

GABRIELLE RIBEIRO DE ANDRADE

**RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR UMA VACINA CONJUGADA CONTRA
Escherichia coli DIARREIOGÊNICAS PERTENCENTES AO SOROGRUPO O111**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dra. Marta de Oliveira Domingos

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

RESUMO

ANDRADE, G. R. **Resposta imune induzida por uma vacina conjugada contra *Escherichia coli* diarreio gênicas pertencentes ai sorogrupo O111**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

E. coli pertencentes ao sorogrupo O111 incluem bactérias que possuem diferentes mecanismos de virulência entre si que são responsáveis por gastroenterites, surtos de diarreia com sangue e síndrome hemolítico-urêmica em países desenvolvidos. Por causa da sua variabilidade fenotípica, uma vacina contra estes patógenos deve ter como alvo um antígeno comum a todos eles, como a molécula de LPS que demonstrou ser em resultados anteriores um excelente candidato a antígeno. No entanto, devido à sua toxicidade, sua utilização em humanos é proibida. Para solucionar este problema, o LPS O111 detoxificado foi conjugado ao citocromo c ou a molécula recombinante EtxB como proteínas carreadoras. O conjugado O111-citocromo foi incorporado em sílica SBA-15 como adjuvante e administrado pela via subcutânea em coelhos, enquanto que o conjugado O111- EtxB foi incorporado em Vaxcine™ (veículo oral à base de óleo) e administrado em camundongos por gavagem. Os resultados mostraram que na presença de nanopartículas de sílica SBA-15, o conjugado O111-citocromo c gerou anticorpos em coelhos até um ano após a imunização. Tais anticorpos foram capazes de reconhecer e inibir a adesão a células epiteliais humanas de todas as categorias de *E. coli* O111, mas não de bactérias pertencentes a um sorogrupo não relacionado. Além disso, o título dos anticorpos foi comparável aos obtidos pela imunização com a bactéria formalinizada ou o extrato bruto de LPS. Os camundongos imunizados por via oral com o conjugado O111-EtxB incorporado em Vaxcine™ foram capazes de gerar resposta imune sistêmica e de mucosa contra todas as categorias de *E. coli* O111. Em resumo, os resultados apresentados neste trabalho, indicam que uma vacina conjugada oral que tenha como alvo o antígeno O111 tem o potencial de prevenir diarreia causada por cepas de *E. coli* O111, independente do mecanismo de virulência das mesmas..

Palavras-chave: *E. coli*. Polissacarídeo O111. Diarreia. Vacina conjugada.

ABSTRACT

ANDRADE, G. R. **Immune response induced by a conjugated vaccine against diarrheagenic *Escherichia coli* belonging to serogroup O111.** 2013. 75 p. Masters thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The *E. coli* O111 serogroup includes strains with different virulence factors that are responsible for enteritis throughout the world, and for outbreaks of blood diarrhea and hemolytic uremic syndrome in developed countries. Because of their phenotypic variability, a vaccine against these strains has to target an antigen that is common to all of them, and previous results have shown that LPS is such a candidate. However, because of its toxicity, its use in humans is forbidden. To overcome this problem, O111 LPS was detoxified, and then conjugated either to cytochrome c or EtxB as carrier protein. The O111- cytochrome c conjugate was incorporated in silica SBA-15 nanoparticles and administered subcutaneously in rabbits, while the O111-EtxB conjugate was incorporated in Vaxcine™, an oil-based oral delivery system, and administered to mice by gavage. The results show that in the presence of SBA-15 nanoparticles, the O111-cytochrome c conjugate was able to generate antibodies in rabbits, one year after immunization, which could recognize, aggregate and inhibit the adhesion to human epithelial cells of all categories of O111 *E. coli*, but not an unrelated serogroup. In addition, the titre of these antibodies was comparable to those generate by immunization with whole formalinized bacteria or crude LPS extract. Mice immunized orally with O111-EtxB conjugate incorporated in Vaxcine™ generated systemic and mucosal antibody responses against all categories of O111 *E. coli*. In summary, the results presented in this work indicate that an oral conjugated vaccine that targets the O111 antigen has the potencial to prevent diarrhea by O111 *E. coli* strains, regardless their mechanism of virulence.

Keywords: *E. coli*. Polysaccharide O111. Diarrhea. Conjugated vaccine.

1.1 INTRODUÇÃO

1.2 Diarreia: impacto socioeconômico

Anualmente, 1,7 bilhões de casos de diarreia são relatados em todo o mundo, sendo o índice de mortalidade infantil entre eles muito elevado (UNITED NATIONS CHILDREN'S FUND; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). 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 800 mil óbitos por ano (UNICEF; WHO, 2009; WHO, 2013).

Apesar do saneamento básico poder reduzir significativamente os casos de diarreia, estudos epidemiológicos demonstraram que 2,5 bilhões de pessoas não têm acesso a esgotamento sanitário devido ao alto custo financeiro gerado para sua implantação, que é estimado em 10 bilhões de dólares anuais ao longo de duas décadas (PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO, 2006; UNICEF, 2012).

Com o intuito de solucionar o problema de saneamento no Brasil, foi estabelecido como uma das metas do projeto Milênio (série de metas socioeconômicas estabelecidas por países da ONU em 2000) proporcionar esgotamento sanitário a 68 % da população brasileira até 2015. No entanto, uma pesquisa solicitada pelo Ministério das Cidades apontou que, mantida a atual tendência, o Brasil dificilmente conseguirá atingir essa meta no prazo determinado. Segundo esse estudo, a probabilidade de que 141 milhões (68%) de brasileiros tenham acesso à rede de esgotos até 2015 é de apenas 30 % (PNUD, 2008).

Apesar disso, as melhorias efetuadas nas condições de saneamento básico, juntamente com outras medidas como: campanhas de aleitamento materno, reidratação oral e redução dos níveis de pobreza absoluta no país contribuíram para o gradual declínio do número anual de morte infantil por diarreia no país (VICTORA, 2009).

1.2 Agentes etiológicos responsáveis por diarreia

Os principais patógenos responsáveis por diarreia em âmbito global são: rotavirus, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* e *Shigella*. Alguns protozoários como *Cryptosporidium*, *Giardia* e *Entamoeba histolytica* também podem causar diarreia, porém a incidência é menor que a induzida por bactérias e vírus (WHO, 2009). A frequência desses patógenos varia epidemiologicamente, sendo o rotavirus o agente etiológico mais isolado (CDC, 2011). No entanto, estudos realizados no Brasil, México e África do Sul demonstraram que *E. coli* é responsável por 30 a 40 % dos casos de diarreia infantil, sendo que em alguns lugares, suplantam em frequência nos demais agentes etiológicos, incluindo o rotavirus (NATARO; KAPER, 1998). *E. coli* diarreiogênicas também são os patógenos mais encontrados em episódios de diarreia do viajante, sendo responsáveis por até 60 % das ocorrências (WAGNER; WIEDERMANN, 2009).

Apesar do transtorno causado por algumas espécies de *E. coli*, a maior parte dessas bactérias fazem parte da microbiota intestinal normal do homem e de outros animais, onde mantém uma relação comensal de benefício mútuo com o hospedeiro (SANTOS et al., 2009). Todavia devido à presença de uma combinação muito bem sucedida de vários fatores de virulência, algumas linhagens tornaram-se patogênicas e, portanto, capazes de causar infecção em indivíduos sadios (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Devido a grande variabilidade genética e fenotípica encontrada em *E. coli* patogênicas, elas foram classificadas de acordo com o sítio de infecção em dois grupos: *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) e *E. coli* diarreiogênicas (DEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000). 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 DEC, diferentemente das ExPEC, são responsáveis por diarreia e agrupadas em seis categorias de acordo com os seguintes fatores: tipo de mecanismo de virulência, síndromes clínicas que causam, aspectos epidemiológicos e/ou padrão de adesão a células epiteliais HEp-2, sendo esses adesão localizada

(AL), adesão agregativa (AA), adesão localizada- *like* (ALL) e adesão difusa (AD) (SACALETSKY et al., 1999).

1.3 *Escherichia coli* diarreio gênicas

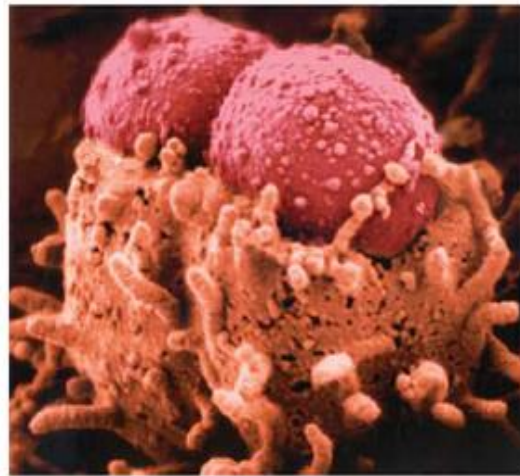
As categorias de DEC foram nomeadas da seguinte maneira: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC) e *E. coli* que apresentam padrão de adesão difuso em células epiteliais (DAEC) (NATARO; KAPER, 1998). As principais características de cada categoria estão descritas a seguir.

1.3.1 *E. coli* enteropatogênica (EPEC)

EPEC são as principais responsáveis por diarreia em crianças menores de dois anos em países em desenvolvimento, (OCHOA et al., 2008). Essas bactérias são caracterizadas pela formação da lesão *attaching and effacing* (A/E), que resulta na aderência íntima da bactéria ao epitélio intestinal promovendo a destruição das microvilosidades dos enterócitos e o rearranjo das proteínas do citoesqueleto, o que leva a formação de um pedestal no local da adesão (MOON et al., 1983).

As proteínas envolvidas na formação da lesão A/E (Figura 1) são produzidas pelo sistema de secreção do tipo III (SST3) codificado por genes localizados em uma ilha de patogenicidade denominada região LEE (*locus of enterocyte effacement*) situada no cromossomo bacteriano (McDANIEL et al., 1995).

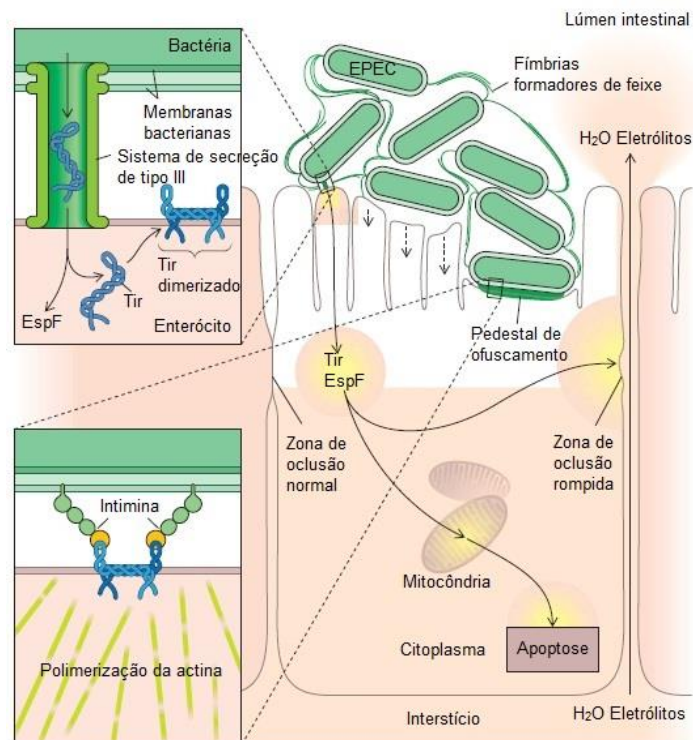
Figura 1- Lesão *attaching and effacing* causada por EPEC.



Fonte: (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

O processo de patogênese dessas bactérias pode ser dividido em quatro etapas: primeiramente ocorre a adesão à célula hospedeira mediada por fímbria e flagelo, seguida pela produção e translocação de proteínas bacterianas através do SST3. No terceiro estágio ocorre a adesão íntima da bactéria ao enterócito através da interação das proteínas intimina (adesina presente na membrana externa da bactéria) e Tir (receptor da intimina, translocado da bactéria para a superfície das células epiteliais). Esse processo resulta no acúmulo de actina e outros componentes do citoesqueleto no local da adesão, levando a alterações celulares que culminam na formação de um pedestal na membrana do enterócito, no local onde a EPEC se encontra aderida (CLARKE et al., 2003; GOMES; GONZÁLEZ-PEDRAJO, 2010) (Figura 2).

Figura 2- Mecanismo de patogenicidade de EPEC.



Fonte: (DONNENBERG, 2010).

EPEC são divididas em duas subcategorias, EPEC típicas e EPEC atípicas. A diferença entre esses dois subgrupos é a presença nas EPEC típicas do plasmídeo EAF (*EPEC adherence factor*), que codifica a fímbria BFP (*bundle forming pilus*) e a expressão dessa fímbria, cujo fenótipo é evidenciado pelo padrão de adesão AL em células HEP-2 (ABE et al., 2009).

EPEC típicas foram até meados de 90 as principais responsáveis por diarreia persistente em crianças menores de dois anos de idade nos países em desenvolvimento, todavia, na última década, o número de casos de diarreia causado por EPEC típicas diminuiu drasticamente e foi suplantado por EPEC atípicas tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (WILLIAMS; TORRES; LLOYD, 2010). Outra diferença entre essas duas subcategorias de EPEC é o fato de EPEC típicas serem espécies específicas tendo sido isoladas até hoje somente em humanos. EPEC atípicas, por sua vez, podem ser encontradas no homem e em diversos animais como cães, gatos e aves (SILVA; SILVA, 2005).

1.3.2 *E. coli* produtoras da toxina de Shiga (STEC)

Essas bactérias estão associadas a graves doenças humanas como colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (SHU) atribuídas à produção de toxinas do tipo Shiga por esses patógenos (GYLES, 2007). As toxinas do tipo Shiga podem ser classificadas como Stx1 e Stx2. Quanto a estrutura, essas toxinas possuem 56.8 % de homologia, todavia, Stx2 é cerca de 100 a 400 vezes mais potente e associada ao desenvolvimento de SHU e ao agravamento da doença (GALLEGOS et al., 2012). Ambas são toxinas do tipo AB₅, portanto, compostas por uma subunidade A (35 kDa) e 5 subunidades B (7,5 kDa cada). A subunidade A é clivada em A1 (que possui atividade enzimática) e A2 (que liga a subunidade A à subunidade B) (GYLES, 2007).

A subunidade A, parte tóxica da molécula, inibe a síntese de proteínas do hospedeiro e induz apoptose, enquanto a subunidade B é responsável pela ligação da toxina ao receptor de globotriasilceramida (Gb₃) presente na superfície de células eucarióticas (NGUYEN; SPERANDIO, 2012). Os genes que codificam as toxinas Shiga estão localizados no genoma de bacteriófagos lisogênicos integrados no cromossoma bacteriano. Um isolado de STEC pode produzir Stx1, Stx2 ou ambas toxinas (SCHEUTZ et al., 2001).

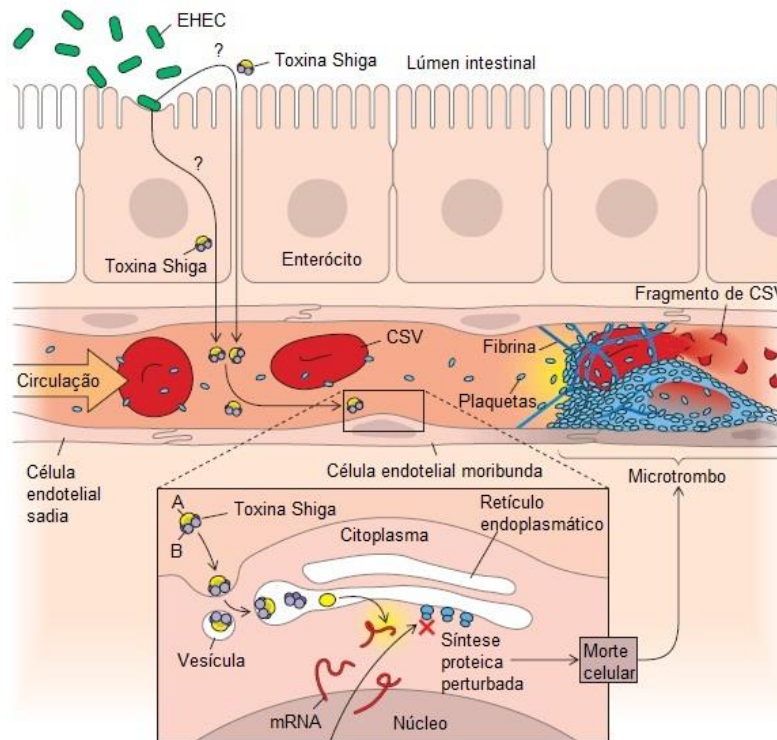
As toxinas Shiga atravessam as monocamadas epiteliais intestinais, e se disseminam através da circulação sanguínea até encontrar o alvo que são as células endoteliais. Após se ligarem ao receptor glicolipídico dessas células, as toxinas são transportadas em vesículas até o retículo endoplasmático. A célula endotelial alterada pela toxina atua então como um ninho de ativação para a cascata de coagulação, o que pode resultar no desenvolvimento de SHU (Figura 3) (DONNENBERG, 2010).

Existe um subgrupo de STEC denominado EHEC (*Escherichia coli* enteroemorrágica) cuja característica diferencial é a presença da região LEE no cromossomo bacteriano ausente nas outras linhagens de STEC. Devido à presença da região LEE as EHEC assim como demonstrado anteriormente para EPEC também são capazes de induzir a formação da lesão A/E pelo sistema de secreção do tipo III (GUTH et al., 2010; OHLAND et al., 2012).

A infecção humana se dá pela ingestão de alimentos e água contaminados. Sendo o gado o principal reservatório dessa categoria, diarreias causadas por STEC

também estão associadas ao consumo de carne, leite e derivados (CAPRIOLI et al., 2005).

Figura 3- Mecanismo de ação das toxinas de shiga.



Fonte: (DONNENBERG, 2010).

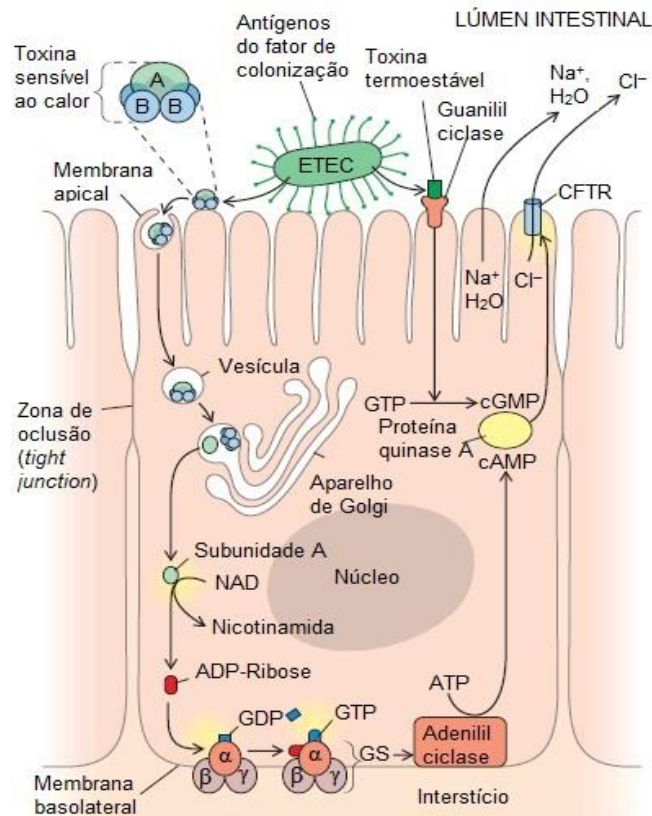
1.3.3 *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)

ETEC são as bactérias mais isoladas em crianças menores de cinco anos em países em desenvolvimento, sendo responsável por cerca de 200 milhões de casos de diarreia por ano (FLORES; OKHUYSEN, 2010; ISIDEAN et al., 2011). *E. coli* enterotoxigênicas também acometem adultos, sendo os principais agentes etiológicos responsáveis pela diarreia dos viajantes em países emergentes (QADRI et al., 2005).

A diarreia causada por ETEC é mediada pela secreção das toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST), ou a combinação das mesmas. ST é uma pequena toxina que se liga ao receptor guanilato ciclase dos enterócitos e estimula sua atividade, o

que gera o aumento dos níveis de GMPc que altera o fluxo eletrolítico da célula com a inibição de absorção de sódio e estímulo de cloretos e conseqüentemente diarreia (CLEMENTS et al., 2012; GIANNELA, 1995) (Figura 4).

Figura 4- Mecanismo de patogenicidade de ETEC.



Fonte: (DONNENBERG, 2010).

A toxina LT é semelhante à toxina da cólera. Ela é classificada como AB₅, sendo composta por uma subunidade A, parte tóxica da molécula e 5 subunidades B que em sua forma pentamérica interagem fortemente com os receptores GM1 (monogangliosídeo) da célula hospedeira e fracamente com diversos glicoesfingolipídios (GDE1b, GD1a, dentre outros) e algumas glicoproteínas. Ao se ligar no receptor, a toxina LT é internalizada por endocitose, ocorrendo assim à dissociação das subunidades A e B, o que leva ao aumento do AMP cíclico resultando em diarreia (HAAN; HIRST, 2004; TENBERG et al., 1994). (Figura 4).

Existem dois tipos de toxina termolábel, a LTI geralmente isolada em humanos e a LTII, mais frequente em animais (CLEMENTS et al., 2012). LTI

apresentam 75 % e 77% de homologia com a toxina CT entre as subunidades A e B. As toxinas LTII, apesar de possuírem a mesma atividade biológica que LTI, não apresentam reação imunológica cruzada.

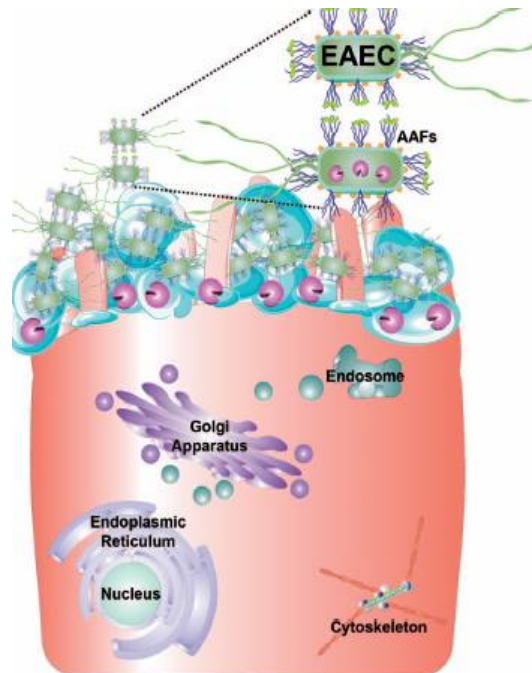
1.3.4 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC são responsáveis por surtos de diarreia infantil em países em desenvolvimento e surtos de origem alimentar em países desenvolvidos (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011). Estes patógenos também são a segunda causa de diarreia do viajante nos Estados Unidos da América (KAUR et al., 2010).

Uma das características desses patógenos é o padrão de adesão do tipo agregativo (AA) a células epiteliais humanas (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A patogênese de EAEC envolve três etapas: aderência à mucosa intestinal através de fímbrias e fatores de adesão, seguida por aumento da produção de muco na superfície do enterócito, formação de biofilme e a liberação de toxinas o que resulta em diarreia (WEINTRAUB, 2007) (Figura 5).

As cepas de EAEC produzem uma variedade de SPATEs (Serino- proteases autotransportadoras de *Enterobacteriaceae*) classificadas em classe I ou citotóxicas e classe II, não citotóxicas. Como exemplo de classe I temos Pet (toxina mediada por plasmídeos) que cliva a ligação da actina à espectrina no citosol do hospedeiro causando arredondamento celular. Como SPATE da classe II temos Pic (proteína envolvida na colonização) que auxilia a penetração da bactéria na camada de muco. Outras toxinas como EAST-1 (Toxina termoestável de EAEC), ShET1 (Enterotoxina 1 de *Shigella*) e HlyE (Hemolisina E) também podem ser produzidas por EAEC (CLEMENTS et al., 2012).

Figura 5- Mecanismo de patogenicidade de EAEC.



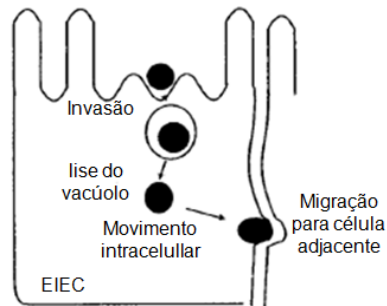
Fonte: (NAVARRO-GARCIA; ELIAS, 2011).

1.3.5 *E. coli* enteroinvasora (EIEC)

EIEC tal como *Shigella* sp., são capazes de invadir e se multiplicar em células epiteliais intestinais causando colite inflamatória e disenteria (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004), no entanto a doença causada por EIEC é menos severa comparada à causada por *Shigella*, o que pode estar relacionado com o baixo nível de expressão de fatores de virulência de EIEC (PARSOT, 2005).

O mecanismo de patogênese da EIEC consiste na invasão da mucosa intestinal através da fagocitose desses patógenos pelos enterócitos, seguida por rompimento do vacúolo e proliferação no citoplasma com subsequente passagem para as células adjacentes (PARSOT, 2005) (Figura 6).

Figura 6- Mecanismo de patogenicidade de EIEC.



Fonte: (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.3.6 *E. coli* com padrão de adesão difuso (DAEC)

DAEC são amostras de *E. coli* que aderem de forma difusa em células epiteliais HEp-2 e HeLa, devido a ação de adesinas fimbriais e afimbriais. Essas adesinas se ligam aos enterócitos resultando no aumento de microvilosidades ao redor do local de fixação da bactéria (CLEMENTS et al., 2012). Essas bactérias podem interagir com neutrófilos que são induzidos a sofrer apoptose, o que prolonga a persistência da bactéria no intestino. DAEC acometem principalmente crianças entre 18 meses e 5 anos de idade onde colonizam o intestino delgado (CROXEN; FINLAY, 2010). O único fator de secreção descrito em infecções causadas por DAEC é a SPATE Sat (toxina autotransportadora), que altera as junções celulares das células epiteliais intestinais (DAUTIN, 2010).

Apesar da grande diferença encontrada entre as categorias de *E. coli* diarreiogênicas, alguns sorogrupos podem ser encontrados em duas ou mais categorias, por exemplo, *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 podem ser caracterizadas como EPEC, STEC e EAEC (CAMPOS et al., 1994; CAMPOS; FRANZOLIN; TRABULSI, 2004).

A importância desse sorogrupo é muito vasta em termos socioeconômicos desde que *E. coli* pertencentes a ele são responsáveis entre si por um alto índice de morte infantil por diarreia em regiões endêmicas e surtos de diarreia com sangue e SHU em países desenvolvidos (CALIN et al., 2013; ELLIOT et al., 2001; GERBER et al., 2002; GYLES, 2007; KATO et al., 2005; MORABITO et al., 1998; WIGHT et al., 2007).

Devido à importância clínica e epidemiológica das *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111, mais detalhes sobre esses patógenos, alvo desse projeto, estão descritos a seguir.

1.4 Sorogrupo O111- epidemiologia

E. coli pertencentes ao sorogrupo O111 são a segunda causa de SHU nos Estados Unidos (BROOKS et al., 2004). Surtos de diarreia com sangue e SHU causados por esses patógenos podem ser muito graves como o que ocorreu em 2008 em Oklahoma onde causaram diarreia em 341 pessoas sendo que dessas, 70 foram hospitalizadas, 17 desenvolveram SHU e uma morreu (CALDERON et al., 2010). Em 2011 no Japão, *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 foram responsáveis por um surto de diarreia com sangue e SHU onde 56 pessoas ficaram doentes e quatro morreram (FSN, 2011).

E. coli O111 também são consideradas patógenos emergentes devido ao surgimento, de novas linhagens patogênicas dentro desse sorogrupo. Um bom exemplo de *E. coli* O111 emergente pode ser ilustrado pelo surto ocorrido em 1996 em Picardy, França, onde um clone de *E. coli* O111 foi responsável pelo desenvolvimento de SHU em 10 crianças. A característica desse clone emergente foi verificada por sua capacidade de produzir toxinas de Shiga, característica de STEC, e apresentar marcadores genéticos e padrão de adesão do tipo AA de EAEC. Em acréscimo, esse clone não apresentava marcadores genéticos da região LEE, característico de EHEC, que é um subgrupo de STEC responsável pela maioria dos surtos de diarreia e SHU em países desenvolvidos. (MORABITO et al., 1998). Esse mesmo fenômeno foi observado no clone de *E. coli* responsável pelo surto ocorrido em 2011 na Europa, onde uma EAEC O104:H recebeu através de transmissão horizontal, genes para produção de toxinas shiga, característica de STEC. Esse surto resultou em 852 casos de SHU e 32 mortes somente na Alemanha (BIELASZEWSKA et al., 2011).

Além disso, tem sido observado nos últimos anos um grande aumento na prevalência de clones emergentes altamente virulentos de *E. coli* O111 de origem aviária. Tal fato resulta em sérias implicações na saúde pública desde que *E. coli* O111 de aves e gado são patógenos zoonóticos podendo, assim, infectar humanos (JOHNSON et al., 2008; MORA et al., 2009, 2010; MOULIN-SCHOULEUR et al.,

2006, 2007;). Essa situação torna-se ainda mais crítica devido a capacidade desses patógenos de sobreviver no meio ambiente por até 8 semanas entre temperaturas de 5 °C a 25 °C. Resultados obtidos no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan também demonstraram que *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 provenientes de cães e gatos formam biofilme em superfícies abióticas principalmente em temperaturas ambiente (aproximadamente 26 °C) (Resultados em fase de submissão, 2013). Esses dados indicam que essas bactérias possuem mecanismos de proteção contra adversidades ambientais, (FUKUSHIMA et al., 1999).

Apesar da grande importância socioeconômica das *E.coli* pertencentes ao sorogrupo O111, não existe disponível no mercado qualquer vacina contra esses patógenos (BROOKS et al., 2004; GOMES et al., 1991; FRANZOLIN et al, 2005; FSN, 2011; ROSA et al., 1998; SPANO et al., 2008; TOLEDO et al., 1983; TRABULSI et al., 1985; VAZ et al., 2004).

Todavia, a formulação de uma vacina contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111 não é uma tarefa fácil devido à grande variedade genética e fenotípica existente entre as linhagens pertencentes a esse sorogrupo. Deste modo, independente do mecanismo de virulência das cepas de *E. coli* O111, a vacina contra estes patógenos deve ter como alvo um antígeno que esteja presente em todas elas.

Resultados obtidos no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan mostraram que anticorpos contra o polissacarídeo O111 foram capazes de inibir a adesão de todas as categorias de *E. coli* pertencentes a esse sorogrupo. Em acréscimo, esses anticorpos também aumentaram a fagocitose de *E. coli* O111 por macrófagos na presença de complemento (SANTOS et al., 2010). Esses resultados indicam que o polissacarídeo O111 é um bom candidato a antígeno para formulação de uma vacina contra todas as cepas de *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111.

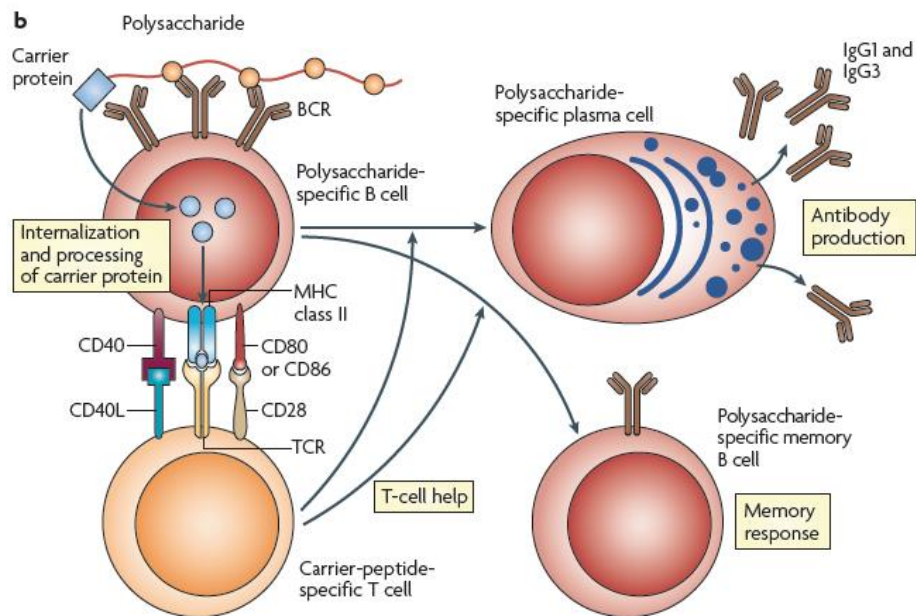
Todavia, polissacarídeos O111 são antígenos Típo independente do tipo II e, portanto, não induzem altos níveis de anticorpos ou memória imunológica em crianças menores de 2 anos de idade, cuja maior parte dos linfócitos B são imaturos (POLLARD; PERRET; BEVERLY, 2009). Para induzir altos níveis de anticorpos e memória imunológica em crianças é necessário conjugar o polissacarídeo a uma proteína carreadora, processo utilizado em vacinas conjugadas.

1.5 Resposta imune contra polissacarídeos- vacina conjugada

Para obtenção de anticorpos contra polissacarídeos, as vacinas conjugadas foram elegantemente construídas com base no mecanismo imunológico de cooperação entre linfócitos T e B. Para que isso ocorra é necessário construir um conjugado, ligando o polissacarídeo a uma proteína (FRASCH, 2009).

O processo de cooperação entre linfócitos T e B ocorre da seguinte forma: primeiramente o linfócito B reconhece o polissacarídeo da molécula conjugada através de suas imunoglobulinas de membrana que são seus receptores de antígeno. A molécula conjugada inteira é endocitada, processada nas vesículas celulares onde fragmentos peptídicos da proteína carreadora (ou seja, da proteína conjugada ao polissacarídeo) são associados às moléculas de MHC da classe II, formando um complexo que é exposto na superfície da célula B. O linfócito B então apresenta através do complexo de MHC da classe II os fragmentos peptídicos às células T auxiliares, específicas para a proteína carreadora. Ao reconhecer o fragmento peptídico da proteína carreadora, a célula T induz a ativação e a diferenciação das células B imaturas tornando-as células imuno-competentes capazes de produzir anticorpos protetores contra polissacarídeos (Figura 7) (DAGAN; POOLMAN; SIEGRIST, 2010).

Figura 7- Mecanismo de cooperação entre linfócitos T e B em uma vacina conjugada.



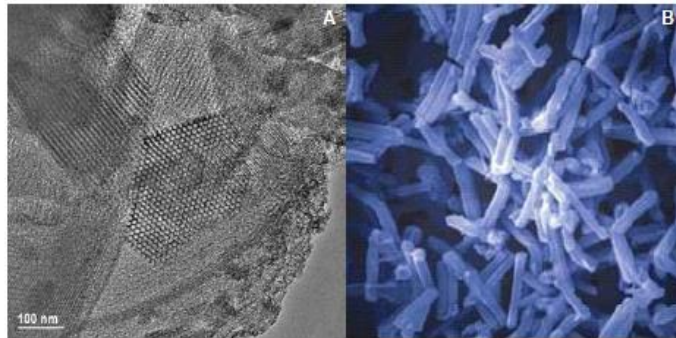
Fonte: (POLLARD; PERRET; BEVERLY, 2009).

No entanto, polissacarídeos mesmo quando conjugados a uma proteína carreadora não induzem resposta imune eficaz sem o auxílio de um adjuvante. O hidróxido de alumínio é o adjuvante mais utilizado na rotina médica, porém com antígenos polissacarídicos, esse adjuvante é pouco eficiente (GONZÁLEZ et al., 2008; LINDBLAD, 1995). Por essa razão, estudos vêm sendo realizados a fim de encontrar um adjuvante que seja capaz de aumentar a resposta de anticorpos induzida por vacinas conjugadas para recém-nascidos.

Desde que diferentes tipos de componentes têm sido utilizados na fabricação de adjuvantes, como por exemplo, partículas de sílica, partículas oleosas, proteínas recombinantes, o tamanho, porosidade, material e as propriedades do adjuvante devem ser levados em consideração na escolha do processo de formulação da vacina.

Um dos adjuvantes que têm demonstrado possuir propriedades imunomodulatórias, capacidade de aumentar a expressão de moléculas coestimuladoras na superfície das células apresentadoras de antígenos e aumentar a fagocitose de partículas por macrófagos, são as partículas mesopórosas de sílica SBA-15 (figura 8).

Figura 8- Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) da sílica mesoporosa nanoestruturada SBA-15.



(A) Estrutura de poros arranjados hexagonalmente. (B) interior dos poros interconectados. Tamanho médio da partícula: 30 μm . Tamanho dos poros: 3,1 – 6 nm.
Fonte: (SCARAMUZZI et al., 2011).

O potencial adjuvante da sílica já foi verificado com diferentes antígenos, como a proteína 1 β de *E.coli*, proteínas do veneno da serpente *Micrurus ibiboboca* e a proteína BSA, em que a sílica foi capaz de induzir imunidade duradoura em camundongos isogênicos e geneticamente modificados (CARVALHO et al., 2010; MERCURI et al., 2006).

Outro fator a ser considerado é a via de administração a ser utilizada. No caso de patógenos entéricos, a melhor maneira para se administrar uma vacina é a via oral, devido aos seguintes fatores: menor custo de produção, dispensa a utilização de agulhas e pessoal especializado para sua administração, além de ser de fácil distribuição em áreas endêmicas localizadas em regiões geográficas de difícil acesso. Todavia, existe uma desvantagem associada à vacina oral, a tolerância imunológica induzida aos antígenos administrados (DOMINGOS, SANT'ANNA, 2005).

Para quebrar a tolerância oral e induzir imunidade na mucosa intestinal é necessária a inclusão de um adjuvante na formulação vacinal. As moléculas de CT (toxina da cólera) e LT (toxina termolábil de *E.coli* enterotoxigênica) são consideradas um dos mais potentes adjuvantes orais descritos (DOMINGOS et al., 2009). No entanto, na sua forma natural essas moléculas são extremamente tóxicas, o que impossibilita a utilização das mesmas na formulação de vacinas. Assim, diversos estudos vêm sendo realizados a fim de se obter moléculas recombinantes que mantenham a propriedade adjuvante das toxinas sem a toxicidade das mesmas (FRASER et al., 2003). Resultados decorrentes desse esforço mostraram que

algumas moléculas recombinantes de LT e CT mantêm a propriedade adjuvante da molécula nativa apesar de possuírem baixa toxicidade. Foi também verificado que algumas recombinantes como a EtxB, subunidade B da toxina LT são capazes de quebrar a tolerância oral e induzir imunidade sistêmica e de mucosa ao antígeno coadministrado (FINGERUT et al., 2006; MILLAR et al., 2001; WILLIAMS, 2000).

Outra característica importante em vacinas orais é a incorporação do antígeno em veículos capazes de proteger o antígeno durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Partículas a base de lipossomas e outros materiais como óleo têm sido comumente utilizados como veículos carreadores de antígeno pela via oral (DOMINGOS et al., 2008; WOODROW et al., 2012.).

Um bom exemplo de adjuvante oral descrito na literatura com capacidade de proteger o antígeno após administração oral é a formulação Vaxcine™. Essa formulação possui uma tecnologia que permite a incorporação do antígeno em partículas oleosas sem danificar a estrutura e as propriedades da molécula. Em acréscimo, Vaxcine™ é capaz de direcionar o antígeno as células M das placas de Peyer, que são sítios imunodominantes do intestino. Além disso, ele apresenta outras vantagens como: estabilidade a temperatura ambiente, rapidez, facilidade de produção e aprovação para uso em humanos (ALVES et al., 2011). Foi também demonstrado que Vaxcine™ é capaz de aumentar a resposta imune oral induzida por adjuvantes orais como a CT e LT (DOMINGOS et al., 2008).

Apesar de toda tecnologia disponível para construção de vacinas contra patógenos entéricos, a Dukoral é a única vacina disponível capaz de gerar proteção em curto prazo contra *E. coli*, no caso ETEC (GIRARD et al., 2006).

Portanto, estudos que visem o desenvolvimento de vacinas para prevenção de um número maior e mais diversificado de patógenos entéricos bacterianos poderão contribuir para reduzir os elevados gastos públicos direcionados, atualmente, no tratamento de doenças diarreicas que ainda são negligenciadas. Desta forma, este trabalho apresenta estudos preliminares que sugerem que a formulação de uma vacina conjugada utilizando o polissacarídeo O111 é viável contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111, que são patógenos de grande importância para a saúde pública.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o polissacarídeo O111 é um bom candidato a antígeno na construção de uma vacina conjugada contra *E. coli* pertencentes ao sorogrupo O111.

A utilização da proteína recombinante EtxB na formulação de uma vacina conjugada oral utilizando Vaxcine como veículo carreador de antígeno é capaz de induzir resposta humoral sistêmica e de mucosa contra diferentes categorias de *E. coli* O111.

REFERÊNCIAS*

- ABE, C. M. et al. Virulence features of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* identified by the eae+ EAF-negative stx- genetic profile. **Diag. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 64, p. 357-365, 2009.
- ALVES, R. C. B. et al. Vaxcine™: na oil-based adjuvant for influenza vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 1052-1054, 2011.
- BALNCHARD-ROHNER, G.; POLLARD, A. J. Long-term protection after immunization with protei-polysaccharide conjugate vaccines in infancy. **Expert Review of Vaccines**, v.10, p. 673-684, 2011.
- BIELASZEWSKA, M. et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a Microbiological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, p. 671-676, 2011.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v.8, p. 93-99, 1987.
- BROOKS, J. T. et al. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H8. Infections among attendees of a high school cheerleading camp. **Clin. Infect Dis.**, v. 38, p. 190-198, 2004.
- CALDERON, V. E. et al. Outbreak caused by cad-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111, Oklahoma. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 107-109, 2010.
- CALIN, O. et. al. Total Synthesis of the *Escherichia coli* O111 O-Specific Polysaccharide Repeating Unit. **Chem. Eur. J.**, v. 19, p. 3995-4002, 2013.
- CAMPOS, L. C. et al. *Escherichia coli* serogroup O111 includes several clones of diarrheagenic strains with different virulence properties. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3282-3288, 1994.
- CAMPOS, L. C.; FRANZOLIN, M. R.; TRABULSI, L. R. Diarrheagenic *Escherichia coli* categories among the Traditional Enteropathogenic *E.coli* O serogroups- A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 545-552, 2004.
- CAPRIOLI, A. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res.**, v. 36, p. 289–311, 2005.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CARVALHO, L. V. et al. Immunological parameters related to the adjuvant effect of the ordered mesoporous silica SBA-15. **Vaccine**, v. 28, p. 7829-7836, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). 2011. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/vaccines/vpd-vac/rotavirus/default.htm>>. Acesso 12 de fev de 2012.

CHU, Y.; WHITESIDES, G. M. Preparation of Conjugates of Proteins with Amyloses by Elongation of Covalently Attached Primers Using Glycogen Phosphorylase a1. **Bioorganic Chemistry**, v. 21, p. 319-329, 1993.

CLARKE, S. C. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, v. 3, p. 365-378, 2003.

CLEMENS, J. Evaluation of vaccines against enteric infections: a clinical and public health research agenda for developing countries. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 366: p. 2799-2805, 2011.

CLEMENTS, A. et al. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes.**, v. 2, p. 71-87, 2012.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature**, v. 8, p. 26-38, 2010.

DAGAN, R.; POOLMAN, J.; SIERGRIST, C. A. Glycoconjugate vaccines and immune interference: A review. **Vaccine**, v. 28, p. 5513-5523, 2010.

DAUTIN, N. Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs): Biogenesis and Function. **Toxins**, v. 2, p. 1179-1206, 2010.

DOMINGOS, M. O.; SANT'ANNA, O. A. Vacinas. In: ALTERTHUM, F. (Ed). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. cap.16, p. 137-142.

DOMINGOS, M. O. et al. A new oil-based antigen delivery formulation for both oral and parenteral vaccination. **The Open Drug Delivery Journal**, v. 2, p. 52-60, 2008.

DOMINGOS, M. O. et al. Influence of the A and B subunits of cholera toxin (CT) and *Escherichia coli* toxin (LT) on TNF-alpha release from macrophages. **Toxicon**, v. 5, p. 570-577, 2009.

DONNENBERG, M.S. Infections due to *E. coli* and other enteric Gram-negative bacilli. **ACP Medicine**, p. 1-10, 2010.

ELLIOTT, E. J. et al. Nationwide Study of Haemolytic Uraemic Syndrome: clinical, microbiological and epidemiological features. **Arch. Dis. Child.**, v. 85, p. 125-131, 2001.

EWING, W. H. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. **Elsevier Science Publishing Co.**, New York, NY, 1986.

FINGERUT, E. et al. subunit of *E. coli* enterotoxin as adjuvant and carrier in oral and skin vaccination. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 112, p. 253-263, 2006.

FLORES, J.; OKHUYSEN, P.C. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, p. 84-94, 2010.

FRANZOLIN M. R. et al. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 359-363, 2005.

FRASCH, C. E. Preparation of bacterial polysaccharide protein conjugates: analytical and manufacturing challenges. **Vaccine**, v. 46, p. 6468-6470, 2009.

FRASER, S. A. et al. Mutant *Escherichia coli* Heat-Labile Toxin B Subunit That Separates Toxoid-Mediated Signaling and Immunomodulatory Action from Trafficking and Delivery Functions. **Infect. Immun.**, v. 71, p. 127-1537, 2003.

FOOD SAFETY NEWS (FSN). Four deaths in *E. coli* O111 outbreak in Japan. 2011. Disponível em: <<http://www.foodsafetynews.com/2011/05/two-deaths-in-e-coli-o111-outbreak-in-japan/>>. Acesso: 25 out 2011.

FUKUSHIMA, H.; KEN, H.; GOMYODA, M. Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O111 and O157 in bovine feces. **Appl. Environmental Microbiol.**, v. 65, p. 5177-5181, 1999.

GALLEGOS, K. M. Shiga toxin binding to glycolipids and glycans. **PloS ONE**, v. 07, p. 01-10, 2012.

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 prospect study. **J. Infect. Dis.**, v. 186, p. 493-500, 2002.

GIANNELA, R. A. *Escherichia coli* heat- stable enterotoxins, guanylin and their receptors: what are they and what do they do? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 125, p. 173-181, 1995.

GIRARD, M. P. et al. A review of vaccine research and development: human enteric infections. **Vaccine**, v. 24, p. 2732-3750, 2006.

GIULIANI, M. M. et al. Mucosal Adjuvanticity and Immunogenicity of LTR72, a Novel Mutant of *Escherichia coli* Heat-labile Enterotoxin with Partial Knockout of ADP-ribosyltransferase Activity. **J. Esp. Med.**, v. 187, p. 1123-1132, 1998.

GOLDMAN, L. C. D. et al. A surface polysaccharide of *Escherichia coli* O111 contains O-antigens and inhibits agglutination of cells by O-antiserum. **J. Bacteriol.**, v. 151, p. 1210-1221, 1982.

GOMES, T. A. T. et al. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.**, v. 169, p. 331-7, 1991.

GOMES, T. A. T.; GONZÁLEZ- PEGRAJO, B. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, p. 25-47, 2010.

GONZÁLEZ-FERNANDEZ, A.; FARO, J.; FERNÁNDEZ, C. Immune responses to polysaccharides: lessons from humans and mice. **Vaccine**, v. 26(3), p. 292-30, 2008.

GUPTA, R. K. et al. Comparative Immunogenicity of Conjugates Composed of *Escherichia coli* O111 O-Specific Polysaccharide, Prepared by Treatment with Acetic Acid or Hydrazine, Bound to Tetanus Toxoid by Two Synthetic Schemes. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 2805-2810, 1995.

GUTH, B. E. C. et al. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, p. 65-83, 2010.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **J Anim. Sci.**, v. 85, p. 45-62, 2007.

HAAN, L.; HIRST, T. R. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). **Molecular Membrane Biology**, v. 21, p. 77-92, 2004.

HARRINGTON, S. M. et al. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 254, p. 12-18, 2006.

HITCHOCK, P. J.; BROWN, T. M. Morphological heterogeneity among Salmonella lipopolysaccharide chemotypes and Silver staining polyacrylamide gels. **J Bacteriol.**, v. 154, p. 269-77, 1983.

IGUCHI, A. et al. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 347-354, 2009

ISIDEAN, S. D. et al. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. **Vaccine**, v. 29, p. 6167-6178, 2011.

JOHNSON, R. P. et al. Bacteriophages for prophylaxis and therapy in cattle, poultry and pigs. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, p. 201-215, 2008.

KAPER, J. B; NATARO, J. P; MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KATO, K. et al. Outbreak of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O111 among high school participants in excursion to Korea. **J. Infect. Dis.**, v. 58, p. 332-333, 2005.

KAUR, P. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, p. 1-10, 2010.

LAEMMLI, V. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LINDBLAD E. B. Aluminium adjuvants, in *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Stewart-Tull, D. E. S., Ed.) Wiley, Chichester, 1995; 21-35.

MECKELIN, B. et al. Contribution of serum immunoglobulin transudate to the antibody immune status of murine intestinal secretions: influence of different sampling procedures. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 10, p. 831-834, 2003.

MERCURI, L. P. et al. Ordered mesoporous silica SBA-15: a new effective adjuvant to induce antibody response. **Small**, v. 2, p. 254-256, 2006.

MILLAR, D. G.; HIRST, T. R.; SNIDER, D. P. *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit is a more potent mucosal adjuvant than its closely related homologue, the B subunit of cholera toxin. **Infect. Immun.**, v. 5, p. 3476–3482, 2001.

McDANIEL, T. K. et al. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 1664-1668, 1995.

McVERION, J. et al. Immunologic memory with no detectable bactericidal antibody response to a first dose of meningococcal serogroup C conjugate vaccine at four years. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 22, p. 659-661, 2003.

McGREGOR, A. C. et al. Prospects for prevention of *Salmonella* infection in children through vaccination. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 26, p. 254-262, 2013.

MONTEIRO, M.A. Capsule Polysaccharide Conjugate Vaccine against Diarrheal Disease Caused by *Campylobacter jejuni*. **Infect. Immun.**, p. 1128-1136, 2009.

MOON, H. W. et al. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infect. Immun.**, v. 41, p. 1340-1351, 1983.

MORA, A. et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O1:K1:H7/NM from human and avian origin: detection of clonal groups B2 ST95 and D ST59 with different host distribution. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 1-11, 2009.

MORABITO, S. et al. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of Hemolytic Uremic Syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 840-842, 1998.

MOULIN-SCHOULER, M. et al. Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin. **J Clin Microbiol.**, v. 44, p. 3484-3492, 2006.

NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 1, p. 142-201, 1998.

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

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

OCHOA, T. J. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 102(9), p. 852–856, 2008.

OHLAND, C. L. et al. *Escherichia coli*-induced epithelial hyporesponsiveness to secretagogues is associated with altered CFTR localization. **Cellular Microbiology**, v. 14, p. 447-459, 2012.

O'RYAN, M.; PRADO, V.; PICKERING, L. K. Pediatric diarrheal illness in the developing world. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 16, p. 125-136, 2005.

PARSOT, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. **FEMS Microbiology Letters.**, v. 252, p. 11-18, 2005.

PATON, A. W. et al. Antibodies to lipopolysaccharide block adherence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* to human intestinal epithelial cells. **Microb. Pathog.**, v. 21, p. 57-63, 1998.

PETROVSKY, N.; COOPER, P. D. Carbohydrate-based immune adjuvants. **Expert Rev. Vaccines**, v. 10, p. 523-537, 2011.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO (PNUD): PNUD: Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento: Falta de esgoto mata 1 criança a cada 19s. 2006. Disponível em: <<http://www.pnud.org.br/saneamento/reportagens/index.php?id01=2392&lay=san>>. Acesso em 12 out de 2011.

PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO (PNUD): Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento: Brasil dificilmente alcançara ODM de esgoto. 2008. Disponível em: <<http://www.pnud.org.br/saneamento/reportagens/index.php?id01=3004&lay=san>>. Acesso em 12 out de 2011.

POLLARD, A. J.; PERRETT, K. P.; BEVERLEY, P. C. Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. **Nat Rev Immunol.**, v. 09, p. 213-220, 2009.

QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical features, Treatment and Prevention. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p.465-483, 2005.

ROSA, A. C. P. et al. Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy controls in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med Microbiol.**, v. 47, p. 781-790, 1998.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

SANTOS, M. F. et al. Lipopolysaccharide as an antigen target for the formulation of a universal vaccine against *Escherichia coli* O111 strains. **Clin Vaccine Immunol.**, v. 11, p.1772-80, 2010.

SEALE, A.; FINN, A. What is the best way to use conjugate vaccines? **Current Opinion in Infectious Diseases.** v. 24, p. 219-224, 2011.

SCALETSKY, I. C. A. et al. A Localized Adherence-Like Pattern as a Second Pattern of Adherence of Classic Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells That Is Associated with Infantile Diarrhea. **Infect. Immun.**, v. 67, nº 07, p. 3410-3415, 1999.

SCARAMUZZI, K. et al. Utilização da sílica nanoestruturada SBA-15 como adjuvante em imunizações com a vacina para hepatite B. **Einstein**, v. 9, p. 436-441, 2011

SCHEUTZ, F. et al. Nomenclature of verotoxins. In: DUFFY, G.; GARVEY, P.; MACDOWELL, D.A. Verocytotoxigenic *E. coli*. Trmbull: **Food and Nutrition Press**, p. 447-452, 2001.

SILVA, J.A.; SILVA, W. D. *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), ao contrário da *Echerichia coli* comensal, adere, sinaliza e lesa enterócitos. **Rev. Patol. Trop.**, v. 34, p. 175-196, 2005.

SPANO, L. C. et al. Age-specific prevalence of diffusely adherent *Escherichia coli* in Brazilian children with acute Diarrhoea. **J. Med. Microbiol.**, v. 57, p. 359–363, 2008.

STEELE, D. et al. Vaccines for enteric diseases: a meeting summary. **Expert Rev. Vaccines.**, v.11, p. 407-409, 2012.

TOLEDO, M. R. F. et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. **Infect. Immun.**, v. 39, p. 586-589, 1983.

VAZ, T. M. I. et al. Virulence Properties and Characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in São Paulo, Brazil, from 1976 through 1999. **J. Clin. Microbiol.**, p. 903-905, 2004.

TRABULSI, L. R. et al. Epidemiology of infantile bacterial diarrheal disease in Brazil. **Bacterial Diseases**, p. 25-35, 1985.

TRUCK, J.; POLLARD, A. J. Challenges in immunization against bacterial infection in children. **Early Human Development** ., v. 86, p. 695-701, 2010.

- VICTORA, C. G. Mortalidade por diarreia. **Jornal de Pediatria**, v. 85, p. 03-05, 2009.
- UNICEF (The United Nations Children`s Fund). Pneumonia and diarrhea. Tackling the deadliest diseases for the world`s poorest children. p. 1-86, 2012.
- UNICEF (The United Nations Children`s Fund), WHO (World Health Organization) Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, p. 1-68, 2009.
- WAGNER, A.; WIEDERMANN, U. Travellers' diarrhoea – pros and cons of different prophylactic measures. *Wien Klin Wochenschr.*, v. 121, p. 03-18, 2009.
- WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p. 4-8, 2007.
- WIGHT, J. P. et al. Outbreaks of food poisoning adults due to *Echerichia coli* O111 and campylobacter associated with coach trips to Northern France. **Epidemiol. Infect.**, v. 119, p. 9-14, 2007.
- WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). Diarrhoeal disease. Initiative for Vaccine Research (IVR) 2009. Disponível em: <http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/>. Acesso em: 15 fev 2012.
- WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO): Diarrhoeal disease. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/en/index.html>>. Acesso em: 2 abr. 2013.
- WILLIAMS, N. A. Immune modulation by the cholera-like enterotoxins B subunits: from adjuvant to immunotherapeutic. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 4-5, p. 447–453, 2000.
- WILLIAMS, N. D.; TORRES, A. G.; LLOYD, S. J. Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**, p. 08-24, 2010. 2010.
- WOODROW, K. A.; BENNETT, K. M.; LO, D. Mucosal vaccine design and delivery. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 14, p. 17-46, 2012.