

MÔNICA JOSIANE RODRIGUES DE JESUS

**Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra a toxina de Shiga
de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) baseada
na proteína recombinante Stx2 Δ AB incorporada a lipossomas.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para o Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno Hospedeiro.

Orientador: Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira

Versão Original

São Paulo
2016

RESUMO

Jesus MJR. Desenvolvimento de uma estratégia vacinal contra a toxina de Shiga (Stx) de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) baseada na proteína recombinante Stx2 Δ AB incorporada a lipossomas. [Dissertação (Mestrado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Infecções associadas a cepas da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), podem causar manifestações clínicas como diarreia, colite hemorrágica e a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), a complicação mais severa da infecção. A expressão de variantes naturais da toxina de Shiga (Stx) representa o principal fator associado à virulência de linhagens de STEC (*Escherichia coli* produtora de Shiga toxina) sendo a variante Stx2 a principal forma da toxina associada à SHU. Até o momento não se dispõe de uma vacina ou tratamentos efetivos para a SHU em humanos. Neste cenário, formas recombinantes atóxicas da toxina Stx2, representam uma alternativa para o desenvolvimento de vacinas para a prevenção da SHU. Assim, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver uma vacina baseada em uma forma atóxica de Stx2 combinada à lipossomas, capaz de induzir a geração de respostas imunológicas humorais com capacidade neutralizante frente à Stx2. Para isso, um derivado atóxico de Stx2, contendo a subunidade B e a porção A₂ da subunidade A denominado Stx2 Δ AB, foi expressa em linhagens de *E.coli* BL21. Tentativas iniciais de purificação resultaram na formação de agregados proteicos. Ajustes nas condições de cultivo e purificação permitiram obter a proteína na forma de monômero da subunidade B, mas sem a presença da porção A₂. O antígeno obtido foi incorporado a lipossomas multilamelares (MLVs), combinados ao lipídio A e administrados por via subcutânea a camundongos. Animais imunizados desenvolveram anticorpos sistêmicos específicos contra Stx2 capazes de neutralizar a toxina *in vitro* e conferir proteção parcial a animais desafiados com dose letal da toxina. Em conclusão, o trabalho confirmou o potencial vacinal do antígeno e validou a estratégia baseada na incorporação do antígeno aos MLVs como estratégia de imunização.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Toxina de Shiga. SHU. Stx2. Lipossomas. MLVs. Nanopartículas. Sistema de entrega vacinal. Proteínas recombinantes.

ABSTRACT

Jesus MJR. Development of a vaccine strategy against Shiga toxin (Stx) of *Escherichia coli* (EHEC) based on recombinant protein Stx2 Δ AB incorporated into liposomes. [Dissertation (Masters thesis (Parasitology))]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomedicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Infections associated with strains of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), can cause clinical manifestations such as diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS), the most severe complication of infection. The expression of natural variants of Shiga toxin (Stx) is the main factor associated with virulence of STEC strains (*Escherichia coli* Shiga toxin-producing) and the variant Stx2 the main form of the toxin associated with HUS. Yet not have a vaccine or effective treatment for HUS in humans. In this scenario, non-toxic recombinant forms of the Stx2 toxin, represent an alternative to the development of vaccines for the prevention of HUS. Thus, this study aimed to develop a vaccine based on a non-toxic form of Stx2 combined with liposomes, capable of inducing the generation of humoral immune responses with neutralizing capacity against the Stx2. For this, a nontoxic derivative of Stx2, containing the B subunit and an A₂ subunit termed portion of Stx2 Δ AB was expressed in BL21 *E. coli* strains. Initial purification attempts resulted in the formation of protein aggregates. Adjustments in the cultivation and purification conditions have enabled the protein as the monomer subunit B but without the presence of the A₂ portion. The obtained antigen was incorporated in multilamellar liposomes (MLVs), the combined lipid A and administered subcutaneously to mice. Immunized animals develop systemic antibodies specific against Stx2 able to neutralize toxin in vitro and to confer partial protection when challenged with a lethal dose of toxin. In conclusion, the study confirmed the potential vaccine antigen and validated strategy based on antigen incorporation into MLVs as immunization strategy.

Keywords: *Escherichia coli*. Shiga Toxin. HUS. Stx2. Liposomes. MLVs. Nanoparticles. Vaccine delivery system. Recombinant protein.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das infecções associadas a linhagens de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) e a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU)

Infecções associadas a cepas da EHEC, em especial aquelas do sorotipo O157:H7, causam manifestações clínicas como diarreia, colite hemorrágica e podem levar a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), a complicação mais severa da infecção (1,2). A SHU pode ser letal, principalmente em crianças e adolescentes. Globalmente estima-se cerca de 6,1 casos por 100.000 pessoas/ano, em crianças menores de 5 anos, com taxa de mortalidade de 3 a 5%. Em adultos, com idade entre 50 e 59 anos, a incidência de casos de SHU é mais baixa, com aproximadamente 0,5 casos por 100.000 pessoas/ano (3). A doença se caracteriza pela falência renal aguda, trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática e complicações do sistema nervoso central (4,5,121). SHU emergiu nas últimas três décadas como uma ameaça à saúde pública mundial. É um problema crítico em países desenvolvidos e em alguns países latino-americanos, particularmente na Argentina atualmente o país com o maior número de casos no mundo, cerca de 55 casos de SHU por 100.000 pessoas (1,130).

Dentre as diversas linhagens de EHEC, as linhagens do sorotipo O157:H7 receberam maior destaque, pois foram responsáveis por surtos de colite hemorrágica nos Estados Unidos (6,7,123), Japão, Argentina, Chile, (8,9,122,129), Canadá e alguns países europeus (10–12,128). Outros sorotipos característicos de EAHEC (*E. coli* enteroagregativa com capacidade de produzir a Stx2) foram associados a casos de SHU, sendo o sorotipo O104:H4 responsável pelo surto ocorrido em 2011 na Alemanha (12–14). No Brasil poucos são os registros de isolamento de linhagens de EHEC do sorotipo O157:H7 associados a casos de SHU. No entanto, a proximidade com a Argentina, representa um risco que não pode ser ignorado (15,16).

1.2 A patogênese de EHEC e a toxina de Shiga (Stx)

Em semelhança a linhagens *E. coli* enteropatogênica (EPEC), linhagens de EHEC possuem a capacidade de colonizar o epitélio intestinal e induzir lesões do tipo A/E, do inglês “*attaching and effacing*”, ao colonizar o trato gastrointestinal. Essa habilidade é codificada por uma ilha de patogenicidade chamada LEE, do inglês “*Locus of Enterocyte*

Effacement” (17). No entanto, a capacidade de produção da toxina Stx, representa o fator associado à virulência mais relevante para o desenvolvimento da diarreia sanguinolenta e as complicações sistêmicas extra-intestinais da SHU.

Descrita pela primeira vez em 1977 (18), as toxinas produzidas por *E. coli* produtora de Shiga toxina (STEC) pertencem a dois grupos sorologicamente distintos: Stx1 e Stx2. Os genes que as codificam estão localizados no genoma de bacteriófagos lambdoides (19), os quais levam à lise da célula hospedeira quando induzido por estresse (uso de antibióticos), desencadeando um aumento na liberação de Stx (20). A Stx1 está relacionada à toxina de shiga produzida pela *S. dysenteriae* tipo I, diferindo apenas pela troca de um aminoácido na subunidade A (11). Linhagens de STEC podem produzir variantes naturais de Stx1 (Stx1, Stx1c, Stx1d) assim como de Stx2 (Stx2a, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f) ou ambas em diferentes combinações (21). Stx1, Stx2 e seus variantes reconhecem um mesmo receptor glicolipídico (exceção de Stx2e, a qual se liga ao Gb₃ e Gb₄), mas apresentam diferenças de afinidade (22). Porém, essas toxinas podem ser diferenciadas por sua atividade biológica e características imunológicas (23).

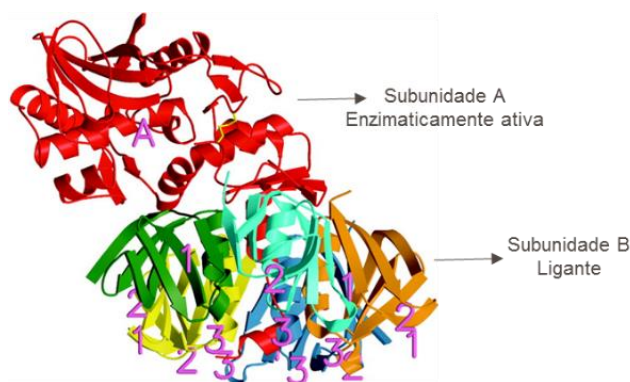


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura molecular da toxina de shiga (Stx) produzidas por EHEC. Em vermelho está indicada a subunidade A da toxina, sendo os locais de ligação da porção A₁ e A₂ destacados em amarelo. A porção A₂ ancora a subunidade A nas subunidades B, esta última composta por um anel pentamérico contendo cinco monômeros (indicado na figura com diferentes cores). Os sítios de ligação ao receptor glicolipídico Gb₃ (globotriaosilceramida) estão indicados pela numeração de 1-3, destacada em rosa. (Reproduzido de Fraser et. al., 2004)

Evidências clínicas indicam que casos de SHU estão mais frequentemente associados a cepas produtoras de Stx2 (10,126). As toxinas Stx2 de STEC são toxinas do tipo AB₅ (21). A subunidade A é formada por 319 aminoácidos, com peso molecular de 32 kDa e representa a porção enzimaticamente ativa. A subunidade B é composta por cinco monômeros formados por 89 aminoácidos, cada um com peso molecular de 7,7 kDa. Esses monômeros formam um anel pentamérico responsável pela ligação da toxina ao receptor glicolipídico Gb₃ (globotriaosilceramida), encontrados em maior quantidade na superfície

de células dos rins, endotélio microvascular e células como macrófagos, dendríticas e neutrófilos (11,24). A ação da Stx2 se dá após a colonização do intestino. A toxina produzida localmente é absorvida pela corrente sanguínea, chegando aos tecidos alvos (25). A subunidade B se liga ao receptor Gb₃ pelo pentâmero e a subunidade A é internalizada por endocitose. Ocorre a sua dissociação em fragmento A₁ (27,5 kDa) e A₂ (4,5 kDa) pela ação da enzima furina. O fragmento A₁ é transportado de forma retrógrada do aparato de Golgi até o retículo endoplasmático onde cliva uma ligação N-glicosídica do resíduo de adenina do RNA ribossômico eucarioto 28S da subunidade ribossomal 60S. Assim, inibe a síntese proteica, tornando-se citotóxica para as células-alvo (26,27).

1.3 Epidemiologia de linhagens de STEC

O principal reservatório de STEC e EHEC são os bovinos. Derivados, como leite e carne crua ou mal passada, representam os maiores contribuintes para a disseminação da infecção. Vegetais e água contaminados, assim como, o contato pessoal com indivíduos portadores da infecção, também são meios de transmissão de EHEC (7,28, 125).

No Brasil em avaliações prévias do gado leiteiro em fazendas no Estado de São Paulo, foi registrada a ocorrência de linhagens de EHEC que carregavam os genes *stx1* e/ou *stx2* (29). Recentes estudos com crianças saudáveis e diagnosticadas com SHU na cidade de São Paulo, mostraram altas frequências de indivíduos produtores de anticorpos contra as subunidades de Stx2 e lipopolissacarídeo do sorotipo O157:H7, o que sugere a presença dessas linhagens em nosso estado (16,30).

1.4 Tratamentos disponíveis para SHU

Nos casos mais graves de SHU, os pacientes necessitam de transfusões de sangue ou plasma e diálise. A hemodiálise e a diálise peritoneal dependem da idade e peso dos pacientes, sendo a diálise peritoneal o tratamento de escolha para a insuficiência renal crônica (31). Embora a diálise peritoneal tenha reduzido significativamente a mortalidade, os danos às células endoteliais predominantemente nos glomérulos renais, desempenham importante papel na patogênese da doença. Entretanto, outros órgãos também são afetados como cérebro, pâncreas e pulmões, levando a sequelas em 12 a 30% dos infectados, incluindo disfunção renal crônica, hipertensão ou manifestações no sistema nervoso central (17,32). As reposições hídricas e eletrolíticas são necessárias como suporte básico

ao paciente (33). O anticorpo monoclonal Eculizumab, um inibidor do complemento foi licenciado para tratamento de SHU primária, principalmente a atípica, associada a uma desregulação do sistema complemento e tem sido utilizado como tentativa terapêutica, principalmente em crianças, na Argentina (2012), Europa (2009) e Estados Unidos (2011) (34). Devido aos riscos associados ao tratamento com antimicrobianos contra as infecções de EHEC (35–37) e a presença de tratamentos apenas paliativos, a vacinação representaria uma alternativa válida para reduzir a incidência da doença e prevenir surtos.

1.5 Abordagens vacinais contra SHU

Diversas estratégias terapêuticas e profiláticas objetivando a neutralização da Stx2 têm sido estudadas em modelos experimentais. Embora modelos baseados em murinos não reproduzam os sintomas observados em humanos, representam uma ferramenta útil para a avaliação da imunidade protetora induzida por formulações vacinais, seja esta mediada por anticorpos secretados em mucosa ou anticorpos sistêmicos (38).

Dentre as abordagens terapêuticas contra SHU, há estudos quanto ao uso de bactérias recombinantes inativadas expressando a subunidade B ou o receptor glicolipídico na forma de bactérias fantasmas, que consistem em envelopes bacterianos desprovidos de citoplasma, como veículos vacinais (39–43). Proteínas do sistema de secreção do tipo 3 (T3SS), também foram alvos de estratégias vacinais experimentais e atuam pelo bloqueio da colonização bacteriana (44,45). A administração de anticorpos monoclonais e anticorpos de cadeia simples contra a Subunidade B, produzidos em lhamas, visando à imunização passiva (46–49) e uso de análogos sintéticos de Gb₃ (50), que adsorvem competitivamente a toxina no intestino também foram testadas, porém, até então, apenas o anticorpo monoclonal Eculizumab mostrou-se promissor o suficiente para testes subsequentes em seres humanos (34,51,52). Encontra-se em fase de recrutamento um estudo clínico com o anticorpo monoclonal Eculizumab, utilizado para o tratamento de SHU atípica, causada por distúrbio no complemento, que leva a ativação de leucócitos e plaquetas, microangiopatia trombótica e subsequente lesão no órgão terminal (53–55).

1.6 Desenvolvimento de vacinas profiláticas contra SHU

Nas últimas décadas, abordagens profiláticas contra SHU também vêm sendo desenvolvidas. Toxóides derivados de Stx1 ou Stx2 mostram-se capazes de conferir proteção a coelhos desafiados com as toxinas (56). Uma vacina de DNA que codifica a subunidade B e uma parte da subunidade A₁ permitiu a indução de anticorpos neutralizantes e conferiu proteção a desafio com Stx2 quando co-administrada com plasmídeo que codifica o fator de estimulação de colônia de granulócitos e monócitos (57).

Vacinas de subunidade têm-se mostrado eficientes na geração de anticorpos neutralizantes e, em alguns casos, geram proteção em modelos animais frente a desafio com a toxina Stx2 (58,59). A imunização com uma proteína quimérica contendo StxA2-StxB1 foi capaz de gerar anticorpos e proteção em camundongos contra as duas toxinas (60–62). A subunidade B de Stx2 quando fusionada à enzima luminase sintase da *Brucella spp.*, resultou em resposta humoral capaz de conferir proteção a desafios com Stx2 em camundongos fêmeas imunizadas e suas crias (63,64). Neste contexto, a subunidade B representa um dos alvos vacinais mais utilizados, principalmente por ser atóxica e os anticorpos gerados contra ela serem capazes de bloquear a ligação da toxina ao receptor Gb₃ e sua entrada no citosol onde exerce seus efeitos tóxicos.

Estudos indicam que epítomos presentes na subunidade B de Stx levam à produção de anticorpos neutralizantes (46,60). Essa subunidade também mostra estabilidade em pH extremo e, mesmo na presença de proteases, possui capacidade de atravessar barreiras de tecido no organismo e resistência à inativação em ambientes extra e intracelular (65). No entanto, a subunidade B da Stx2 apresenta baixa imunogenicidade após imunização em mamíferos (66). Essa baixa imunogenicidade de Subunidade B de Stx representa uma restrição no desenvolvimento de uma formulação vacinal eficientemente capaz de induzir uma imunidade protetora contra EHEC e prevenir SHU (66). Nesse sentido, a proteína recombinante Stx2B já foi utilizada em diversos estudos associada a adjuvantes demonstrando a necessidade do uso de adjuvantes, para potencialização da resposta humoral gerada (59,62–64,67,68). Por outro lado, outras evidências indicam a presença de epítomos mais imunogênicos localizados na porção A₂ da subunidade A de Stx2 (69).

1.7 Estratégias vacinais baseadas no antígeno Stx2 Δ AB

Uma vacina de DNA construída para expressar um mutante atóxico de Stx2, formado pela subunidade B e a porção A₂ (pStx2 Δ AB), demonstrou ser capaz de gerar anticorpos neutralizantes *in vitro* e conferir proteção parcial *in vivo* (70). Esta mesma construção foi utilizada em outras duas abordagens vacinais. A primeira avaliou o potencial neutralizante e protetor dos anticorpos gerados pela imunização com linhagens vacinais de *S. Typhimurium* capaz de expressar o antígeno Stx2 Δ AB (42). A administração de uma forma recombinante de Stx2 Δ AB, em combinação com diferentes adjuvantes vacinais indicou que apenas o adjuvante de Freund foi capaz de induzir imunidade protetora parcial nos animais (71). Os resultados obtidos atestam o potencial vacinal da Stx2 Δ AB, mas ressaltam a importância do adjuvante na geração de repostas imunológicas eficazes na neutralização da toxina Stx2

1.8 Sistema de entrega de antígenos baseado em lipossomas

Muito utilizados por seu potencial adjuvante e eficiência na entrega de antígenos, os lipossomas tem seu uso relacionado a diferentes estratégias vacinais. São vesículas lipídicas compostas normalmente por uma bicamada de fosfolipídios e compatíveis com as membranas celulares (72–77). Possuem baixa toxicidade, são biodegradáveis e se mostram apropriados para transportar antígenos pela capacidade de incorporar material solúvel na fase hidrofílica ou hidrofóbica (78). Fatores como estabilidade de armazenamento e baixo custo reforçam a lista de vantagens dos lipossomos. A ação adjuvante depende de características estruturais, dentre estas, o tamanho demonstra influência no tráfego, processamento e apresentação dos antígenos às APCs, em resumo, influencia no perfil de resposta imunológico a ser obtido com a formulação administrada, Th1 ou Th2 (79–83). Assim, antígenos pouco imunogênicos quando incorporados a lipossomas, são capazes de promover resposta imune humoral ou celular e, em alguns casos, podem promover sinergismo quando combinados a adjuvantes (76,84,85).

Os lipossomas multilamelares (MLVs) representam uma forma de lipossoma que conta com várias camadas lipídicas espaçadas entre si. São obtidas por processo de fusão das vesículas na presença de íons de cálcio ou magnésio (86). Essas vesículas permitem o encapsulamento eficiente de antígenos e a liberação de forma lenta e contínua, o que

proporciona um maior estímulo da resposta imunológica (87). Lipossomas unilamelares conjugados a toxóides de Stx1 ou Stx2 por processo químico mostraram-se promissores quando avaliados em modelo murino e em macacos, gerando anticorpos neutralizantes de Stx2 (88,89,124). Em uma imunização oral com lipossomas compostos por lipídios neutros, aniônicos e o lipídio A (MPL), encapsulando um lisado celular de *E. coli* O157:H7, induziu a produção de anticorpos neutralizantes de mucosa e séricos, que inibiram a adesão de Stx em células Caco-2 (90). Esses resultados sugerem que o uso de lipossomas multilamelares associados à Stx2ΔAB possa aumentar a imunogenicidade do antígeno e seu potencial protetor.

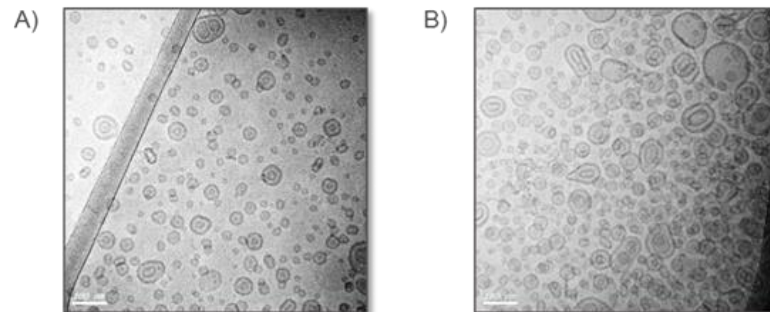


Figura 2 - Lipossomas multilamelares (MLVs). Imagem da estrutura de MLVs compostos pelos lipídios DOPC, DPPG e DGS-NTA(Ni), obtida por microscopia eletrônica de transmissão (A) MLV em solução. (B) Efeito de agregação das MLV (foto gentilmente cedida por Wesley Fotoran).

6 CONCLUSÕES

- A proteína recombinante rStx2B foi expressa em linha de *Escherichia coli*, em quantidade e qualidade para a realização dos ensaios in vitro e in vivo.
- A imunização por via subcutânea com a formulação vacinal MLV-rStx2B se demonstrou promissora para o uso de vacinas de subunidades baseada em uma forma recombinante atóxica de Stx, sendo capaz de induzir anticorpos StxB-específicos com afinidade e capacidade de neutralização da toxina nativa.
- A proteção parcial conferida pela vacina abre perspectivas para estudos futuros com os MLVs em associação à subunidade B da Stx, bem como outras formas recombinantes de Stx, como estratégias de prevenção da SHU gerada pela infecção com linhagens de EHEC.

REFERÊNCIAS*

- 1- Palermo MS, Exeni R a, Fernández GC. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2009;7(6):697–707. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1586/eri.09.49>
- 2- Karmali M a. Host and pathogen determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome. *Kidney Int Suppl*. 2009;75(112):S4–7.
- 3- Terrell DR, Williams LA, Vesely SK, Lämmle B, Hovinga JAK, George JN. The incidence of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: All patients, idiopathic patients, and patients with severe ADAMTS-13 deficiency. *J Thromb Haemost*. 2005;3(7):1432–6.
- 4- Cleary TG. The role of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2004;15(4):260–5.
- 5- Mayer CL, Leibowitz CS, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ. Shiga toxins and the pathophysiology of hemolytic uremic syndrome in humans and animals. *Toxins (Basel)*. 2012;4(11):1261–87.
- 6- Banatvala N, Griffin PM, Greene KD, Barrett TJ, Bibb WF, Green JH, et al. The United States National Prospective Hemolytic Uremic Syndrome Study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J Infect Dis*. 2001;183:1063–70.
- 7- Centers for Disease Control and Prevention. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996–2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60(22):749–55.
- 8- Kanayama A, Yahata Y, Arima Y, Takahashi T, Saitoh T, Kanou K, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outbreaks related to childcare facilities in Japan, 2010-2013. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2015 Nov 20 [cited 2016 Oct 20];15:539. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26589805>
- 9- Rivas, M; Exeni R, Jansen PS. Síndrome Urémico Hemolítico. Manifestaciones clínicas. Tratamiento. 2006;66.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

- 10- Friedrich AWW, Bielaszewska M, Zhang WW, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J Infect Dis [Internet]. 2002;185(1):74–84. Available from: <http://jid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/338115>
- 11- Fraser ME, Fujinaga M, Cherney MM, Melton-Celsa AR, Twiddy EM, O'Brien AD, et al. Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. J Biol Chem. 2004;279(26):27511–7.
- 12- Bielaszewska M, Mellmann A, Zhang W, Köck R, Fruth A, Bauwens A, et al. Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: A microbiological study. Lancet Infect Dis [Internet]. 2011;11(9):671–6. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70165-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70165-7)
- 13- Morabito S, Karch H, Mariani-Kurkdjian P, Schmidt H, Minelli F, Bingen E, et al. Enteroaggregative, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol. 1998;36(3):840–2.
- 14- Dallman T, Smith GP, O'Brien B, Chattaway MA, Finlay D, Grant KA, et al. Characterization of a verocytotoxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O111:H21 strain associated with a household outbreak in Northern Ireland. J Clin Microbiol. 2012;50(12):4116–9.
- 15- Guth BEC, Lopes De Souza R, Vaz TMI, Irino K. First Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolate from a Patient with Hemolytic Uremic Syndrome, Brazil. Emerg Infect Dis [Internet]. 2002;8(5):535–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3310449&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 16- Irino K, Kato MAMF, Vaz TMI, Ramos II, Souza MAC, Cruz AS, et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in São Paulo State, Brazil. Vet Microbiol. 2005;105(1):29–36.
- 17- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev [Internet]. 1998;11(1):142–201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9457432> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC121379>
- 18- Konowalchuk J, Speirs JJ, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 1977;18(3):775–9.
- 19- Tyler JS, Mills MJ, Friedman DI. The operator and early promoter region of the Shiga toxin type 2-encoding bacteriophage 933W and control of toxin expression. J Bacteriol. 2004;186(22):7670–9.

- 20- Zhang X, McDaniel a D, Wolf LE, Keusch GT, Waldor MK, Acheson DW. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis.* 2000;181:664–70.
- 21- Johannes L, Römer W. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010;8(2):105–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2279>
- 22- Scheutz F, Teel LD, Beutin L, Piérard D, Buvens G, Karch H, et al. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2012;50(9):2951–63.
- 23- Jackson MP, Neill RJ, O'Brien AD, Holmes RK, Newland JW. Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 1987;44:109–14.
- 24- Okuda T, Tokuda N, Numata SI, Ito M, Ohta M, Kawamura K, et al. Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. *J Biol Chem.* 2006;281(15):10230–5.
- 25- Paton AW, Morona R, Paton JC. A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat Med* [Internet]. 2000;6(3):265–70. Available from: [internal-pdf://3829176385/nm0300_265.pdf\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10700227](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10700227)
- 26- Sandvig K, Van Deurs B. Transport of protein toxins into cells: Pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett.* 2002;529(1):49–53.
- 27- Tam PJ, Lingwood CA. Membrane-cytosolic translocation of verotoxin A1 subunit in target cells. *Microbiology.* 2007;153(8):2700–10.
- 28- Sheng H, Lim JY, Knecht HJ, Li J, Hovde CJ. Role of *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infect Immun.* 2006;74(8):4685–93.
- 29- Nunes AP, Lorenzon CS, Paulista UE. *Escherichia Coli* , Produtoras De Shigatoxinas. 2010;567–73.
- 30- Guirro M, Piazza RMF, de Souza RL, Guth BEC, M. G, R.M.F. P, et al. Humoral immune response to Shiga Toxin 2 (Stx2) among Brazilian urban children with hemolytic uremic syndrome and healthy controls. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2014;14(1):320. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=24919599\nhttp://www.biomedcentral.com/1471-2334/14/320\nhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed12&NEWS=N&AN=2014412957\nhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=J>

- 31- Offner G, Brodehl J, Galaske R, Rutt T. prognostic features after treatment with acute dialysis. 1986;482–6.
- 32- Bielaszewska M, Clarke I, Karmali MA, Petric M. Localization of intravenously administered verocytotoxins (shiga-like toxins) 1 and 2 in rabbits immunized with homologous and heterologous toxoids and toxin subunits. *Infect Immun*. 1997;65(7):2509–16.
- 33- Ojeda JM, Kohout I, Cuestas E. Dehydration upon admission is a risk factor for incomplete recovery of renal function in children with haemolytic uremic syndrome. *Nefrologia* [Internet]. 2013;33(3):372–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640118>
- 34- Yüksel S, Evrengül H, Özçakar ZB, Becerir T, Yalçın N, Korkmaz E, et al. First-Line, Early and Long-Term Eculizumab Therapy in Atypical Hemolytic Uremic Syndrome: A Case Series in Pediatric Patients. *Pediatr Drugs* [Internet]. 2016 Sep 19 [cited 2016 Oct 4]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s40272-016-0194-0>
- 35- Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* [Internet]. 2000 Jun 29 [cited 2016 Oct 4];342(26):1930–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10874060>
- 36- Wong CS, Mooney JC, Brandt JR, Staples AO, Jelacic S, Boster DR, et al. Risk factors for the hemolytic uremic syndrome in children infected with *Escherichia coli* O157:H7: a multivariable analysis. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2012 Jul [cited 2016 Oct 4];55(1):33–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22431799>
- 37- Amorim JH, Del Cogliano ME, Fernandez-Brando RJ, Bilen MF, Jesus MR, Luiz WB, et al. Role of bacteriophages in STEC infections: new implications for the design of prophylactic and treatment approaches. *F1000Research* [Internet]. 2014 [cited 2016 Oct 4];3:74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25580222>
- 38- Mohawk KL, O'Brien AD. Mouse Models of *Escherichia coli* O157:H7 Infection and Shiga Toxin Injection. *J Biomed Biotechnol* [Internet]. 2011;2011:1–17. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/258185/>
- 39- Paton JC, Rogers TJ, Morona R, Paton AW. Oral administration of formaldehyde-killed recombinant bacteria expressing a mimic of the Shiga toxin receptor protects mice from fatal challenge with shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2001;69(3):1389–93.
- 40- Lubitz P, Mayr UB, Lubitz W. Applications of bacterial ghosts in biomedicine. *Adv Exp Med Biol*. 2009;655:159–70.

- 41- Gomes P a. DP, Bentancor LV, Pancez JD, Sbrogio-Almeida ME, Palermo MS, Ferreira RCC, et al. Antibody responses elicited in mice immunized with *Bacillus subtilis* vaccine strains expressing Stx2B subunit of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Brazilian J Microbiol.* 2009;40:333–8.
- 42- Rojas RLG, Gomes PADP, Bentancor L V., Sbrogio-Almeida ME, Costa SOP, Massis LM, et al. *Salmonella enterica serovar typhimurium* vaccine strains expressing a nontoxic shiga-like toxin 2 derivative induce partial protective immunity to the toxin expressed by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(4):529–36.
- 43- Fujii J, Naito M, Yutsudo T, Matsumoto S, Heatherly DP, Yamada T, et al. Protection by a recombinant *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Gu??rin vaccine expressing Shiga toxin 2 B subunit against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in mice. *Clin Vaccine Immunol.* 2012;19(12):1932–7.
- 44- Amani J, Salmanian AH, Rafati S, Mousavi SL. Immunogenic properties of chimeric protein from *espA*, *eae* and *tir* genes of *Escherichia coli* O157:H7. *Vaccine.* 2010;28(42):6923–9.
- 45- Garcia-Angulo VA, Kalita A, Torres AG. Advances in the development of enterohemorrhagic *Escherichia coli* vaccines using murine models of infection. *Vaccine.* 2013;31(32):3229-35.
- 46- Mukherjee J, Chios K, Fishwild D, Hudson D, O'Donnell S, Rich SM, et al. Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun* [Internet]. 2002 Feb [cited 2016 Oct 19];70(2):612–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11796590>
- 47- Tzipori S, Sheoran A, Akiyoshi D, Donohue-rolfe A, Trachtman H. Antibody Therapy in the Management of Shiga Toxin-Induced Hemolytic Uremic Syndrome. *Society.* 2004;17(4):926–41.
- 48- Luz D, Chen G, Maranhão AQ, Rocha LB, Sidhu S, Piazza RMF. Development and characterization of recombinant antibody fragments that recognize and neutralize in vitro Stx2 toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2016 Oct 19];10(3):e0120481. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25790467>
- 49- Mejias MP, Hiriart Y, Lauche C, Fernandez-Brando RJ, Pardo R, Bruballa A, et al. Development of camelid single chain antibodies against Shiga toxin type 2 (Stx2) with therapeutic potential against Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(April):24913. Available from: <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=pem&N EWS=N&AN=27118524>

- 50- Bernedo-Navarro RA, Miyachiro MM, Da Silva MJ, Reis CF, Conceição RA, Gatti MS V, et al. Peptides derived from phage display libraries as potential neutralizers of Shiga toxin-induced cytotoxicity *in vitro* and *in vivo*. *J Appl Microbiol*. 2014;116(5):1322–33.
- 51- Takeda T, Yoshino K, Adachi E, Sato Y, Yamagata K. In vitro assessment of a chemically synthesized Shiga toxin receptor analog attached to chromosorb P (Synsorb Pk) as a specific absorbing agent of Shiga toxin 1 and 2. *Microbiol Immunol* [Internet]. 1999;43(4):331–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10385199>
- 52- Karmali MA. Prospects for preventing serious systemic toxemic complications of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections using Shiga toxin receptor analogues. *J Infect Dis*. 2004;189(3):355–9.
- 53- Legendre CM, Licht C, Muus P, Greenbaum LA, Babu S, Bedrosian C, et al. Terminal Complement Inhibitor Eculizumab in Atypical Hemolytic–Uremic Syndrome. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Jun 6 [cited 2016 Oct 19];368(23):2169–81. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1208981>
- 54- Licht C, Greenbaum L, Muus P, Babu S, Bedrosian CL, Cohen DJ, et al. Efficacy and safety of eculizumab in atypical hemolytic uremic syndrome from 2-year extensions of phase 2 studies. *Kidney Int* [Internet]. 2015;87(5):1061–73. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4424817&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 55- Thomson N, Ulrickson M. Maintenance eculizumab dose adjustment in the treatment of atypical hemolytic uremic syndrome: a case report and review of the literature. *Clin case reports* [Internet]. 2016 Aug [cited 2016 Oct 19];4(8):773–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27525082>
- 56- Ludwig K, Karmali MA, Smith CR, Petric M. Cross-protection against challenge by intravenous *Escherichia coli* verocytotoxin 1 (VT1) in rabbits immunized with VT2 toxoid. *Can J Microbiol* [Internet]. 2002;48(1):99–103. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11888169
- 57- Capozzo AVE, Creydt VP, Dran G, Ferna G, Bentancor L V, Rubel C, et al. Development of DNA Vaccines against Hemolytic-Uremic Syndrome in a Murine Model. *Society*. 2003;71(7):3971–8.
- 58- Marcato P, Griener TP, Mulvey GL, Armstrong GD. Recombinant Shiga Toxin B-Subunit-Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate Vaccine Protects Mice from Shigatoxemia Recombinant Shiga Toxin B-Subunit – Keyhole Limpet Hemocyanin Conjugate Vaccine Protects Mice from Shigatoxemia. *Infect Immun*. 2005;73(10):6523–9.

- 59- Torres AG. Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Vaccines Biodefense Emerg Neglected Dis.* 2009;1013–29.
- 60- Smith MJ, Teel LD, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD. Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. *Vaccine.* 2006;24(19):4122–9.
- 61- Gao X, Cai K, Shi J, Liu H, Hou X, Tu W, et al. Immunogenicity of a novel Stx2B-Stx1B fusion protein in a mice model of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine.* 2009;27(14):2070–6.
- 62- Cai K, Gao X, Li T, Wang Q, Hou X, Tu W, et al. Enhanced immunogenicity of a novel Stx2Am-Stx1B fusion protein in a mice model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Vaccine* [Internet]. 2011;29(5):946–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.035>
- 63- Mejias MP, Ghersi G, Craig PO, Panek CA, Bentancor L V, Baschkier A, et al. Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and *Brucella* lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice. *J Immunol* [Internet]. 2013;191(5):2403–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23918978>
- 64- Mejias MP, Cabrera G, Fernández-Brando RJ, Baschkier A, Ghersi G, Abrey-Recalde MJ, et al. Protection of mice against Shiga toxin 2 (Stx2)-associated damage by maternal immunization with a *Brucella* lumazine synthase-Stx2 B subunit chimera. *Infect Immun.* 2014;82(4):1491–9.
- 65- Johannes L, Decaudin D. Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. *Gene Ther.* 2005;12(18):1360–8.
- 66- Tsuji T, Shimizu T, Sasaki K, Tsukamoto K, Arimitsu H, Ochi S, et al. A nasal vaccine comprising B-subunit derivative of Shiga toxin 2 for cross-protection against Shiga toxin types 1 and 2. *Vaccine.* 2008;26(17):2092–9.
- 67- Gu J, Liu Y, Yu S, Wang H, Wang Q, Yi Y, et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* trivalent recombinant vaccine containing EspA, intimin and Stx2 induces strong humoral immune response and confers protection in mice. *Microbes Infect* [Internet]. 2009;11(10–11):835–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.024>
- 68- Gupta P, Singh MK, Singh Y, Gautam V, Kumar S, Kumar O, et al. Recombinant Shiga toxin B subunit elicits protection against Shiga toxin via mixed Th type immune response in mice. *Vaccine* [Internet]. 2011 Oct [cited 2016 Oct 7];29(45):8094–100. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X11012710>

- 69- Haste Andersen P, Nielsen M, Lund O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. *Protein Sci* [Internet]. 2006;15(11):2558–67. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2242418&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 70- Bentancor L V., Bilen M, Brando RJF, Ramos MV, Ferreira LCS, Ghiringhelli PD, et al. A DNA vaccine encoding the enterohemorrhagic *Escherichia coli* shiga-like toxin 2 A2 and B subunits confers protective immunity to shiga toxin challenge in the murine model. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16(5):712–8.
- 71- Gomes, PADP. Desenvolvimento de novas abordagens vacinais contra a Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU) baseadas em variantes atóxicos da toxina Stx2 de *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC). [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013
- 72- Afrin F, Anam K, Ali N. Induction of partial protection against *Leishmania donovani* by promastigote antigens in negatively charged liposomes. *J Parasitol* [Internet]. 2000;86(4):730–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10958448>
- 73- Migliaccio V, Santos FR, Ciancaglini P, Ramalho-Pinto FJ. Use of proteoliposome as a vaccine against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Chem Phys Lipids*. 2008;152(2):86–94.
- 74- Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30(11):592–9.
- 75- Simão AMS, Yadav MC, Narisawa S, Bolean M, Pizauro JM, Hoylaerts MF, et al. Proteoliposomes harboring alkaline phosphatase and nucleotide pyrophosphatase as matrix vesicle biomimetics. *J Biol Chem*. 2010;285(10):7598–609.
- 76- Schmidt ST, Foged C, Korsholm KS, Rades T, Christensen D. Liposome-based adjuvants for subunit vaccines: Formulation strategies for subunit antigens and immunostimulators. *Pharmaceutics*. 2016;8(1):1–22.
- 77- Bhowmick S, Mazumdar T, Sinha R, Ali N. Comparison of liposome based antigen delivery systems for protection against *Leishmania donovani*. *J Control Release* [Internet]. 2010;141(2):199–207. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.09.018>
- 78- Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(2):145–60.
- 79- Brewer JM, Tetley L, Richmond J, Liew FY, Alexander J. Lipid vesicle size determines the Th1 or Th2 response to entrapped antigen. *J Immunol*. 1998;161(8):4000–7.

- 80- Brewer JM, Pollock KGJ, Tetley L, Russell DG. Vesicle size influences the trafficking, processing, and presentation of antigens in lipid vesicles. *J Immunol*. 2004;173(10):6143–50.
- 81- Watson DS, Endsley AN, Huang L. Design considerations for liposomal vaccines: Influence of formulation parameters on antibody and cell-mediated immune responses to liposome associated antigens. *Vaccine* [Internet]. 2012;30(13):2256–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X12001089>
- 82- Smith DM, Simon JK, Baker JR. Applications of nanotechnology for immunology. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2013;13(8):592–605. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nri3488>
- 83- Alinaghi A, Rouini MR, Johari Daha F, Moghimi HR. The influence of lipid composition and surface charge on biodistribution of intact liposomes releasing from hydrogel-embedded vesicles. *Int J Pharm* [Internet]. 2014;459(1–2):30–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.011>
- 84- Ignatius R, Mahnke K, Rivera M, Hong K, Isdell F, Steinman RM, et al. Presentation of proteins encapsulated in sterically stabilized liposomes by dendritic cells initiates CD8(+) T-cell responses in vivo. *Blood*. 2000;96(10):3505–13.
- 85- Huang B, Sohail M, Luo S, Um SH, Khant H. NIH Public Access. 2011;10(3):243–51.
- 86- Papahadjopoulos D, Nir S, Düzgünes N. Molecular mechanisms of calcium-induced membrane fusion. *J Bioenerg Biomembr*. 1990;22(2):157–79.
- 87- Foged C, Arigita C, Sundblad A, Jiskoot W, Storm G, Frokjaer S. Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: Effect of bilayer composition. *Vaccine*. 2004;22(15–16):1903–13.
- 88- Fukuda T, Kimiya T, Takahashi M, Arakawa Y, Ami Y, Suzaki Y, et al. Induction of protection against oral infection with cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in mice by shiga-like toxin-liposome conjugate. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 1998;116(4):313–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9693282
- 89- Suzaki Y, Ami Y, Nagata N, Naito S, Kato H, Taneichi M, et al. Protection of monkeys against Shiga toxin induced by Shiga toxin-liposome conjugates. *Int Arch Allergy Immunol* [Internet]. 2002;127(4):294–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12021548>

- 90- Tana, Watarai S, Isogai E, Oguma K. Induction of intestinal IgA and IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin-producing *Escherichia coli* to Caco-2 cells by oral immunization with liposomes. *Lett Appl Microbiol*. 2003;36(3):135–9.
- 91- MacDonald RA, Hosking CS, Jones CL. The measurement of relative antibody affinity by ELISA using thiocyanate elution. *J Immunol Methods*. 1988;106(2):191–4.
- 92- Bondos SE, Bicknell A. Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal Biochem*. 2003;316(2):223–31.
- 93- Wang W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *Int J Pharm*. 2005;289(1–2):1–30.
- 94- Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2004;22(11):1399–408. Available from: <http://www.nature.com/nbt/journal/v22/n11/full/nbt1029.html> \n <http://www.nature.com/nbt/journal/v22/n11/pdf/nbt1029.pdf>
- 95- Timasheff SN. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. *Adv Protein Chem* [Internet]. 1998;51:355–432. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60656-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60656-7)
- 96- Vingert B, Adotevi O, Patin D, Jung S, Shrikant P, Freyburger L, et al. The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* [Internet]. 2006 May [cited 2016 Oct 9];36(5):1124–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16568496>
- 97- Pina DG, Gómez J, Villar E, Johannes L, Shnyrov VL. Thermodynamic analysis of the structural stability of the Shiga toxin B-subunit. *Biochemistry*. 2003;42(31):9498–506.
- 98- Conrady DG, Flagler MJ, Friedmann DR, Vander Wielen BD, Kovall RA, Weiss AA, et al. Molecular basis of differential B-pentamer stability of Shiga toxins 1 and 2. *PLoS One*. 2010;5(12):1–9.
- 99- DeMuth PC, Moon JJ, Suh H, Hammond PT, Irvine DJ. Releasable layer-by-layer assembly of stabilized lipid nanocapsules on microneedles for enhanced transcutaneous vaccine delivery. *ACS Nano* [Internet]. 2012 Sep 25 [cited 2016 Oct 13];6(9):8041–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22920601>

- 100- Luo Y, Liu Z, Zhang X, Huang J, Yu X, Li J, et al. Effect of a controlled-release drug delivery system made of oleanolic acid formulated into multivesicular liposomes on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2016 [cited 2016 Oct 4];11:3111–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27471381>
- 101- Schwendener RA. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines* [Internet]. 2014;2(6):159–82. Available from: <http://tav.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/2051013614541440>
- 102- Oussoren C, Zuidema J, Crommelin DJA, Storm G. Lymphatic uptake and biodistribution of liposomes after subcutaneous injection. II. Influence of liposomal size, lipid composition and lipid dose. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1997;1328(2):261–72.
- 103- Lee S, Nguyen MT. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases. *Immune Netw* [Internet]. 2015;15(2):51–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51>
- 104- MacLeod MKL, McKee AS, David A, Wang J, Mason R, Kappler JW, et al. Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011;108(19):7914–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518876> \n <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3093483>
- 105- Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J Pharm.* 2008;364(2):272–80.
- 106- Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med* [Internet]. 2013;19(12):1597–608. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24309663>
- 107- Marcato P, Mulvey G, Read RJ, Vander Helm K, Nation PN, Armstrong GD. Immunoprophylactic potential of cloned Shiga toxin 2 B subunit. *J Infect Dis* [Internet]. 2001;183(3):435–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133375>
- 108- Lell B, Agnandji S, von Glasenapp I, Haertle S, Oyakhiromen S, Issifou S, et al. A randomized trial assessing the safety and immunogenicity of AS01 and AS02 adjuvanted RTS, S malaria vaccine candidates in children in Gabon. *PLoS One.* 2009;4(10).
- 109- Kester KE, Cummings JF, Ofori-Anyinam O, Ockenhouse CF, Krzych U, Moris P, et al. Randomized, double-blind, phase 2a trial of falciparum malaria vaccines RTS,S/AS01B and RTS,S/AS02A in malaria-naive adults: safety, efficacy, and immunologic associates of protection. *J Infect Dis.* 2009;200:337–46.

- 110- Montoya J, Solon JA, Cunanan SRC, Acosta L, Bollaerts A, Moris P, et al. A randomized, controlled dose-finding Phase II study of the M72/AS01 candidate tuberculosis vaccine in healthy PPD-positive adults. *J Clin Immunol*. 2013;33(8):1360–75.
- 111- Watanabe H, Numata K, Ito T, Takagi K, Matsukawa A. Innate Immune Response in Th1- and Th2-Dominant Mouse Strains. *Shock* [Internet]. 2004;22(5):460–6. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00024382-200411000-00010>
- 112- Mills CD. M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease. *Crit Rev Immunol* [Internet]. 2012;32(6):463–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23428224>
- 113- Ohmura-Hoshino M, Yamamoto M, Yuki Y, Takeda Y, Kiyono H. Non-toxic Stx derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for mucosal immunity. *Vaccine*. 2004;22(27–28):3751–61.
- 114- Haicheur N, Benchetrit F, Amessou M, Leclerc C, Falguières T, Fayolle C, et al. The B subunit of Shiga toxin coupled to full-size antigenic protein elicits humoral and cell-mediated immune responses associated with a Th1-dominant polarization. *Int Immunol* [Internet]. 2003 Oct [cited 2016 Oct 19];15(10):1161–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679386>
- 115- Ohmura M, Yamamoto M, Tomiyama-Miyaji C, Yuki Y, Takeda Y, Kiyono H. Nontoxic Shiga toxin derivatives from *Escherichia coli* possess adjuvant activity for the augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation. *Infect Immun* [Internet]. 2005 Jul [cited 2016 Oct 8];73(7):4088–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972497>
- 116- Kostova V, Dransart E, Azoulay M, Brulle L, Bai SK, Florent JC, et al. Targeted Shiga toxin-drug conjugates prepared via Cu-free click chemistry. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2015;23(22):7150–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.10.010>
- 117- Batisse C, Dransart E, Ait Sarkouh R, Brulle L, Bai SK, Godefroy S, et al. A new delivery system for auristatin in STxB-drug conjugate therapy. *Eur J Med Chem*. 2015;95:483–91.
- 118- Couture O, Dransart E, Dehay S, Nemati F, Decaudin D, Johannes L, et al. Tumor Delivery of ultrasound contrast agents using shiga toxin B subunit. *Mol Imaging*. 2011;10(2):135–43.
- 119- Arimitsu H, Sasaki K, Iba Y, Kurosawa Y, Shimizu T, Tsuji T. Isolation of B subunit-specific monoclonal antibody clones that strongly neutralize the toxicity of Shiga toxin 2. *Microbiol Immunol*. 2015;59(2):71–81.

- 120- Tremblay JM, Mukherjee J, Leysath CE, Debatis M, Ofori K, Baldwin K, et al. A single VHH-based toxin-neutralizing agent and an effector antibody protect mice against challenge with Shiga toxins 1 and 2. *Infect Immun.* 2013;81(12):4592–603.
- 121- Tozzoli R, Scheutz F. “Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in humans. In: Stefano, M. (ed.), *Pathogenic Escherichia coli*, Molecular and Cellular Microbiology. Caister Academic Press, Norfolk; 2014. p. 1-18.
- 122- Rivas ME, Padola NL, Luchesiv PMA, Masana M. Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. In: Torres, AG (ed), *Pathogenic Escherichia coli* in Latin America. Oak Park, IL; 2010. p. 142-61.
- 123- Karmali MA, Petric M, Fleming PC, Arbus GC, Lior H. The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 1985;151 (5):775-82.
- 124- Naito S, Horino A, Komiva T, Fukuda Y, Takahashi M, Ami Y, et. al. Protection against verocytotoxin in mice induced by liposome-coupled verocytotoxin. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1997;114:293-7.
- 125- Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet. Res.* 2005;36:289-311.
- 126- Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 1991;13:60-98.
- 127- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* using Calcium Chloride. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. p. 1:1116.
- 128- Rowe PC, Orrbine E, Lior H, Wells GA, Yetisir E, Clulow M, McLaine PN. Risk of hemolytic uremic syndrome after sporadic *Escherichia coli* O157:H7 infection: results of a Canadian collaborative study. Investigators of the Canadian Pediatric Kidney Disease Research center. *J. Pediatric.* 1998;132:777-82.
- 129- Exeni, R. Síndrome Urémico Hemolítico. *Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica.* 2001;1:35-56.
- 130- Rivas M, Chinen I, Miliwebsky E, Galli L, Repetto HÁ, Masana M. Epidemiology of Argentinean Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In: Walk ST, Feng PCH (eds.) *Population genetics of bacteria: a tribute to Thomas S. Whittam*. Washington, DC.; ASM Press; 2011. p. 109-3