

Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Pós-graduação *Lato Sensu*
Biotecnologia para Saúde – Vacinas e Biofármacos

Daniela Duarte

**Determinação do potencial do polissacarídeo O157 como antígeno vacinal
contra a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC)**

São Paulo
2024

Daniela Duarte

**Determinação do potencial do polissacarídeo O157 como antígeno vacinal
contra a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (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

2024

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

Duarte, Daniela

Determinação do potencial do polissacarídeo O157 como antígeno vacinal contra a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) / Daniela Duarte ; orientador(a) Marta de Oliveira Domingos - São Paulo, 2024.

41 p. : il.

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

1. Polissacarídeo O157 2. *E. coli* O157:H7. 3. STEC. 4. Antígeno vacinal I. Domingos, Marta de Oliveira . II. 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, Daniela Duarte, 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, 19 de DEZEMBRO de 2023

..... Daniela Duarte
aluno(a)

De acordo: Marta de O. Domingos
Orientador(a): Marta de Oliveira Domingos

Aos meus pais, irmão e amigos pelo carinho e apoio fundamentais para a minha formação.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente à minha orientadora, Marta de Oliveira Domingos, pela orientação valiosa neste trabalho.

À Dra. Maria da Graça Salomão, coordenadora do curso de Biotecnologia para a Saúde - Vacinas e Biofármacos, pelo apoio constante.

Meus sinceros agradecimentos se estendem aos meus amigos, aos alunos e funcionários do laboratório de Bacteriologia, cuja a colaboração foi fundamental.

Ao Instituto Butantan, a Fundação Butantan e a Secretaria da Saúde pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram, meu profundo agradecimento.

RESUMO

DUARTE, Daniela. **Determinação do potencial do polissacarídeo O157 como antígeno vacinal contra a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC).** 2024. 41 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

As doenças diarreicas persistem como uma preocupação global devido ao seu impacto significativo na saúde. A diarreia, responsável pela morte de 370 mil crianças em 2019 no mundo, é a segunda principal causa de óbito em crianças menores de cinco anos. Fatores diversos, como infecções por patógenos parasitários, virais ou bacterianos, desencadeiam episódios de diarreia, destacando-se *Escherichia coli*, associada à síndrome hemolítico-urêmica (SHU). O sorotipo *E. coli* O157:H7, reconhecido por sua produção de toxinas Shiga, está associado a infecções gastrointestinais e SHU, especialmente em crianças. O tratamento envolve principalmente medidas de suporte, pois a exposição a antibióticos pode intensificar os sintomas, aumentando o risco de SHU e outras complicações. Devido à associação deste sorotipo com surtos alimentares, é essencial uma vigilância rigorosa na produção de alimentos, práticas sanitárias e processos que resultem na prevenção de infecções causadas por esses patógenos. Esse estudo, portanto, avalia o potencial do polissacarídeo O157 como agente vacinal contra *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC). Os resultados mostraram que anticorpos gerados contra o polissacarídeo O157 foram capazes de reconhecer *E. coli* O157:H7 mesmo na presença de cápsula. Eles também auxiliaram o sistema complemento na lise dessas bactérias bem como inibiram a adesão das mesmas a células epiteliais humanas. Em suma, os resultados sugerem que o polissacarídeo O157 pode ser considerado um bom candidato a antígeno em formulações vacinais contra *E. coli* produtoras de toxina Shiga.

Palavras-chave: Polissacarídeo O157. *E. coli* O157:H7. STEC. Antígeno vacinal.

ABSTRACT

DUARTE, Daniela. **Determination of the Potential of Polysaccharide O157 as a Vaccine Antigen Against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC)**. 2024. 41 p. Monograph (Specialist in Biotechnology for health – Vaccines and Biopharmacy) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2024.

Diarrheal diseases persist as a global concern due to their significant impact on health. Diarrhea, responsible for the death of 370,000 children worldwide in 2019, ranks as the second leading cause of mortality in children under five. Diverse factors, such as infections by parasitic, viral, or bacterial pathogens, trigger episodes of diarrhea, with *Escherichia coli* standing out, associated with hemolytic-uremic syndrome (HUS). The *E. coli* O157:H7 serotype, known for its Shiga toxin production, is linked to gastrointestinal infections and HUS, particularly in children. Treatment primarily involves supportive measures, as antibiotic exposure can exacerbate symptoms, increasing the risk of HUS and other complications. Due to this serotype's association with foodborne outbreaks, strict surveillance in food production, sanitation practices, and processes is essential to prevent infections caused by these pathogens. This study evaluates the potential of O157 polysaccharide as a vaccine candidate against Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). Results indicate that antibodies generated against O157 polysaccharide could recognize *E. coli* O157:H7 even in the presence of a capsule. They also assisted the complement system in lysing these bacteria and inhibited their adherence to human epithelial cells. In summary, the findings suggest that O157 polysaccharide could be considered a promising antigen in vaccine formulations against Shiga toxin-producing *E. coli*.

Keywords: O157 polysaccharide. *E. coli* O157:H7. STEC. Vaccine antigen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mecanismo de virulência da DAEC.....	15
Figura 2 - Mecanismo de virulência da EAEC.....	15
Figura 3 - Mecanismo de virulência da EIEC.	16
Figura 4 - Mecanismo de virulência da EPEC.....	17
Figura 5 – Mecanismo de virulência da ETEC.	18
Figura 6 – Mecanismo de virulência da STEC.	19
Figura 7 - Visualização da cápsula bacteriana.	28
Figura 8 - Identificação da capacidade de formação de biofilme pela E. coli O157:H7.	30
Figura 9 - Reconhecimento do polissacarídeo O157 pelo anticorpo anti-O157.	31
Figura 10 - A influência do anticorpo anti-O157 na lise bacteriana pelo sistema complemento.....	32
Figura 11 - Influência dos anticorpos anti-O157 na fagocitose.....	33
Figura 12 - Inibição de adesão de amostras de E. coli O157:H7 em células HEp-2.	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das cepas de <i>Escherichia coli</i>	14
Tabela 2 - Suscetibilidade frente a antibióticos da cepa <i>E. coli</i> O157:H7.	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 <i>Escherichia coli</i>	13
1.2 <i>Escherichia coli</i> diarreioogênicas.....	14
1.2.1 <i>E. coli</i> difusamente aderente (DAEC).....	14
1.2.2 <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC).....	15
1.2.3 <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	16
1.2.4 <i>E. coli</i> enteropatogênica (EPEC).....	17
1.2.5 <i>E. coli</i> enterotoxigênica (ETEC)	18
1.2.6 <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC).....	18
1.3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	20
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 Geral	22
2.2 Específicos	22
3 METODOLOGIA	23
3.1 Cepa bacteriana.....	23
3.2 Anticorpo	23
3.3 Linhagem Celular	23
3.4 Teste de sensibilidade a antibióticos	23
3.5 Teste de detecção de cápsula bacteriana	24
3.6 Produção de biofilme	24
3.7 Determinação da capacidade de anticorpos anti-O157 de reconhecerem o polissacarídeo O157 em <i>Escherichia coli</i> O157:H7 com e sem a presença de cápsula.....	24
3.7.1 Remoção da cápsula e formalinização das amostras.	24
3.7.2 Teste de ELISA.	25
3.8 Teste de lise do sistema complemento	25

3.9 Fagocitose	25
3.10 Teste de inibição de adesão bacteriana em células epiteliais	26
3.11 Análise estatística	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 Identificação da cápsula bacteriana	28
4.2 Suscetibilidade a antibióticos	28
4.3 Formação de biofilme	29
4.4 Capacidade dos anticorpos anti-O157 de reconhecerem o polissacarídeo O157.	30
4.5 Influência do anticorpo anti-O157 na resposta do sistema complemento...31	
4.6 Fagocitose	32
4.7 Inibição de adesão bacteriana em células epiteliais.....	33
5 DISCUSSÃO	35
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS.....	38

1 INTRODUÇÃO

As doenças diarreicas continuam a ser uma preocupação constante devido ao seu impacto significativo na saúde global. Apenas em 2019, a diarreia foi responsável pela trágica morte de 370 mil crianças, colocando-a como a segunda principal causa de óbito em crianças com menos de cinco anos de idade após pneumonia (UNICEF, 2021).

Diversos fatores podem desencadear episódios de diarreia, incluindo infecções por uma variedade de patógenos, sejam eles parasitários, virais ou bacterianos. Entre os principais agentes bacterianos, destacam-se *Campylobacter spp*, *Clostridioides difficile*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*, sendo *E. coli* o principal agente etiológico de origem bacteriana responsável por diarreia. (AKHONDI; SIMONSEN, 2023)(KAPER *et al.*, 2004)(SILVA *et al.* 2022).

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é um bacilo Gram negativo predominantemente anaeróbio facultativo, de significativo interesse clínico, pertencente à família Enterobacteriaceae. São comumente encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais. No entanto, podem ocorrer cepas com características patogênicas, sendo possível classificá-la em dois principais grupos: as ExPEC (*E. coli* patogênicas extra-intestinais) e as DEC (*E. coli* diarreiogênicas), que, por sua vez, podem ser subdivididas em várias categorias (NATARO; KAPER, 1998)(GOMES *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Classificação das cepas de *Escherichia coli*.

Classificação	Subcategoria
ExPEC	APEC (<i>E. coli</i> patogênica aviária)
	MNEC (<i>E. coli</i> associada em meningite neonatal)
	SEPEC (<i>E. coli</i> associada à sepse)
	UPEC (<i>E. coli</i> uropatogênica)
DEC	DAEC (<i>E. coli</i> difusamente aderente)
	EAEC (<i>E. coli</i> enteroagregativa)
	EIEC (<i>E. coli</i> enteroinvasiva)
	EPEC (<i>E. coli</i> enteropatogênica)
	ETEC (<i>E. coli</i> enterotoxigênica)
	STEC (<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga)

Fonte: adaptado de NATARO; KAPER, 1998.

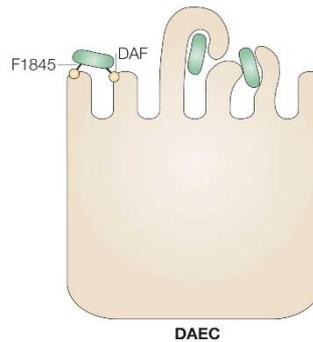
1.2 *Escherichia coli* diarreio gênicas

As *Escherichia coli* diarreio gênicas (DEC) referem-se a cepas específicas dessa bactéria que desencadeiam infecções gastrointestinais. Essas cepas são as principais responsáveis pela ocorrência de diarreia, sobretudo em áreas onde as condições sanitárias são precárias. Como descrito na tabela 1, *E. coli* diarreio gênicas (DEC) podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de virulência, epidemiologia, tipo de adesão a células epiteliais e manifestações clínicas em seis categorias diferentes: DAEC, EAEC, EIEC, EPEC, ETEC e STEC (NATARO; KAPER, 1998).

1.2.1 *E. coli* difusamente aderente (DAEC)

A DAEC destaca-se por sua habilidade de aderir difusamente às células intestinais, formando um revestimento uniforme nas mucosas e desencadeando eventos cruciais no desenvolvimento de infecções gastrointestinais. Essa cepa apresenta uma gama de fatores de virulência que facilitam a aderência e colonização do trato gastrointestinal, contribuindo para a persistência da infecção (KAPER *et al.*, 2004)(SERVIN; AL, 2014).

Figura 1 - Mecanismo de virulência da DAEC.



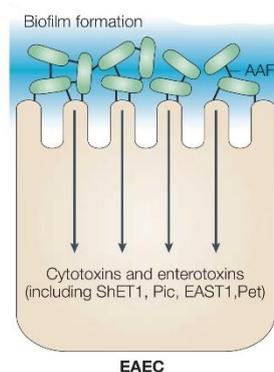
Fonte: KAPER *et al.*, 2004.

Este sorotipo é caracterizado por adesinas, proteínas especializadas que permitem a ligação específica da bactéria às células intestinais. As adesinas estabelecem uma conexão específica entre a DAEC e as células intestinais, sendo o tipo de adesão caracterizado como adesão difusa. Outro fator de virulência produzido por DAEC são toxinas capazes de quebrar as mucinas, proteínas altamente glicosiladas que revestem o epitélio intestinal (KAPER *et al.*, 2004)(SERVIN; AL, 2014).

A maioria das cepas de DAEC produz a adesina fimbrial F1845 ou uma adesina relacionada. F1845, pertencente à família Dr, e em conjunto com a proteína de superfície celular DAF, desencadeia a ativação da cascata de transdução de sinal, incluindo a ativação da PI-3 quinase (KAPER *et al.*, 2004)(SERVIN; AL, 2014).

1.2.2 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

Figura 2 - Mecanismo de virulência da EAEC.



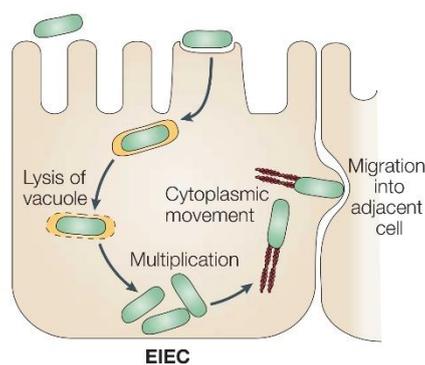
Fonte: KAPER *et al.*, 2004

A EAEC é responsável por causar diarreia em crianças e adultos em todo o mundo, incluindo em países desenvolvidos. Tem capacidade de aderir às células intestinais, formando um padrão de adesão agregativa, resultando em camadas espessas que impactam a absorção de nutrientes, levando à manifestação de diarreia persistente. Um de seus fatores de virulência é a capacidade do sorotipo de induzir a produção de muco na mucosa intestinal consequentemente formando uma densa camada de biofilme. Além disso, a EAEC tem a capacidade de secretar toxinas, como a toxina de aderência e desencadear respostas inflamatórias no intestino, contribuindo para os sintomas gastrointestinais observados durante a infecção (KAPER *et al.*, 2004)(VASCONCELLOS; FM, 2009).

1.2.3 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

A EIEC distingue-se por compartilhar características em comum com a *Shigella spp*, causadora de disenteria bacilar, uma forma grave de diarreia com febre, dor abdominal e evacuações frequentemente sanguinolentas. Transmitida principalmente por via fecal-oral, é prevalente em áreas com condições sanitárias precárias, sendo a ingestão de água ou alimentos contaminados uma via comum de infecção (KAPER *et al.*, 2004)(VAN DEN BELD; REUBSAET, 2012).

Figura 3 - Mecanismo de virulência da EIEC.



Fonte: KAPER *et al.*, 2004

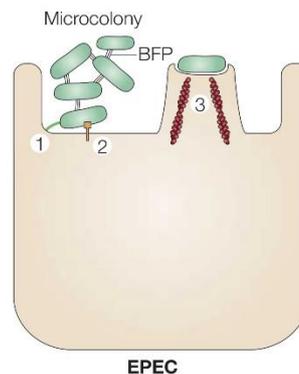
Após a ingestão, a EIEC atravessa a barreira intestinal, invadindo e multiplicando-se nas células epiteliais. Esse processo resulta em danos ao tecido intestinal, inflamação e liberação de toxinas associadas aos sintomas clínicos da infecção. Essas características destacam a gravidade das infecções por EIEC e a

importância de medidas preventivas em ambientes com condições sanitárias inadequadas (KAPER *et al.*, 2004)(VAN DEN BELD; REUBSAET, 2012).

1.2.4 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

A EPEC é uma cepa específica da bactéria *Escherichia coli* que se destaca como uma das principais causadoras de infecções gastrointestinais. Este grupo é reconhecido como uma significativa causa de diarreia em crianças, especialmente em regiões com condições sanitárias precárias, frequentemente associada a surtos em ambientes com aglomeração de crianças e instituições infantis (OCHOA; CONTRERAS, 2011)(PEARSON *et al.*, 2016).

Figura 4 - Mecanismo de virulência da EPEC.



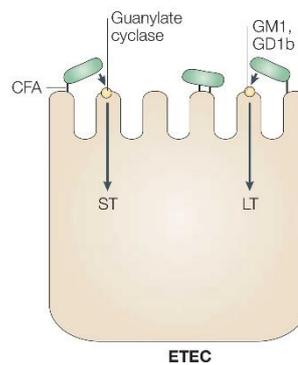
Fonte: KAPER *et al.*, 2004

Uma vez aderidas às células hospedeiras, a EPEC induz a formação de lesões características conhecidas como pedestais de actina, estas são formações de proteínas que se projetam da superfície da célula hospedeira, proporcionando um ambiente favorável para a fixação das bactérias. Essa cepa é capaz de causar lesões A/E (*attaching and effacing*) nas células intestinais, reorganizando a estrutura das células hospedeiras e resultando em uma área "apagada" na superfície celular, onde as bactérias estão firmemente aderidas. A intimina e a proteína Tir são cruciais nesse processo, desempenhando papéis importantes na ligação entre a bactéria e a célula hospedeira. Essas alterações na estrutura das células intestinais podem levar a uma redução na absorção de nutrientes, resultando em diarreia (OCHOA; CONTRERAS, 2011)(PEARSON *et al.*, 2016).

1.2.5 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

A ETEC é reconhecida como uma das principais causadoras de diarreia globalmente, porém sua prevalência é notável em regiões onde o acesso à água potável é limitado e as condições sanitárias são inadequadas, sendo uma das principais preocupações em países em desenvolvimento (ISIDEAN *et al.*, 2011)(YAMAMOTO; BB, 2016).

Figura 5 – Mecanismo de virulência da ETEC.



Fonte: KAPER *et al.*, 2004

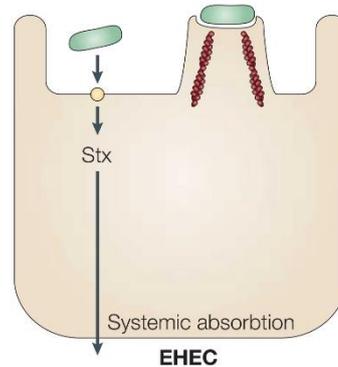
A característica distintiva desse sorotipo está associada à produção de toxinas termolábeis (LT) e termoestáveis (ST), desempenhando um papel crucial nos sintomas da infecção. A toxina termolábil atua de maneira semelhante à toxina da cólera, aumentando a produção de AMP cíclico (cAMP) nas células intestinais, resultando em um aumento na secreção de água e eletrólitos no intestino. Por outro lado, a toxina termoestável estimula a produção de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), também contribuindo para o aumento na secreção intestinal (ISIDEAN *et al.*, 2011)(YAMAMOTO; BB, 2016).

1.2.6 *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC)

A STEC, é caracterizada pela presença do antígeno somático (O), e atualmente, mais de 200 sorotipos de STEC são identificados. A transmissão dessa cepa ocorre por meio do consumo de água e alimentos contaminados ou até mesmo pelo contato direto com animais. O gado bovino é considerado um importante reservatório natural da STEC, e a contaminação ambiental, especialmente da água

potável, pode contribuir para a disseminação dessa bactéria (KAPER *et al.*, 2004)(KIM *et al.*, 2020).

Figura 6 – Mecanismo de virulência da STEC.



Fonte: KAPER *et al.*, 2004

Este grupo é notável por sua produção de toxinas Shiga (Stx1 e Stx2), similares às produzidas pela bactéria *Shigella dysenteriae*. Essas toxinas inibem a síntese proteica nas células hospedeiras, causando danos ao endotélio vascular e contribuindo para complicações como coagulação intravascular disseminada e disfunção renal. As toxinas Shiga podem entrar na corrente sanguínea, provocando lesões nos rins e desencadeando o desenvolvimento da síndrome hemolítico-urêmica (SHU). A SHU é uma condição grave que envolve a destruição de glóbulos vermelhos, insuficiência renal e trombocitopenia (KAPER *et al.*, 2004)(KIM *et al.*, 2020).

O tratamento da infecção por STEC frequentemente se baseia em medidas de suporte, como a reposição de líquidos para prevenir a desidratação. O uso rotineiro de antibióticos não é recomendado, pois pode aumentar o risco de complicações, incluindo a liberação acelerada de toxinas Shiga (KAPER *et al.*, 2004)(KIM *et al.*, 2020).

Dentro deste grupo, diversos sorotipos merecem destaque, sendo o O157:H7 um dos mais significativos. Este sorotipo, devido à sua produção de toxina Shiga, está frequentemente associado a numerosos casos de SHU, além disso é um dos principais sorotipos associados a epidemias (NATARO; KAPER, 1998)(MEAD; GRIFFIN, 1998).

1.3 *Escherichia coli* O157:H7

A *Escherichia coli* O157:H7 é uma cepa específica associada a infecções gastrointestinais, destacando-se por sua produção significativa de toxinas Shiga (Stx). Essa cepa ganhou proeminência devido à sua ligação com surtos alimentares e à síndrome hemolítico-urêmica (SHU), especialmente em crianças. A cepa O157:H7 se distingue pelos antígenos O157 e H7, fundamentais para sua identificação (MEAD; GRIFFIN, 1998)(TARR; NEILL, 2001).

Notória por sua alta patogenicidade, a *E. coli* O157:H7, ao produzir a toxina Shiga, desencadeia sintomas gastrointestinais graves, SHU e, em casos extremos, insuficiência renal e morte. A principal fonte de infecção é o consumo de alimentos contaminados, especialmente carne bovina crua ou mal cozida, produtos lácteos não pasteurizados, vegetais crus e água contaminada. Além disso, a transmissão direta de pessoa para pessoa é possível. (MEAD; GRIFFIN, 1998)(TARR; NEILL, 2001) (NATARO; KAPER, 1998)

Embora tenha distribuição global, o sorotipo O157:H7 provoca surtos epidêmicos em nações desenvolvidas, como Estados Unidos, Canadá, Japão, entre outros. Alguns estudos indicaram que de 50% a 80% das infecções por STEC nos Estados Unidos são causadas pela cepa O157:H7 (NATARO; KAPER, 1998).

Um dos surtos mais significativos ocorreu entre os anos de 1992 e 1993 no oeste dos Estados Unidos, houve um surto de infecções por *E. coli* O157:H7 associado ao consumo de hambúrgueres contaminados. Esse evento resultou em numerosos casos da doença e levou a uma reavaliação dos padrões de segurança alimentar e regulamentações relacionadas à carne (TUTTLE *et al.*, 1999).

Outro surto relevante aconteceu em 2011 na Alemanha, onde houve uma epidemia de infecções por *E. coli* O157:H7 causando um grande número de casos de SHU (FRANK *et al.*, 2011).

Também ocorreram surtos epidêmicos relacionados a alimentos contaminados com a cepa O157:H7 no Japão em 1996 (MICHINO *et al.*, 1999) e no início dos anos 2000 no Canadá (ALI; SH, 2004).

O tratamento, frequentemente, envolve medidas de suporte, focando na reposição de líquidos para prevenir desidratação, com a abordagem antibiótica sendo desaconselhada devido ao risco de complicações. Esta bactéria, quando exposta a antibióticos, pode sofrer lise bacteriana, resultando na liberação de toxinas Shiga

armazenadas nas células bacterianas. Este fenômeno pode intensificar os sintomas da infecção e aumentar o risco de desenvolvimento de SHU (TARR; NEILL, 2001).

Quando as bactérias são expostas a antibióticos que causam danos ao DNA a resposta SOS pode ser ativada. A ativação do sistema SOS é uma estratégia da célula bacteriana para lidar com o estresse e danos no DNA induzidos pelos antibióticos. A ativação desse sistema pode desencadear mutagênese, levando a bactéria a introduzir mutações em seu genoma como uma estratégia de sobrevivência. Assim como, pode conduzir à adaptação genética, aumentando o risco de desenvolvimento de resistência aos antibióticos (MASLOWSKA *et al.*, 2019).

Sendo assim, essa cepa exige vigilância rigorosa na produção de alimentos e práticas sanitárias para minimizar os riscos. Como desdobramento, este estudo avalia o potencial do polissacarídeo O157 como agente vacinal contra a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) visando contribuir não apenas para a compreensão aprofundada da cepa O157:H7, mas também para avanços na prevenção eficaz de suas infecções.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do presente estudo foi verificar o potencial do polissacarídeo O157 de ser utilizado como antígeno em formulações vacinais contra para *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC).

2.2 Específicos

- Verificar a capacidade dos anticorpos anti-O157 em auxiliarem no reconhecimento da bactéria capsulada;
- Determinar a influência dos anticorpos anti-O157 em auxiliar o sistema complemento na lise bacteriana;
- Verificar a capacidade dos anticorpos anti-O157 de interferir na adesão bacteriana em células epiteliais;
- Determinar a capacidade dos anticorpos anti-O157 de interferir na fagocitose por macrófagos.

3 METODOLOGIA

3.1 Cepa bacteriana

A cepa bacteriana que foi utilizada neste estudo é uma amostra de *Escherichia coli* diarreiogênica pertencente ao sorotipo O157:H7 proveniente da coleção de bactérias patogênicas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, São Paulo - Brasil.

3.2 Anticorpo

O soro de coelho contra o polissacarídeo O157 foi adquirido da empresa PROBAC, São Paulo - Brasil.

3.3 Linhagem Celular

Para o teste de fagocitose foi utilizada a linhagem celular de macrófagos J774A.1 e para o teste de inibição de adesão bacteriana foi utilizada as células da linhagem HEp-2, ambas as células foram adquiridas do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo – Brasil.

3.4 Teste de sensibilidade a antibióticos

O teste de suscetibilidade a antibióticos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Kirby-Bauer. Uma colônia da bactéria previamente crescida em TSA (*Tryptic Soy Agar*) foi coletada e ressuspensa até a concentração 0,5 na escala Mcfarland, em seguida a suspensão bacteriana foi semeada seguindo a técnica de difusão em discos Kirby-Bauer em ágar Muller-Hinton. Os antibióticos utilizados foram amicacina (30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), levofloxacino (5 µg), sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg) e tetraciclina (30 µg).

3.5 Teste de detecção de cápsula bacteriana

Para a detecção da cápsula bacteriana foi realizado o método de coloração de Maneval, esta é uma coloração negativa, sendo assim a capsula é a região não corada. Para tal, a suspensão bacteriana foi inoculada através da técnica de esgotamento em meio TSA e incubada a 37°C por 24 horas. Após o tempo de incubação, foi realizado um esfregaço sobre a lâmina de vidro, utilizando 2 gotas do corante Vermelho Congo (1%) e 1 colônia da bactéria, o qual foi seco em temperatura ambiente. O esfregaço foi tratado com a solução de Maneval por 1 minuto. Logo após, foi realizada a observação da lâmina em microscopia óptica (1000 x em imersão).

3.6 Produção de biofilme

A cepa de *E. coli* O157:H7 foi inoculada em caldo triptona de soja (TSB – *Tryptic Soy Broth*) e incubada a 37°C por 24 horas. A seguir, uma alíquota da cultura de 200 µl foi semeada em triplicata, em uma microplaca de 96 poços. Após incubação de 24 horas, a placa foi lavada 3 vezes com PBS, as bactérias foram fixadas com etanol 75% por 10 minutos e seca à temperatura ambiente. O corante cristal violeta (1%) foi colocado por 5 minutos na placa. Após 3 lavagens com PBS para a remoção do corante e adição de etanol 95% para solubilizar o cristal violeta por 2 minutos, a placa foi colocada no leitor de ELISA (Multiskan) (595 nm).

3.7 Determinação da capacidade de anticorpos anti-O157 de reconhecerem o polissacarídeo O157 em *Escherichia coli* O157:H7 com e sem a presença de cápsula.

3.7.1 Remoção da cápsula e formalinização das amostras.

A cepa de *E. coli* O157:H7 foi cultivada em caldo TSB a 37°C por 24 horas. Foi colocado 1 ml de TSB com bactéria crescida em 16 microtubos, sendo que 8 deles foram submetidos ao procedimento de remoção da cápsula descrito a seguir. Os microtubos foram aquecidos no termobloco por 30 minutos, as bactérias foram centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, enquanto o *pellet* que continha as bactérias sem a cápsula foi homogeneizado e ressuspendido ao volume original em Formalina 0,5% PBS. Os 8 microtubos que não passaram pelo

procedimento de remoção da cápsula foram centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos, após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado ao volume original em Formalina 0,5% PBS. Todas as amostras foram incubadas em refrigerador a 4°C *overnight*.

3.7.2 Teste de ELISA.

Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 5 µL da cultura bacteriana de *E. coli* O157:H7, previamente cultivada em TSB em 200 µL de TSB por poço, em triplicata. A seguir é realizada uma incubação *overnight* no refrigerador a 4°C. Após a incubação, a microplaca foi lavada 3 vezes com PBS Tween 0,05% e bloqueada por 2 horas na estufa a 37°C com PBS 3% Molico. Após o bloqueio, a microplaca foi lavada 3 vezes e foi realizada a diluição seriada (1/200) com soro de coelho anti-O157 em PBS 1% Molico, em seguida foi incubada por 2 horas em 37°C. Após a incubação, a placa foi lavada 3 vezes novamente e incubada por 1 hora com o conjugado (anti IgG de coelho) em diluição (1/5000) em PBS 1% Molico. A placa foi lavada, revelada com o substrato e colocada no leitor de ELISA (Multiskan) (405 nm).

3.8 Teste de lise do sistema complemento

Para avaliar a capacidade do sistema complemento em lisar a bactéria, 5 µL da amostra de *Escherichia coli* O157:H7, previamente cultivada em TSB, foram adicionados a uma microplaca de cultura de 96 poços. A placa foi incubada por 16 horas a 37°C, com a adição de 50 µL de soro anti-O157 de coelho, juntamente com 15 µL de soro normal humano (SNH), tanto em conjunto quanto individualmente, ou seja, na presença exclusiva de soro anti-O157 ou apenas do SNH. A determinação da viabilidade bacteriana foi conduzida seguindo a metodologia descrita por Baron e Beck, mediante a contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) (BARON; F, 2006)(BECK; NK, 2009).

3.9 Fagocitose

Para o teste de fagocitose foram usados macrófagos J774A.1 a uma concentração de 5×10^5 células/mL cultivados em RPMI com 10% de soro fetal bovino. Os macrófagos foram semeados em uma placa de cultura de 24 poços (500 µL/poço)

e incubados por 24 horas a 37°C em incubadora de 5% de CO₂. Simultaneamente, 10 µL da amostra bacteriana crescida em TSB (10⁷ UFC/mL) foram incubados por 1 hora a 37°C com soro de coelho anti-O157 diluído (1/10) em RPMI. Como controle, as bactérias foram incubadas na ausência do soro anti-O157. Após a incubação, as amostras foram adicionadas em triplicata às células e incubadas por mais 2 horas a 37°C. Posteriormente, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e então incubada por 30 minutos com solução de 10 µg/mL de gentamicina em PBS. Em seguida, a placa foi lavada 6 vezes com PBS, as células foram lisadas com solução de 0,1% de Triton X-100 em PBS (0,5 mL/poço) por 30 minutos em temperatura ambiente e os lisados foram submetidos a diluições seriadas (1/10) em soro fisiológico. A seguir, 10 µL de cada diluição foram adicionados em triplicata as placas de TSA para determinar o número de unidades formadoras de colônias (UFC). O número de UFC foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Baron e Beck (BARON; F, 2006)(BECK; NK, 2009).

3.10 Teste de inibição de adesão bacteriana em células epiteliais

As células HEp-2 foram cultivadas até 70% de confluência em lâminulas circulares em poços de placas de cultura de tecidos de 24 poços na presença de DMEM sem antibióticos. 20 µL de cultura bacteriana (*E. coli* O157:H7) na concentração de 10⁷ UFC/mL previamente incubada por 1 hora a 37°C com soro de coelho contra polissacarídeos O157 diluído 1/2 em DMEM contendo 1% de soro fetal bovino foram adicionados em duplicata nos poços (1 mL/poço) e incubados durante 3 horas a 37°C em 5% de CO₂. Como controle positivo para adesão bacteriana, às células foram incubadas apenas com bactérias na ausência de anticorpos. Após a incubação, a placa foi lavada 6 vezes com PBS estéril e depois fixadas com metanol 100% por 10 minutos, coradas por 5 minutos com corante May-Grunwald diluído 1/2 em tampão Sorensen e finalmente coradas por 20 minutos com corante Giemsa diluído 1/3 em tampão Sorensen. O excesso de corante foi descartado e as lâminulas com as células coradas foram fixadas em lâminas de microscópio para a visualização em microscopia óptica (ocular, 10x; objetiva, 100x).

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0), por meio do teste-t não pareado. A significância estatística foi estabelecida considerando $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação da cápsula bacteriana

O resultado da coloração de Maneval revelou a presença da cápsula bacteriana na cepa *Escherichia coli* O157:H7, conforme ilustrado na imagem abaixo (figura 7).

Figura 7 - Visualização da cápsula bacteriana.



Fonte: próprio autor.

Legenda: A visualização da cápsula bacteriana em *E. coli* O157:H7 foi realizada por meio da técnica de Maneval.

4.2 Suscetibilidade a antibióticos

O teste de suscetibilidade a antibióticos foi executado de acordo com a metodologia de difusão em discos, visando analisar a resposta da bactéria à ação de diversos antimicrobianos (tabela 2).

Tabela 2 - Suscetibilidade frente a antibióticos da cepa *E. coli* O157:H7.

Antibióticos	Classe dos antibióticos	Halo de Inibição em mm	Resultado do Teste
Amicacina (30 µg)	Aminoglicosídeo	28	Sensível
Amoxicilina/Ácido Clavulânico (30 µg)	Penicilinas	25	Sensível
Ceftazidima (30 µg)	Cefalosporina 3 ^a geração	25	Sensível
Cefotaxima (30 µg)	Cefalosporina 3 ^a geração	37	Sensível
Ciprofloxacina (5 µg)	Fluoroquinolonas	40	Sensível
Gentamicina (10 µg)	Aminoglicosídeo	25	Sensível
Imipenem (10 µg)	Betalactâmico – tienamicinas	22	Intermediário
Levofloxacino (5 µg)	Quinolona	30	Sensível
Sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg)	Sulfonamidas	32	Sensível
Tetraciclina (30 µg)	Tetraciclina	30	Sensível

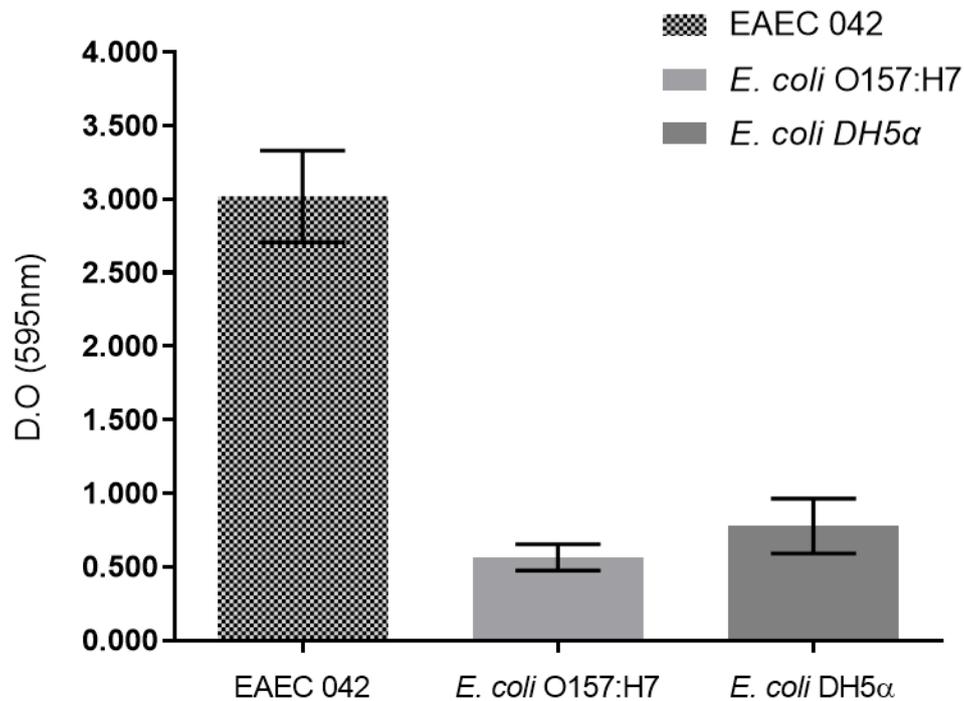
Fonte: próprio autor.

Legenda: Utilizando a metodologia de difusão em discos conforme descrito por Kirby-Bauer, procedeu-se à análise da sensibilidade ou resistência da cepa de *E. coli* O157:H7.

4.3 Formação de biofilme

A cepa *E. coli* O157:H7 foi testada para avaliar sua capacidade de formação de biofilme. Os resultados demonstraram que a bactéria não é produtora de biofilme (figura 8).

Figura 8 - Identificação da capacidade de formação de biofilme pela *E. coli* O157:H7.



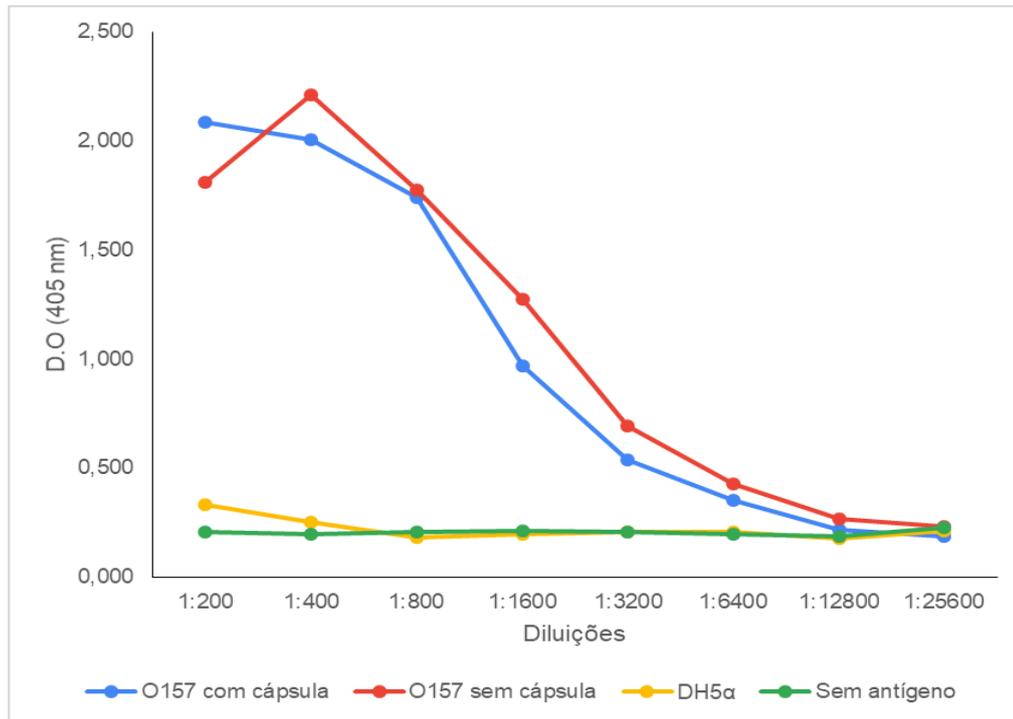
Fonte: próprio autor.

Legenda: Para controle negativo foi utilizada a cepa *E. coli* DH5 α e a cepa de *E. coli* O42 (EAEC) para o controle positivo.

4.4 Capacidade dos anticorpos anti-O157 de reconhecerem o polissacarídeo O157.

Os resultados evidenciaram a capacidade dos anticorpos anti-O157 em reconhecer o polissacarídeo O157 através do método de ELISA em bactérias capsuladas e não capsuladas (figura 9). A bactéria *Escherichia coli* DH5 α foi utilizada como controle negativo.

Figura 9 - Reconhecimento do polissacarídeo O157 pelo anticorpo anti-O157.



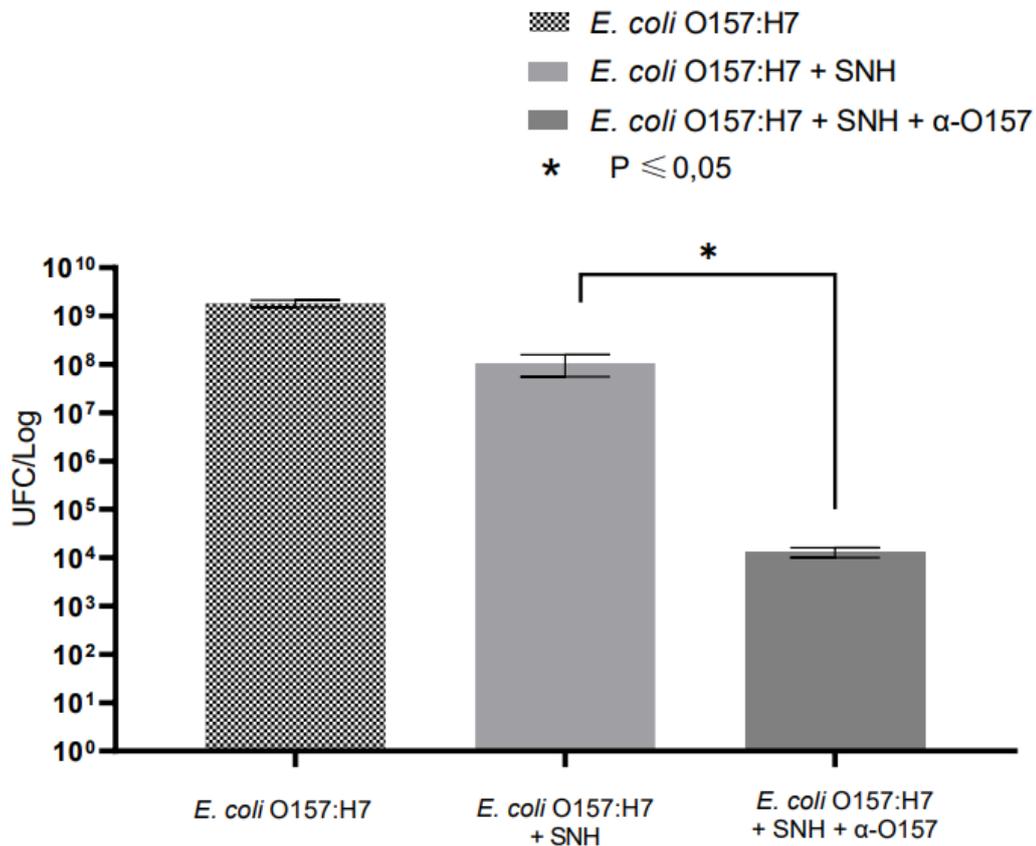
Fonte: próprio autor.

Legenda: O teste de ELISA foi empregado para avaliar a capacidade dos anticorpos anti-O157 em reconhecer *E. coli* O157:H7 (com e sem cápsula). Como controle, utilizou-se *E. coli* DH5-α.

4.5 Influência do anticorpo anti-O157 na resposta do sistema complemento

A influência do anticorpo na lise bacteriana pelo sistema complemento foi examinada através da incubação de amostras bacterianas de *E. coli* O157:H7 na presença de anticorpos contra o polissacarídeo O157 (figura 10).

Figura 10 - A influência do anticorpo anti-O157 na lise bacteriana pelo sistema complemento.



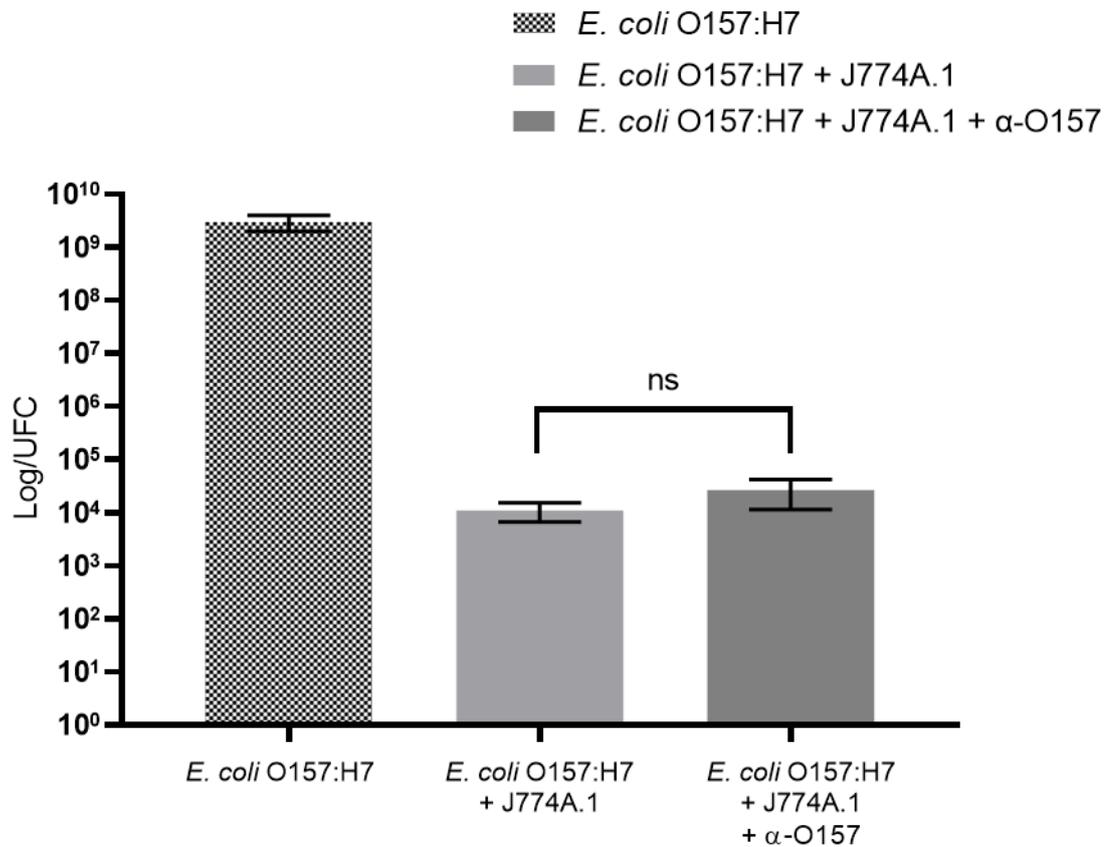
Fonte: próprio autor.

Legenda: A avaliação da lise bacteriana pelo sistema complemento na cepa de *E. coli* O157:H7 ocorreu mediante incubação de amostras bacterianas com anticorpos anti-O157. O soro normal humano (SNH) foi utilizado como fonte de complemento. A eficácia foi determinada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), sendo considerado estatisticamente significativo quando o valor p foi $\leq 0,05$.

4.6 Fagocitose

A avaliação da influência do anticorpo anti-O157 na fagocitose envolveu a incubação de macrófagos J774A.1 com a bactéria. Os resultados demonstraram que tanto na presença quanto na ausência do anticorpo anti-O157 a fagocitose da bactéria mantém-se a mesma (figura 11).

Figura 11 - Influência dos anticorpos anti-O157 na fagocitose.



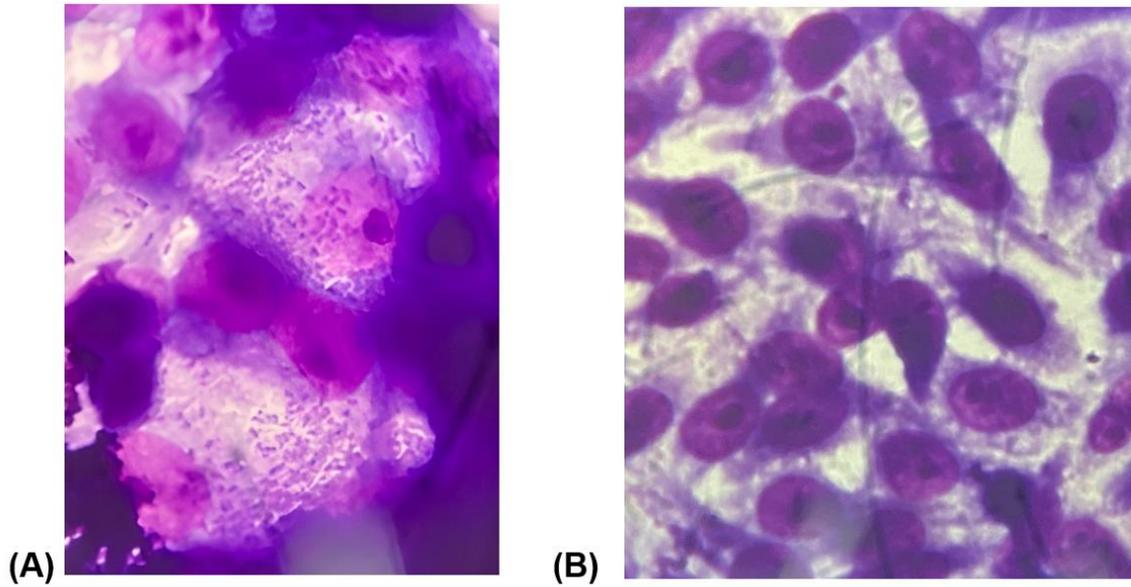
Fonte: próprio autor.

Legenda: Os macrófagos foram incubados com *E. coli* O157:H7, em presença ou ausência de soro contendo anticorpos anti-O157. A quantificação das bactérias fagocitadas foi realizada contando o número de unidades formadoras de colônias (UFC), sendo considerado estatisticamente significativo quando o valor $p \leq 0,05$.

4.7 Inibição de adesão bacteriana em células epiteliais

Os testes de inibição de adesão revelaram que os anticorpos anti-O157 foram capazes de inibir a adesão de *E. coli* O157:H7 às células HEp-2 (figura 12).

Figura 12 - Inibição de adesão de amostras de *E. coli* O157:H7 em células HEp-2.



Fonte: próprio autor.

Legenda: Células epiteliais HEp-2 foram incubadas por 3 horas com a bactéria O157:H7. A amostra bacteriana foi incubada na ausência (A) ou na presença (B) de anticorpos anti-O157.

5 DISCUSSÃO

O uso de antibióticos desempenha um papel crucial no tratamento das infecções causadas pela *Escherichia coli*. Entretanto, é preciso ter cautela ao considerar a utilização desses medicamentos em casos envolvendo cepas produtoras da toxina Shiga, desde que sua utilização pode acarretar um aumento no risco de complicações, como a Síndrome Hemolítico-Urêmica (TOSHIMA *et al.*, 2007).

Este estudo investigou a suscetibilidade da bactéria *E. coli* O157:H7 a diversas classes de antibióticos, como aminoglicosídeos, penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, betalactâmicos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina. A bactéria demonstrou sensibilidade à maioria dessas classes, incluindo aminoglicosídeos e tetraciclina, que atuam na inibição da síntese proteica, sendo algumas das poucas classes que podem ser indicadas no início do tratamento de infecções por cepas produtoras de toxina Shiga (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Contudo, é de extrema importância ressaltar que, mesmo sob essas circunstâncias, o uso de antibióticos é recomendado com ressalvas, dada a associação com riscos significativos relacionados à SHU e outras complicações graves.

A elaboração de uma vacina eficaz contra STEC revela-se um passo importante diante dos desafios apresentados por esse grupo de patógenos. A vacinação específica contra à *E. coli* O157:H7 desempenha um papel vital na contenção da disseminação desse patógeno, sobretudo em regiões endêmicas. Este sorotipo está associado a surtos severos de doenças gastrointestinais, representando uma ameaça significativa à saúde pública (NESTA; PIZZA, 2018).

Portanto, este estudo investigou o potencial do polissacarídeo O157 como antígeno vacinal. Inicialmente, foi examinada a possibilidade da presença da cápsula bacteriana dificultar o reconhecimento do polissacarídeo pelos anticorpos, uma vez que ela atua como uma barreira de proteção (WHITFIELD; C, 2006). Contudo, os resultados revelaram que os anticorpos efetivamente identificaram a bactéria, mesmo na presença da cápsula.

Os resultados não apenas demonstraram a eficácia do reconhecimento imunológico mesmo na presença da cápsula bacteriana, mas também evidenciaram que os anticorpos desempenham um papel fundamental em diversas frentes. Observou-se que os anticorpos contribuíram para a lise bacteriana e colaboraram na

inibição da adesão bacteriana às células epiteliais, um passo importante no processo de colonização que precede a infecção.

Todavia, não houve influência dos anticorpos na fagocitose. Os anticorpos utilizados nesse estudo são industrializados, desta maneira é possível sugerir que a presença de componentes exógenos que podem ter interferido nas células, prejudicando a fagocitose. No entanto, são necessários estudos adicionais para confirmar essa possibilidade.

Em resumo, os resultados desta pesquisa indicam que o polissacarídeo O157 apresenta-se como um possível candidato a antígeno vacinal. Sua capacidade de gerar anticorpos capazes de reconhecerem a bactéria, mesmo na presença da cápsula bacteriana, aliada à sua eficácia em diversas etapas do processo imunológico, o coloca como uma opção promissora para servir como antígeno no desenvolvimento de vacinas contra E. coli pertencentes ao sorotipo O157:H7.

6 CONCLUSÕES

Em síntese, este estudo buscou avaliar o potencial do polissacarídeo O157 como um candidato promissor para antígeno vacinal contra a *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC).

Frente aos resultados apresentados, destacamos a influência positiva dos anticorpos anti-O157 na lise bacteriana, evidenciando sua contribuição para a resposta imunológica. Além disso, observamos a capacidade destes anticorpos em interferir na adesão bacteriana em células epiteliais. Tais resultados não apenas corroboram a viabilidade do polissacarídeo O157 como um possível candidato à antígeno vacinal, mas também ressaltam sua eficácia em diferentes fases do processo imunológico.

No entanto, é vital ressaltar a necessidade de conduzir pesquisas adicionais e estudos mais aprofundados com o intuito de aprimorar ainda mais nossa compreensão e, portanto, impulsionar o desenvolvimento de uma vacina abrangente e eficaz contra esse patógeno, promovendo uma contribuição significativa para a saúde pública.

REFERÊNCIAS¹

AKHONDI, H.; SIMONSEN, K. A. Bacterial Diarrhea. **StatPearls Publishing**, 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551643/>>. Acesso em: 13 nov. 2023.

ALI, S. H. A socio-ecological autopsy of the E. coli O157:H7 outbreak in Walkerton, Ontario, Canada. **Social Science & Medicine**, vol. 58, nº 12, 2601–612, 2004.

BARON, F. *et al.* Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of conventional plate-counting technique. **Lait INRA Ed**, vol. 86, p. 251-57, 2006.

BECK, N. K. *et al.* Development of a Spot-Titer Culture assay for Quantifying bacteria and viral. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, vol. 17, p. 455-64, 2009.

FRANK, C. *et al.* Large and ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome, Germany, May 2011. **Euro Surveill**, vol. 16, nº 21, p. 19878, maio. 2011.

GOMES, T. A. T. *et al.* Diarrheagenic Escherichia coli. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 47, nº 1, p. 3-30, dez. 2016.

GUIMARÃES, D. O; MOMESSO, L. S; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, vol. 33, nº 3, p. 667–79, 2010.

ISIDEAN, S. D. *et al.* A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine**, vol. 29, nº 37, p. 6167–78, ago. 2011.

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

KAPER, J. B. *et al.* Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews. Microbiology**, vol. 2, n° 2, p. 123-40, fev. 2004.

KIM, J. S. *et al.* Recent Updates on Outbreaks of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli and Its Potential Reservoirs. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 10, p. 273, 2020.

MASLOWSKA, K. H. *et al.* The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, vol. 60, n° 4, p. 368-84, maio. 2019.

MEAD, P. S.; GRIFFIN, P. M. Escherichia coli O157:H7. **The Lancet**, vol. 352, n° 9135, p. 1207–12, out. 1998

MICHINO H. *et al.* Massive outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. **The American Journal of Epidemiology**, vol. 150, n° 8, p. 787-96, out. 1999.

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

NESTA, B; PIZZA, M. Vaccines Against Escherichia coli. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, vol. 416, p. 213-42, 2018.

OCHOA, T. J.; CONTRERAS, C. A. Enteropathogenic E. coli (EPEC) infection in children. **Current Opinion in Infectious Diseases**, vol. 24, n° 5, p. 478–83, out. 2011.

PEARSON, J. S. *et al.* The Genetics of Enteropathogenic Escherichia coli Virulence. **The Annual Review of Genetics**, vol. 50, p. 493-513, nov. 2016.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of human diffusely adhering Escherichia coli expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, vol. 27, n° 4, p. 823-69, 2014.

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**, vol. 11, nº 8, p. 895, ago. 2022.

TARR, P. I.; NEILL, M. A. Escherichia coli O157:H7. **Gastroenterology Clinics of North America**, vol. 30, nº 3, p. 735-51, set. 2001.

TOSHIMA, H. *et al.* Enhancement of Shiga toxin production in enterohemorrhagic Escherichia coli serotype O157:H7 by DNase colicins. **Applied and Environmental Microbiology Journal**, vol. 73, nº 23, p. 7582-8, dez. 2007.

TUTTLE J. *et al.* Lessons from a large outbreak of Escherichia coli O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. **Epidemiology and Infection**, vol. 122, nº 2, p. 185-92, abr. 1999.

UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND. Diarrhoea. UNICEF, 2021. Disponível em: <<https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoealdisease>>. Acesso em: 29 out. 2023.

VAN DEN BELD, M. J. C.; REUBSAET, F. A. G. Differentiation between Shigella, Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) and Noninvasive Escherichia coli. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, vol. 31, nº 6, p. 899–904, jun. 2012.

VASCONCELLOS, F. M. Padrão de adesão agregativa e formação de biofilme em Escherichia coli enteroagregativa típica e atípica: papel da proteína Shf. **Universidade de São Paulo**. 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/D.42.2009.tde-28102009-083025>>. Acesso em: 13 nov. 2023.

WHITFIELD, C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in Escherichia coli. **The Annual Review of Biochemistry**, vol. 75, p. 39-68, 2006.

YAMAMOTO, B. B. Análise do perfil de expressão, produção e secreção das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) em isolados de Escherichia coli enterotoxigênica.

2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.11606/D.42.2017.tde-08052017-135148>>. Acesso em: 13 nov. 2023.