 1/4, (3) 1/16 e (5) 1/32, adicionadas de 20 μ L de partículas de látex - AcMo para *V. cholerae*

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP, Projeto Temático 00/05834-7 e o Instituto Adolfo Lutz pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Faruque SM, Albert MJ, Mekalanos JJ. Epidemiology, Genetics and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62 (4): 1301-14.
2. Shimada T et al. Two strains of *Vibrio cholerae* non-O1 possessing somatic (O) antigen factors in common with *Vibrio cholerae* serogroup O139 synonym "Bengal". *Curr Microbiol* 1994; 29: 331-3.
3. Yamai S, Okitsu T, Shimada T, Katsube Y. Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin and addition of novel serogroups. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 1997; 71: 1037-45.
4. Albert MJ et al. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet* 1993; 342: 387-90.
5. Shimada T et al. Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in Índia and Bangladesh. *Lancet* 1993; 341:1347.
6. Carvajal GH, Sanchez J, Ayala ME, Hase A. Differences among marine and hospital strains of *Vibrio cholerae* during Peruvian epidemic. *J Gen Appl Microbiol* 1998; 44(1):27-33.
7. Eyles MJ, Davey GR. *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of two urban estuaries in Australia. *Int J Food Microbiol* 1998; 6: 207-18.
8. Borroto RJ. La ecología de *Vibrio cholerae* serogrupo O1 en ambientes acuáticos. *Rev Panam Salud Publica* 1997; 1(1):3-8.
9. Varnam AH, Evans MG. *Foodborne pathogens*. London: Wolfe Publishing; 1991.
10. Tauxe RV, Mintz ED, Quick RE. Epidemiologic Cholera in the New World: Translating Field Epidemiology into New Prevention Strategies. *Emerg Infect Dis* 1995; 1(4):141-6.
11. Lipp EK, Rose JB. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. *Rev Sci Tech Off Int Epiz Paris* 1997; 16(2):620-40.
12. Klontz KC, Tauxe RV, Cook WL, Riley WH, Wachsmuth K. Cholera after the consumption of raw oysters. *Ann Inter Med* 1991; 107(6): 846-8.
13. D'oro LC, Merlo E, Ariano E, Silvestri MG, Ceraminiello A, Negri E, La Vecchia C. La *Vibrio cholerae* Outbreak in Italy. *Emerg Infect Dis* 1999; 5(2):300-1.
14. Germani Y, Quilici ML, Glaziou P, Mattered D, Morvan J, Fournier JM. Emergence of Cholera in the Central African Republic. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 888-90.
15. Tauxe RV. Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge. *Emerg Infect Dis* 1997; 3(4): 425-34.
16. Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Cólera: a situação da doença no Brasil. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=21688. Acesso em: 28 de ago. 2006.
17. ICMSF. *Microorganisms in foods 5 - Microbiological Specifications of Food Pathogens*. London: Blackie Academic, 1996. 513p.
18. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-7.
19. Peterson NC. Advances in monoclonal antibody technology: genetic engineering of mice, cells, and immunoglobulins. *ILAR J* 2005; 46(3):314-9.
20. Belo EF, Coutinho LM, Ferraz AS, De Gaspari EN. Production of monoclonal antibody to subtype 9 of *Neisseria meningitidis* and the distribution of this subtype in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2004; 8(6): 407-18.
21. De Gaspari EN, Zollinger W. Expression of class 5 antigens by meningococcal strains obtained from patients in Brazil and evaluation of two new monoclonal antibodies. *Braz J Infect Dis* 2001; 5(3):143-53.
22. De Gaspari EN. Production and characterization of a new monoclonal antibody against *Neisseria meningitidis*: study of the cross-reactivity with different bacterial genera. *Hybridoma* 2000; 19(6): 445-53.
23. Espindola NM, De Gaspari EN, Nakamura PM, VAZ, AJ. Production of monoclonal antibodies anti-*Taenia crassiceps* cysticerci with cross-reactivity with *Taenia solium* antigens. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2000; 42(3): 175-7.
24. De-Gaspari EN, Ribeiro-Filho AA, Zollinger WD. The use of filter paper monoclonal antibodies in a Dot-blot test for typing *Neisseria meningitidis* B. *Braz J Med Biol Res* 1994; 27(12):2889-93.
25. Holmdah IR, Moran T, Andersson M. A rapid and efficient immunization protocol for production of monoclonal antibodies reactive with autoantigens. *J Immunol Methods* 1985; 83:379-84.
26. Chackerian B, Lowy DR, Schiller JT. Conjugation of a self-antigen to papillomavirus-like particles allows for efficient induction of protective autoantibodies. *J Clin Invest* 2001; 108:415-23.
27. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology*. 1992; 24:145-9.
28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
29. DePaola AJr, Kaysner CA. "Vibrio". In: FDA - Bacteriological Analytical Manual online. New York: AOAC International, 2001. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>. Acesso em: 10 de abr. 2005.
30. Carmo MAS. Estudo da imunogenicidade da proteína de classe 5C de *Neisseria meningitidis* B em camundongos imunizados pela via nasal. (Dissertação de Mestrado). São Paulo (SP): Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2005.
31. Coutinho, LMCC. Uso de anticorpos monoclonais na seleção de antígenos lipopolissacaríde da cepa epidêmica de B:4:P1.15 de *Neisseria meningitidis*: imunização intranasal. (Dissertação de Mestrado). São Paulo (SP): Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2002.
32. Seneme Ferraz A. Avaliação da resposta imune em coelhos pela via de imunização nasal com antígenos de *Neisseria meningitidis* B selecionados para os imunotipos L379[†] e L8[†] por meio de anticorpos monoclonais. (Dissertação de Mestrado). São Paulo (SP): Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2005.
33. Belo EFT. Expressão antigênica de LPS de cepas meningocócicas prevalentes no Brasil e produção de anticorpos monoclonais como subsídios para estudos epidemiológicos. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2002.
34. Ansell PR. Hybridoma technology: a view from the patent arena. *Immunol Today* 2000; 21(8): 357-8.
35. Bach JF, Fracchia GN, Chatenoud L. Safety and efficacy of therapeutic monoclonal antibodies in clinical therapy. *Immunol Today* 1993; 14:421-5.
36. Ristori CA. Bactérias patogênicas em ostras (*Crassostrea brasiliensis*) e água da região estuarina de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo. (Dissertação de Mestrado). São Paulo (SP): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2000.