

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Especialização em Biotecnologia para saúde: Vacinas e Biofármacos

Renata Hiromi Nakagima Goncalves

**Potencial do polissacarídeo O26 para ser utilizado como antígeno em
formulações vacinais contra a-EPEC e STEC**

São Paulo
2023

Renata Hiromi Nakagima Goncalves

**Potencial do polissacarídeo O26 para ser utilizado como antígeno em
formulações vacinais contra a-EPEC e STEC**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para saúde: vacinas e biofármacos do Programa de Pós-graduação *Lato Sensu* da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia.

Orientador (a): Marta de Oliveira Domingos

São Paulo

2023

**Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)**

Gonçalves, Renata Hiromi Nakagima

Potencial do polissacarídeo O26 para ser utilizado como antígeno em formulações vacinais contra a-EPEC e STEC / Renata Hiromi Nakagima Gonçalves ; orientador(a) Marta de Oliveira Domingos - São Paulo, 2023.

37 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Polissacarídeo O26 2. Diarreia infantil. 3. Antígenos bacterianos. 4. Vacinas contra Escherichia coli I. Domingos, Marta de Oliveira. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Renata Flávia Nobrega Gonçalves, aluno(a) do Curso de Especialização em Biotecnologia para saúde: vacinas e biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 18 de janeiro de 2023

Renata Flávia Nobrega Gonçalves
.....
aluno(a)

De acordo: Marta de O. Semingol
Orientador(a):

Aos meus familiares e amigos pelo carinho e apoio fundamentais para a minha formação.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Marta Domingos pelas experiências e aprendizados

Às minhas amigas pela parceria indispensáveis durante essa jornada

À Dra. Maria Graça Salomão por todo o apoio e o bom trato aos alunos

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Bacteriologia pelos ensinamentos

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Agradeço também o Instituto Butantan, a Fundação Butantan e a Secretaria da Saúde pelo acolhimento e apoio financeiro.

RESUMO

GONÇALVES, Renata Hiromi Nakagima. **Potencial do polissacarídeo O26 para ser utilizado como antígeno em formulações vacinais contra a-EPEC e STEC.** 2023. 37 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as doenças diarreicas são a segunda maior causa de mortalidade no mundo em crianças menores de 5 anos, sendo *Escherichia coli* diarreiogênicas, o principal agente etiológico de origem bacteriana. Esse grupo de *E. coli* também é responsável por surtos de diarreia com sangue e síndrome hemolítica urêmica (SHU) em países desenvolvidos. Dentre os principais grupos de *E. coli* diarreiogênicas encontram-se as linhagens pertencentes ao sorogrupo O26 que podem ser categorizadas como EPEC (*E. coli* enteropatogênica) e STEC (*E. coli* produtoras de toxina shiga). Atualmente, a melhor maneira de se combater esses patógenos é o desenvolvimento de uma vacina que seja eficaz contra as duas categorias pertencentes ao sorogrupo O26. Diante dessa problemática, esse estudo visou determinar o potencial do polissacarídeo O26, presente nas cepas de EPEC e STEC de ser utilizado como antígeno alvo em formulações vacinais contra esses patógenos. Para isso utilizamos duas linhagens diferentes do sorotipo O26:H11, sendo uma da categoria EPEC e outra da categoria STEC. Sendo as EPEC bactérias capsuladas, determinamos a capacidade de anticorpos anti-O26 de reconhecer bactérias capsuladas e não capsuladas. Verificamos também, a capacidade desses anticorpos de reconhecer bactérias na presença de biofilme. Finalmente, determinamos a capacidade dos anticorpos anti-O26 de aumentar a fagocitose de EPEC por macrófagos e inibir a adesão desses patógenos a células epiteliais. Os resultados obtidos pela técnica de ELISA mostraram que o nível de reconhecimento de EPEC formadora de biofilme pelos anticorpos anti-O26 foi equivalente ao reconhecimento de STEC não produtoras de biofilme. Os resultados também mostraram que os anticorpos auxiliaram macrófagos (J774A.1) na fagocitose de EPEC e também foram capazes de inibir a adesão dessas bactérias a células epiteliais. Em resumo, os resultados indicam que o polissacarídeo O26 é um bom candidato a antígeno para ser utilizado em formulações vacinais contra todas as

linhagens de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O26 independentemente do mecanismo de virulência das mesmas.

Palavras-chave: Polissacarídeo O26. EPEC. STEC. Diarreia infantil. Antígenos bacterianos. Vacinas contra *Escherichia coli*.

ABSTRACT

GONÇALVES, Renata Hiromi Nakagima. **Potential of the O26 polysaccharide as an antigen in vaccine formulations against a-EPEC and STEC**. 2023. 37 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for health – Vaccines and Biopharmacy) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

According to the World Health Organization, diarrheal diseases are the second leading cause of mortality in the world in children under 5 years of age, with diarrheagenic *Escherichia coli* being the main etiological agent of bacterial origin. This group of *E. coli* is also responsible for outbreaks of bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome (HUS) in developed countries. Among the main groups of diarrheagenic *E. coli* are the strains belonging to serogroup O26 that can be categorized as EPEC (enteropathogenic *E. coli*) and STEC (shiga toxin producing *E. coli*). Currently, the best way to combat these pathogens is to develop a vaccine that is effective against both categories belonging to serogroup O26. Faced with this problem, this study aimed to determine the potential of the O26 polysaccharide, present in EPEC and STEC strains, to be used as a target antigen in vaccine formulations against these pathogens. For this, we used two different strains of serotype O26:H11, one from the EPEC category and the other from the STEC category. Being EPEC, capsulated bacteria, we determined the ability of anti-O26 antibodies to recognize capsulated and non-encapsulated bacteria. We also verified the ability of these antibodies to recognize bacteria in the presence of biofilm. Finally, we determined the ability of anti-O26 antibodies to increase EPEC phagocytosis by macrophages and inhibit the adhesion of these pathogens to epithelial cells. The results obtained by the ELISA technique showed that the level of recognition of biofilm-forming EPEC by anti-O26 antibodies was equivalent to the recognition of non-biofilm-producing STEC. The results also showed that the antibodies helped macrophages (J774A.1) in the phagocytosis of EPEC and were able to inhibit the adhesion of these bacteria to epithelial cells. In summary, the results indicate that the O26 polysaccharide is a good antigen candidate to be used in vaccine formulations against all *E. coli* strains belonging to the O26 serogroup, regardless of their virulence mechanism.

Keywords: Polysaccharide O26. EPEC. STEC. Infantile diarrhea. Bacterial antigens.
Escherichia coli vaccines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Lesão A/E por EPEC numa cultura celular de fibroblastos	16
Figura 2 - Determinação da capacidade de EPEC e STEC pertencentes ao sorogrupo O26 de formar biofilme em superfície abiótica.	27
Figura 3 - Reconhecimento de EPEC e STEC pelos anticorpos anti-O26	27
Figura 4 - Influência da cápsula no reconhecimento de a-EPEC por anticorpos anti-O26	28
Figura 5 - Influência dos anticorpos anti-O26 na fagocitose de EPEC por macrófagos	29
Figura 6 - Influência dos anticorpos anti-O26 na adesão de a-EPEC à HEp-2	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a-EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica atípica

DAEC - *Escherichia coli* difusamente aderente

DEC - *Escherichia coli* diarreogênicas

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos

EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa

E. coli - *Escherichia coli*

EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica

EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica

MNEC - *Escherichia coli* associada à meningite

nm - nanômetro

PBS - Tampão fosfato-salino

rpm - rotações por minuto

SEPEC - *Escherichia coli* associada à sepse

TSB - Caldo Triptona Soja

UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica

µL - Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	<i>Escherichia coli</i>	15
1.1.1	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	16
1.1.2	<i>Escherichia coli</i> produtora da toxina Shiga (STEC)	16
1.1.3	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	17
1.1.4	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	17
1.1.5	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	18
1.1.6	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente (DAEC)	18
1.2	Principais grupos de <i>E. coli</i> responsáveis por surtos de diarreia com sangue e SHU	19
1.2.1	Sorogrupo O26	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Geral	21
2.2	Específicos	21
3	METODOLOGIA	22
3.1	Cepas Bacterianas	22
3.2	Linhagens Celulares	22
3.3	Anticorpos	22
3.4	Determinação da capacidade de anticorpos anti-O26 de reconhecerem EPEC e STEC pertencentes ao sorogrupo O26 formadoras e não formadoras de biofilme	22
3.4.1	Teste de identificação de bactérias formadoras de biofilme	23
3.4.2	Teste de Elisa para análise da influência do biofilme no reconhecimento de EPEC e STEC	23
3.5	Determinação da capacidade dos anticorpos anti-O26 de reconhecerem EPEC O26 capsuladas e não capsuladas	24
3.5.1	Remoção da cápsula	24
3.5.2	Formalinização das amostras bacterianas	24
3.5.3	Teste de ELISA para análise da influência da cápsula no reconhecimento dos anticorpos anti-O26	24
3.6	Fagocitose	25
3.7	Teste de inibição de adesão bacteriana a células epiteliais	26

3.8 Estatística	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Formação de Biofilme	27
4.2 Determinar a capacidade dos anticorpos anti-O26 de reconhecerem EPEC e STEC.....	27
4.3 Influência da cápsula no reconhecimento de EPEC pelos anticorpos anti- O26.....	28
4.4 Avaliação da influência dos anticorpos anti-O26 na fagocitose de EPEC ...	29
4.5 Avaliação da influência dos anticorpos anti-O26 na adesão de EPEC em células epiteliais	30
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Doenças diarreicas são a segunda principal causa de mortalidade infantil em países em desenvolvimento, perdendo apenas para pneumonia (UNICEF; WHO, 2009; ANDRADE; FAGUNDES-NETO, 2011). A diarreia mata mais crianças do que a malária e a tuberculose, seis vezes mais que conflitos armados e cinco vezes mais que a AIDS, resultando em 1,7-2 milhões de óbitos por ano (UNICEF; WHO, 2009; UNICEF, 2021).

Entre os principais patógenos responsáveis por diarreia, *E. coli* é o principal agente etiológico de origem bacteriana, sendo responsável por episódios de diarreia aguda em crianças menores de cinco anos em países em desenvolvimento e surtos de diarreia com sangue e síndrome hemolítica urêmica (SHU) em países desenvolvidos (SILVA *et al.*, 2022).

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli são bacilos Gram negativos anaeróbios facultativos, pertencentes ao grupo das *Enterobacteriaceae*. Podem ser encontrados no meio ambiente e na microbiota de humanos e outros animais, onde convivem de maneira comensal. No entanto, devido a transmissão horizontal de genes de fatores de virulência, algumas linhagens de *E. coli* comensais adquiriram caráter patogênico, e conseqüentemente se tornaram capazes de causar infecção em organismos saudáveis (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004)

As *E. coli* patogênicas são classificadas como *E. coli* responsáveis por infecções extra-intestinais (ExPEC) e *E. coli* associadas a infecções intestinais responsáveis por diarreia denominadas de DEC (Diarrheagenic *E. coli*)

As ExPEC podem ser subdivididas da seguinte maneira: *E. coli* responsáveis por infecção urinária, denominadas de UPEC (*E. coli* uropatogênica), as que causam meningite, denominadas de MNEC (*E. coli* associada à meningite) e as causadoras de sepse, denominadas de SEPEC (*E. coli* associada à sepse) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As *E. coli* diarreiogênicas são classificadas em seis categorias distintas, de acordo com os seguintes fatores: tipo de mecanismo de virulência, síndromes clínicas que

causam, aspectos epidemiológicos e/ou padrão de adesão a células HEp-2. Essas categorias foram denominadas da seguinte maneira: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), e *E. coli* que apresentam padrão de adesão difuso em células epiteliais (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998).

1.1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

As EPEC são responsáveis por diarreia aquosa em crianças. Elas apresentam um mecanismo de patogenicidade denominado sistema de secreção do tipo III, responsável pela indução de uma lesão conhecida como A/E (attaching and effacing), que resulta na aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal promovendo assim a destruição das microvilosidades do epitélio e o rearranjo das proteínas do citoesqueleto levando a formação de um pedestal no local da lesão (Figura 1) (MOON *et al.*, 1983; KNUTTON; LLOYD; MCNEISH, 1987; LEE; KIM; YOON, 2022).

Figura 1 - Lesão A/E por EPEC numa cultura celular de fibroblastos



Fonte: Rohde, 2008.

As EPEC podem ser classificadas como EPEC típicas (tEPEC) e EPEC atípicas (aEPEC). A diferença entre essas duas categorias se baseia na presença do plasmídeo EAF que codifica a fímbria bfp (*bundle forming pilus*) presente em tEPEC e ausente em aEPEC (TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; CLEMENTS *et al.*, 2012).

1.1.2 *Escherichia coli* produtora da toxina Shiga (STEC)

Naturalmente encontrada em gado, a categoria STEC, é uma doença zoonótica transmitida através de água e alimentos derivados desses animais. Caracterizada, também, pela transmissão oro-fecal, facilitada devido à baixa dose bacteriana para infecção do organismo humano (FERENS; HOVDE, 2011).

A categoria é muito conhecida pela produção de toxinas shiga (stx1 e stx2), e é a principal responsável por surtos e casos de diarreia com sangue, colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (HUS). Sendo a HUS, a maior causadora de insuficiência renal aguda em crianças (CHAN; NG, 2016).

Dentre seus principais subgrupos, destaca-se a *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), que utiliza o sistema de secreção do tipo III, de maneira similar a EPEC, para a lesão por *attaching and effacing* (A/E) de enterócitos localizados nas Placas de Peyer e no intestino grosso (GAYTÁN *et al.*, 2016).

1.1.3 *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)

A ETEC causa uma diarreia semelhante à cólera, afetando, principalmente crianças que residem em países em desenvolvimento, como também turistas que visitam esses países, sendo conhecida como “Diarreia dos Viajantes” (SACK, 2011; LEUNG *et al.*, 2019).

As amostras de ETEC produzem dois tipos de toxinas: a LT (termo-lábil) e a ST (termo-estável), podendo sintetizar somente uma dessas toxinas ou ambas.

A ETEC coloniza o intestino delgado, principalmente o íleo através de fímbrias de colonização (CFA), que podem ser subdivididas baseadas em suas características morfológicas. (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004)

Uma das principais vias de contaminação é a ingestão de água ou alimentos contaminados, necessitando de uma dose relativamente alta para que ocorra a infecção. Em países onde a ETEC é endêmica, o número de casos aumenta nos meses de altas temperaturas e pluviosidade, fatos que favorecem a multiplicação do patógeno. (NATARO; KAPER, 1998).

1.1.4 *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

A EIEC é capaz de invadir as células do cólon humano, causando uma infecção semelhante à provocada pela Shigella, da qual pode ser diferenciada através de alguns testes bioquímicos. (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Este patógeno inicia a invasão dos enterócitos preferencialmente através das células M, localizadas no intestino delgado, evitando assim a fagocitose. EIEC é capaz de induzir apoptose em macrófagos e se utiliza da face basolateral das células epiteliais para se espalhar no organismo. (ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). Afeta principalmente, crianças maiores de dois anos e adultos que adquirem o patógeno através da ingestão de água e alimentos contaminados (ABBASI *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2016).

1.1.5 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

A EAEC é uma categoria muito descrita em doenças diarreicas em crianças, não só em países em desenvolvimento, mas também em países industrializados. Sendo muito associada a diarreia aquosa persistente por 14 dias. Ela é caracterizada pela infecção do intestino delgado e grosso a partir da adesão agregativa (AA) (SCALETSKY *et al.*, 2002).

As EAEC são bactérias produtoras de biofilme, que é um fator de virulência muito importante na defesa dessas bactérias. E a principal constituição desse biofilme inclui: uma matriz extracelular complexa formada por exopolissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e água (SRINIVASAN *et al.*, 2021).

Importante para proteção bacteriana, o biofilme diminui as possíveis agressões do meio ambiente como: mudança de pH, deficiência de nutrientes, forças mecânicas e temperatura. Além de proteger contra múltiplos fármacos e químicos, como por exemplo antibióticos. (SCALETSKY *et al.*, 2002; SHEIKH *et al.*, 2008).

Em acréscimo, também protege as bactérias da resposta imune do hospedeiro. Em conjunto, esses fatores transformam o biofilme em um fator de virulência muito importante que contribui com o desenvolvimento de infecções crônicas, principalmente em indivíduos imunologicamente fragilizados (SRINIVASAN *et al.*, 2021).

1.1.6 *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC)

A DAEC se distingue das outras categorias devido a presença de um padrão de adesão celular denominada adesão difusa (DA), pela qual essa cepa se distribui uniformemente pela superfície dos enterócitos (SCALETSKY *et al.*, 2002).

A família de adesinas Afa/Dr são comumente encontradas em cepas de DAEC. E dentro dessa família existem as adesinas afimbriais Afa-I, II, III, V, VII e VIII, Nfa-I, as fímbrias Dr-I e II, AAF-I, II, III e F1845 (ALMEIDA, 2013). No processo de infecção, a junção das fímbrias Dr ao receptor DAF e emissão de um sinal transdutor, induz a expansão celular dos enterócitos em formato similar a um longo dedo, que envolve a bactéria. Induzindo também, a ativação de outras diversas cascatas transdutoras de sinal, incluindo a PI-3 quinase, que se desregulada, pode estimular a formação de células tumorais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A infecção por DAEC inclui sintomas de diarreia aquosa sem sangue e afeta, particularmente, crianças maiores de 1 ano de idade (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.2 Principais grupos de *E. coli* responsáveis por surtos de diarreia com sangue e SHU

Seis sorogrupos de *E. coli* além do sorogrupo O157, são os principais causadores de surtos de diarreia com sangue e SHU sendo eles os sorogrupos O26, O45, O103, O111, O121, e o O145 (ALHARBI *et al.*, 2022).

Alguns desses sorogrupos se destacam por pertencerem a mais de uma categoria, como por exemplo o sorogrupo O26 que pode ser categorizado como STEC e EPEC, o que o faz também, responsável por diarreia aguda e mortalidade infantil em países em desenvolvimento (PEIXOTO *et al.*, 2001).

1.2.1 Sorogrupo O26

O sorogrupo O26 é formado por cepas que possuem mecanismos de virulência distintos. Portanto, enquanto algumas cepas são responsáveis por diarreia aguda em crianças de países em desenvolvimentos (EPEC), outras cepas (STEC e/ou EHEC), são responsáveis por surtos de diarreia com sangue e síndrome hemolítica urêmica

em países desenvolvidos (PEIXOTO *et al.*, 2001; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004.). Por exemplo, surtos de SHU por *E. coli* O26 foram relatados em diversos países como: Alemanha, Áustria, Irlanda (MCMASTER *et al.*, 2001; GERBER *et al.*, 2002) e Estados Unidos, onde casos de infecção por esse sorogrupo de *E. coli* foram descritos em 11 estados diferentes (CDC, 2012). No Brasil, apesar de nenhum surto ter sido notificado, casos de SHU por *E. coli* O26 já foram registrados (GUTH *et al.*, 2002).

Além dos surtos causados por cepas de *E. coli* O26, essas bactérias mostram uma evidente predisposição para se transformarem em clones emergentes, sendo o sorogrupo O26 entre todos os sorogrupos de *E. coli* um dos que possuem maior potencial emergente. Esse potencial foi evidenciado de várias formas sendo uma delas, a não existência de polimorfismo entre as cepas de EPEC e EHEC O26 provenientes de bovinos e humanos (BARBIAU *et al.*, 2011). Em acréscimo, *E. coli* O26 é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos, o que pode ter um impacto significativo na indústria alimentícia (CASTRO *et al.*, 2019).

Devido à grande importância sócio econômica dessas bactérias a produção de uma vacina contra elas poderia ajudar a prevenir surtos de doenças transmitidas por alimentos e morte infantil em regiões carentes de países em desenvolvimento.

Portanto o objetivo deste trabalho foi determinar se o polissacarídeo O26 que está presente em todas as cepas de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O26, é um bom candidato a antígeno para ser utilizado em formulações vacinas contra esses patógenos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antigênico do polissacarídeo O26 frente a cepas de *E. coli* O26 pertencentes a categoria EPEC e *E. coli* O26 pertencentes a categoria STEC.

2.2 Específicos

Como objetivos específicos foram avaliados os seguintes fatores:

- a) Capacidade das amostras de EPEC e STEC O26 de formar biofilme
- b) Capacidade dos anticorpos anti-O26 de reconhecerem EPEC e STEC pertencentes ao sorogrupo O26 formadoras e não formadoras de biofilme
- c) Capacidade dos anticorpos anti-O26 de reconhecerem bactérias capsuladas e não capsuladas
- d) Influência dos anticorpos anti-O26 na fagocitose de EPEC por macrófagos
- e) Influência dos anticorpos anti-O26 na adesão de *E. coli* a células epiteliais

3 METODOLOGIA

3.1 Cepas Bacterianas

As cepas utilizadas nesse estudo foram: O26:H11 (aEPEC); O26:H11 (STEC) e *E. coli* K12 DH5 α , todas derivadas da coleção “Professor Luiz Rachid Trabulsi” do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil.

3.2 Linhagens Celulares

As linhagens de células HEp-2 e J774A. 1 utilizadas neste estudo foram obtidas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

A HEp-2 é uma célula aderente de tecido epitelial humano, derivado de células tumorais da laringe, utilizada em pesquisas relacionadas à imunologia e empregada na investigação de padrões de adesão (MATHEWSON; CRAVIOTO, 1989; WEI *et al.*, 2009). No estudo, para a manutenção da célula, a linhagem HEp-2 foi cultivada em meio de cultura DMEM (*Dulbecco 's Modified Eagle Medium*) suplementada com 10% de Soro Fetal Bovino e 10 mg/mL de gentamicina.

A J774A.1 é uma célula aderente derivada de macrófagos de camundongo, utilizada em pesquisas relacionadas à imunologia e citotoxicidade (TAKEBE *et al.*, 2003). A linhagem J774A.1 foi cultivada em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 10 mg/mL de gentamicina.

3.3 Anticorpos

O soro de coelho contra o polissacarídeo O26 foi gentilmente doado pelo Dr. Luis Fernando dos Santos, do Centro de Bacteriologia do Núcleo de Doenças Infecciosas do Instituto Adolfo Lutz.

3.4 Determinação da capacidade de anticorpos anti-O26 de reconhecerem EPEC e STEC pertencentes ao sorogrupo O26 formadoras e não formadoras de biofilme

3.4.1 Teste de identificação de bactérias formadoras de biofilme

Foi determinada a capacidade das linhagens de aEPEC O26:H11 e STEC O26:H11 de formar biofilme em superfície abiótica. Em resumo, 5 µL de cultura bacteriana previamente cultivada em TSB (*Tryptic Soy Broth*) foram adicionados em triplicatas, em placas de 96 poços contendo 200 µL de meio TSB por poço. Após 24 horas de incubação a 37°C, a placa foi lavada três vezes com PBS e as bactérias aderidas à placa foram fixadas com 200 µL/poço de etanol 75% por 10 minutos. A placa foi lavada novamente e subsequentemente as bactérias aderidas à placa foram coradas com 200 µL/poço de Cristal Violeta a 0,5%. Após 5 minutos de incubação, a placa foi lavada novamente com PBS e foram adicionados 200 µL/poço de álcool a 95%, para a solubilização do Cristal Violeta. A densidade óptica foi lida em 595 nm, em espectrofotômetro (SHEIKH *et al.*, 2008). Foi considerado positivo para formação de biofilme a densidade óptica acima de 0,5.

3.4.2 Teste de Elisa para análise da influência do biofilme no reconhecimento de EPEC e STEC

Para determinar a influência do biofilme no reconhecimento das bactérias pelos anticorpos anti-O26, foi utilizado o teste de ELISA. Para isso, placas de cultura de 96 poços foram tratadas como descrito no item 3.5.1, com algumas alterações. Em resumo, após serem fixadas com 100 µL de etanol 75% por 10 minutos, ao invés de serem coradas para determinação do biofilme, as placas foram incubadas com 3% de leite Molico® em PBS *overnight* a 4°C. Após bloqueio, as placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS + 0,05% de tween 20) por 3 vezes. Diluições seriadas (1/2) do soro de coelho anti-O26 em tampão de incubação (PBS + 1% leite Molico) foram adicionadas em triplicatas na placa. Subsequentemente, as placas foram incubadas por 2 horas em 37°C e depois, *overnight* a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas 3 vezes e incubadas por 2 horas com o conjugado (anti-IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina) diluído 1/5000 em tampão de incubação. As placas foram então lavadas e reveladas com o substrato p-nitrofenil fosfato. A leitura do teste foi realizada em um leitor de microplacas (Multiskan 405 nm).

3.5 Determinação da capacidade dos anticorpos anti-O26 de reconhecerem EPEC O26 capsuladas e não capsuladas

Uma das características de EPEC é a presença de uma pseudocápsula formada por polissacarídeos idênticos ao antígeno O presente na molécula de LPS ancorada na membrana dessas bactérias (THOMASSIN *et al.*, 2013). Portanto, resolvemos determinar a capacidade dos anticorpos anti-O26 de reconhecer as cepas de EPEC capsuladas e cepas cujas as cápsulas foram retiradas por calor. Tanto as bactérias capsuladas quanto as bactérias não capsuladas foram posteriormente formalinizadas para serem usadas no teste de ELISA.

3.5.1 Remoção da cápsula

A amostra de EPEC O26 foi crescida em TSB a 37°C *overnight*. Após aquecimento a 100°C por 10 minutos, as bactérias foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante contendo as cápsulas foi descartado. Para lavagem, o *pellet* contendo as bactérias “nuas” foi homogeneizado, ressuspendido em PBS e centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos. Esse processo foi repetido mais uma vez, e o *pellet* obtido foi utilizado para formalinização.

3.5.2 Formalinização das amostras bacterianas

O *pellet* das bactérias capsuladas ou das bactérias nuas (cujas cápsulas foram retiradas por aquecimento) foram ressuspendidos em uma solução de salina formalinizada 0,5% e deixados a 4°C *overnight*. Após a incubação, as bactérias foram novamente centrifugadas como descrito anteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi guardado para ser utilizado como antígeno no teste de ELISA.

3.5.3 Teste de ELISA para análise da influência da cápsula no reconhecimento dos anticorpos anti-O26

Na realização do teste de ELISA, foram utilizados os *pellets* de bactérias capsuladas ou bactérias cujas capsulas foram removidas como descrito nos itens

(3.6.1 e 3.6.2). Sendo que, na sensibilização das placas (Costar® Assay Plate, 96 poços), 100 µL desses *pellets* ressuspendidos em PBS, foram incubados adicionados em triplicadas na placa e incubados *overnight* em geladeira a 4°C. Após incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS + 0,05% de tween 20). Subsequentemente, as placas foram bloqueadas por 2 horas em estufa a 37° C com tampão de bloqueio (PBS + 3% leite Molico). Após bloqueio, as placas foram lavadas 3 vezes. Diluições seriadas (1/2) do soro de coelho anti-O26 em tampão de incubação (PBS + 1% leite Molico) foram adicionadas em triplicatas na placa. Logo após, as placas foram incubadas por 2 horas em 37°C e depois, *overnight* a 4 °C. Após incubação, as placas foram lavadas 3 vezes e incubadas por 1 hora com o conjugado (anti-IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina) diluído 1/5000 em tampão de incubação. As placas foram então lavadas e reveladas com o substrato p-nitrofenil fosfato. A leitura do teste foi realizada em um leitor de microplacas (Multiskan 405 nm).

3.6 Fagocitose

Macrófagos J774A.1 a uma concentração de 5×10^5 células/mL em RPMI com 10% fetal soro bovino foram semeados em placas de cultura celular de 24 poços (500 µL/poço) e incubados por 24 h a 37°C em uma incubadora de 5% de CO₂. Em paralelo, 10 µL de a-EPEC O26 (10^7 UFC/mL) foram incubados por 1 h a 37°C com soro de coelho anti-O26 diluído 1/10 em RPMI contendo 15% de soro normal humano ou humano normal inativado pelo calor. Como controle, as bactérias foram incubadas na ausência de soro de coelho anti-O26 e soro normal humano. O soro normal humano foi utilizado como fonte de complemento. Após a incubação, as amostras foram adicionadas em triplicatas às células e incubadas por 2 h a 37°C. Subsequentemente, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e então incubada por 30 minutos com solução de 10 µg/mL de gentamicina em PBS. Posteriormente, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS, e os macrófagos foram lisados com uma solução de 0,1% de Triton X-100 em PBS (0,5 mL/poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, os lisados foram então submetidos a diluições seriadas (1/10) em soro fisiológico, começando com uma diluição de 1/10. Na sequência, 10 µL de cada diluição foram adicionados em triplicata a placas de TSA (Tryptic Soy Agar) para determinar o

número de unidades formadoras de colônias (UFC). O número de unidades formadoras de colônias foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Baron e Beck (BARON *et al.*, 2006; BECK *et al.*, 2009).

3.7 Teste de inibição de adesão bacteriana a células epiteliais

Os testes de adesão foram realizados, de acordo com Scaletsky *et al.* (2002). Células HEp-2 foram transferidas, na concentração de 5×10^5 células/mL em meio DMEM contendo 1% de SFB (soro fetal bovino inativado), para placas de cultura de células de 24 poços (TPP) forradas com lamínulas esterilizadas. As células foram incubadas a 37°C em estufa de CO₂ até formarem monocamadas com 70% de confluência. As monocamadas foram então lavadas 1X com PBS estéril. Subsequentemente 50 µL de cultura bacteriana (10^7 /mL) previamente crescida em TSB por 18 horas foram acrescentadas em 195 µL de meio DMEM sem antibiótico na presença ou ausência de soro de coelho anti-O26 diluído 1/10. Após incubação, as amostras foram adicionadas em triplicatas na placa de 24 poços contendo as lamínulas com monocamadas de células. As amostras foram então incubadas por 3 horas a 37° C em estufa de 5% de CO₂. Após incubação, as placas foram lavadas 4 x com PBS, e as células fixadas com metanol 100% por 10 minutos. As células foram coradas com May-Grünwald (Merck) diluído 1:2 em tampão Sorensen (33 mM KH₂PO₄, 55 mM Na₂HPO₄, pH 7,3), por 5 minutos e subsequentemente, com corante Giemsa (Merck) diluído 1:3 com o mesmo tampão, por 20 minutos. O excesso do corante foi retirado com água corrente, as lamínulas foram secas à temperatura ambiente e montadas em lâminas para microscopia para posterior visualização em microscópio óptico, em aumento de 1000 vezes (objetiva 100X e ocular 10X) (SCALETSKY *et al.*, 2002).

3.8 Estatística

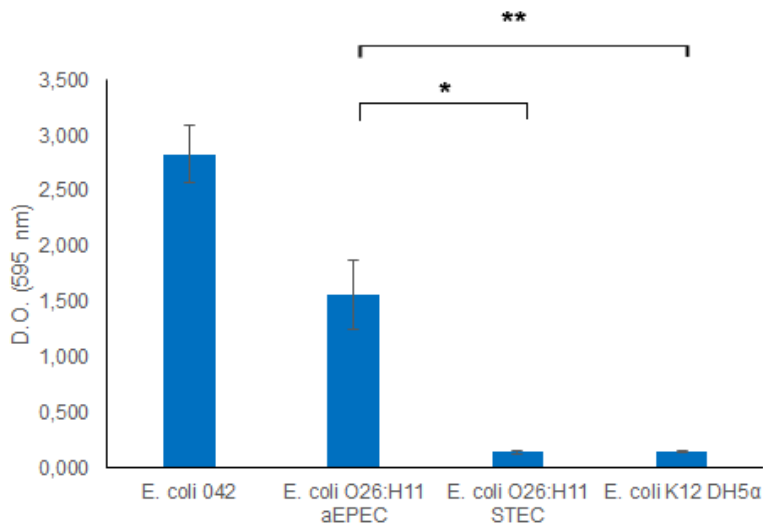
Para a realização do teste t de *student* de distribuição bicaudal foi utilizado o programa Excel (Excel, Microsoft Corporation, US). Em que, o valor $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Formação de Biofilme

Dentre as cepas testadas, O26:H11 a-EPEC e O26:H11 STEC apenas a cepa de a-EPEC foi capaz de produzir biofilme (Figura 2). As amostras de *E. coli* 042 EAEC e a *E. coli* K12 DH5 α , foram utilizadas respectivamente como controle positivo e controle negativo de formação de biofilme (Figura 2).

Figura 2 - Determinação da capacidade de EPEC e STEC pertencentes ao sorogrupo O26 de formar biofilme em superfície abiótica.



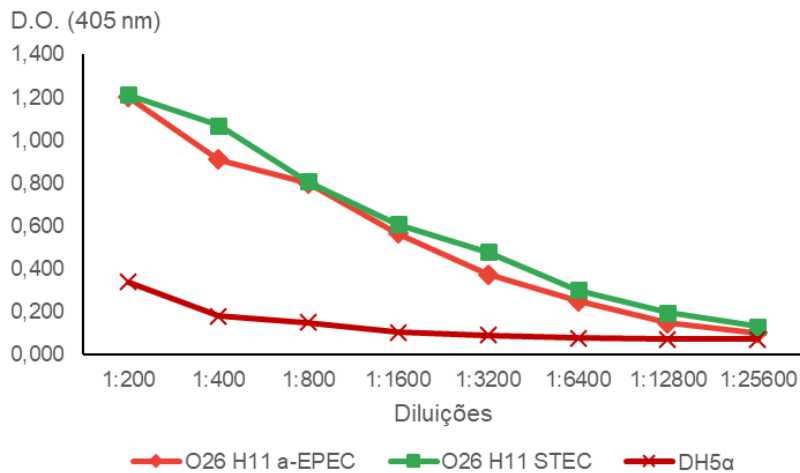
Fonte: próprio autor.

Legenda: *E. coli* 042 foi utilizada como controle positivo de formação de biofilme e *E. coli* K12 DH5 α como controle negativo. Teste *t* independente: */** (Valor $p \leq 0,05$) foi considerado estatisticamente significativo.

4.2 Determinar a capacidade dos anticorpos anti-O26 de reconhecerem EPEC e STEC

Os resultados mostraram que os anticorpos anti-O26 foram capazes de reconhecer tanto EPEC (formadora de biofilme) quanto STEC (não formadora de biofilme) pertencentes ao sorogrupo O26 (Figura 3).

Figura 3 - Reconhecimento de EPEC e STEC pelos anticorpos anti-O26



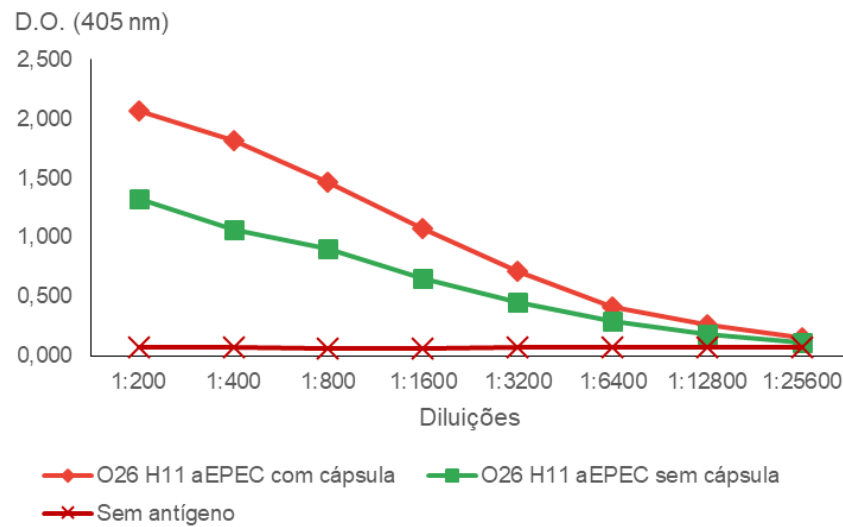
Fonte: próprio autor.

Legenda: Foi determinado pelo teste de ELISA a capacidade dos anticorpos anti-O26 de reconhecerem a-EPEC O26:H11 (capsulada e produtora de biofilme) e STEC O26:H11 (não capsulada e não produtora de biofilme). *E. coli* K12 DH5-α foi utilizada como controle.

4.3 Influência da cápsula no reconhecimento de EPEC pelos anticorpos anti-O26

Os resultados obtidos mostraram que os anticorpos anti-O26 foram capazes de reconhecer melhor a-EPEC O26:H11 capsulada do que a mesma bactéria cuja cápsula foi retirada pelo calor (Figura 4).

Figura 4 - Influência da cápsula no reconhecimento de a-EPEC por anticorpos anti-O26



Fonte: próprio autor.

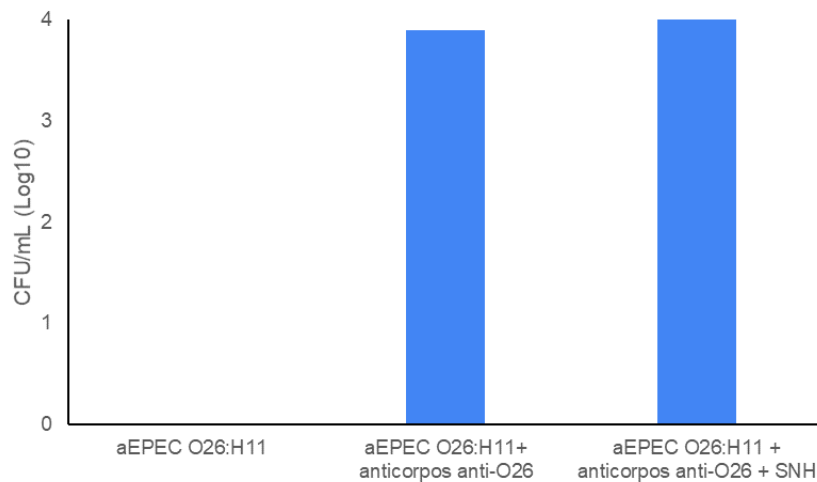
Legenda: a-EPEC O26:H11 capsulada e a-EPEC O26:H11 “nua” cuja cápsula foi retirada por aquecimento, foram submetidas ao teste de ELISA para determinar a influência da cápsula no reconhecimento dessas bactérias.

4.4 Avaliação da influência dos anticorpos anti-O26 na fagocitose de EPEC

Para determinar a influência da cápsula na fagocitose de EPEC na presença e ausência de anticorpos anti-O26, macrófagos J774A.1 foram incubados com a-EPEC O26:H11 na presença de anticorpos anti-O26 e soro normal humano como fonte de complemento.

Os resultados mostraram que os macrófagos só foram capazes de fagocitar a amostra de a-EPEC O26 na presença de anticorpos anti-O26 (Figura 5). A presença de soro humano normal não aumentou, significativamente, o processo de fagocitose induzido na presença de anticorpos anti-O26 (Figura 5).

Figura 5 - Influência dos anticorpos anti-O26 na fagocitose de EPEC por macrófagos



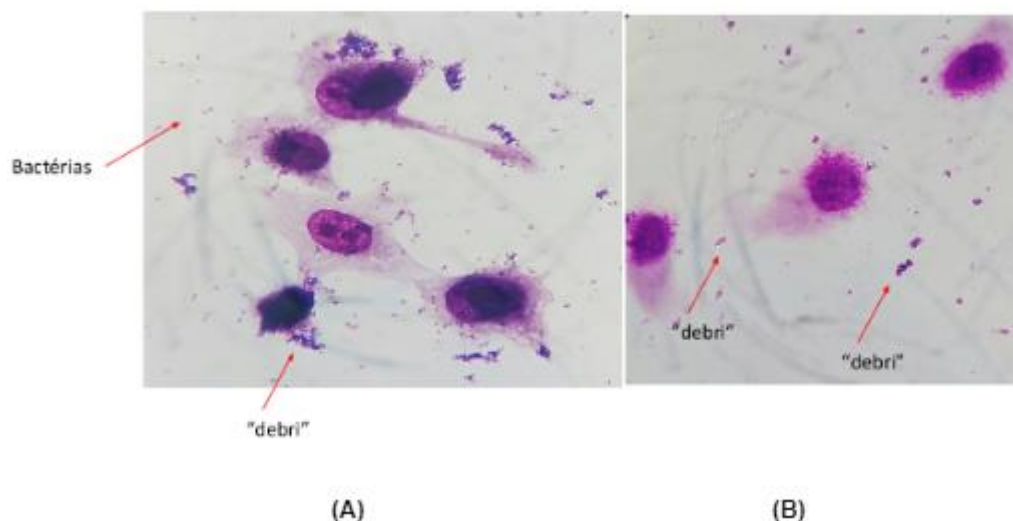
Fonte: próprio autor.

Legenda: Macrófagos J774A.1 foram incubados com a-EPEC O26:H11 (107/UFC) na presença e ou ausência de anticorpos anti-O26 por duas horas. Após a incubação as células foram lavadas, as bactérias no exterior das células foram mortas por incubação com gentamicina. Após a lavagem, as células foram lisadas e o número de bactérias fagocitadas foi determinado pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). O soro normal humano (SNH) foi utilizado como fonte de complemento.

4.5 Avaliação da influência dos anticorpos anti-O26 na adesão de EPEC em células epiteliais

Os resultados obtidos com os testes de inibição de adesão mostraram que o soro de coelho anti-O26 foi capaz de inibir a adesão de a-EPEC O26:H11 a células HEp-2 (Figura 6).

Figura 6 - Influência dos anticorpos anti-O26 na adesão de a-EPEC à HEp-2



Fonte: próprio autor, 2022.

Legenda: Células HEp-2 foram incubadas por 3 horas com a-EPEC O26:H11 (107 UFC) na presença ou ausência de soro de coelho anti-O26. (A) células HEp-2 incubadas com EPEC na ausência de anticorpos, (B) Células HEp-2 incubadas com EPEC na presença de anticorpos anti-O26. UFC= Unidades Formadoras de Colônia. Objetiva (10) Ocular 100X.

5 DISCUSSÃO

Existem várias razões pelas quais é importante produzir uma vacina contra *E. coli* O26. Em primeiro lugar, a vacina pode ajudar a evitar a mortalidade infantil induzida por EPEC O26 em países em desenvolvimento, como já foi comprovado com a utilização da Rotarix monovalente contra rotavírus na redução da hospitalização de mais de 75% populações de todas as faixas etárias de um estudo em Moçambique (LANGA, 2019). A vacina também contribuiria para reduzir a propagação desses patógenos em áreas endêmicas e inibir o progresso de surtos de SHU e diarreia com sangue causados por STEC (ZHU *et al.*, 2008).

Outro motivo para o desenvolvimento de uma vacina contra esses patógenos é o fato de antibióticos não serem indicados para o tratamento de infecções por STEC, pois podem induzir o sistema SOS dessas bactérias e conseqüentemente a liberação de toxinas shiga (NGUYEN; SPERANDIO, 2012; CHAN; NG, 2016).

Além disso, as infecções por *E. coli* O26 podem ter conseqüências econômicas significativas. Os surtos podem levar ao recall de produtos alimentícios e ao fechamento de restaurantes, o que pode ter um impacto significativo na indústria alimentícia. Em resumo, uma vacina contra esse sorogrupo ajudaria a reduzir o risco de surtos e a proteger tanto os consumidores quanto a indústria alimentícia.

Todavia, devido a diversidade encontrada nas cepas de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O26, seria necessário que a formulação vacinal tivesse como alvo, um antígeno presente em todas as cepas pertencentes a esse sorogrupo independentemente do mecanismos de virulência das mesmas. No desenvolvimento de uma vacina contra *E. coli*, devem ser considerados múltiplos fatores pelo qual o patógeno utiliza ao colonizar e infectar o organismo como: mecanismo de virulência, padrão de adesão e epidemiologia nas mais diversas categorias de *E. coli* diarreio gênicas para a identificação de um antígeno vacinal adequado.

Foi observado no presente estudo que o polissacarídeo O26 seria um bom candidato a antígeno pois possui todas as características descritas para um antígeno adequado como: induziu anticorpos capazes de reconhecer as duas categorias de *E. coli* O26, independentemente do mecanismo de virulência e da formação de biofilme. Além disso, do aumento da fagocitose de EPEC capsuladas por macrófagos, uma característica crucial na defesa do organismo contra bactérias capsuladas.

Por último, foram capazes de inibir a adesão de EPEC a células epiteliais, um passo essencial no processo de infecção desde que precede a colonização. Apesar dos dados promissores, a determinação do potencial do polissacarídeo O26 de ser utilizado como antígeno é o primeiro passo no desenvolvimento de uma vacina contra esses patógenos. Portanto, muito estudo ainda deve ser realizado para a formulação de uma vacina eficaz contra todas as cepas de *E. coli* O26.

6 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, concluímos que o polissacarídeo O26 é um antígeno promissor para ser utilizado como alvo na formulação de uma vacina contra todas as linhagens de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O26, independentemente do mecanismo de virulência que elas apresentem.

REFERÊNCIAS¹

- ABBASI, P. *et al.* Real Time PCR for Characterization of Enteroinvasive E. coli (EIEC) in Children with Diarrhea in Shiraz. **Annals of Colorectal Research**, v. 2, n. 3, 30 set. 2014.
- ALHARBI, M. G. *et al.* The “Big Six”: Hidden Emerging Foodborne Bacterial Pathogens. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 11, p. 356, 7 nov. 2022.
- ALMEIDA, R. M. **Escherichia coli de adesão difusa (DAEC) isoladas de crianças e de adultos constituem duas populações diferentes**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília. Brasília, p. 121. 2013
- ANDRADE, J. A. B.; FAGUNDES-NETO, U. Persistent diarrhea: still an important challenge for the pediatrician. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n.3, p. 199-205, 1 fev. 2011.
- BARON, F. *et al.* Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. **Le Lait**, v. 86, n. 3, p. 251–257, maio 2006.
- BARDIAU, M.; LABROZZO, S.; MAINIL, J. G. Study of polymorphisms in tir, eae and tccP2 genes in enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli of serogroup O26. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 1, 30 maio 2011.
- BECK, N. K. *et al.* DEVELOPMENT OF A SPOT-TITER CULTURE ASSAY FOR QUANTIFYING BACTERIA AND VIRAL INDICATORS. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 455–464, dez. 2009.
- CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic Escherichia coli categories among the traditional enteropathogenic E. coli O serogroups: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 6, p. 545–552, out. 2004.
- CASTRO, V. S. *et al.* Shiga-Toxin Producing Escherichia Coli in Brazil: A Systematic Review. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 137, 16 maio 2019.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate Outbreak of Shiga Toxin-producing Escherichia coli O26 Infections Linked to Raw Clover Sprouts at Jimmy John’s Restaurants. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/2012/o26-02-12/index.html>>. Acesso em: 11 jan. 2023.
- CHAN, Y. S.; NG, T. B. Shiga toxins: from structure and mechanism to applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1597–1610, 19 dez. 2015.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

- CLEMENTS, A. *et al.* Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71–87, mar. 2012.
- FERENS, W. A.; HOVDE, C. J. *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 4, p. 465–487, abr. 2011.
- GAYTÁN, M. O. *et al.* Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, 21 out. 2016.
- GERBER, A. *et al.* Clinical Course and the Role of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infection in the Hemolytic-Uremic Syndrome in Pediatric Patients, 1997–2000, in Germany and Austria: A Prospective Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 4, p. 493–500, 15 ago. 2002.
- GOMES, T. A. T. *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 3–30, dez. 2016.
- GUTH, B. E. C. *et al.* First Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolate from a Patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 535–536, maio 2002.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, fev. 2004.
- KNUTTON, S.; LLOYD, D. R.; MCNEISH, A. S. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 1, p. 69–77, 1 jan. 1987.
- LANGA, J. S. Epidemiologia e caracterização molecular de rotavirus A em crianças menores de cinco anos com diarreia aguda, antes e depois da introdução da vacina em moçambique (2013-2018). Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/37786>>. Acesso em: 9 jan. 2023.
- LEE, J. B.; KIM, S. K.; YOON, J. W. Pathophysiology of enteropathogenic *Escherichia coli* during a host infection. **Journal of Veterinary Science**, v. 23, n. 2, p. e28, 27 jan. 2022.
- LEUNG, A. K. C. *et al.* Travelers' Diarrhea: A Clinical Review. **Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery**, v. 13, n. 1, p. 38–48, 5 ago. 2019.
- MATHEWSON, J. J.; CRAVIOTO, A. HEp-2 Cell Adherence as an Assay for Virulence among Diarrheagenic *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 6, p. 1057–1060, 1989.
- MCMMASTER, C. *et al.* Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O26:H11 outbreak in an Irish crèche. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 430–432, 2001.

MOON, H. W. *et al.* Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340–1351, set. 1983.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1 jan. 1998.

NGUYEN, Y; SPERANCIO, V. Enterohemorrhagic *E.coli* (EHEC) pathogenesis. **Cell. Infect. Microbiol.**, v. 02, p. 01-07. 2012.

PEIXOTO, J. C. C. *et al.* Genetic differences between *Escherichia coli* O26 strains isolated in Brazil and in other countries. **FEMS Microbiology Letters**, v. 196, n. 2, p. 239–244, mar. 2001.

ROBINS-BROWNE, R. M.; HARTLAND, E. L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 4, p. 467–475, abr. 2002.

ROHDE, M. E. *coli* EPEC actin pedestals on fibroblast cell culture. 2008. 1 imagem. 3307 x 1609 pixels. Disponível em: <https://www.flickr.com/photos/zeissmicro/7266467546/in/photostream/>. Acesso em: 12 dez. 2022

SACK, R. B. The discovery of cholera - like enterotoxins produced by *Escherichia coli* causing secretory diarrhoea in humans. **Indian Journal of Medical Research**, v. 133, n. 2, p. 171, 1 fev. 2011.

SCALETSKY, I. C. A. *et al.* Diffusely Adherent *Escherichia coli* as a Cause of Acute Diarrhea in Young Children in Northeast Brazil: a Case-Control Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 645–648, 1 fev. 2002.

SCALETSKY, I. C. A. *et al.* Hep-2-Adherent *Escherichia coli* Strains Associated with Acute Infantile Diarrhea, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 8, p. 855–858, 1 ago. 2002.

SHEIKH, J. *et al.* Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 983–997, 7 jul. 2008.

SILVA, H. G. DE S. *et al.* O55 Polysaccharides Are Good Antigen Targets for the Formulation of Vaccines against O55 STEC and Capsulated aEPEC Strains. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 895, 9 ago. 2022.

SRINIVASAN, R. *et al.* Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 12 maio 2021.

TAKEBE, J. *et al.* Titanium surface topography alters cell shape and modulates bone morphogenetic protein 2 expression in the J774A.1 macrophage cell line. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 64A, n. 2, p. 207–216, 9 jan. 2003.

THOMASSIN, J.-L. *et al.* Both Group 4 Capsule and Lipopolysaccharide O-Antigen Contribute to Enteropathogenic *Escherichia coli* Resistance to Human α -Defensin 5. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82475, 4 dez. 2013.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508–513, maio 2002.

United Nations Children’s Fund. Water Under Fire Volume 3: Attacks on water and sanitation services in armed conflicts and the impacts on children. New York: UNICEF, 2021. v. 3

WEI, X. D. *et al.* In vivo investigation of CD133 as a putative marker of cancer stem cells in Hep-2 cell line. **Head & Neck**, v. 31, n. 1, p. 94–101, jan. 2009.

UNITED NATIONS CHILDREN’S FUND; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done. 2009. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789241598415>>. Acesso em: 11 jan. 2023.

ZHU, C. *et al.* Protection against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection by Transcutaneous Immunization with Shiga Toxin Subunit B. **Clinical and Vaccine Immunology: CVI**, v. 15, n. 2, p. 359–366, 1 fev. 2008.